

Novocastra™ Liquid Mouse Monoclonal Antibody Inhibin Alpha

Product Code: NCL-L-InhibinA

Leica Biosystems Newcastle Ltd
Balliol Business Park
Benton Lane
Newcastle Upon Tyne NE12 8EW
United Kingdom
☎ +44 191 215 4242



[EN](#) [FR](#) [IT](#) [DE](#) [ES](#) [PT](#) [SV](#) [EL](#) [DA](#) [NL](#)
[NO](#) [TR](#) [BG](#) [HU](#) [RO](#) [RU](#) [PL](#) [SL](#) [CS](#) [SK](#)

Instructions for Use

Please read before using this product.

Mode d'emploi

À lire avant d'utiliser ce produit.

Istruzioni per L'uso

Si prega di leggere, prima di usare il prodotto.

Gebrauchsanweisung

Bitte vor der Verwendung dieses Produkts lesen.

Instrucciones de Uso

Por favor, leer antes de utilizar este producto.

Instruções de Utilização

Leia estas instruções antes de utilizar este produto.

Instruktioner vid Användning

Var god läs innan ni använder produkten.

Οδηγίες Χρήσης

Παρακαλούμε διαβάστε τις οδηγίες πριν χρησιμοποιήσετε το προϊόν αυτό.

Brugsanvisning

Læs venligst før produktet tages i brug.

Gebruiksaanwijzing

Lezen vóór gebruik van dit product.

Bruksanvisning

Vennligst les denne før du bruker produktet.

Kullanım Talimatları

Lütfen bu ürünü kullanmadan önce okuyunuz.

Инструкции за употреба

Моля, прочетете преди употреба на този продукт.

Használati utasítás

A termék használatba vétele előtt olvassa el.

Instruțiuni de utilizare

Citiți aceste instruțiuni înainte de a utiliza produsul.

Инструкция по применению

Прочтите перед применением этого продукта.

Instrukcja obsługi

Przed użyciem tego produktu należy przeczytać instrukcję.

Navodila za uporabo

Preberite pred uporabo tega izdelka.

Návod k použití

Čtěte před použitím tohoto výrobku.

Návod na použitie

Prosím, prečítajte si ho pred použitím produktov.

Check the integrity of the packaging before use.

Vérifier que le conditionnement est en bon état avant l'emploi.

Prima dell'uso, controllare l'integrità della confezione.

Vor dem Gebrauch die Verpackung auf Unversehrtheit überprüfen.

Comprobar la integridad del envase, antes de usarlo. Verifique a integridade da embalagem antes de utilizar o produto.

Kontrollera att paketet är obrutet innan användning. Ελέγξτε την ακεραιότητα της συσκευασίας πριν από τη χρήση.

Kontroller, at pakken er ubeskadiget før brug.

Controleer de verpakking vóór gebruik.

Sjekk at pakningen er intakt før bruk.

Kullanmadan önce ambalajın bozulmamış olmasını kontrol edin.

Проверете целостта на опаковката преди употреба.

Használat előtt ellenőrizze a csomagolás épségét.

Verificați integritatea ambalajului înainte de a utiliza produsul.

Перед применением убедитесь в целостности упаковки.

Przed użyciem należy sprawdzić, czy opakowanie jest szczelne.

Pred uporabo preverite celovitost embalaže.

Před použitím zkontrolujte neporušenost obalu.

Pre použitím skontrolujte, či balenie nie je porušené.

Novocastra™ Liquid Mouse Monoclonal Antibody Inhibin Alpha

Product Code: NCL-L-InhibinA

Intended Use

For in vitro diagnostic use.

NCL-L-InhibinA is intended for the qualitative identification by light microscopy of inhibin alpha molecules in paraffin sections. The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Principle of Procedure

Immunohistochemical (IHC) staining techniques allow for the visualization of antigens via the sequential application of a specific antibody to the antigen (primary antibody), a secondary antibody to the primary antibody and an enzyme complex with a chromogenic substrate with interposed washing steps. The enzymatic activation of the chromogen results in a visible reaction product at the antigen site. The specimen may then be counterstained and coverslipped. Results are interpreted using a light microscope and aid in the differential diagnosis of pathophysiological processes, which may or may not be associated with a particular antigen.

Clone

AMY82

Immunogen

Prokaryotic recombinant protein corresponding to 134 amino acids of the human inhibin alpha molecule.

Specificity

Human inhibin alpha.

Reagent Composition

NCL-L-InhibinA is a liquid tissue culture supernatant containing 15 mM sodium azide as a preservative.

Ig Class

IgG1

Total Protein Concentration Total Protein

1.0–8.0 g/L. Refer to vial label for lot specific total protein concentration.

Antibody Concentration

Greater than or equal to 214 mg/L as determined by ELISA. Refer to vial label for batch specific Ig concentration.

Recommendations On Use

Immunohistochemistry (see **Methodology**) on paraffin sections. Suggested dilution: 1:100 for 30 minutes at 25 °C. Heat induced epitope retrieval using Epitope Retrieval Solution pH 6.0 (RE7113 or RE7114).

Visualization. Please follow the instructions for use in the Novolink™ Polymer Detection System RE7280–K (1250 tests), RE7150–K (500 tests), RE7140–K (250 tests) or RE7290–K (50 tests).

Storage and Stability

Store at 2–8 °C. Do not freeze. Return to 2–8 °C immediately after use. Do not use after expiration date indicated on the vial label. Storage conditions other than those specified above must be verified by the user.

Specimen Preparation

The recommended fixative is 10% neutral-buffered formalin for paraffin-embedded tissue sections.

Warnings and Precautions

This reagent has been prepared from the supernatant of cell culture. As it is a biological product, reasonable care should be taken when handling it.

The molarity of sodium azide in this reagent is 15 mM. A Material Safety Data Sheet (MSDS) is available upon request for sodium azide. Consult federal, state or local regulations for disposal of any potentially toxic components.

Specimens, before and after fixation, and all materials exposed to them, should be handled as if capable of transmitting infection and disposed of with proper precautions.† Never pipette reagents by mouth and avoid contacting the skin and mucous membranes with reagents and specimens. If reagents or specimens come in contact with sensitive areas, wash with copious amounts of water. Seek medical advice.

Minimize microbial contamination of reagents or an increase in non-specific staining may occur.

Incubation times or temperatures, other than those specified, may give erroneous results. Any such changes must be validated by the user.

Quality Control

Differences in tissue processing and technical procedures in the user's laboratory may produce significant variability in results, necessitating regular performance of in-house controls in addition to the following procedures.

Controls should be fresh autopsy/biopsy/surgical specimens, formalin-fixed, processed and paraffin wax-embedded as soon as possible in the same manner as the patient sample(s).

Positive Tissue Control

Used to indicate correctly prepared tissues and proper staining techniques.

One positive tissue control should be included for each set of test conditions in each staining run.

A tissue with weak positive staining is more suitable than a tissue with strong positive staining for optimal quality control and to detect minor levels of reagent degradation.²

Recommended positive control tissue is testis.

If the positive tissue control fails to demonstrate positive staining, results with the test specimens should be considered invalid.

Negative Tissue Control

Should be examined after the positive tissue control to verify the specificity of the labeling of the target antigen by the primary antibody.

Recommended negative control tissue is cerebellum.

Alternatively, the variety of different cell types present in most tissue sections frequently offers negative control sites, but this should be verified by the user.

Non-specific staining, if present, usually has a diffuse appearance. Sporadic staining of connective tissue may also be observed in sections from excessively formalin-fixed tissues. Use intact cells for interpretation of staining results. Necrotic or degenerated cells often stain non-specifically.³ False-positive results may be seen due to non-immunological binding of proteins or substrate reaction products. They may also be caused by endogenous enzymes such as pseudoperoxidase (erythrocytes), endogenous peroxidase (cytochrome C), or endogenous biotin (eg. liver, breast, brain, kidney) depending on the type of immunostain used. To differentiate endogenous enzyme activity or non-specific binding of enzymes from specific immunoreactivity, additional patient tissues may be stained exclusively with substrate chromogen or enzyme complexes (avidin-biotin, streptavidin, labeled polymer) and substrate-chromogen, respectively. If specific staining occurs in the negative tissue control, results with the patient specimens should be considered invalid.

Negative Reagent Control

Use a non-specific negative reagent control in place of the primary antibody with a section of each patient specimen to evaluate non-specific staining and allow better interpretation of specific staining at the antigen site.

Patient Tissue

Examine patient specimens stained with NCL-L-InhibinA last. Positive staining intensity should be assessed within the context of any non-specific background staining of the negative reagent control. As with any immunohistochemical test, a negative result means that the antigen was not detected, not that the antigen was absent in the cells/tissue assayed. If necessary, use a panel of antibodies to identify false-negative reactions.

Results Expected

Normal Tissues

Clone AMY82 detected the inhibin alpha protein in Sertoli and Leydig cells of the testis, in the cortex and medulla of the adrenal gland and the theca interna of ovary. (Total number of cases = 38).

Abnormal Tissues

Clone AMY82 detected the inhibin alpha protein in 27/105 abnormal ovarian tissues evaluated including 17/44 benign theca cell tumors, 4/6 malignant theca cell tumors, 2/9 cysts, 3/3 granulosa cell tumors and 1/5 clear cell carcinomas. No staining was observed in serous adenocarcinomas (0/8), endometrial adenocarcinomas (0/6), transitional cell carcinomas (0/5), yolk sac tumors (0/4), dysgerminomas (0/3), fibromas (0/2), mucinous cystadenomas (0/2), mucinous adenocarcinomas (0/2), mucinous cystadenocarcinomas (0/2), serous cystadenocarcinoma (0/1), serous papillary cystadenoma (0/1), Brenner tumor (0/1), and a mucinous borderline tumor (0/1). No staining was detected in a variety of additional tumors including squamous cell carcinomas (0/10), thyroid tumors (0/4), liver tumors (0/4), lymphomas (0/3), colorectal tumors (0/3), brain tumors (0/2), breast tumors (0/2), stomach tumors (0/2), pancreatic tumors (0/2), lung tumors (0/2), kidney tumors (0/2), prostate tumors (0/2) and unspecified metastatic tumors (0/2). (Total number of cases = 145).

NCL-L-InhibinA is recommended for the detection of inhibin alpha in normal and neoplastic tissues.

General Limitations

Immunohistochemistry is a multistep diagnostic process that consists of specialized training in the selection of the appropriate reagents; tissue selection, fixation, and processing; preparation of the IHC slide; and interpretation of the staining results.

Tissue staining is dependent on the handling and processing of the tissue prior to staining. Improper fixation, freezing, thawing, washing, drying, heating, sectioning or contamination with other tissues or fluids may produce artifacts, antibody trapping, or false negative results. Inconsistent results may be due to variations in fixation and embedding methods, or to inherent irregularities within the tissue.⁴ Excessive or incomplete counterstaining may compromise proper interpretation of results.

The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Antibodies from Leica Biosystems Newcastle Ltd are for use, as indicated, on either frozen or paraffin-embedded sections with specific fixation requirements. Unexpected antigen expression may occur, especially in neoplasms. The clinical interpretation of any stained tissue section must include morphological analysis and the evaluation of appropriate controls.

Bibliography – General

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29–P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio–Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.
5. Robertson D, Burger H and Fuller P. Inhibin/activin and ovarian cancer. *Endocrine-Related Cancer*. 2004; 11:35–49.
6. Bernard J, Chapman S and Woodruff T. Mechanisms of inhibin signal transduction. *Recent Progress in Hormone Research*. 2001; 56:417–450.

Amendments to Previous Issue

Not applicable

Date of Issue

15 April 2019

Immunohistochemical Methodology For Novocastra™ Antibodies On Paraffin-Embedded Tissue Utilizing The Heat Induced Epitope Retrieval Technique.

Reagents Required but not Supplied

1. Standard solvents used in immunohistochemistry.
2. 50 mM Tris-Buffered Saline (TBS) pH 7.6.
3. Epitope Retrieval Solution (see C. Epitope Retrieval Solutions).
4. Antibody diluent, Novocastra IHC Diluent, RE7133.
5. Visualization system, Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) or RE7290-K (50 tests).
6. Mounting medium – use as recommended by manufacturer.

Equipment Required but not Supplied

1. Incubator set to 25 °C.
2. Heating device for epitope retrieval: water bath, steamer, pressure cooker or other temperature controlled laboratory equipment.
3. General immunohistochemistry laboratory equipment.

Epitope Retrieval Solutions (see Recommendations on Use for one of the following)

RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 L	Citrate-based buffer containing surfactant
RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 mL	
RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 L	
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 L	EDTA-based buffer containing surfactant
RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 L	
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 L	Tris/EDTA-based buffer containing surfactant
RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 L	

Methodology

Prior to undertaking this methodology, users must be trained in immunohistochemical techniques.

Users should determine optimal dilutions for antibodies. Unless indicated, all steps are performed at room temperature (25 °C).

Epitope Retrieval

Please follow the instructions for use in Epitope Retrieval Solutions, RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119 or RE7122.

Visualization

Please follow the instructions for use in the Novolink Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) or RE7290-K (50 tests).

Amendments to Previous Issue

Not applicable

Date of Issue

23 April 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

Novocastra™ Anticorps Monoclonal Liquide de Souris

Inhibin Alpha

Référence du Produit: NCL-L-InhibinA

Utilisation Prévue

Diagnostic in vitro.

Le NCL-L-InhibinA est destiné à l'identification qualitative par microscopie optique de la molécule Inhibin Alpha sur des coupes en paraffine. L'interprétation clinique de tout marquage, ou absence de marquage, doit être complétée par des études morphologiques utilisant des contrôles appropriés et doit être évaluée par un pathologiste qualifié à la lumière des antécédents cliniques du patient et d'autres analyses diagnostiques.

Principe de la Procédure

Les techniques de marquage immunohistochimique (IHC) permettent la visualisation des antigènes via l'application séquentielle d'un anticorps spécifique sur un antigène (anticorps primaire), d'un anticorps secondaire sur l'anticorps primaire et d'un complexe enzymatique comportant un substrat chromogène, avec des étapes de lavage intercalées. L'activation enzymatique du chromogène se traduit par la présence d'un produit de réaction visible au niveau du site de l'antigène. Le spécimen peut ensuite faire l'objet d'une coloration de contraste et être placé sous une lamelle. Les résultats sont interprétés à l'aide d'un microscope optique et participent au diagnostic différentiel des processus physiopathologiques, susceptibles, ou non, d'être associés à un antigène particulier.

Clone

AMY82

Immunogène

Protéine procaryote recombinante correspondant à 134 acides aminés de la molécule alpha-inhibine humaine.

Spécificité

Alpha-inhibine humaine.

Composition du Réactif

Le NCL-L-InhibinA est un surnageant de culture tissulaire liquide contenant une solution d'azide de sodium 15 mM comme conservateur.

Classe d'Ig

IgG1

Concentration Totale en Protéines

1,0–8,0 g/L. La concentration totale en protéines, spécifique du lot, figure sur l'étiquette du flacon.

Concentration en Anticorps

Supérieure ou égale à 214 mg/L, déterminée par la méthode ELISA. La concentration totale en Ig, spécifique du lot, figure sur l'étiquette du flacon.

Recommandations d'utilisation

Immunohistochimie (voir **Méthodologie**) sur des coupes en paraffine. Dilution préconisée : 1:100 pendant 30 minutes à 25 °C.

Restauration de l'épitope induite par la chaleur à l'aide d'Epitope Retrieval Solution pH6.0 (RE7113 ou RE7114).

Visualisation. Veuillez respecter le mode d'emploi des Novolink™ Polymer Detection Systems RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) ou RE7290-K (50 tests).

Conservation et Stabilité

Conserver à 2–8 °C. Ne pas congeler. Remettre immédiatement à 2–8 °C après utilisation. Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur l'étiquette du récipient. Les conditions de conservation autres que celles qui sont spécifiées ci-dessus doivent faire l'objet d'une vérification par l'utilisateur.

Préparation des Spécimens

Le fixateur recommandé est le formol à 10%, tamponné, neutre, pour coupes tissulaires incluses en paraffine.

Mises en Garde et Précautions

Ce réactif a été préparé à partir du surnageant d'une culture cellulaire. Du fait de sa nature de produit biologique, sa manipulation doit faire l'objet du plus grand soin.

Dans ce réactif, la molarité de l'azide de sodium est de 15 mM. Une fiche toxicologique (MSDS) relative à l'azide de sodium est disponible sur demande.

Consulter les réglementations nationales, régionales ou locales en vigueur relatives à l'élimination de tous les éléments potentiellement toxiques.

Les spécimens, avant et après fixation, ainsi que toutes les matières ayant été en contact avec eux, doivent être manipulés comme s'ils étaient susceptibles de transmettre une infection et être éliminés en respectant les précautions appropriées¹. Ne jamais pipeter les réactifs avec la bouche et éviter tout contact des réactifs et des spécimens avec la peau et les membranes muqueuses. Rincer avec de grandes quantités d'eau en cas de contact des réactifs ou des spécimens avec des zones sensibles. Consulter un médecin.

Minimiser la contamination microbienne des réactifs sinon un accroissement du marquage non spécifique est susceptible de se produire.

Des durées et des températures d'incubation différentes de celles qui ont été spécifiées sont susceptibles de conduire à des résultats erronés. Toutes les modifications doivent être validées par l'utilisateur.

Contrôle de Qualité

Des différences de traitement des tissus et de procédures techniques du laboratoire de l'utilisateur sont susceptibles de conduire à une variabilité significative des résultats, ce qui rend nécessaire la mise en œuvre de contrôles en interne en plus des procédures suivantes.

Les contrôles doivent être des spécimens frais provenant d'autopsies, de biopsies ou d'interventions chirurgicales, fixés au formol, traités et inclus en cire de paraffine dès que possible, de la même façon que le(s) échantillon(s) de patient.

Tissu de Contrôle Positif

Il est utilisé pour indiquer que les tissus ont été préparés correctement et que les techniques de marquage étaient appropriées.

Un contrôle tissulaire positif doit être inclus dans toute opération de marquage pour chaque ensemble de conditions d'analyse.

Un tissu présentant un marquage faiblement positif est plus adapté à un contrôle de qualité optimal qu'un tissu présentant un marquage fortement positif et il permet de détecter de moindres niveaux de dégradation du réactif.²

Les testicules constituent le tissu de contrôle positif recommandé.

Si le tissu de contrôle positif ne présente pas de marquage positif, les résultats des spécimens analysés doivent être considérés comme invalides.

Tissu de Contrôle Négatif

Il doit être examiné après le tissu de contrôle positif afin de vérifier la spécificité du marquage de l'antigène cible par l'anticorps primaire. Le cervelet constitue le tissu de contrôle négatif recommandé.

Sinon, la diversité des types cellulaires présents dans la plupart des tissus permet de disposer fréquemment de sites de contrôle négatif, mais ils doivent être vérifiés par l'utilisateur.

S'il est présent, le marquage non spécifique prend habituellement une apparence diffuse. Un marquage sporadique du tissu conjonctif peut également être observé sur des coupes de tissus qui ont été fixées par un excès de formol. Utiliser des cellules intactes pour l'interprétation des résultats du marquage. Les cellules nécrotiques ou dégénérées sont souvent marquées de façon non spécifique.³ Des résultats faussement positifs peuvent être observés en raison d'une liaison non immunologique à des protéines ou à des produits de réaction du substrat. Ils peuvent également être provoqués par des enzymes endogènes comme la pseudoperoxydase (érythrocytes), la peroxydase endogène (cytochrome C), ou la biotine endogène (foie, sein, cerveau, rein, par exemple) selon le type d'immunomarquage utilisé. Pour différencier l'activité des enzymes endogènes ou la liaison non spécifique d'enzymes de l'immunoréactivité spécifique, des tissus supplémentaires du patient peuvent être marqués exclusivement avec le substrat chromogène ou par des complexes enzymatiques (avidine-biotine, streptavidine, polymère marqué) et le substrat chromogène respectivement. Si un marquage spécifique se produit dans le tissu de contrôle négatif, les résultats des spécimens de patient doivent être considérés comme invalides.

Réactif de Contrôle Négatif

Utiliser un réactif de contrôle négatif non spécifique à la place de l'anticorps primaire avec une coupe de chaque spécimen du patient afin d'évaluer le marquage non spécifique et de permettre une meilleure interprétation du marquage spécifique au niveau du site antigénique.

Tissu du Patient

Examiner les échantillons du patient marqués au NCL-L-InhibinA en dernier lieu. L'intensité du marquage positif doit être évaluée à la lumière du bruit de fond du marquage non spécifique du réactif de contrôle négatif. Comme pour toutes les analyses immunohistochimiques, un résultat négatif signifie que l'antigène n'a pas été détecté mais ne signifie pas qu'il est absent des cellules/tissus testés. Si nécessaire, employer un panel d'anticorps pour identifier les réactions faussement négatives.

Résultats Attendus

Tissus normaux

Le clone AMY82 a détecté la protéine alpha-inhibine dans les cellules de Sertoli et de Leydig des testicules, dans le cortex, la médullo-surrénale et la thèque interne de l'ovaire. (Nombre total de cas = 38).

Tissus tumoraux

Le clone AMY82 a détecté la protéine alpha-inhibine dans 27 tissus ovariens anormaux sur 105 analysés, dont des thécomes bénins (17/44), des thécomes malins (4/6), des kystes (2/9), des tumeurs de la granulosa (3/3) et un carcinome à cellules claires (1/5). Aucun marquage n'a été observé sur des adénocarcinomes séreux (0/8), sur des adénocarcinomes endométriaux (0/6), sur des carcinomes des cellules transitionnelles (0/5), sur des tumeurs du sac vitellin (0/4), sur des dysgerminomes (0/3), sur des fibromes (0/2), sur des cystadénomes mucineux (0/2), sur des adénocarcinomes mucineux (0/2), sur un cystadénocarcinome séreux (0/1), sur un cystadénome papillaire séreux (0/1), sur une tumeur de Brenner (0/1) et sur une tumeur mucineuse à la limite de la malignité (0/1). Aucun marquage n'a été détecté dans diverses autres tumeurs dont des carcinomes à cellules squameuses (0/10), des tumeurs de la thyroïde (0/4), des tumeurs du foie (0/4), des lymphomes (0/3), des tumeurs colorectales (0/3), des tumeurs du cerveau (0/2), des tumeurs du sein (0/2), des tumeurs de l'estomac (0/2), des tumeurs pancréatiques (0/2), des tumeurs du poumon (0/2), des tumeurs du rein (0/2), des tumeurs de la prostate (0/2), et des tumeurs métastatiques non spécifiées (0/2). (Nombre total de cas = 145).

L'utilisation du NCL-L-InhibinA est recommandée pour la détection d'alpha-inhibine dans les tissus normaux et néoplasiques.

Limites Générales

L'immunohistochimie est un processus diagnostique constitué de plusieurs étapes qui nécessite une formation spécialisée relative au choix des réactifs appropriés ; au choix, à la fixation et au traitement des tissus ; à la préparation des lames IHC ; et à l'interprétation des résultats du marquage.

Le marquage des tissus dépend de leur manipulation et de leur traitement avant le marquage. Une fixation, une congélation, une décongélation, un lavage, un séchage, un chauffage, une coupe, incorrects ou une contamination par d'autres tissus ou d'autres liquides sont susceptibles de conduire à la production d'artefacts, au piégeage de l'anticorps ou à des résultats faussement négatifs. Des variations dans les méthodes de fixation et d'inclusion, ainsi que des irrégularités propres au tissu, peuvent conduire à des résultats incohérents.⁴

Une coloration de contraste excessive ou incomplète peut gêner l'interprétation correcte des résultats.

L'interprétation clinique de tout marquage, ou absence de marquage, doit être complétée par des études morphologiques utilisant des contrôles appropriés et doit être évaluée par un pathologiste qualifié à la lumière des antécédents cliniques du patient et d'autres analyses diagnostiques.

Les anticorps de Leica Biosystems Newcastle Ltd sont destinés, selon les besoins, à être utilisés sur des coupes incluses en paraffine ou des coupes congelées, et conformément à des exigences particulières en matière de fixation. Une expression antigénique inattendue est susceptible de se produire, en particulier au niveau des néoplasmes. L'interprétation clinique de toute coupe tissulaire marquée doit comporter une analyse morphologique et l'évaluation des contrôles appropriés.

Bibliographie Générale

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Robertson D, Burger H and Fuller P. Inhibin/activin and ovarian cancer. Endocrine-Related Cancer. 2004; 11:35-49.
6. Bernard J, Chapman S and Woodruff T. Mechanisms of inhibin signal transduction. Recent Progress in Hormone Research. 2001; 56:417-450.

Amendements Apportés à la Version Précédente

Non applicable.

Date de Publication

15 avril 2019

Méthodologie immunohistochimique d'utilisation des anticorps Novocastra™ sur les tissus inclus en paraffine à l'aide de la technique de restauration de l'épitope par la chaleur.

Réactifs nécessaires mais non fournis

1. Solvants standard utilisés en immunohistochimie.
2. Solution saline tamponnée de Tris (TBS) 50 mM, pH 7,6.
3. Solution de restauration de l'épitope (voir section C Solutions de restauration de l'épitope).
4. Diluant anticorps, Novocastra™ IHC Diluent, RE7133.
5. Système de révélation, Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) ou RE7290-K (50 tests).
6. Milieu de montage – utiliser selon les recommandations du fabricant.

Equipements nécessaires mais non fournis

1. Incubateur réglé à 25 °C.
2. Dispositif de chauffage pour restauration de l'épitope : bain-marie ou four à vapeur, autocuiseur ou tout autre appareil de laboratoire à température contrôlée.
3. Équipements généraux de laboratoire d'immunohistochimie.

Solutions de restauration de l'épitope (voir Recommandations d'utilisation pour l'une des solutions suivantes)

RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 L	Tampon citrate contenant un surfactant
RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 mL	
RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 L	
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 L	Tampon EDTA contenant un surfactant
RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 L	
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 L	Tampon Tris/EDTA contenant un surfactant
RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 L	

Méthodologie

Avant d'utiliser cette méthodologie, les utilisateurs doivent avoir été formés aux techniques immunohistochimiques.

Les utilisateurs doivent déterminer les dilutions optimales des anticorps. Sauf mention contraire, toutes les étapes sont réalisées à température ambiante (25 °C).

Restauration de l'épitope

Veuillez respecter le mode d'emploi des Epitope Retrieval Solutions, RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119, RE7122.

Révélation

Veuillez respecter le mode d'emploi de Novolink™ Polymer Detection Systems , RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) ou RE7290-K (50 tests).

Amendements apportés à la version précédente

Non applicable.

Date de publication

23 avril 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

Novocastra™ Anticorpo Monoclonale Murino Liquido

Inhibin Alpha

Codice Del Prodotto: NCL-L-InhibinA

Uso Previsto

Per uso diagnostico in vitro.

NCL-L-InhibinA è destinato all'identificazione qualitativa in microscopia ottica della molecole Inhibin Alpha, in sezioni incluse in paraffina. L'interpretazione clinica di ogni colorazione o della sua assenza va integrata da studi morfologici che utilizzino i controlli appropriati e deve essere valutata da un patologo qualificato, nel contesto della storia clinica del paziente e delle altre metodiche diagnostiche adoperate.

Principio Della Procedura

Le tecniche di colorazione immunocitochimica (IHC) consentono la visualizzazione degli antigeni mediante l'applicazione sequenziale di un anticorpo specifico per l'antigene (anticorpo primario), di un anticorpo secondario che lega l'anticorpo primario e di un complesso enzimatico con un substrato cromogeno; l'applicazione dei tre reagenti è intervallata da fasi di lavaggio. L'attivazione enzimatica del cromogeno produce una reazione visibile in corrispondenza del sito antigenico. Il campione biologico può, quindi, essere controcolorato e montato. I risultati vengono interpretati mediante un microscopio ottico e sono utili nella diagnosi differenziale di processi fisiopatologici, che possono essere più o meno associati ad un particolare antigene.

Clone

AMY82

Immunogeno

Proteina ricombinante procariotica corrispondente a 134 aminoacidi della molecola alfa-inibina umana.

Specificità

Alfa-inibina umana.

Composizione Del Reagente

NCL-L-InhibinA è un supernatante liquido di coltura tissutale, contenente 15 mM di sodio azide come conservante.

Classe Ig

IgG1

Concentrazione Proteica Totale

Total Protein

1.0–8.0 g/L. Consultare l'etichetta del flacone per la concentrazione proteica totale specifica del lotto.

Concentrazione Anticorpale

Superiore o uguale a 214 mg/L, come determinato mediante test ELISA. Consultare l'etichetta del flacone per la concentrazione di Ig specifica del lotto.

Raccomandazioni Per L'uso

Immunocitochimica (vedere **Metodologia**) sulle sezioni in paraffina. Diluizione raccomandata: 1:100 per 30 minuti a 25 °C. Smascheramento antigenico termindotto con Epitope Retrieval Solution pH 6.0 (RE7113 o RE7114).

Visualizzazione. Si raccomanda di seguire le istruzioni per l'uso dei Novolink™ Polymer Detection Systems RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) o RE7290-K (50 tests).

Conservazione E Stabilità

Conservare a 2–8 °C. Non congelare. Immediatamente dopo l'uso, raffreddare di nuovo a 2–8 °C. Non usare dopo la data di scadenza, indicata sull'etichetta del flacone. Condizioni di conservazione diverse da quelle sopra specificate vanno verificate dall'utente.

Preparazione Del Campione Biologico

Il fissativo raccomandato è la formalina tamponata neutra al 10% per sezioni tissutali incluse in paraffina.

Avvertenze E Precauzioni

Questo reagente è stato preparato dal supernatante di coltura cellulare. Trattandosi di un prodotto biologico, va maneggiato con cautela. La molarità della sodio azide nel reagente corrisponde a 15 mM. Su richiesta, è disponibile una scheda dei dati di sicurezza del materiale (MSDS) per la sodio azide.

Fare riferimento alla normativa federale, statale o locale per lo smaltimento dei componenti potenzialmente tossici.

Prima e dopo la fissazione, i campioni biologici e tutti i materiali ad essi esposti vanno trattati come potenzialmente infettanti e smaltiti con le appropriate precauzioni.¹ Non pipettare i reagenti con la bocca ed evitare il contatto dei reagenti e dei campioni biologici con la pelle e con le mucose. Se i reagenti o i campioni biologici vengono a contatto con zone sensibili, sciacquare abbondantemente le parti interessate. Consultare il medico.

Ridurre al minimo la contaminazione microbica dei reagenti, allo scopo di evitare un aumento di colorazione aspecifica.

Tempi o temperature d'incubazione diversi da quelli specificati possono condurre a risultati non veritieri. Tali variazioni devono essere convalidate dall'utente.

Controllo Qualità

Differenze nella processazione del tessuto e nelle tecniche in uso presso il laboratorio dell'utente possono produrre una discrepanza significativa nei risultati, rendendo necessaria la regolare esecuzione di controlli interni, in aggiunta alle procedure descritte di seguito. I controlli devono essere costituiti da campioni biologici freschi autoptici/bioptici/chirurgici e devono essere il più rapidamente possibile fissati in formalina, processati ed inclusi in paraffina, allo stesso modo dei campioni biologici ottenuti dal paziente.

Controllo Positivo Del Tessuto

È usato per indicare tessuti correttamente preparati e tecniche di colorazione appropriate.

Per ogni gruppo di condizioni del test e ogni volta che viene eseguita la colorazione, deve essere incluso un controllo positivo del tessuto.

Un tessuto a debole colorazione positiva è più adatto di uno a colorazione positiva intensa per un ottimale controllo qualità e per mettere in evidenza anche minimi livelli di degradazione del reagente.²

Il tessuto raccomandato per il controllo positivo è il testicolo.

Se il controllo positivo del tessuto non dimostra colorazione positiva, i risultati con i campioni biologici del test vanno considerati non validi.

Controllo Negativo Del Tessuto

Va esaminato dopo il controllo positivo, per verificare la specificità nei confronti dell'antigene bersaglio da parte dell'anticorpo primario. Il tessuto raccomandato per il controllo negativo è il cervelletto.

In alternativa, la varietà dei tipi cellulari presenti nella maggior parte delle sezioni tissutali offre spesso siti di controllo negativo, ma questo va verificato dall'utente.

La colorazione aspecifica, se presente, assume di solito aspetto diffuso. La colorazione sporadica del tessuto connettivo può anche manifestarsi in seguito ad iperfissazione di sezioni di tessuto in formalina. Per l'interpretazione dei risultati della colorazione, usare cellule intatte. Le cellule necrotiche o degenerate si colorano spesso in maniera aspecifica³. Si possono osservare risultati falsamente positivi, dovuti a legame non immunologico delle proteine o a prodotti di reazione del substrato. Tali falsi positivi possono essere anche causati da enzimi endogeni quali la pseudoperossidasi (eritrociti), la perossidasi endogena (citocromo C) o la biotina endogena (es. fegato, mammella, cervello, rene), a seconda del tipo di immunocolorazione usato. Per differenziare l'attività enzimatica endogena o il legame enzimatico aspecifico dall'immunoreattività specifica, possono essere colorati ulteriori tessuti del paziente esclusivamente con substrato cromogeno o con complessi enzimatici (avidina-biotina, streptavidina, polimero marcato) e substrato cromogeno. Se nel controllo negativo del tessuto compare una colorazione specifica, i risultati sui campioni biologici ottenuti dal paziente devono essere considerati non validi.

Controllo Negativo Del Reagente

Usare un controllo negativo aspecifico del reagente in luogo dell'anticorpo primario, con una sezione di ogni campione biologico del paziente, per valutare la colorazione aspecifica e per consentire una migliore interpretazione della colorazione specifica in corrispondenza del sito antigenico.

Tessuto Del Paziente

Successivamente, esaminare i campioni biologici del paziente colorati con NCL-L-InhibinA. L'intensità della colorazione positiva va analizzata nel contesto di qualsiasi colorazione aspecifica di fondo del controllo negativo del reagente. Come per tutti gli altri test immunostochimici, un risultato negativo significa che l'antigene non è stato determinato, ma non necessariamente che fosse assente dalle cellule o dal tessuto esaminato. Se necessario, usare un pannello di anticorpi per identificare reazioni falsamente negative.

Risultati Attesi

Tessuti normali

Il clone AMY82 ha rilevato la proteina alfa-inibina nelle cellule di Sertoli e di Leydig del testicolo, nella zona corticale e midollare della ghiandola surrenale e nelle teche interne dell'ovaio. (Numero totale di casi = 38).

Tessuti tumorali

Il clone AMY82 ha rilevato la proteina alfa-inibina in 27/105 tessuti ovarici anomali valutati inclusi 17/44 tumori benigni delle cellule tecali, 4/6 tumori maligni delle cellule tecali, 2/9 cisti, 3/3 tumori a cellule granulose e 1/5 carcinomi a cellule chiare. Non è stata osservata alcuna colorazione in adenocarcinomi sierosi (0/8), addenocarcinomi endometriali (0/6), carcinomi a cellule transizionali (0/5), tumori del sacco vitellino (0/4), disgerminomi (0/3), fibromi (0/2), cistoadenomi mucinosi (0/2), adenocarcinomi mucinosi (0/2), cistoadenocarcinomi mucinosi (0/2), un cistoadenocarcinoma sieroso (0/1), un cistoadenoma papillare sieroso (0/1), un tumore di Brenner (0/1), e un tumore mucinoso borderline (0/1). Non è stata osservata alcuna colorazione in una varietà di altri tessuti inclusi carcinomi a cellule squamose (0/10), tumori della tiroide (0/4), tumori del fegato (0/4), linfomi (0/3), tumori coloretali (0/3), tumori del cervello (0/2), tumori della mammella (0/2), tumori dello stomaco (0/2), tumori pancreatici (0/2), tumori del polmone (0/2), tumori del rene (0/2), tumori della prostata (0/2) e tumori metastatici non specificati (0/2). (Numero totale di casi = 145).

Si raccomanda l'uso di NCL-L-InhibinA per la rilevazione di alfa-inibina in tessuti normali e neoplastici.

Limitazioni Generali

L'immunostochimica è un procedimento diagnostico a più passi (multistep) che richiede un'esperienza specifica nella selezione dei reagenti appropriati, nella selezione, fissazione e processazione dei tessuti, nella preparazione di vetrini IHC e nell'interpretazione dei risultati della colorazione.

La colorazione del tessuto dipende dalle modalità di manipolazione e di processazione del tessuto stesso, adottate prima della colorazione. La fissazione, il congelamento, lo scongelamento, il lavaggio, l'asciugatura, il riscaldamento o la sezione condotti in modo non corretto, o la contaminazione con altri tessuti o liquidi, possono produrre artefatti, intrappolamento (trapping) anticorpale o risultati falsi negativi. Risultati incompatibili possono essere dovuti a modifiche dei metodi di fissazione e di inclusione o ad irregolarità intrinseche al tessuto.⁴

Una controcolorazione eccessiva o incompleta può compromettere la corretta interpretazione dei risultati.

L'interpretazione clinica di ogni colorazione o della sua assenza va integrata da studi morfologici che utilizzino i controlli appropriati e deve essere valutata da un patologo qualificato, nel contesto della storia clinica del paziente e delle altre metodiche diagnostiche adoperate.

Gli anticorpi di Leica Biosystems Newcastle Ltd. sono destinati all'uso, quando indicato, su sezioni congelate o incluse in paraffina, con specifici requisiti di fissazione. Un'espressione antigenica inattesa può manifestarsi in particolare nelle neoplasie. L'interpretazione clinica di ogni sezione tissutale colorata deve includere l'analisi morfologica e la valutazione dei controlli appropriati.

Riferimenti Bibliografici Di Base

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.
5. Robertson D, Burger H and Fuller P. Inhibin/activin and ovarian cancer. *Endocrine-Related Cancer*. 2004; 11:35–49.
6. Bernard J, Chapman S and Woodruff T. Mechanisms of inhibin signal transduction. *Recent Progress in Hormone Research*. 2001; 56:417–450.

Modifiche Alla Pubblicazione Precedente

Non applicabile.

Data Di Pubblicazione

15 aprile 2019

Metodologia immunoistochimica per l'uso di anticorpi Novocastra™ su tessuto incluso in paraffina, utilizzando la tecnica di smascheramento ad alta temperatura dell'epitopo.

Reagenti necessari ma non forniti

1. Solventi standard utilizzati in immunoistochimica.
2. Tampone Tris salino (TBS) 50 mM a pH 7.6.
3. Soluzione di smascheramento dell'epitopo (vedere sezione C Soluzioni per lo smascheramento dell'epitopo).
4. Diluente per anticorpi, Novocastra™ IHC Diluent, RE7133.
5. Sistema di visualizzazione, Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) o RE7290-K (50 tests).
6. Mezzo di montaggio – usare secondo le raccomandazioni del produttore.

Attrezzature necessarie ma non fornite

1. Set incubatore a 25 °C.
2. Dispositivo di riscaldamento per lo smascheramento dell'epitopo: bagno termostatico o vaporizzatore, autoclave o altre attrezzature termostatiche da laboratorio.
3. Attrezzatura di base del laboratorio di immunoistochimica: steamer vaporizer.

Soluzioni per lo smascheramento dell'epitopo (vedere le Raccomandazioni per l'uso per uno dei seguenti prodotti)

RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 L	Tampone citrato contenente surfattante
RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 mL	
RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 L	
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 L	Tampone EDTA contenente surfattante
RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 L	
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 L	Tampone Tris/EDTA contenente surfattante
RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 L	

Metodologia

Prima di intraprendere questa metodologia, l'utente deve aver acquisito esperienza con le tecniche immunoistochimiche.

Gli utenti devono determinare le diluizioni ottimali degli anticorpi. Se non indicato diversamente, tutte le fasi vanno condotte a temperatura ambiente (25 °C).

Smascheramento dell'epitopo

Si prega di seguire le istruzioni per l'uso in Epitope Retrieval Solutions, RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119, RE7122.

Visualizzazione

Si prega di seguire le istruzioni per l'uso in Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) o RE7290-K (50 tests).

Modifiche alla pubblicazione precedente

Non applicabile.

Data di pubblicazione

23 aprile 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

Novocastra™ Flüssiger Monoklonaler Maus–Antikörper Inhibin Alpha Produkt–Nr.: NCL-L-InhibinA

Verwendungszweck

Für *in-vitro*-Diagnostik.

NCL-L-InhibinA ist für den qualitativen Nachweis der Inhibin Alpha–Moleküle in Paraffinschnitten mittels Lichtmikroskopie gedacht. Die klinische Bewertung einer vorliegenden bzw. fehlenden Färbung sollte durch morphologische Studien mit entsprechenden Kontrollen ergänzt und im Kontext der Krankengeschichte des Patienten und anderer diagnostischer Tests von einem qualifizierten Pathologen vorgenommen werden.

Verfahrensgrundlage

Immunhistochemische (IHC) Färbetechniken gestatten die optische Darstellung von Antigenen mittels sequentieller Anwendung eines spezifischen Antikörpers zum Antigen (primärer Antikörper), eines sekundären Antikörpers zum primären Antikörper und eines Enzymkomplexes mit einem chromogenen Substrat, jeweils getrennt durch dazwischen liegende Waschschrte. Die enzymatische Aktivierung des Chromogens führt zu einem sichtbaren Reaktionsprodukt am Ort des Antigens. Die Probe kann dann gegengefärbt und mit einem Deckglas versehen werden. Die Ergebnisse werden mithilfe eines Lichtmikroskops interpretiert und unterstützen die Differentialdiagnose pathophysiologischer Prozesse, die mit einem bestimmten Antigen assoziiert sein könnten.

Klon

AMY82

Immunogen

Prokaryotisches rekombinantes Protein, das 134 Aminosäuren des humanen Inhibin–alpha–Moleküls entspricht.

Spezifität

Humanen Inhibin–alpha–Moleküls.

Reagenzzusammensetzung

NCL-L-InhibinA ist ein flüssiger Gewebekulturüberstand, der 15 mmol/l Natriumazid als Konservierungsmittel enthält.

Ig–Klasse

IgG1

Gesamtproteinkonzentration Total Protein

1,0–8,0 g/L. Siehe Angaben auf dem Produktetikett bezüglich der chargenspezifischen Gesamtproteinkonzentration.

Antikörperkonzentration

Größer als oder gleich 214 mg/L laut ELISA–Bestimmung. Hinsichtlich der chargenspezifischen Ig–Konzentration siehe Angaben auf dem Produktetikett.

Gebrauchsempfehlungen

Immunhistochemie (siehe **Vorgehensweise**) auf Paraffinschnitten. Empfohlene Verdünnung: 1:100 über einen Zeitraum von 30 Minuten bei 25 °C. Hitzeinduzierte Epitopdemaskierung mit Epitope Retrieval Solution pH 6.0 (RE7113 oder RE7114).

Visualisierung. Beachten Sie bitte die Gebrauchsanweisungen in den Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280–K (1250 tests), RE7150–K (500 tests), RE7140–K (250 tests) oder RE7290–K (50 tests).

Lagerung und Stabilität

Bei 2–8 °C lagern. Nicht einfrieren. Nach Gebrauch sofort wieder bei 2–8 °C lagern. Nach Ablauf des Verfallsdatums (auf dem Behälteretikett) darf das Produkt nicht mehr verwendet werden. Lagerbedingungen, die von den oben genannten Bedingungen abweichen, müssen vom Benutzer verifiziert werden.

Probenvorbereitung

Für paraffineingebettete Gewebeschnitte ist das empfohlene Fixativ 10% neutral gepuffertes Formalin.

Warnhinweise und Sicherheitsmaßnahmen

Dieses Reagenz wurde aus Zellkulturüberstand zubereitet. Das Reagenz ist ein biologisches Produkt und sollte mit entsprechender Vorsicht gehandhabt werden.

Die Molarität des Natriumazids in diesem Reagenz beträgt 15 mmol/l. Ein Sicherheitsdatenblatt (MSDS) für Natriumazid ist auf Anfrage erhältlich.

Die entsprechenden nationalen und lokalen Bestimmungen und Vorschriften zur Entsorgung potentiell giftiger Komponenten sind einzuhalten.

Vor und nach der Fixierung sind die Proben sowie alle Materialien, die mit ihnen in Kontakt gekommen sind, als potentiell infektiös zu behandeln und daher mit entsprechender Vorsicht zu entsorgen.¹ Reagenzien dürfen niemals mit dem Mund pipettiert werden, und jeglicher Kontakt der Reagenzien und Proben mit Haut und Schleimhäuten ist zu vermeiden. Falls Reagenzien oder Proben mit empfindlichen Bereichen in Kontakt gekommen sind, müssen diese mit reichlich Wasser gespült werden. Ärztlichen Rat einholen.

Die mikrobielle Verunreinigung von Reagenzien ist zu minimieren, da ansonsten eine erhöhte unspezifische Färbung auftreten kann.

Falls die spezifizierten Inkubationszeiten oder –temperaturen nicht eingehalten werden, kann es zu fehlerhaften Ergebnissen kommen. Jegliche Abweichungen von den angegebenen Werten müssen vom Benutzer verifiziert werden.

Qualitätskontrolle

Unterschiede bei der Gewebearbeitung und den technischen Verfahren im Labor des Benutzers können zu signifikanten Schwankungen bei den Ergebnissen führen. Daher ist es wichtig, zusätzlich zu den folgenden Verfahren regelmäßige laborinterne Kontrollen durchzuführen.

Die Kontrollen sollten mit frischen Autopsie–/Biopsie–/chirurgischen Proben vorgenommen werden, die so bald wie möglich und auf dieselbe Weise wie die Patientenprobe(n) in Formalin fixiert, behandelt und in Paraffin eingebettet worden sind.

Positive Gewebekontrolle

Zeigt korrekt vorbereitete Gewebe und korrekte Färbetechniken an.

In jedem Färbelauf sollte für jeden Satz Testbedingungen eine positive Gewebekontrolle durchgeführt werden.

Gewebe mit schwach positiver Färbung ist für die optimale Qualitätskontrolle und den Nachweis kleiner Minderungen in der Reagenzleistung besser geeignet als ein Gewebe mit stark positiver Färbung.²

Für die positive Gewebekontrolle wird Hodengewebe empfohlen.

Falls das positive Kontrollgewebe keine positive Färbung nachweisen kann, sollten die mit den Testproben erzielten Ergebnisse als ungültig betrachtet werden.

Negative Gewebekontrolle

Die negative Gewebekontrolle sollte nach der positiven Gewebekontrolle erfolgen, um die Spezifität der Zielantigenmarkierung durch den primären Antikörper zu verifizieren.

Für die negative Gewebekontrolle wird Kleinhirngewebe empfohlen.

Alternativ bietet die Vielfalt unterschiedlicher Zelltypen, die in den meisten Gewebeschnitten vorliegen, häufig Stellen für eine negative Kontrolle. Jedoch sollte dies vom Benutzer verifiziert werden.

Liegt eine unspezifische Färbung vor, hat diese gewöhnlich ein diffuses Erscheinungsbild. Eine sporadische Färbung des Bindegewebes kann ebenfalls in Schnitten von übermäßig formalinfixierten Geweben beobachtet werden. Zur Bewertung der Färberegebnisse intakte Zellen verwenden. Nekrotische oder degenerierte Zellen werden oft unspezifisch gefärbt.³ Falsch–positive Ergebnisse können aufgrund einer nichtimmunologischen Bindung von Proteinen oder Substratreaktionsprodukten beobachtet werden. In Abhängigkeit von der Art der verwendeten Immunfärbung können solche Ergebnisse auch durch endogene Enzyme wie Pseudoperoxidase (Erythrozyten), endogene Peroxidase (Zytochrom C) oder endogenes Biotin (beispielsweise Leber, Mamma, Gehirn, Niere) hervorgerufen werden.

Um eine endogene Enzymaktivität bzw. eine unspezifische Enzymbindung von einer spezifischen Immunreaktivität zu unterscheiden, können zusätzliche Patientengewebe ausschließlich mit Substratchromogen bzw. mit Enzymkomplexen (Avidin–Biotin, Streptavidin, markiertes Polymer) plus Substratchromogen gefärbt werden. Falls im negativen Kontrollgewebe eine spezifische Färbung auftritt, sollten die Ergebnisse mit den Patientenproben als ungültig betrachtet werden.

Negative Reagenzkontrolle

Zur Beurteilung einer unspezifischen Färbung und zur besseren Bewertung einer spezifischen Färbung an der Antigenstelle ist mit einem Schnitt jedes Patientenpräparates anstelle des primären Antikörpers eine unspezifische negative Reagenzkontrolle zu verwenden.

Patientengewebe

Die mit NCL–L–InhibinA gefärbten Patientenproben müssen zuletzt untersucht werden. Eine positive Färbereintensität ist im Kontext einer unspezifischen Hintergrundfärbung der negativen Reagenzkontrolle zu bewerten. Wie bei jedem immunhistochemischen Test bedeutet ein negatives Ergebnis, dass das Antigen nicht nachgewiesen wurde. Ein negatives Ergebnis bedeutet jedoch nicht notwendigerweise, dass das Antigen in den getesteten Zellen / im getesteten Gewebe nicht vorlag. Bei Bedarf sollte zur Identifizierung falsch–negativer Reaktionen eine Gruppe von Antikörpern verwendet werden.

Erwartete Ergebnisse

Normale Gewebe

Klon AMY82 wies das Inhibin–alpha–Protein in Sertoli– und Leydig–Zellen der Hoden, im Kortex und in der Medulla der Nebenniere und in der Theca interna des Ovars nach. (Gesamtzahl der Fälle = 38).

Tumorgewebe

Klon AMY82 wies das Inhibin–alpha–Protein in 27/105 anomalen Ovargeweben nach, einschließlich 17/44 gutartigen Thekazelltumoren, 4/6 malignen Thekazelltumoren, 2/9 Zysten, 3/3 Granulosazelltumoren und 1/5 Klarzellkarzinomen. Bei serösem Adenokarzinom (0/8), Endometriumadenokarzinom (0/6), Übergangszellkarzinom (0/5), Dottersacktumoren (0/4), Dysgerminom (0/3), Fibrom (0/2), muzinösem Zystadenom (0/2), muzinösem Adenokarzinom (0/2), muzinösem Zystadenokarzinom (0/2), einem serösen Zystadenokarzinom (0/1), einem serösen papillären Zystadenom (0/1), einem Brenner–Tumor (0/1) und einem muzinösen Borderline–Tumor (0/1) wurde keine Färbung beobachtet. Bei einer Reihe von zusätzlichen Tumoren wurde keine Färbung nachgewiesen, einschließlich Plattenepithelkarzinomen (0/10), Schilddrüsentumoren (0/4), Lebertumoren (0/4), Lymphomen (0/3), kolorektalen Tumoren (0/3), Gehirntumoren (0/2), Brusttumoren (0/2), Magentumoren (0/2), Pankreastumoren (0/2), Lungentumoren (0/2), Nierentumoren (0/2), Prostataumoren (0/2) und unspezifizierten metastatischen Tumoren (0/2). (Gesamtzahl der Fälle = 145).

NCL–L–InhibinA wird zum Nachweis von Inhibin alpha in normalen und neoplastischen Geweben empfohlen.

Allgemeine Beschränkungen

Die Immunhistochemie ist ein mehrstufiger diagnostischer Prozess, der eine spezialisierte Ausbildung auf den folgenden Gebieten erfordert: Auswahl der entsprechenden Reagenzien; Gewebeauswahl, –fixierung und –verarbeitung; Vorbereitung des IHC–Objektträgers sowie Bewertung der Färberegebnisse. Die Gewebefärbung hängt von der Handhabung und Verarbeitung des Gewebes vor dem Färben ab. Unsachgemäßes Fixieren, Einfrieren, Auftauen, Waschen, Trocknen, Erwärmen, Schneiden oder eine Kontamination mit anderen Geweben oder Flüssigkeiten kann zu Artefakten, Antikörper–Trapping oder falsch–negativen Ergebnissen führen. Abweichende Ergebnisse können aufgrund von Unterschieden bei der Fixierung und Einbettung oder intrinsischen Unregelmäßigkeiten im Gewebe selbst entstehen.⁴

Eine exzessive oder unvollständige Gegenfärbung kann die korrekte Bewertung von Ergebnissen gefährden.

Die klinische Bewertung einer vorliegenden bzw. fehlenden Färbung sollte durch morphologische Studien mit entsprechenden Kontrollen ergänzt und im Kontext der Krankengeschichte des Patienten und anderer diagnostischer Tests von einem qualifizierten Pathologen vorgenommen werden.

Antikörper von Leica Biosystems Newcastle Ltd sind wo angezeigt für die Verwendung entweder auf gefrorenen oder in Paraffin eingebetteten Schnitten mit spezifischen Fixierungsanforderungen bestimmt. Es kann insbesondere bei Neoplasmen zu einer unerwarteten Antigenexpression kommen. Die klinische Bewertung eines gefärbten Gewebeschnitts muss eine morphologische Analyse und die Auswertung der entsprechenden Kontrollen einschließen.

Literatur – Allgemein

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29–P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio–Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Robertson D, Burger H and Fuller P. Inhibin/activin and ovarian cancer. Endocrine–Related Cancer. 2004; 11:35–49.
6. Bernard J, Chapman S and Woodruff T. Mechanisms of inhibin signal transduction. Recent Progress in Hormone Research. 2001; 56:417–450.

Änderungen zur vorhergehenden Ausgabe

Keine.

Ausgabedatum

15 April 2019

Immunhistochemische Vorgehensweise für die Anwendung von Novocastra™–Antikörpern auf in Paraffin eingebettetes Gewebe mit Hilfe des wärmeinduzierten Epitopdemaskierungsverfahrens.

Erforderliche, jedoch nicht mitgelieferte Reagenzien

1. In der Immunhistochemie gebräuchliche Standardlösungsmittel
2. 50 mM Tris–gepufferte Kochsalzlösung (TBS) mit pH–Wert 7,6.
3. Epitop–Retrieval–Lösung (siehe Abschnitt C Epitopdemaskierungslösung)
4. Antikörperverdünnungsmittel, Novocastra™ IHC Diluent, RE7133..
5. Visualisierungssystem, Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280–K (1250 tests), RE7150–K (500 tests), RE7140–K (250 tests) oder RE7290–K (50 tests).
6. Fixativ – gemäß Herstellerempfehlungen verwenden.

Erforderliche, jedoch nicht mitgelieferte Ausrüstung

1. Auf 25 °C eingestellter Inkubator.
2. Erwärmungsgerät für das Epitopdemaskierungsverfahren: Wasserbad oder Dampfbad, Dampfdrucktopf oder andere temperaturgesteuerte Laboranlage.
3. Allgemeine immunhistochemische Laborausrüstun.

Epitopdemaskierungslösungen (siehe Gebrauchsempfehlungen für eines der folgenden Produkte)

RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 L	Zitratbasierter Puffer mit Detergens
RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 mL	
RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 L	
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 L	EDTA–basierter Puffer mit Detergens
RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 L	
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 L	Tris–/EDTA–basierter Puffer mit Detergen
RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 L	

Vorgehensweise

Vor der Durchführung dieser Methode müssen die Anwender in immunhistochemischen Verfahren ausgebildet werden.

Die Kunden müssen die optimalen Verdünnungen für Antikörper bestimmen. Wenn nicht anders angegeben, werden alle Schritte bei Raumtemperatur (25 °C) durchgeführt.

Epitopdemaskierungsverfahren

Bitte befolgen Sie die Gebrauchsanweisungen für die Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119, RE7122.

Visualisierung

Bitte befolgen Sie die Gebrauchsanweisungen der Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280–K (1250 tests), RE7150–K (500 tests), RE7140–K (250 tests) oder RE7290–K (50 tests).

Änderungen zur vorherigen Ausgabe

Keine.

Ausgabedatum

23 April 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

Novocastra™ Anticuerpos Monoclonal Murino Líquidos

Inhibin Alpha

Código De Producto: NCL-L-InhibinA

Indicaciones De Uso

Para uso diagnóstico in vitro.

NCL-L-InhibinA está indicado para la identificación cualitativa en secciones de parafina, mediante microscopía óptica, de moléculas de Inhibin Alpha. La interpretación clínica de cualquier tinción o de su ausencia debe complementarse con estudios morfológicos, con el uso de los controles adecuados, y un anatomopatólogo cualificado debe evaluarla en el contexto del historial clínico del paciente y de otras pruebas diagnósticas.

Principio Del Procedimiento

Las técnicas de tinción inmunohistoquímica (IHQ) permiten la visualización de antígenos mediante la aplicación secuencial de un anticuerpo específico dirigido contra el antígeno (anticuerpo primario), un anticuerpo secundario dirigido contra el anticuerpo primario y un complejo enzimático con un sustrato cromogénico, con pasos de lavado intercalados. La activación enzimática del cromógeno produce una reacción visible en el lugar en que se encuentra el antígeno. Luego se puede contrateñir la muestra y cubrirla con un cubreobjeto. Los resultados se interpretan utilizando un microscopio óptico y son de ayuda en el diagnóstico diferencial de los procesos fisiopatológicos, que pueden estar o no vinculados a un determinado antígeno.

Clon

AMY82

Inmunógeno

Proteína recombinante procarciática correspondiente a 134 aminoácidos de la molécula alfa inhibina humana.

Especificidad

Alfa inhibina humana.

Composición Del Reactivo

NCL-L-InhibinA es un sobrenadante de cultivo tisular líquido que contiene azida sódica 15 mM como conservante.

Clase de Ig

IgG1

Concentración Total De Proteína Total Protein

1,0–8,0 g/L. Consulte la etiqueta del vial para ver la concentración total de proteína específica del lote.

Concentración De Anticuerpo

Igual o superior a 214 mg/L según se ha determinado mediante ELISA. Consulte en la etiqueta del vial la concentración de Ig específica del lote.

Recomendaciones De Uso

Inmunohistoquímica (ver **Metodología**) con secciones de parafina. Dilución sugerida: 1:100 durante 30 minutos a 25 °C. Recuperación de epitopos inducida por calor con Epitope Retrieval Solution pH 6.0 (RE7113 o RE7114).

Visualización. Por favor, siga las instrucciones de uso de Novolink™ Polymer Detection Systems RE7280–K (1250 tests), RE7150–K (500 tests), RE7140–K (250 tests) o RE7290–K (50 tests).

Almacenamiento Y Estabilidad

Almacénelo a una temperatura de 2–8 °C. No lo congele. Devuélvalo a 2–8 °C inmediatamente después de su uso. No lo utilice después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial. Cualesquiera condiciones de almacenamiento que no sean las arriba especificadas deben ser verificadas por el usuario.

Preparación De Las Muestras

El fijador recomendado para secciones de tejido incluidos en parafina es formol tamponado neutro al 10%.

Advertencias Y Precauciones

Este reactivo se ha preparado a partir del sobrenadante de un cultivo celular. Como se trata de un producto de origen biológico, debe manipularse con precaución.

La molaridad de la azida sódica en este reactivo es 15 mM. Si la solicita, existe una hoja de información sobre la seguridad del material (MSDS) azida sódica a su disposición.

Consulte las normativas nacionales, estatales, provinciales o municipales acerca de cómo desechar cualquier componente potencialmente tóxico.

Las muestras, antes y después de ser fijadas, así como todos los materiales expuestos a ellas, deben manipularse como susceptibles de transmitir una infección, y se deben desechar tomando las precauciones adecuadas.¹ No pipeteo nunca los reactivos con la boca, y evite el contacto de la piel y de las membranas mucosas con los reactivos y las muestras. Si los reactivos o las muestras entran en contacto con zonas delicadas, lave éstas con abundante agua. Acuda inmediatamente al médico.

Reduzca al mínimo la contaminación microbiana de los reactivos; de lo contrario, podría producirse un aumento de la tinción no específica.

Cualquier tiempo o temperatura de incubación que no sean los aquí especificados pueden conducir a resultados erróneos. Cualquier cambio de tal naturaleza debe ser validado por el usuario.

Control De Calidad

Las diferencias en el procesamiento de los tejidos y en los procedimientos técnicos del laboratorio del usuario pueden producir una variabilidad significativa en los resultados; por ello, es necesario que éste lleve a cabo regularmente los controles de su propio laboratorio, además de los siguientes procedimientos.

Los controles deben ser muestras frescas de autopsia, biopsia o quirúrgicas fijadas en formol, procesadas e incluidas en parafina, lo antes posible, de manera idéntica a la utilizada para la muestra o muestras del paciente o pacientes.

Control Tisular Positivo

Se utiliza para indicar la preparación correcta de los tejidos y las técnicas de tinción adecuadas.

Debe incluirse un control tisular positivo por cada conjunto de condiciones de ensayo en cada tinción o serie de tinciones realizada.

Un tejido con una tinción positiva débil es más adecuado que un tejido con una tinción positiva intensa para lograr un control de calidad óptimo y para detectar niveles bajos de degradación del reactivo.²

El tejido de control positivo recomendado es testículos.

Si el tejido de control positivo no muestra tinción positiva, los resultados de las muestras analizadas deben considerarse no válidos.

Control Tisular Negativo

Debe examinarse después del control de tejido positivo, a fin de verificar la especificidad del marcado del antígeno diana por el anticuerpo primario.

El tejido de control negativo recomendado es cerebelo.

O bien, la variedad de diferentes tipos de células presentes en la mayoría de los cortes de tejido ofrece con frecuencia lugares de control negativo, pero esto debe ser verificado por el usuario.

Si aparece una tinción no específica, ésta tiene generalmente aspecto difuso. En cortes de tejido fijados excesivamente con formol puede observarse también una tinción esporádica del tejido conectivo. Utilice células intactas para la interpretación de los resultados de la tinción. A menudo, las células necróticas o degeneradas quedan teñidas de forma no específica.³ También pueden observarse falsos positivos causados por la unión no inmunológica a proteínas o a productos de reacción del sustrato. Estos falsos positivos pueden estar causados también por enzimas endógenas tales como la pseudoperoxidasa (eritrocitos), la peroxidasa endógena (citocromo C), o la biotina endógena (por ejemplo, de hígado, mama, cerebro, riñón), en función del tipo de inmunotinción utilizada. Para diferenciar la actividad de las enzimas endógenas o los enlaces no específicos de las enzimas de la inmunorreactividad específica, pueden teñirse otros tejidos del paciente exclusivamente con cromógeno sustrato o con complejos enzimáticos (avidina-biotina, estreptavidina, polímeros marcados) y cromógeno sustrato respectivamente. Si se produce una tinción específica del control tisular negativo, los resultados de las muestras de los pacientes deben considerarse no válidos.

Control De Reactivo Negativo

Utilice un control de reactivo negativo no específico en lugar del anticuerpo primario con un corte de cada muestra del paciente a fin de evaluar la tinción no específica y obtener una mejor interpretación de la tinción específica en el lugar en que se encuentra el antígeno.

Tejido Del Paciente

Examine las muestras del paciente o pacientes teñidas con NCL-L-InhibinA al final. La intensidad de la tinción positiva debe valorarse en el contexto de cualquier tinción de fondo no específica del control de reactivo negativo. Como con cualquier prueba inmunohistoquímica, un resultado negativo significa que no se ha detectado antígeno, y no que el antígeno esté ausente en las células o tejido probados. Si es necesario, use un panel de anticuerpos para identificar falsas reacciones negativas.

Resultados esperados

Tejidos normales

El clon AMY82 detectó la proteína alfa inhibina en células de Sertoli y de Leydig de los testículos, en la corteza y la médula de la glándula suprarrenal y en la teca interna del ovario. (Número total de casos = 38).

Tejidos tumorales

El clon AMY82 detectó la proteína alfa inhibina en 27 de 105 tejidos ováricos anormales estudiados, incluidos 17 de 44 tumores benignos de célula de teca, 4 de 6 tumores malignos de célula de teca, 2 de 9 quistes, 3 de 3 tumores de células granulosa y 1 de 5 carcinomas de células claras. No se observó tinción en adenocarcinomas serosos (0 de 8), adenocarcinomas endometriales (0 de 6), carcinomas de célula de transición (0 de 5), tumores de saco vitelino (0 de 4), disgerminomas (0 de 3), fibromas (0 de 2), cistoadenomas mucinosos (0 de 2), adenocarcinomas mucinosos (0 de 2), cistoadenocarcinomas mucinosos (0 de 2), un cistoadenocarcinoma seroso (0 de 1), un cistoadenoma papilar seroso (0 de 1), un tumor de Brenner (0 de 1) y un tumor mucinoso de bajo potencial maligno (borderline) No se detectó tinción en otros tumores diversos, entre los cuales se encuentran carcinomas de células escamosas (0 de 10), tumores de glándula tiroidea (0 de 4), tumores de hígado (0 de 4), linfomas (0 de 3), tumores colorrectales (0 de 2), tumores cerebrales (0 de 2), tumores de mama (0 de 2), tumores de estómago (0 de 2), tumores de páncreas (0 de 2), tumores de pulmón (0 de 2), tumores de riñón (0 de 2), tumores de próstata (0 de 2) y tumores metastásicos no especificados (0 de 2). (Número total de casos = 145).

El NCL-L-InhibinA está recomendado para la detección de la alfa inhibina en tejidos normales y neoplásicos.

Limitaciones Generales

La inmunohistoquímica es un proceso de diagnóstico en varias fases que abarca: la formación especializada en la selección de los reactivos apropiados, la selección, fijación y procesamiento de tejidos, la preparación del portaobjeto para IHQ, y la interpretación de los resultados de la tinción.

La tinción de los tejidos depende de la manipulación y el procesamiento del tejido previos a la tinción. Una fijación, congelación, descongelación, lavado, secado, calentamiento o seccionamiento incorrectos, o la contaminación con otros tejidos o líquidos pueden generar artefactos, atrapamiento del anticuerpo o falsos negativos. La aparición de resultados incoherentes puede deberse a variaciones en los métodos de fijación y de inclusión, o a irregularidades inherentes al tejido.⁴

Una contratinción excesiva o incompleta puede poner en peligro la interpretación correcta de los resultados.

La interpretación clínica de cualquier tinción o de su ausencia debe complementarse con estudios morfológicos, con el uso de los controles adecuados, y un anatomopatólogo cualificado debe evaluarla en el contexto del historial clínico del paciente y de otras pruebas diagnósticas.

Los anticuerpos de Leica Biosystems Newcastle Ltd son para utilizarlos, según se indique, con secciones congeladas o incluidas en parafina, con requisitos de fijación específicos. Puede producirse una expresión inesperada del antígeno, especialmente en las neoplasias. La interpretación clínica de cualquier sección de tejido teñida debe incluir un análisis morfológico y la evaluación de los controles apropiados.

Bibliografía – General

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29–P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Robertson D, Burger H and Fuller P. Inhibin/activin and ovarian cancer. Endocrine-Related Cancer. 2004; 11:35–49.
6. Bernard J, Chapman S and Woodruff T. Mechanisms of inhibin signal transduction. Recent Progress in Hormone Research. 2001; 56:417–450.

Correcciones A La Publicación Anterior

No aplicable.

Fecha De Publicación

15 de abril de 2019

Metodología inmunohistoquímica para la utilización de anticuerpos Novocastra™, en tejidos incluidos en parafina, con la aplicación de la técnica de recuperación de epítomos inducida por calor.

Reactivos necesarios que no se suministran

1. Disolventes estándar utilizados en inmunohistoquímica.
2. Solución salina tamponada con Tris 50 mM (TBS), pH 7,6.
3. Solución para la recuperación de epítomos (véase la sección C Soluciones para la recuperación de epítomos).
4. Diluyente del anticuerpo, Novocastra™ IHC Diluent, RE7133.
5. Sistema de visualización, Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) o RE7290-K (50 tests).
6. Medio de montaje; utilizado de la forma recomendada por el fabricante.

Equipo necesario que no se suministra

1. Incubador ajustado a 25 °C.
2. Dispositivo de calentamiento para la recuperación de epítomos: baño de agua o de vapor, olla de presión u otro equipo de laboratorio con temperatura controlada.
3. Equipo de laboratorio utilizado generalmente para inmunohistoquímica.

Soluciones para la recuperación de epítomos (véanse las Recomendaciones de uso de alguna de las siguientes)

RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 L	Tampón basado en citrato, que contiene agente tensioactivo
RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 mL	
RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 L	
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 L	Tampón basado en EDTA, que contiene agente tensioactivo
RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 L	
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 L	Tampón basado en Tris/EDTA, que contiene agente tensioactivo
RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 L	

Metodología

Antes de poner en práctica esta metodología, los usuarios deben formarse en el uso de las técnicas inmunohistoquímicas.

Los clientes deben determinar las diluciones óptimas de los anticuerpos. A menos que se indique otra cosa, todos los pasos se llevan a cabo a temperatura ambiente (25 °C).

Recuperación de epítomos

Siga las instrucciones de uso de las Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119, RE7122.

Visualización

Siga las instrucciones de uso de los sistemas de detección de polímeros Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) o RE7290-K (50 tests).

Correcciones con respecto a la publicación anterior

No aplicable.

Fecha de publicación

23 de abril de 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

Novocastra™ Anticorpo Monoclonal Líquido de Ratinho

Inibin Alpha

Código Do Produto: NCL-L-InhibinA

Utilização prevista

Para utilização em diagnósticos in vitro.

NCL-L-InhibinA foi concebido para efectuar a identificação qualitativa das moléculas de Inibin Alpha por microscopia óptica, em secções parafinadas. A interpretação clínica de qualquer coloração ou da sua ausência deve ser complementada por estudos morfológicos empregando os devidos controlos e deve ser avaliada por um patologista qualificado, dentro do contexto do historial clínico do doente e de outros testes de diagnóstico.

Princípio Do Procedimento

As técnicas de coloração imunohistoquímica (IHQ) permitem que se faça a visualização de antígenos por meio da aplicação sequencial de um anticorpo específico do antígeno (o anticorpo primário), de um anticorpo secundário ao anticorpo primário, e de um complexo enzimático com um substrato cromogénico e etapas de lavagem de permeio. A activação enzimática do cromogénio resulta num produto de reacção visível no local do antígeno. A amostra pode então ser contrastada e coberta com uma lamela. Os resultados são interpretados por meio de um microscópio óptico, e ajudam a formular o diagnóstico diferencial dos processos fisiopatológicos, os quais podem ou não estar associados a antígenos específicos.

Clone

AMY82

Imunogénio

Proteína recombinante procarciótica que corresponde a 134 aminoácidos da molécula de inibina alfa humana.

Especificidade

Inibina alfa humana.

Composição Do Reagente

NCL-L-InhibinA é o sobrenadante líquido da cultura de um tecido contendo 15 mM de azida de sódio como produto conservante.

Classe De Ig

IgG1

Concentração Total De Proteína Total Protein

1,0–8,0 g/L. Consultar a etiqueta da ampola para determinar a concentração total de proteína do lote específico.

Concentração De Anticorpo

Maior que ou igual a 214 mg/L, conforme determinado por ELISA. Consultar a etiqueta da ampola para determinar a concentração de Ig do lote específico.

Recomendações Sobre A Utilização

Imunohistoquímica (ver **Metodologia**) em secções de parafina. Diluição sugerida: 1:100 durante 30 minutos a 25 °C. Recuperação de epitopos induzida pelo calor utilizando a solução Epitope Retrieval Solution pH 6.0 (RE7113 ou RE7114).

Visualização. Queira seguir as instruções de utilização de Novolink™ Polymer Detection Systems RE7280–K (1250 tests), RE7150–K (500 tests), RE7140–K (250 tests) ou RE7290–K (50 tests).

Armazenamento E Estabilidade

Armazenar a 2–8 °C. Não congelar. Retornar à temperatura de 2–8 °C imediatamente após a utilização. Não utilizar após o prazo de validade indicado no rótulo do recipiente. As condições de armazenamento que diferirem das que se encontram especificadas acima devem ser verificadas pelo utilizador.

Preparação Das Amostras

O fixador recomendado é formol tamponado neutro a 10% para secções de tecido envolvidas em parafina.

Avisos E Precauções

Este reagente foi preparado a partir do sobrenadante de cultura celular. Visto ser um produto biológico, deve ser manuseado com o devido cuidado.

A molaridade da azida de sódio neste reagente é de 15 mM. Encontra-se disponível, mediante pedido, uma folha de dados de segurança de materiais (MSDS) sobre a azida de sódio.

Consultar a legislação aplicável em relação ao descarte de quaisquer componentes potencialmente tóxicos.

As amostras, antes e depois da sua fixação, bem como todos os materiais expostos às mesmas, devem ser manipulados como se tivessem a capacidade de transmitir infecções e devem ser descartados com as devidas precauções.¹ Não pipetar nunca os reagentes com a boca e evitar o contacto entre a pele e membranas mucosas e os reagentes e amostras. Caso os reagentes ou amostras entrem em contacto com áreas sensíveis, lavar com grandes quantidades de água. Consultar um médico.

Minimizar a contaminação microbiana dos reagentes para evitar a possibilidade do aumento da coloração não específica.

Os períodos de incubação ou temperaturas diferentes dos que foram especificados poderão dar azo a resultados errados. Todas as alterações desse tipo devem ser validadas pelo utilizador.

Controlo Da Qualidade

As diferenças entre os diferentes métodos e técnicas de processamento de tecidos no laboratório do utilizador podem causar uma grande variabilidade de resultados, requerendo a realização frequente de controlos internos suplementares aos procedimentos que se seguem.

Os controlos devem ser amostras de autópsia/biopsia/cirurgia frescas, fixadas em formol, processadas e envolvidas em cera parafínica logo que possível, da mesma maneira que a(s) amostra(s) do(s) doente(s).

Controlo De Tecido Positivo

Usado para assinalar os tecidos correctamente preparados e as técnicas de coloração indicadas.

Cada conjunto de condições de testes, em cada processo de coloração, deve incluir um controlo de tecido positivo.

Os tecidos com uma coloração positiva fraca são mais indicados do que os têm uma coloração positiva forte para proporcionarem um controlo de qualidade óptimo, bem como para detectar níveis reduzidos de degradação dos reagentes.²

O tecido de controlo positivo recomendado é o testículo.

Se o controlo de tecido positivo não demonstrar uma coloração positiva, os resultados obtidos com as amostras de testes devem ser considerados inválidos.

Controlo De Tecido Negativo

Este deve ser examinado depois do controlo de tecido positivo para verificar a especificidade da marcação do antígeno objectivado pelo anticorpo primário.

O controlo de tecido negativo recomendado é o cerebello.

Alternativamente, a variedade de diferentes tipos de células presentes na maioria das secções de tecidos oferece muitas vezes locais de controlo negativo, mas isto deve ser verificado pelo utilizador.

A coloração não específica, caso ocorra, tem geralmente um aspecto difuso. A coloração esporádica do tecido conjuntivo pode também ter lugar em secções de tecido excessivamente fixado em formol. Devem utilizar-se células intactas para a interpretação dos resultados da coloração. As células necróticas ou degeneradas causam muitas vezes uma coloração não específica.³ Podem verificar-se resultados positivos falsos devido à ligação não imunológica de proteínas ou de produtos da reacção do substrato. Esses resultados podem também ser causados por enzimas endógenas tais como a pseudoperoxidase (eritrócitos), a peroxidase endógena (citocromo C), ou a biotina endógena (ex. no fígado, mama, cérebro ou rim) dependendo do tipo de imunocoloração utilizado. Para diferenciar entre a actividade das enzimas endógenas e as ligações não específicas de enzimas de imunoreactividade específica, podem colorir-se tecidos adicionais dos doentes exclusivamente com substrato cromogénio ou com complexos de enzimas (avidina-biotina, estreptavidina, polímero marcado) e substrato-cromogénio, respectivamente. Se ocorrer a coloração específica no controlo de tecido negativo, os resultados dos testes feitos com as amostras do doente devem ser considerados inválidos.

Controlo De Reagente Negativo

Utilizar um controlo de reagente negativo não específico em vez do anticorpo primário com uma secção de cada amostra de doente para avaliar a coloração não específica e permitir uma melhor interpretação da coloração específica no local do antígeno.

Tecido Do Doente

Examinar as amostras do doente coloridas com NCL-L-InhibinA em último lugar. A intensidade da coloração positiva deve ser avaliada dentro do contexto de qualquer coloração não específica de fundo do controlo de reagente negativo. Tal como com qualquer teste imunohistoquímico, um resultado negativo significa que o antígeno não foi detectado, e não que o antígeno se encontrava ausente das células ou tecido analisados. Se necessário, deve utilizar-se um painel de anticorpos para identificar reacções falso-negativas.

Resultados Previstos

Tecidos normais

O clone AMY82 detectou a proteína inibina alfa nas células de Sertoli e de Leydig do testículo, no córtex e medula das supra-renais e na teca interna do ovário. (Número total de casos = 38).

Tecidos tumorais

O clone AMY82 detectou a proteína inibina alfa em 27 dos 105 tecidos de ovário anormais avaliados, incluindo 17/44 tumores benignos de células da teca, 4/6 tumores malignos de células da teca, 2/9 quistos, 3/3 tumores das células granulosas e 1/5 carcinomas de células claras. Não se observou coloração em adenocarcinomas serosos (0/8), adenocarcinomas endometriais (0/6), carcinomas das células de transição (0/5), tumores do saco vitelino (0/4), disgerminomas (0/3), fibromas (0/2), cistadenomas mucinosos (0/2), adenocarcinomas mucinosos (0/2), cistadenocarcinomas mucinosos (0/2), um cistadenocarcinoma seroso (0/1), um cistadenoma papilar seroso (0/1), um tumor de Brenner (0/1) e um tumor mucinoso limfotrofe (0/1). Não foi detectada coloração em vários outros tumores que incluíram carcinomas de células pavimentosas (0/10), tumores da tireóide (0/4), tumores hepáticos (0/4), linfomas (0/3), tumores colo-rectais (0/3), tumores do cérebro (0/2), tumores da mama (0/2), tumores do estômago (0/2), tumores pancreáticos (0/2), tumores do pulmão (0/2), tumores renais (0/2), tumores da próstata (0/2) e tumores metastáticos não especificados (0/2). (Número total de casos = 145).

NCL-L-InhibinA é recomendado para a detecção da inibina alfa em tecidos normais e neoplásicos.

Limitações Gerais

A imunohistoquímica é um processo diagnóstico em múltiplas etapas que consta de: uma formação especializada na selecção dos reagentes apropriados, selecção, fixação e processamento de tecidos, preparação das lâminas de IHQ e interpretação dos resultados das colorações.

A coloração de tecidos depende do seu manuseamento e processamento antes da sua coloração. A fixação, congelação, descongelação, lavagem, secagem, aquecimento ou corte incorrectos das amostras, ou a sua contaminação com outros tecidos ou fluidos, podem produzir artefactos, retenção de anticorpos, ou resultados falso-negativos. Os resultados inconsistentes podem dever-se a variações nos métodos de fixação e envolvimento ou a irregularidades inerentes ao tecido.⁴

Uma contrastação excessiva ou incompleta pode comprometer a correcta interpretação dos resultados.

A interpretação clínica de qualquer coloração ou da sua ausência deve ser complementada por estudos morfológicos empregando os devidos controles e deve ser avaliada por um patologista qualificado, dentro do contexto do historial clínico do doente e de outros testes de diagnóstico.

Os anticorpos da Leica Biosystems Newcastle Ltd destinam-se a serem utilizados, conforme indicado, em secções de tecido ou congeladas ou envolvidas em parafina, com requisitos de fixação específicos. Pode ocorrer uma expressão inesperada de antígeno, especialmente em neoplasmas. A interpretação clínica de qualquer secção de tecido colorido deverá incluir a análise morfológica e a avaliação de controlos apropriados.

Bibliografia – Geral

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29–P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio–Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Robertson D, Burger H and Fuller P. Inhibin/activin and ovarian cancer. Endocrine-Related Cancer. 2004; 11:35–49.
6. Bernard J, Chapman S and Woodruff T. Mechanisms of inhibin signal transduction. Recent Progress in Hormone Research. 2001; 56:417–450.

Emendas Da Edição Anterior

Não aplicável.

Data De Emissão

15 de Abril de 2019

Metodologia de imunohistoquímica para utilização de anticorpos Novocastra™ em tecidos envolvidos em parafina através da técnica de recuperação de epítomos por indução térmica.

Reagentes necessários mas não fornecidos

1. Solventes comuns utilizados em imunohistoquímica.
2. Solução salina a 50 mM com tampão Tris (TBS) pH 7,6.
3. Solução de recuperação de epítomos (ver a secção C Soluções de recuperação de epítomos).
4. Diluente de anticorpos, Novocastra™ IHC Diluent RE7133.
5. Sistema de visualização, Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) ou RE7290-K (50 tests).
6. Meio de montagem – usar conforme recomendado pelo fabricante.

Equipamento necessário mas não fornecido

1. Incubador regulado para 25 °C.
2. Dispositivo de aquecimento para a recuperação de epítomos: banho-maria ou vaporizador, panela de pressão ou outro equipamento de laboratório com controlo da temperatura.
3. Equipamento geral de laboratório de imunohistoquímica.

Soluções de recuperação de epítomos (ver as Recomendações sobre a utilização de um dos seguintes produtos)

RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 L	Tampão à base de citrato contendo um surfactante
RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 mL	
RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 L	
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 L	Tampão à base de EDTA contendo um surfactante
RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 L	
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 L	Tampão à base de Tris/EDTA contendo um tenso-activo
RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 L	

Metodologia

Antes de intentar esta metodologia, o utilizador deve ter recebido a devida formação em técnicas de imunohistoquímica.

O cliente deve determinar quais as fórmulas de diluição ideais para os anticorpos. A não ser indicação em contrário, todas as etapas devem ser efectuadas à temperatura ambiente (25 °C).

Recuperação de epítomos

Aderir às instruções de utilização aplicáveis às Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119 e RE7122.

Visualização

Aderir às instruções de utilização dos Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) ou RE7290-K (50 tests).

Emendas da edição anterior

Não é aplicável.

Data de emissão

23 de abril de 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

Novocastra™ Flytande Monoklonal Musantikrop

Inhibin Alpha

Produktkod: NCL-L-InhibinA

Avsedd Användning

För in vitro diagnostisk användning.

NCL-L-InhibinA är avsedd för kvalitativ identifiering med ljusmikroskopi av Inhibin Alpha-molekyler i paraffinsnitt. Den kliniska tolkningen av all färgning eller dess frånvaro bör kompletteras med morfologiska undersökningar som använder korrekta kontroller och utvärderas av kvalificerad patolog inom ramen för patientens kliniska anamnes och andra diagnostiska tester.

Metodens Princip

Immunhistokemiska (IHC) färgningstekniker tillåter visualisering av antigener genom sekvenstillämpning av en specifik antikropp till antigenet (primär antikropp), en sekundär antikropp till den primära antikroppen och ett enzymkomplex med ett kromogent substrat med inlagda tvättsteg. Den enzymatiska aktiveringen av kromogenet resulterar i en synlig reaktionsprodukt på antigenområdet. Proverna kan då kontrastfärgas och förses med täckglas. Resultaten tolkas med ljusmikroskop och bidrar till differentialdiagnosen av patofysiologiska processer som eventuellt kan associeras till ett särskilt antigen.

Klon

AMY82

Immunogen

Prokaryotiskt rekombinant protein som motsvarar 134 aminosyror i den humana inhibin-alfa-molekylen.

Specifitet

Humana inhibin-alfa-molekylen.

Reagensinnehåll

NCL-L-InhibinA är en flytande supernatant från vävnadsodling som innehåller 15 mM natriumazid som konserveringsmedel.

Ig-klass

IgG1

Total Proteinkoncentration Total Protein

1.0–8.0 g/L. Se flaskans etikett för total specifik proteinkoncentration för satsen.

Antikropps-koncentration

Större än eller lika med 214 mg/L fastställt genom ELISA. Se flaskans etikett för specifik Ig-koncentration för satsen.

Rekommendationer Vid Användning

Immunhistokemi (se **Metodologi**) på paraffinsnitt. Föreslagen spädning: 1:100 i 30 minuter vid 25 °C. Värmeinducerad epitopåtvinnning med Epitope Retrieval Solution pH 6.0 (RE7113 eller RE7114).

Visualisering. Vänligen följ instruktionerna för användning i Novolink™ Polymer Detection Systems RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) eller RE7290-K (50 tests).

Förvaring Och Stabilitet

Förvara vid 2–8 °C. Frys ej. Återgå till 2–8 °C direkt efter användning. Använd ej efter det utgångsdatum som anges på flaskans etikett. Förvaringsförhållanden som skiljer sig från de ovannämnda måste kontrolleras av användaren.

Preparation Av Prov

Rekommenderat fixeringsmedel för paraffininbäddade vävnadssnitt är 10% neutralbuffrat formalin.

Varningar Och Försiktighetsåtgärder

Reagenset har förberetts från supernatanten av vävnadsodlingar. Eftersom det är en biologisk produkt bör skälig försiktighet iaktas vid hantering.

Natriumazidens molaritet i reagenset är 15 mM. Varuinformationsblad (MSDS) för natriumazid finns att få på begäran.

För kassering av potentiellt toxiska komponenter hänvisas till nationella eller lokala bestämmelser.

Före och efter fixering bör prover och alla material som har varit utsatta för dem hanteras som om det finns risk för att de kan överföra infektioner och kasseras med iakttagande av försiktighet.¹ Pipettera aldrig reagenser med munnen och se till att huden och slemhinnorna inte kommer i kontakt med reagens och prover. Om reagens eller prover kommer i kontakt med känsliga områden, tvätta med rikliga mängder vatten. Rådgör med läkare.

Minimera mikrobisk kontaminering av reagens annars kan en ökning av ospecifik färgning ske.

Inkubationstider eller temperaturer som skiljer sig från dem som specificeras kan ge felaktiga resultat. Alla sådana förändringar måste kontrolleras av användaren.

Kvalitetskontroll

Skilnader i vävnadsbehandling och tekniska metoder i användarens laboratorium kan ge stor variation i resultaten vilket kan göra det nödvändigt att genomföra regelbundna interna kontroller utöver följande metoder.

Kontroller bör vara färskas obduktions-/biopsi-/kirurgi prover som snarast möjligt formalinfixeras, bearbetas och paraffinbäddas på samma sätt som patientprover.

Positiv Vävnadskontroll

Används för att ange korrekt förberedda vävnader och rätt färgningstekniker.

En positiv vävnadskontroll bör ingå i varje uppsättning av testförhållanden vid varje färgningskörning.

En vävnad med svag positiv färgning är mer lämplig för optimal kvalitetskontroll och för att upptäcka låga nivåer av reagensdegradering än en vävnad med stark positiv färgning.²

Testikel rekommenderas som positiv kontrollvävnad.

Om den positiva vävnadskontrollen inte uppvisar positiv färgning bör resultat med testproverna anses vara ogiltiga.

Negativ Vävnadskontroll

Bör undersökas efter den positiva vävnadskontrollen för att fastställa specificiteten för märkningen av målantigenet med den primära antikroppen.

Lillhjärnan rekommenderades som negativ kontrollvävnad.

Alternativt ger ofta en mängd olika celltyper som finns i de flesta vävnadssnitt negativa kontrollområden men detta bör kontrolleras av användaren.

Ospecifik färgning, om det förekommer, har ofta ett diffust utseende. Sporadisk färgning av bindväv kan också observeras i snitt från överflödigt formalinfixerade vävnader. Använd intakta celler för tolkning av färgningsresultat. Nekrotiska eller degenererade celler färgar ofta ospecifikt.³ Falskt positiva resultat kan uppstå p.g.a. icke-immunologisk bindning av proteiner eller substratreaktionsprodukter. De kan också orsakas av endogena enzymer som pseudoperoxidas (erythrocyter), endogent peroxid (cytokrom C) eller endogent biotin (t.ex. lever, bröst, hjärna, njure) beroende på typ av immunfärgning som används. För att skilja endogen enzymaktivitet eller ospecifik enzymbindning från specifik immunreaktivitet kan ytterligare patientvävnader färgas exklusivt med respektive substratkromogen eller enzymkomplex (avidin-biotin, streptavidin, märkt polymer) och substrat-kromogen. Om specifik färgning sker i den negativa vävnadskontrollen bör resultat med patientprover anses vara ogiltiga.

Negativ Reagenskontroll

Använd en ospecifik negativ reagenskontroll istället för den primära antikroppen med ett snitt från varje patientprov för att utvärdera ospecifik färgning och tillåta bättre tolkning av specifik färgning på antigenområdet.

Patientvävnad

Undersök patientprover färgade med NCL-L-InhibinA sist. Positiv färgningsintensitet bör utvärderas inom ramen för all ospecifik bakgrunds färgning av den negativa reagenskontrollen. Som vid alla immunhistokemiska tester betyder ett negativt resultat att antigenet inte upptäcktes och inte att det inte förekom i de analyserade cellerna/vävnaderna. Använd vid behov en antikroppspanel för att identifiera falskt negativa reaktioner.

Förväntade Resultat

Normal vävnad

Klon AMY82 detekterade inhibin-alfa-proteinet i testiklarnas Sertoli- och Leydigceller, i binjurarnas bark och märg och äggstockarnas theca interna. (Totalt antal fall = 38).

Tumörvävnader

Klon AMY82 upptäckte inhibin-alfa-proteinet i 27/105 onormala äggstockstumörer som utvärderades, inklusive 17/44 benigna tekacellstumörer, 4/6 maligna tekacellstumörer, 2/9 cystor, 3/3 granulosaacellstumörer och 1/5 klarcellskarcinom. Ingen färgning observerades i serösa adenokarcinom (0/8), endometriala adenokarcinom (0/6), transitionalcellskarcinom (0/5), äggulesäckstumörer (0/4), dysgerminom (0/3), fibrom (0/2), mucinöst cystadenom (0/2), mucinöst adenokarcinom (0/2), mucinöst cystadenokarcinom (0/2), ett seröst cystadenokarcinom (0/1), ett seröst papillärt cystadenom (0/1), en Brenner tumor (0/1) och en mucinös borderline tumör (0/1). Ingen färgning upptäcktes i en mängd ytterligare tumörer, inklusive skvamosa cellkarcinom (0/10), sköldkörteltumörer (0/4), levertumörer (0/4), lymfom (0/3), kolorektala tumörer (0/3), hjärntumörer (0/2), brösttumörer (0/2), magsäckstumörer (0/2), tumörer i bukspottskörtel (0/2), lungtumörer (0/2), njurtumörer (0/2), prostatatumörer (0/2) och ospecificerade metastatiska tumörer (0/2). (Totalt antal fall = 145).

NCL-L-InhibinA rekommenderas för detektion av inhibin-alfa i normala och neoplastiska vävnader.

Allmänna Begränsningar

Immunhistokemi är en diagnostisk process i flera steg som kräver specialiserad utbildning i urvalet av lämpliga reagens, val av vävnad, fixering och bearbetning, förberedelse av IHC-objektglaset samt tolkning av färgningsresultaten.

Vävnadsfärgning påverkas av hantering och bearbetning av vävnaden före färgningen. Felaktig fixering, nedfrysning, upptining, tvättning, torkning, uppvärmning, snittning eller kontaminering av andra vävnader eller vätskor kan framställa artefakter, infångande av antikroppar eller falskt negativa resultat. Motsägelsefulla resultat kan bero på variationer av fixerings- och inbäddningsmetoder eller på naturliga oregelbundenheter i vävnaden.⁴

Överflödigt eller ofullständig kontrastfärgning kan försvåra en korrekt tolkning av resultatet.

Den kliniska tolkningen av all färgning eller dess frånvaro bör kompletteras med morfologiska undersökningar som använder korrekta kontroller och utvärderas av kvalificerad patolog inom ramen för patientens kliniska anamnes och andra diagnostiska tester.

Antikroppar från Leica Biosystems Newcastle Ltd är till för användning så som anges på antingen frysa eller paraffinbäddade snitt med specifika fixeringskrav. Övåntat antigenuttryck kan ske, speciellt i neoplasmer. Morfologisk analys och utvärdering av lämpliga kontroller måste ingå i den kliniska tolkningen av alla färgade vävnadssnitt.

Bibliografi – Allmän

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29–P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio–Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Robertson D, Burger H and Fuller P. Inhibin/activin and ovarian cancer. Endocrine–Related Cancer. 2004; 11:35–49.
6. Bernard J, Chapman S and Woodruff T. Mechanisms of inhibin signal transduction. Recent Progress in Hormone Research. 2001; 56:417–450.

Rättelser Av Tidigare Utgivning

Gäller inte.

Utgivningsdatum

15 april 2019

Immunhistokemisk metodologi för användning av Novocastra™ antikroppar på paraffinbäddad vävnad med hög temperatur epitopåtervinningstekniken.

Reagens som krävs men inte tillhandahålls

1. Standardlösningar som används inom immunhistokemi.
2. 50 mM Tris-buffrad koksaltlösning (TBS) pH 7,6.
3. Epitopåtervinningslösning (se avsnitt C Epitopåtervinningslösningar).
4. Antikroppsutspädningsmedel, Novocastra™ IHC Diluent, RE7133.
5. Visualiseringssystem, Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) eller RE7290-K (50 tester).
6. Monteringsmedel – bered enligt tillverkarens rekommendationer.

Utrustning som krävs men inte tillhandahålls

1. Inkubator inställd på 25 °C.
2. Uppvärmningsapparat för epitopåtervinning: vattenbad eller förångare, tryckkokare eller annan temperaturkontrollerad laboratorieutrustning.
3. Allmän immunhistokemisk laboratorieutrustning.

Epitopåtervinningslösningar (se Rekommendationer för användning för en av följande)

RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 L	Citratbaserad buffert innehållande ytaktivt medel
RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 mL	
RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 L	
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 L	EDTA baserad buffert innehållande ytaktivt medel
RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 L	
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 L	Tris/EDTA baserad buffert innehållande ytaktivt medel
RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 L	

Metodologi

Innan metoden tillämpas måste användarna vara utbildade i immunhistokemiska tekniker.

Kunder bör fastställa optimal spädning för antikroppar. Om inte annat anges utförs alla steg vid rumstemperatur (25 °C).

Epitopåtervinning

Vänligen följ instruktionerna för användning i Epitope Retrieval Solutions, RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119, RE7122.

Visualisering

Vänligen följ instruktionerna för användning i Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) eller RE7290-K (50 tests).

Rättelser av tidigare utgivning

Inte tillämpligt.

Utgivningsdatum

23 April 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink)

Novocastra™ Υγρό Μονοκλωνικό Αντίσωμα Ποντικού

Inhibin Alpha

Κωδικός είδους: NCL-L-InhibinA

Χρήση Για Την Οποία Προορίζεται

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση.

Το NCL-L-InhibinA προορίζεται για την ποιοτική ταυτοποίηση με μικροσκοπία φωτός της ανθρώπινης Μόρια Inhibin Alpha σε τομές παραφίνης. Η κλινική ερμηνεία οποιασδήποτε χρώσης ή της απουσίας της θα πρέπει να συμπληρώνεται με μορφολογικές μελέτες που χρησιμοποιούν αμύωντες μάρτυρες και θα πρέπει να αξιολογείται στα πλαίσια του κλινικού ιστορικού του ασθενούς και άλλων διαγνωστικών εξετάσεων από ειδικευμένο παθολογοανατόμο.

Αρχή Της Διαδικασίας

Οι τεχνικές ανοσοϊστοχημικής (IHC) χρώσης επιτρέπουν την οπτικοποίηση των αντιγόνων μέσω της διαδοχικής εφαρμογής ενός ειδικού αντισώματος στο αντιγόνο (πρωτοταγές αντίσωμα), ενός δευτεροταγούς αντισώματος στο πρωτοταγές αντίσωμα και ενός ενζυμικού συμπλόκου με χρωμογόνο υπόστρωμα με παρεμβαλλόμενα βήματα πλύσης. Η ενζυμική ενεργοποίηση του χρωμογόνου έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός ορατού προϊόντος αντίδρασης στη θέση του αντιγόνου. Το δείγμα μπορεί κατόπιν να υποβληθεί σε αντίχρωση και να καλυφθεί με καλυπτρίδα. Τα αποτελέσματα ερμηνεύονται με χρήση μικροσκοπίου φωτός και βοηθούν στη διαφορική διάγνωση παθοφυσιολογικών εξεργασιών, οι οποίες ενδέχεται ή όχι να σχετίζονται με ένα συγκεκριμένο αντιγόνο.

Κλώνος

AMY82

Ανοσογόνο

Προκαρνωτική ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη που αντιστοιχεί σε 134 αμινοξέα του μορίου της ανθρώπινης ανασταλίνης άλφα.

Ειδικότητα

Ανθρώπινη ανασταλίνη άλφα.

Σύνθεση Αντιδραστήριου

Το NCL-L-InhibinA είναι ένα υγρό υπερκείμενο ιστοκαλλιέργειας που περιέχει 15 mM αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό.

Τάξη Ig

IgG1

Ολική Συγκέντρωση Πρωτεΐνης

Total Protein

1.0–8.0 g/L. Για την ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης που είναι ειδική για την εκάστοτε παρτίδα, ανατρέξτε στην ετικέτα του φιαλιδίου.

Συγκέντρωση Αντισώματος

Μεγαλύτερη ή ίση με 214 mg/L, όπως προσδιορίζεται με ELISA. Για τη συγκέντρωση Ig που είναι ειδική για την εκάστοτε παρτίδα, ανατρέξτε στην ετικέτα του φιαλιδίου.

Συστάσεις Για Τη Χρήση

Ανοσοϊστοχημεία (δείτε την **Μεθοδολογία**) σε τομές παραφίνης. Προτεινόμενη αραίωση: 1:100 επί 30 λεπτά στους 25 °C. Θερμικά επαγόμενη ανάκτηση επιτόπου με χρήση Epitope Retrieval Solution pH 6.0 (RE7113 ή RE7114).

Απεικόνιση. Παρακαλούμε ακολουθήστε τις οδηγίες χρήσης στο Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280–K (1250 tests), RE7150–K (500 tests), RE7140–K (250 tests) ή RE7290–K (50 tests).

Φύλαξη Και Σταθερότητα

Φυλάσσετε στους 2–8 °C. Μην καταψύχετε. Επαναφέρετε στους 2–8 °C αμέσως μετά τη χρήση. Μην χρησιμοποιείτε μετά την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα του φιαλιδίου. Τυχόν συνθήκες φύλαξης διαφορετικές από εκείνες που καθορίζονται παραπάνω πρέπει να επαληθεύονται από το χρήστη.

Παρασκευή Δείγματος

Το συνιστώμενο μονιμοποιητικό είναι ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φορμόλης 10% για τομές ιστού εγκλεισμένες σε παραφίνη.

Προειδοποιήσεις Και Προφυλάξεις

Το αντιδραστήριο αυτό έχει παρασκευαστεί από το υπερκείμενο κυτταροκαλλιέργειας. Επειδή είναι βιολογικό προϊόν, θα πρέπει να δίνεται εύλογη προσοχή κατά το χειρισμό του.

Η μοριακότητα του αζιδίου του νατρίου στο αντιδραστήριο αυτό είναι 15 mM. Κατόπιν αιτήματος, διατίθεται ένα δελτίο δεδομένων ασφαλείας υλικού (MSDS) για το αζίδιο του νατρίου.

Συμβουλευτείτε τους ομοσπονδιακούς, πολιτειακούς ή τοπικούς κανονισμούς για απόρριψη τυχόν δυνητικών τοξικών συστατικών.

Ο χειρισμός δειγμάτων, πριν και μετά τη μονιμοποίηση, καθώς και όλων των υλικών που έχουν εκτεθεί σε αυτά, θα πρέπει να γίνεται ως εάν ήταν δυνητικά μετάδοσης λοίμωξης και η απόρριψή τους να πραγματοποιείται λαμβάνοντας τις σωστές προφυλάξεις.¹ Μην αναρροφάτε ποτέ με πιπέτα αντιδραστήρια με το στόμα και αποφύγετε την επαφή του δέρματος και των βλεννογόνων με αντιδραστήρια και δείγματα. Εάν τα αντιδραστήρια ή τα δείγματα έλθουν σε επαφή με ευαίσθητες περιοχές, πλύνετε με άφθονες ποσότητες νερού. Ζητήστε τη συμβουλή του γιατρού.

Ελαχιστοποιήστε τη μικροβιακή μόλυνση των αντιδραστηρίων, διότι ενδέχεται να συμβεί αύξηση μη ειδικής χρώσης.

Χρόνοι ή θερμοκρασίες επώασης διαφορετικές από εκείνες που καθορίζονται ενδέχεται να δώσουν εσφαλμένα αποτελέσματα. Τυχόν τέτοιες μεταβολές πρέπει να επικυρώνονται από το χρήστη.

Ποιοτικός Έλεγχος

Τυχόν διαφορές στην επεξεργασία των ιστών και τις τεχνικές διαδικασίες στο εργαστήριο του χρήστη ενδέχεται να προκαλέσουν σημαντική μεταβλητότητα στα αποτελέσματα, καθιστώντας αναγκαία την τακτική εκτέλεση εσωτερικών ελέγχων επιπλέον των ακόλουθων διαδικασιών.

Οι μάρτυρες θα πρέπει να είναι φρέσκα δείγματα νεκροψιας/βιοψίας/χειρουργικά δείγματα, τα οποία είναι μονιμοποιημένα σε φορμόλη, επεξεργασμένα και εγκλεισμένα σε κηρό παραφίνης, το συντομότερο δυνατό με τον ίδιο τρόπο με το(α) δείγμα(τα) του ασθενούς.

Θετικός Μάρτυρας Ιστού

Χρησιμοποιείται για να υποδεικνύει σωστά παρασκευασμένους ιστούς και σωστές τεχνικές χρώσης.

Θα πρέπει να περιλαμβάνεται ένας θετικός μάρτυρας ιστού για κάθε σύνολο συνθηκών εξέτασης σε κάθε εκτέλεση χρώσης.

Ένας ιστός με ασθενή θετική χρώση είναι πιο κατάλληλος από έναν ιστό με ισχυρή ειδική χρώση για βέλτιστο έλεγχο ποιότητας και για την ανίχνευση πολύ μικρών επιπέδων τυχόν αποδόμησης των αντιδραστηρίων.²

Ο συστατώμενος ιστός θετικού μάρτυρα είναι ο όρχης.

Εάν ο θετικός μάρτυρας ιστού δεν παρουσιάζει θετική χρώση, τα αποτελέσματα με τα δείγματα της εξέτασης θα πρέπει να θεωρούνται άκυρα.

Αρνητικός Μάρτυρας Ιστού

Θα πρέπει να εξετάζεται μετά τον θετικό μάρτυρα ιστού για την επαλήθευση της ειδικότητας της επισημάνσης του αντιγόνου-στόχου από το πρωτοταγές αντισώμα.

Ο συστατώμενος ιστός αρνητικού μάρτυρα είναι η παρεγκεφαλίδα.

Εναλλακτικά, η ποικιλία διαφόρων κυτταρικών τύπων που υπάρχουν στις περισσότερες τομές ιστών παρέχει συχνά θέσεις αρνητικού μάρτυρα, αλλά αυτό πρέπει να επαληθεύεται από το χρήστη.

Μη ειδική χρώση, εάν υπάρχει, έχει συνήθως διάχυτη εμφάνιση. Ενδέχεται επίσης να παρατηρηθεί σποραδική χρώση του συνδεδεμένου ιστού σε τομές από ιστούς που έχουν μονιμοποιηθεί με υπερβολική ποσότητα φορμόλης. Χρησιμοποιείτε άβικτα κύτταρα για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της χρώσης. Νεκρωτικά ή εκφυλισμένα κύτταρα παρουσιάζουν συχνά μη ειδική χρώση.³ Ενδέχεται να παρατηρηθούν ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω μη ανοσολογικής δέσμευσης των πρωτεϊνών ή των προσόντων αντίδρασης του υποστρώματος. Ενδέχεται επίσης να προκληθούν από ενδογενή ένζυμα, όπως η ψευδοπυροξείδωση (ερυθροκύτταρα), η ενδογενής υπεροξειδωση (κυτόχρωμα C) ή η ενδογενής βιοτίνη (π.χ. ήπαρ, μαστός, εγκέφαλος, νεφρός) ανάλογα με τον τύπο ανσοχρόσης που χρησιμοποιείται. Για τη διαφοροποίηση της ενδογενούς ενζυμικής δραστηριότητας ή της μη ειδικής δέσμευσης των ενζύμων από ειδική ανσοαντιδραστικότητα, είναι δυνατό να χρωματιστούν αποκλειστικά επιπλέον ιστού ασθενών με χρωμογόνο υποστρώματος ή ενζυμικά σύμπλοκα (αβιδίνη-βιοτίνη, στρεπταβιδίνη, σημασμένο πολυμερές) και υπόστρωμα-χρωμογόνο, αντίστοιχα. Εάν παρουσιαστεί ειδική χρώση στον αρνητικό μάρτυρα ιστού, τα αποτελέσματα με τα δείγματα ασθενούς θα πρέπει να θεωρούνται άκυρα.

Αρνητικός Μάρτυρας Αντιδραστηρίου

Χρησιμοποιείτε έναν μη ειδικό αρνητικό μάρτυρα αντιδραστηρίου αντί του πρωτοταγούς αντισώματος με μια τομή κάθε δείγματος ασθενούς για την αξιολόγηση μη ειδικής χρώσης και για να επιτρέπεται καλύτερη ερμηνεία της ειδικής χρώσης στη θέση του αντιγόνου.

Ιστός Ασθενούς

Εξέταστε τελευταία τα δείγματα ασθενούς που έχουν χρωματιστεί με το NCL-L-InhibinA. Η ένταση της θετικής χρώσης θα πρέπει να εκτιμάται στα πλαίσια ιστών μη ειδικής χρώσης υποβάθρου του αρνητικού μάρτυρα αντιδραστηρίου. Όπως συμβαίνει με οποιαδήποτε ανοσοϊστοχημική εξέταση, ένα αρνητικό αποτέλεσμα σημαίνει ότι το αντιγόνο δεν ανιχνεύτηκε, όχι ότι το αντιγόνο δεν υπήρχε στα κύτταρα/στον ιστό που εξετάστηκε. Εάν είναι απαραίτητο, χρησιμοποιήστε μια σειρά αντισώματος για την αναγνώριση ψευδώς αρνητικών αντιδράσεων.

Αναμενόμενα Αποτελέσματα

Φυσιολογικοί ιστοί

Ο κλώνος AMY82 ανίχνευσε την πρωτεΐνη ανασταλτίνης άλφα σε κύτταρα Sertoli και Leydig του όρχηως, στον φλοιό και το μυελό του επινεφριδίου και στην εσωτερική θήκη της ωοθήκης. (Συνολικός αριθμός περιπτώσεων = 38).

Καρκινικοί ιστοί

Ο κλώνος AMY82 ανίχνευσε την πρωτεΐνη ανασταλτίνης άλφα σε 27/105 ανώμαλους ωοθηκικούς ιστούς που αξιολογήθηκαν συμπεριλαμβανομένων 17/44 καλοήθων όγκων κυττάρων θήκης, 4/6 κακοήθων όγκων κυττάρων θήκης, 2/9 κύστεων, 3/3 όγκων κοκκιδώδων κυττάρων και 1/5 καρκινωμάτων διαγυκοκυτταρικών κυττάρων. Δεν παρατηρήθηκε χρώση σε ορώδες αδενοκαρκίνωμα (0/8), ενδομητριοειδές αδενοκαρκίνωμα (0/6), καρκίνωμα εκ μεταβατικών κυττάρων (0/5), όγκους λεκθικού ασκού (0/4), δυσεργινώμα (0/3), ίνωμα (0/2), βλεννώδες κυσταδένωμα (0/2), βλεννώδες αδενοκαρκίνωμα (0/2), βλεννώδες κυσταδενοκαρκίνωμα (0/2), ένα ορώδες κυσταδενοκαρκίνωμα (0/1), ένα ορώδες θηλώδες κυσταδένωμα (0/1), έναν όγκο Brenner (0/1) και έναν βλεννώδη όγκο οριακής κακοήθειας (0/1). Δεν ανιχνεύτηκε χρώση σε μια ποικιλία πρόσθετων όγκων, οι οποίοι συμπεριλαμβάνουν καρκινώματα εκ πλακιδώδων κυττάρων (0/10), θυροειδικούς όγκους (0/4), ηπατικούς όγκους (0/4), λεμφώματα (0/3), όγκους στο ορθό και το κόλον (0/3), όγκους εγκέφαλου (0/2), όγκους μαστού (0/2), όγκους στομάχου (0/2), παγκρεατικούς όγκους (0/2), πνευμονικούς όγκους (0/2), νεφρικούς όγκους (0/2), όγκους προστάτη (0/2) και προσθιόρριστους μεταστατικούς όγκους (0/2). (Συνολικός αριθμός περιπτώσεων = 145).

Το NCL-L-InhibinA συνιστάται για την ανίχνευση της ανασταλτίνης άλφα σε φυσιολογικούς και νεοπλασματικούς ιστούς.

Γενικοί Περιορισμοί

Η ανοσοϊστοχημεία είναι μια διαγνωστική διεργασία πολλαπλών βημάτων, η οποία αποτελείται από ειδικευμένη εκπαίδευση στην επιλογή των κατάλληλων αντιδραστηρίων, επιλογή ιστού, μονιμοποίηση και επεξεργασία, προετοιμασία της πλάκας IHC και ερμηνεία των αποτελεσμάτων της χρώσης.

Η χρώση του ιστού εξαρτάται από το χειρισμό και την επεξεργασία του ιστού πριν από τη χρώση. Τυχόν εσφαλμένη μονιμοποίηση, κατάψυξη, αποψύξη, πλύση, στέγνωμα, θέρμανση, τομή ή μόλυνση με άλλους ιστούς ή υγρά ενδέχεται να παράγει μορφώματα, παγίδευση αντισώματος ή ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Τυχόν ασυνήθιστα αποτελέσματα ενδέχεται να οφείλονται σε παραλλαγές των μεθόδων μονιμοποίησης και εγκλεισμού ή σε εγγενείς ανωμαλίες εντός του ιστού.⁴

Τυχόν υπερβολική ή ατελής αντίχρωση ενδέχεται να διακυβεύσει τη σωστή ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Η κλινική ερμηνεία οποιασδήποτε χρώσης ή της απουσίας της θα πρέπει να συμπληρώνεται με μορφολογικές μελέτες που χρησιμοποιούν σωστούς μάρτυρες και θα πρέπει να αξιολογείται στα πλαίσια του κλινικού ιστορικού του ασθενούς και άλλων διαγνωστικών εξετάσεων από ειδικευμένο παθολογολογικό.

Τα αντισώματα που παρέχονται από την Leica Biosystems Newcastle Ltd προορίζονται για χρήση, όπως υποδεικνύεται, είτε σε κατεψυγμένες είτε σε εγκλεισμένες σε παραφίνη τομές, με ειδικές απαιτήσεις μονιμοποίησης. Ενδέχεται να παρουσιαστεί μη αναμενόμενη έκφραση αντιγόνου, ειδικά σε νεοπλασμάτα. Η κλινική ερμηνεία οποιασδήποτε χρωματισμένης τομής ιστού πρέπει να περιλαμβάνει μορφολογική ανάλυση και την αξιολόγηση των κατάλληλων μαρτύρων.

Βιβλιογραφία – Γενική

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Robertson D, Burger H and Fuller P. Inhibin/activin and ovarian cancer. Endocrine-Related Cancer. 2004; 11:35–49.
6. Bernard J, Chapman S and Woodruff T. Mechanisms of inhibin signal transduction. Recent Progress in Hormone Research. 2001; 56:417–450.

Τροποποιήσεις Στην Προηγούμενη Έκδοση

Δεν έχει εφαρμογή

Ημερομηνία Έκδοσης

15 Απριλίου 2019

Μεθοδολογία ανοσοϊστοχημείας για χρήση αντισωμάτων Novocastra™ σε ιστό εγκλεισμένο σε παραφίνη με χρήση της τεχνικής θερμικά επαγόμενης ανάκτησης επιτόπου.

Αντιδραστήρια που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

1. Πρότυποι διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην ανοσοϊστοχημεία
2. 50 mM αλατούχου ρυθμιστικού διαλύματος Tris (TBS) με pH 7,6.
3. Διάλυμα ανάκτησης επιτόπου (δείτε την ενότητα Γ)
4. Αραιωτικό αντισώματος, Novocastra™ IHC Diluent, RE7133.
5. Σύστημα απεικόνισης, Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) ή RE7290-K (50 tests).
6. Μέσο στερέωσης – χρησιμοποιείτε σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.

Εξοπλισμός που απαιτείται αλλά δεν παρέχεται

1. Θάλαμος επώασης ρυθμισμένος στους 25 °C.
2. Συσκευή θέρμανσης για ανάκτηση επιτόπου: υδατόλουτρο ή συσκευή ατμού, ατμοκλίβανος ή άλλος εργαστηριακός εξοπλισμός ελεγχόμενης θερμοκρασίας.
3. Γενικός εργαστηριακός εξοπλισμός ανοσοϊστοχημείας.

Διαλύματα ανάκτησης επιτόπου (δείτε την ενότητα “Συστάσεις για τη χρήση” για ένα από τα ακόλουθα)

RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 L	Ρυθμιστικό διάλυμα με βάση κιτρικά που περιέχει επιφανειοδραστικό παράγοντα
RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 mL	
RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 L	Ρυθμιστικό διάλυμα με βάση το EDTA που περιέχει επιφανειοδραστικό παράγοντα
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 L	
RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 L	
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 L	Ρυθμιστικό διάλυμα με βάση το Tris/EDTA που περιέχει επιφανειοδραστικό παράγοντα
RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 L	

Μεθοδολογία

Πριν από την εφαρμογή της μεθοδολογίας αυτής, οι χρήστες πρέπει να εκπαιδευτούν σε ανοσοϊστοχημικές τεχνικές.

Οι πελάτες θα πρέπει να προσδιορίσουν τις βέλτιστες αραιώσεις για αντισώματα. Εκτός εάν υποδεικνύεται διαφορετικά, όλα τα βήματα εκτελούνται σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C).

Ανάκτηση επιτόπου

Παρακαλούμε ακολουθήστε τις οδηγίες χρήσης στα Epitope Retrieval Solutions, RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119, RE7122.

Απεικόνιση

Παρακαλούμε ακολουθήστε τις οδηγίες χρήσης στα Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) ή RE7290-K (50 tests).

Τροποποιήσεις στην προηγούμενη έκδοση

Δεν έχει εφαρμογή.

Ημερομηνία έκδοσης

23 Απρίλιος 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

Novocastra™ Væskeformigt Monoklonalt Museantistof Inhibin Alpha Produktkode: NCL-L-InhibinA

Tilsigtet Anvendelse

Til in vitro diagnostisk anvendelse.

NCL-L-InhibinA er beregnet til kvalitativ identifikation af Inhibin Alpha-molekyler i paraffinsnit ved lysmikroskopi. Klinisk fortolkning af farvning eller mangel derpå skal suppleres med morfologiske undersøgelser under anvendelse af passende kontroller og bør evalueres i sammenhæng med patientens kliniske historie og andre diagnostiske tests af en kvalificeret patolog.

Procedureprincip

Immunhistokemiske (IHC) farvningsteknikker muliggør visualisering af antigener via sekventiel tilsætning af et specifikt antistof mod antigenet (primært antistof), et sekundært antistof mod det primære antistof og et enzym kompleksbundet til et kromogent substrat med indskudte vasketrin. Den enzymatiske aktivering af kromogenet resulterer i et synligt reaktionsprodukt på antigenstedet. Prøven kan derefter kontrastfarves og dækkes med et dækglas. Resultaterne fortolkes ved anvendelse af et lysmikroskop og medvirker til differential diagnose af patofysiologiske processer, som muligvis kan være associeret med et bestemt antigen.

Klon

AMY82

Immunogen

Prokaryot rekombinant protein svarende til 134 aminosyrer fra det humane inhibin- α -molekyle.

Specifitet

Humane inhibin- α -molekyle.

Reagenssammensætning

NCL-L-InhibinA er en flydende vævskultursupernatant indeholdende 15 mM natriumazid som konserveringsmiddel. Confirm

Ig-klasse

IgG1

Totalproteinkoncentration

Total Protein

1.0–8.0 g/L. Se etiketten på hætteflasken for lotspecifik totalproteinkoncentration.

Antistofkoncentration

Større end eller lig med 214 mg/L som bestemt ved ELISA. Se etiketten på hætteflasken for lotspecifik Ig-koncentration.

Anbefalinger Vedrørende Anvendelse

Immunhistokemi (se **Metodologi**) på paraffinsnit. Foreslået fortynding: 1:100 ved 30 minutter ved 25 °C. Varmeinduceret epitopgenfindning ved brug af Epitope Retrieval Solution pH 6.0 (RE7113 eller RE7114).

Visualisering. Følg venligst vejledningen i Novolink™ Polymer Detection Systems RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) eller RE7290-K (50 tests).

Opbevaring Og Holdbarhed

Opbevares ved 2–8 °C. Må ikke fryses. Sættes tilbage til 2–8 °C umiddelbart efter brug. Må ikke anvendes efter udløbsdatoen angivet på hætteflaskens etikette. Andre opbevaringsbetingelser end de ovenfor angivne skal verificeres af brugeren.

Prøveklargøring

Det anbefalede fiksativ er 10% neutralbufferjusteret formalin til paraffinindstøbte vævssnit.

Advarsler Og Forholdsregler

Dette reagens er fremstillet ud fra supernatanten af en cellekultur. Da det er et biologisk produkt, skal der tages fornuftige sikkerhedsforanstaltninger ved dets håndtering.

Molariteten af natriumazid i dette reagens er 15 mM. Der kan efter anmodning leveres et datablad for materialesikkerhed (MSDS) for natriumazid.

Konsulter landsdækkende og lokale love og regler vedrørende bortskaffelse af alle potentielt toksiske komponenter.

Prøver skal før og efter fiksering, lige som alle materialer eksponeret mod prøverne, håndteres som potentielt smittefarlige og bortskaffes under iagttagelse af passende forholdsregler¹. Pipetter aldrig reagenser med munden og undgå, at reagenser og prøver kommer i kontakt med huden eller slimhinder. Hvis reagenser eller prøver kommer i kontakt med følsomme områder, skal der skylles efter med rigelige mængder vand. Søg læge.

Minimer mikrobiel kontaminering af reagenserne, da der ellers kan forekomme øget uspecifik farvning.

Inkubationstider eller –temperaturer andre end de specificerede kan give fejlagtige resultater. Alle sådanne ændringer skal valideres af brugeren.

Kvalitetskontrol

Forskelle i behandlingen af væv og forskelle i tekniske procedurer i brugerens laboratorium kan frembringe betydeligt varierende resultater og nødvendiggøre regelmæssig udførelse af kontroller på stedet ud over nedenstående procedurer.

Kontrollerne skal være friske autopsier/biopsier/kirurgiske prøver fikseret i formalin og behandlet og indstøbt i paraffin så hurtigt som muligt på samme måde som patientprøver.

Positiv Vævskontrol

Anvendes til påvisning af, at vævet er fremstillet korrekt, og at der er anvendt korrekte farvningssteknikker.

Der bør inkluderes en positiv vævskontrol for hvert sæt testbetingelser i hver farvekørsel.

Svagt positivt farvet væv er mere egnet end kraftigt positivt farvet væv til optimal kvalitetskontrol og påvisning af små niveauer af reagensnedbrydning.²

Anbefalet positivt kontrolvæv er testis.

Hvis den positive vævskontrol ikke udviser positiv farvning, skal resultater af testprøverne kasseres.

Negativ Vævskontrol

Skal undersøges efter den positive vævskontrol for at sikre, at det primære antistof mærker målantigenet specifikt.

Anbefalet negativt kontrolvæv er cerebellum.

Alternativt frembyder de mange forskellige celletyper, der er til stede i de fleste vævssnit, ofte negative kontrolsteder, men dette skal verificeres af brugeren.

Uspecifik farvning har, hvis til stede, ofte et diffus udseende. Sporadisk farvning af bindevæv kan ligeledes observeres i vævssnit af væv, der er fikseret for kraftigt i formalin. Anvend intakte celler til fortolkning af farvningsresultaterne. Nekrotiske eller degenererede celler farves ofte mere uspecifikt.³ Der kan eventuelt ses falske positive resultater, der skyldes non-immunologisk binding af proteiner eller substratreaktionsprodukter. Dette kan ligeledes skyldes endogene enzymer, såsom pseudoperoxidase (erythrocytter), endogen peroxidase (cytochrom C) eller endogent biotin (f.eks. lever, bryst, hjerne, nyre) afhængigt af den anvendte type immunfarve. For at differentiere mellem endogen enzymaktivitet eller uspecifik enzymbinding og specifik immunreaktivitet kan yderligere patientvæv eventuelt farves udelukkende med henholdsvis substratkromogen eller enzymkomplekser (avidin-biotin, streptavidin, mærket polymer) og substratkromogen. Hvis der optræder specifik farvning i den negative vævskontrol, skal resultaterne af patientprøverne kasseres.

Negativ Reagenskontrol

Anvend en uspecifik negativ reagenskontrol i stedet for det primære antistof på et vævssnit af hver patientprøve for at vurdere uspecifik farvning og muliggøre bedre fortolkning af specifik farvning på antigenstedet.

Patientvæv

Eksaminer patientprøver farvet med NCL-L-InhibinA sidst. Intensiteten af positiv farvning bør vurderes i sammenhæng med eventuel uspecifik baggrundsfarvning af den negative reagenskontrol. Som med alle immunhistokemiske tests betyder et negativt resultat, at antigenet ikke blev påvist. Ikke at antigenet var fraværende i de analyserede celler eller det analyserede væv. Om nødvendigt anvendes et panel af antistoffer til identifikation af falske negative reaktioner.

Forventede Resultater

Normalt væv

Klon AMY82 påviste inhibin-alfa-proteinet i Sertoli- og Leydig-celler fra testis, i cortex og marv fra binyrekirtlen og ovarierens theca interna. (Antal tilfælde i alt = 38).

Tumorvæv

Klon AMY82 påviste inhibin-alfa-proteinet i 27/105 unormale ovarievæv inklusive 17/44 benigne thecacelletumorer, 4/6 maligne thecacelletumorer, 2/9 cyster, 3/3 granuloscacelletumorer og 1/5 klare cellectinomer. Der blev ikke observeret farvning i serøse adenocarcinomer (0/8), endometrie adenocarcinomer (0/6), transitionscellectinomer (0/5), blommesæktumorer (0/4), dysgerminomer (0/3), fibromer (0/2), mucinøse cystadenomer (0/2), mucinøse adenocarcinomer (0/2), mucinøse cystadenocarcinomer (0/2), et serøst cystadenocarcinom (0/1), et serøst papillært cystadenom (0/1), en Brenner-tumor (0/1) og en mucinøs borderline-tumor (0/1). Der blev ikke påvist farvning i en række forskellige tumorer inklusive pladecellectinomer (0/10), thyreoideatumorer (0/4), levertumorer (0/4), lymfomer (0/3), coloretale tumorer (0/3), hjernetumorer (0/2), brysttumorer (0/2), mavetumorer (0/2), pankreastumorer (0/2), lungtumorer (0/2), nyretumorer (0/2), prostatatumorer (0/2) og uspecificerede metastaserende tumorer (0/2). (Antal tilfælde i alt = 145).

NCL-L-InhibinA anbefales anvendt til påvisning af inhibin alfa i normalt og neoplastisk væv.

Generelle Begrænsninger

Immunhistokemi er en diagnostisk proces bestående af mange trin, der omfatter specialiseret uddannelse i valg af passende reagenser, vævsselektion, -fiksering og -behandling samt fremstilling af IHC-objektglas og fortolkning af farvningsresultaterne.

Vævsfarvning er afhængig af håndteringen og behandlingen af vævet inden farvning. Forkert fiksering, frysning, optøning, vask, tørring, opvarmning, sektionering eller kontaminering med andet væv eller andre væsker kan frembringe artefakter, indfangning af antistof eller falske negative resultater. Inkonsistente resultater kan skyldes variationer i fikserings- og indstøbningsmetoder eller irregulariteter indeholdt i vævet.⁴

For kraftig eller ukomplet kontrastfarvning kan gøre korrekt fortolkning af resultaterne vanskelig.

Klinisk fortolkning af farvning eller mangel derpå skal suppleres med morfologiske undersøgelser under anvendelse af passende kontroller og bør evalueres i sammenhæng med patientens kliniske historie og andre diagnostiske tests af en kvalificeret patolog.

Antistoffer fra Leica Biosystems Newcastle Ltd er som angivet beregnet til anvendelse på enten frosne eller paraffinindstøbte vævssnit med specifikke krav til fiksering. Der kan forekomme uventet antigenekspresion, navnlig i neoplasmer. Den kliniske fortolkning af alle farvede vævssnit skal indbefatte morfologisk analyse og evaluering af passende kontroller.

Bibliografi – Generelt

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29–P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio–Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Robertson D, Burger H and Fuller P. Inhibin/activin and ovarian cancer. Endocrine–Related Cancer. 2004; 11:35–49.
6. Bernard J, Chapman S and Woodruff T. Mechanisms of inhibin signal transduction. Recent Progress in Hormone Research. 2001; 56:417–450.

Rettelser Til Tidligere Udgave

Ingen rettelser.

Udgivelsesdato

15 april 2019

Immunhistokemisk fremgangsmåde til anvendelse af Novocastra™ antistoffer på paraffinindstøbte væv ved anvendelse af varmeinduceret epitopgenfindingssteknik.

Nødvendige reagenser, der ikke medfølger

1. Standardopløsningsmidler anvendt i immunhistokemi
2. 50 mM tris–bufferjusteret saltvandsopløsning (TBS) pH 7,6
3. Epitopgenfindingsopløsning (se afsnit C Antigengendfindingsopløsninger).
4. Antistofdiluent, Novocastra™ IHC Diluent, RE7133.
5. Visualiseringssystem, Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280–K (1250 tests), RE7150–K (500 tests), RE7140–K (250 tests) eller RE7290–K (50 tests).
6. Monteringsmedium – fremstilles ifølge producentens anbefalinger.

Nødvendigt udstyr, der ikke medfølger

1. Inkubator sat til 25 °C.
2. Opvarmningsapparat til epitopgenfinding: vandbad eller dampbad, trykkoger eller andet temperaturkontrolleret laboratorieudstyr.
3. Almindeligt laboratorieudstyr til immunhistokemi.

Antigengendfindingsopløsninger (se Anbefalinger vedrørende anvendelse for en af følgende)

RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 L	Citratbaseret buffer indeholdende overfladeaktivt middel
RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 mL	
RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 L	
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 L	EDTA–baseret buffer indeholdende overfladeaktivt middel
RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 L	
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 L	Tris/EDTA–baseret buffer indeholdende overfladeaktivt middel
RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 L	

Fremgangsmåde

Inden ibrugtagning af denne metodologi, skal brugere være oplært i immunhistokemiske teknikker.

Kunden skal fastlægge optimale fortyndinger for antistoffer. Med mindre andet er anført, skal alle trin udføres ved stuetemperatur (25 °C).

Epitopgenfinding

Følg venligst vejledningen i Epitope Retrieval Solutions, RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119, RE7122.

Visualisering

Følg venligst vejledningen i Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280–K (1250 tests), RE7150–K (500 tests), RE7140–K (250 tests) eller RE7290–K (50 tests).

Rettelser til tidligere udgave

Ingen rettelser.

Udgivelsesdato

23 April 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

Novocastra™ vloeibaar monoklonaal muisantilichaam

Inhibin Alpha

Productcode: NCL-L-InhibinA

Beoogd gebruik

Voor gebruik bij *in-vitro*diagnostiek

NCL-L-InhibinA is bedoeld voor de kwalitatieve identificatie, door middel van lichtmicroscopie, van inhibine-alfa-moleculen in paraffinecoupes. De klinische interpretatie van elke kleuring of het ontbreken hiervan moet worden aangevuld door morfologische studies met de juiste controles en moet binnen de context van de klinische voorgeschiedenis van de patiënt en andere diagnostische tests worden geëvalueerd door een bevoegd patholoog.

Principe van de procedure

Immunohistochemische (IHC) kleuringstechnieken maken het mogelijk om antigenen te visualiseren via de sequentiële toepassing van een specifiek antilichaam op het antigeen (primair antilichaam), een secundair antilichaam op het primaire antilichaam en een enzymcomplex met een chromogeen substraat met ingevoegde wasstappen. De enzymatische activering van het chromogeen resulteert in een zichtbaar reactieproduct op de antigeenplaats. Het monster kan dan worden tegengekleurd en met een dekglasje worden bedekt. De resultaten worden geïnterpreteerd met behulp van een lichtmicroscop en helpen bij de differentiële diagnose van pathofysiologische processen, die al dan niet met een bepaald antigeen kunnen worden geassocieerd.

Kloon

AMY82

Immunogeen

Prokaryotisch recombinant eiwit dat overeenkomt met 134 aminozuren van het inhibine-alfa-molecuul.

Specificiteit

Humaan inhibine-alfa.

Reagenssamenstelling

NCL-L-InhibinA is een vloeibaar supernatant van weefselkweek dat 15 mM natriumazide bevat als conserveringsmiddel.

Ig-klasse

IgG1

Totale eiwitconcentratie

Total Protein

1,0–8,0 g/l. Zie het etiket van de flacon voor de totale eiwitconcentratie van de partij.

Antilichaamconcentratie

Groter dan of gelijk aan 214 mg/L zoals bepaald door ELISA. Zie het flaconlabel voor specifieke Ig-concentratie van de partij.

Aanbevelingen voor het gebruik

Immunohistochemie (zie **Methodologie**) op paraffinecoupes. Voorgestelde verdunning: 1:100 gedurende 30 minuten bij 25°C. Warmtegeïnduceerd epitoopherstel met Epitope Retrieval Solution pH 6.0 RE7113 of RE7114.

Visualisatie. Volg de instructies voor gebruik in de Novolink Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) of RE7290-K (50 tests).

Opslag en stabiliteit

Bewaar bij 2–8°C. Niet invriezen. Direct na gebruik weer bij 2–8°C opslaan. Niet gebruiken na de vervaldatum die op het etiket van de flacon staat. Andere dan de hierboven genoemde opslagcondities moeten door de gebruiker worden geverifieerd.

Monsterpreparatie

Het aanbevolen fixatief is 10% neutraal gebufferde formaline voor in paraffine ingebedde weefselcoupes.

Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

Dit reagens is bereid uit het supernatant van celkweek. Gezien dit een biologisch product is, moet redelijke voorzichtigheid worden betracht bij het hanteren ervan.

De molariteit van natriumazide in dit reagens is 15 mM. Er is op verzoek een veiligheidsinformatieblad (VIB) beschikbaar voor natriumazide.

Raadpleeg de nationale, regionale en plaatselijke voorschriften voor het afvoeren van potentieel giftige componenten.

Specimens, zowel voor als na de fixatie, en alle materialen die eraan worden blootgesteld, moeten worden behandeld als potentiële overdragers van infecties en met inachtneming van de juiste voorzorgsmaatregelen worden afgevoerd.¹ Pipetteer reagentia nooit met de mond en vermijd dat de huid en slijmvliezen in aanraking komen met reagentia en specimens. Indien reagentia of monsters in aanraking komen met gevoelige gebieden, moet u deze wassen met een overvloedige hoeveelheid water. Raadpleeg een arts.

Minimaliseer de kans op microbiële contaminatie van reagentia omdat door de niet-specifieke kleuring kan toenemen.

Andere incubatietijden of temperaturen dan hierin vermeld, kunnen onjuiste resultaten opleveren. Dergelijke wijzigingen moeten door de gebruiker worden gevalideerd.

Kwaliteitscontrole

Verschillen in weefselbewerking en technische procedures in het laboratorium van de gebruiker kunnen tot aanzienlijke variabiliteit in de resultaten leiden, waardoor het nodig is om regelmatig interne controles uit te voeren in aanvulling op de volgende procedures.

Controles zijn verse autopsie-/biopsie-/chirurgische monsters die zo snel mogelijk en op dezelfde manier als het monster of de monsters van de patiënt zijn gefixeerd in formaline, bewerkt en ingebed in paraffinewas.

Positieve weefselcontrole

Wordt gebruikt om aan te geven dat weefsels correct geprepareerd zijn en dat passende kleuringstechnieken zijn gebruikt.

Voor elke set testvoorwaarden in elke kleuringsrun moet één positieve weefselcontrole worden opgenomen.

Voor optimale kwaliteitscontrole en detectie van lichte degeneratie van het reagens is een weefsel met zwakke positieve kleuring meer geschikt dan een weefsel met sterke positieve kleuring.²

Aanbevolen positief controleweefsel is testis.

Als de positieve weefselcontrole geen positieve kleuring vertoont, moeten de resultaten die met testmonsters zijn verkregen als ongeldig worden beschouwd.

Negatieve weefselcontrole

De negatieve weefselcontrole moet na de positieve weefselcontrole worden onderzocht om de specificiteit van de labeling van het doelantigeen door het primaire antilichaam te verifiëren.

Aanbevolen negatief controleweefsel is cerebellum.

Aan de andere kant levert de verscheidenheid aan diverse celtypen die in de meeste weefselcoupes aanwezig zijn, vaak negatieve controlelocaties op, maar dit moet wel worden geverifieerd door de gebruiker.

Niet-specifieke kleuring, indien aanwezig, ziet er doorgaans diffuus uit. Een sporadische kleuring van bindweefsel kan ook worden waargenomen in coupes van bovenmatig in formaline gefixeerde weefsels. Gebruik intacte cellen voor het interpreteren van kleuringresultaten. Necrotische of gedegenererde cellen kleuren vaak niet-specifiek.³ Fout-positieve resultaten kunnen optreden als gevolg van niet-immunologische binding van eiwitten of substraatreactieproducten. Ze kunnen ook worden veroorzaakt door endogene enzymen zoals pseudoperoxidase (erythrocyten), endogene peroxidase (cytochroom c) of endogene biotine (bv. lever, borst, hersenen, nier), afhankelijk van het gebruikte type immunokleuring. Om activiteit van endogene enzymen of niet-specifieke binding van enzymen te onderscheiden van specifieke immunoreactiviteit, kunnen aanvullende patiëntweefsels worden gekleurd met respectievelijk uitsluitend substraatchromogeen of enzymcomplexen (avidine-biotine, streptavidine, gelabeld polymeer) en substraatchromogeen. Als er specifieke kleuring optreedt in de negatieve weefselcontrole, moeten resultaten met de patiëntmonsters als ongeldig worden beschouwd.

Negatieve reagenscontrole

Gebruik een niet-specifieke negatieve reagenscontrole van het primaire antilichaam met een coupe van elk patiëntspecimen om niet-specifieke kleuring te evalueren en specifieke kleuring op de antigeenlocatie beter te kunnen interpreteren.

Patiëntweefsel

Onderzoek de patiëntmonsters die met NCL-L-InhibinA zijn gekleurd als laatste. De intensiteit van de positieve kleuring moet worden geëvalueerd binnen de context van niet-specifieke achtergrondkleuring van de negatieve reagenscontrole. Zoals bij elke immunohistochemische test betekent een negatief resultaat dat het antigeen niet is gedetecteerd. Het betekent niet dat het antigeen afwezig was in de onderzochte cellen of het onderzochte weefsel. Gebruik zo nodig een panel antilichamen om fout-negatieve reacties te identificeren.

Verwachte resultaten

Normale weefsels

Kloon AMY82 detecteerde het inhibine-alfa-eiwit in Sertoli- en Leydig-cellen van de testis, in de cortex en medulla van de bijnier en de theca interna van de eierstokken. (Totaal aantal gevallen = 38).

Afwijkende weefsels

Kloon AMY82 detecteerde het inhibine-alfa-eiwit in 27/105 geëvalueerde abnormale eierstokweefsels inclusief 17/44 goedaardige theca celltumoren, 4/6 kwaadaardige theca celltumoren, 2/9 cysten, 3/3 granulosaacelltumoren en 1/5 'clear-cell'-carcinomen. Er werd geen kleuring waargenomen in ernstige adenocarcinomen (0/8), endometrische adenocarcinomen (0/6), overgangsel carcinomen (0/5), dooierzak tumoren (0/4), dysgerminomen (0/3), fibromen (0/2), mucineuze cystadenocarcinomen (0/2), mucineuze adenocarcinomen (0/2), mucineuze cystadenocarcinomen (0/2), ernstige cystadenocarcinomen (0/1), ernstig papillair cystadenoom (0/1), Brenner-tumor (0/1) en een mucineuze borderlinetumor (0/1). Er werd geen kleuring gedetecteerd in verschillende aanvullende tumoren inclusief plaveiselcelcarcinomen (0/10), schildklier tumoren (0/4), lever tumoren (0/4), lymfomen (0/3), colorectale tumoren (0/3), hersentumoren (0/2), borst tumoren (0/2), maagtumoren (0/2), pancreastumoren (0/2), longtumoren (0/2), niertumoren (0/2), prostaattumoren (0/2) en ongespecificeerde gemetastaseerde tumoren (0/2). (Totaal aantal gevallen = 145).

NCL-L-InhibinA wordt aanbevolen voor de detectie van inhibine-alfa in normale en neoplastische weefsels.

Algemene beperkingen

Immunohistochemie (IHC) is een diagnostisch meerstapsproces waarvoor een gespecialiseerde opleiding nodig is in het kiezen van de juiste reagentia, het selecteren, fixeren en bewerken van weefsel, het prepareren van IHC-objectglaasjes en het interpreteren van de kleuringresultaten.

Weefselkleuring is afhankelijk van de manier waarop het weefsel vóór de kleuring wordt behandeld en bewerkt. Verkeerd fixeren, invriezen, ontdoien, wassen, drogen, verwarmen, snijden, of contaminatie met andere weefsels of vloeistoffen kan tot artefacten, insluiting van antilichamen of fout-negatieve resultaten leiden. Inconsistente resultaten kunnen te wijten zijn aan variaties in de fixatie- en inbeddingsmethodes, of aan intrinsieke onregelmatigheden in het weefsel.⁴

Een te sterke of onvolledige tegenkleuring kan een juiste interpretatie van de resultaten bemoeilijken of onmogelijk maken.

De klinische interpretatie van elke kleuring of het ontbreken hiervan moet worden aangevuld door morfologische studies met de juiste controles en moet binnen de context van de klinische voorgeschiedenis van de patiënt en andere diagnostische tests worden geëvalueerd door een bevoegd patholoog.

Antilichamen van Leica Biosystems Newcastle Ltd zijn bedoeld voor gebruik, zoals aangegeven, op bevroren of in paraffine ingebedde coupes die een specifieke fixatie vereisen. Er kan onverwachte antigeenexpressie optreden, met name bij neoplasmata. De klinische interpretatie van gekleurde weefselcoupes moet een morfologische analyse en de evaluatie van overeenkomstige controles bevatten.

Literatuurlijst – algemeen

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadjji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Robertson D, Burger H and Fuller P. Inhibin/activin and ovarian cancer. Endocrine-Related Cancer. 2004; 11:35–49.
6. Bernard J, Chapman S and Woodruff T. Mechanisms of inhibin signal transduction. Recent Progress in Hormone Research. 2001; 56:417–450.

Aanpassingen ten opzichte van de vorige uitgave

Niet van toepassing

Datum uitgave

15 april 2019

Immunohistochemische methodologie voor Novocastra™-antilichamen op in paraffine ingebed weefsel met de warmte-geïnduceerd epitoophersteltechniek.

Benodigde, maar niet inbegrepen reagentia

1. Standaard oplossingen gebruikt in de immunohistochemie.
2. 50 mM Tris-gebufferde zoutoplossing (TBS), pH 7,6.
3. Epitope Retrieval Solution (zie C. Epitope Retrieval Solutions).
4. Antilichaam-verdunningsmiddel, Novocastra IHC Diluent, RE7133.
5. Visualisatiesysteem, Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) of RE7290-K (50 tests).
6. Inbedmiddel - gebruiken volgens de aanbevelingen van de fabrikant.

Benodigde, maar niet inbegrepen apparatuur

1. Incubator ingesteld op 25°C.
2. Verwarmingsapparaat voor epitoopherstel: waterbad, stomer, snelkoker of andere temperatuurgecontroleerde laboratoriumapparatuur.
3. Algemene uitrusting van immunohistochemisch laboratorium.

Epitope Retrieval Solutions (zie gebruiksaanwijzingen voor één van de volgende)

RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 l	Oppervlakte-actieve stof met buffer op basis van citraat
RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml	
RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 l	
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 l	Oppervlakte-actieve stof met buffer op basis van EDTA
RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 l	
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 l	Oppervlakte-actieve stof met buffer op basis van Tris/EDTA
RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 l	

Methodologie

Gebruikers moeten vóór het ondernemen van deze methodologie worden opgeleid in immunohistochemische technieken.

Gebruikers moeten de optimale verdunning voor antilichamen bepalen. Tenzij anders vermeld worden alle stappen uitgevoerd bij kamertemperatuur (25°C).

Epitoopherstel

Volg de instructies voor gebruik in Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119 of RE7122.

Visualisatie

Volg de instructies voor gebruik in de Novolink Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) of RE7290-K (50 tests).

Aanpassingen ten opzichte van de vorige uitgave

Niet van toepassing

Datum uitgave

23 April 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

Novocastra™ flytende murint monoklonalt antistoff

Inhibin Alpha

Produktkode: NCL-L-InhibinA

Tiltenkt bruk

Til in vitro-diagnostisk bruk.

NCL-L-InhibinA skal brukes til kvalitativ identifikasjon av inhibin alpha-molekyler i parafinsnitt ved lysmikroskopering. Den kliniske tolkningen av en farging eller uteblitt farging skal suppleres av morfologiske studier ved bruk av riktige kontroller og skal evalueres av en kvalifisert patolog innenfor sammenhengen av pasientens kliniske historie og andre diagnostiske tester.

Prinsipp for prosedyren

Teknikker for immunhistokjemisk (IHC) farging muliggjør visualisering av antigener via sekvensiell applikasjon av et spesifikt antistoff på antigenet (primært antistoff), et sekundært antistoff på det primære antistoffet og et enzymkompleks med et kromogen substrat med mellomliggende vasketrinn. Den enzymatiske aktiveringen av kromogenet resulterer i et synlig reaksjonsprodukt på antigenstedet. Prøven kan deretter kontrastfarges og påføres dekkglass. Resultatene tolkes ved hjelp av lysmikroskop og bidrar til differensialdiagnosen for patofysiologiske prosesser, som kan være tilknyttet et spesielt antigen eller ikke.

Klon

AMY82

Immunogen

Prokaryotisk rekombinant protein tilsvarende 134 aminosyrer av det humane inhibin alpha-molekylet.

Spesifisitet

Human inhibin alpha.

Reagenssammensetning

NCL-L-InhibinA er en flytende vevskulturkultursupernatant som inneholder 15 mM natriumazid som konserveringsmiddel.

Ig-klasse

IgG1

Totalproteinkonsentrasjon Total Protein

1,0–8,0 g/l. Se etiketten på hetteglasset for partispesifikk totalproteinkonsentrasjon.

Antistoffkonsentrasjon

Større enn eller lik 214 mg/l som fastslått av ELISA. Se etiketten på hetteglasset for batchspesifikk Ig-konsentrasjon.

Anbefalinger for bruk

Immunhistokjemi (se **Metode**) på parafinsnitt. Foreslått fortykning: 1:100 i 30 minutter ved 25 °C. Varmeindusert epitop demaskering med Epitope Retrieval Solution pH 9.0 RE7113 eller RE7114.

Visualisering. Følg bruksanvisningen for NovolinkTM polymerdeteksjonssystemer, RE7280-K (1250 tester), RE7150-K (500 tester), RE7140-K (250 tester) eller RE7290-K (50 tester).

Oppbevaring og stabilitet

Oppbevar ved 2–8 °C. Må ikke fryses. Returner til 2–8 °C umiddelbart etter bruk. Må ikke brukes etter utløpsdatoen som er angitt på etiketten på hetteglasset. Andre oppbevaringsforhold enn de som er angitt ovenfor, må verifiseres av brukeren.

Prøveklargjøring

Anbefalt fiksativ er 10 % nøytralt bufret formalin for parafininnstøpte vevsnett.

Advarsler og forholdsregler

Dette reagenset ble fremstilt fra supernatanten fra cellekultur. Ettersom det er et biologisk produkt, må det utvises rimelig forsiktighet når det håndteres.

Molariteten av natriumazid er 15 mM. Et sikkerhetsdatablad (SDS) er tilgjengelig på forespørsel for natriumazid.

Se lokale, regionale eller statlige forskrifter for avhending av potensielt toksiske komponenter.

Prøver, før og etter fiksering, og alle materialer som utsettes for dem, skal håndteres som smittefarlige og avhendes etter egnede forholdsregler.¹ Pipetter aldri reagenser via munnen og unngå kontakt med hud og slimhinner med reagenser og prøver. Hvis reagenser eller prøver kommer i kontakt med følsomme områder, skyll med rikelige mengder vann. Oppsøk lege.

Minimer mikrobiell kontaminering av reagenser, ellers kan det forekomme en økning i uspesifikk farging.

Andre inkubasjonstider eller temperaturer enn de som er spesifisert, kan gi feilaktige resultater. Enhver slik endring må valideres av brukeren.

Kvalitetskontroll

Forskjeller i vevsprosessering og tekniske prosedyrer i brukerens laboratorium kan frembringe signifikant variasjon i resultatene og gjør det påkrevd med regelmessige interne ytelseskontroller i tillegg til følgende prosedyrer.

Kontroller skal være ferske prøver fra obduksjon/biopsi/kirurgi, som er formalinfiksert, behandlet og parafininnstøpt så snart som mulig på samme måte som pasientprøven(e).

Positiv vevkontroll

Brukes for å indikere riktig klargjorte vev og riktige fargingsteknikker.

En positiv vevkontroll bør inkluderes for hvert sett med testbetingelser i hver fargerunde.

Svakt positivt farget vev er mer egnet enn kraftig positivt farget vev til optimal kvalitetskontroll og påvisning av små nivåer reagensnedbrytning.²

Anbefalt positivt kontrollvev er testikkel.

Hvis den positive vevkontrollen ikke gir positiv farging, skal resultater med testprøvene betraktes som ugyldige.

Negativ vevkontroll

Skal undersøkes etter den positive vevkontrollen for å verifisere spesifisiteten i merkingen av målantigenet med det primære antistoffet.

Anbefalt negativt kontrollvev er cerebellumvev.

Alternativt gir variasjonen av forskjellige celletyper som kan finnes i de fleste vevsniitt ofte rom for negativ kontroll, men dette må verifiseres av brukeren.

Ikke-spesifikk farging, hvis dette forekommer, har vanligvis et diffust utseende. Sporadisk farging av bindevev vil også kunne observeres i vevsniitt som er fiksert i for mye formalin. Bruk intakte celler til tolkning av fargingsresultater. Nekrotiske eller degenererte celler farger ofte uspesifikt.³ Falske positive resultater kan sees på grunn av ikke-immunologisk binding av proteiner eller substratreaksjonsprodukter. De kan også forårsakes av endogene enzymer slik som pseudoperoxidase (erythrocytter), endogen peroksidase (cytokrom C) eller endogent biotin (f.eks. lever, bryst, hjerne, nyre) avhengig av type immunfarging som brukes. For å differensiere endogen enzymaktivitet eller ikke-spesifikk binding av enzymer fra spesifikk immunreaktivitet kan ekstra pasientvev farges eksklusivt med henholdsvis substratkromogen eller enzymkomplekser (avidin-biotin, streptavidin, merket polymer) og substratkromogen. Hvis det forekommer spesifikk farging i de negative vevkontrollene, skal resultater med pasientprøvene betraktes som ugyldige.

Negativ reagenskontroll

Bruk en uspesifikk negativ reagenskontroll i stedet for det primære antistoffet med et snitt av hver pasientprøve for å evaluere uspesifikk farging og gi bedre mulighet for tolkning av den spesifikke fargingen på antigenstedet.

Pasientvev

Undersøk pasientprøver farget med NCL-L-InhibinA sist. Positiv fargingsintensitet skal vurderes i lys av eventuell ikke-spesifikk bakgrunnsfarging i den negative reagenskontrollen. På samme måte som for alle andre immunhistokjemiske tester betyr et negativt resultat at antigenet ikke ble påvist, ikke at antigenet ikke var til stede i cellene / det analyserte vevet. Om nødvendig, skal det brukes et panel med antistoffer til å identifisere falske negative reaksjoner.

Forventede resultater

Normale vev

Klon AMY82 påviste inhibin alpha-protein i Sertoli- og Leydig-celler i testikler, i cortex og medulla av binyrene og theka-interna av eggstokkene. (Totalt antall tilfeller = 38).

Unormale vev

Klon AMY82 påviste inhibin-alpha-protein i 27/105 unormale evaluerte ovarievev, inkludert 17/44 godartede theka-cellettumorer, 4/6 ondartede theka-cellettumorer, 2/9 cyster, 3/3 granulosa-cellettumorer og 1/5 klare cellekarsinomer. Ingen farging ble observert i serøse adenokarsinomer (0/8), endometrie-adenokarsinomer (0/6), overgangscellekarsinomer (0/5), blæretumorer (0/4), dysgerminomer (0/3), fibromer (0/2), mucinøse cystadenomer (0/2), mucinøse adenokarsinomer (0/2), mucinøse cystadenokarsinomer (0/2), serøst cystadenokarsinom (0/1), serøst papillært cystadenom (0/1), Brenner-tumor (0/1), og en mucinøs borderline-tumor (0/1). Ingen farging ble påvist i en rekke ekstra tumorer, inkludert skvamøse cellekarsinomer (0/10), skjoldbruskkjerteltumorer (0/4), levertumorer (0/4), lymfomer (0/3), kolorektale tumorer (0/3), hjernetumorer (0/2), brysttumorer (0/2), mageumorer (0/2), bukspyttkjerteltumorer (0/2), lungtumorer (0/2), nyretumorer (0/2), prostataumorer (0/2) og uspesifiserte metastaserende tumorer (0/2). (Totalt antall tilfeller = 145).

NCL-L-InhibinA anbefales til påvisning av inhibin alpha i normale og neoplastiske vev.

Generelle begrensninger

Immunhistokjemi er en flertrinns diagnostisk prosess som krever spesialisert opplæring i valg av egnede reagenser, valg, fiksering og behandling av vev, klargjøring av IHC-objektglass og tolkning av fargingsresultater.

Vevfargingen er avhengig av håndteringen og behandlingen av vevet før det farges. Uriktig fiksering, dypfrysing, opptining, vasking, tørking, oppvarming, snitting eller kontaminering med annet vev eller væsker kan frembringe artefakter, fanging av antistoff eller falske negative resultater. Inkonsistente resultater kan skyldes variasjoner i fikserings- og innstøpingsmetoder eller uregelmessigheter i vevet.⁴ Overdreven eller ufullstendig kontrastfarging kan hindre riktig tolkning av resultater.

Den kliniske tolkningen av en farging eller uteblitt farging skal suppleres av morfologiske studier ved bruk av riktige kontroller og skal evalueres av en kvalifisert patolog innenfor sammenhengen av pasientens kliniske historie og andre diagnostiske tester.

Antistoffer fra Leica Biosystems Newcastle Ltd er til bruk, som indisert, på enten frosne eller paraffinnestøpte snitt med spesifikke fikseringskrav. Det kan forekomme uventet antigenuttrykk, spesielt i neoplasmer. Den kliniske tolkningen av ethvert farget vevsniitt må inkludere morfologisk analyse og evaluering av egnede kontroller.

Bibliografi – generell

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadj M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavi M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Robertson D, Burger H and Fuller P. Inhibin/activin and ovarian cancer. Endocrine-Related Cancer. 2004; 11:35–49.

6. Bernard J, Chapman S and Woodruff T. Mechanisms of inhibin signal transduction. Recent Progress in Hormone Research. 2001; 56:417–450.

Endringer på tidligere utgave

Ikke relevant

Utstedelsesdato

15 april 2019

Immunhistokjemisk metode for Novocastra™-antistoffer på parafininnstøpt vev gjennom varmeindusert epitop demaskeringsteknikk.

Nødvendige reagenser som ikke følger med

1. Standard løsemidler som brukes innen immunhistokjemi.
2. 50 mM tris-bufret saltvann (TBS) pH 7,6.
3. Epitope Retrieval Solution (se C. Løsninger for epitop demaskering).
4. Antistofffortynner, Novocastra IHC Diluent, RE7133.
5. Visualiseringssystem, Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280–K (1250 tester), RE7150–K (500 tester), RE7140–K (250 tester) eller RE7290–K (50 tester).
6. Monteringsmedium – bruk som anbefalt av produsenten.

Nødvendig utstyr som ikke følger med

1. Inkubator stilt til 25 °C.
2. Oppvarmingsutstyr for epitop demaskering: vannbad, dampkoker, trykkoker eller annet laboratorieutstyr med temperaturkontroll.
3. Generelt immunhistokjemisk laboratorieutstyr.

Løsninger for epitop demaskering (se anbefalinger for bruk for en av følgende)

RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 l	Sitratbasert buffer som inneholder et overflateaktivt stoff
RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml	
RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (klar til bruk) 1 L	
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 l	EDTA-basert buffer som inneholder et overflateaktivt stoff
RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (klar til bruk) 1 L	
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 l	Tris/EDTA-basert buffer som inneholder et overflateaktivt stoff
RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (klar til bruk) 1 L	

Metodikk

Før bruk av denne metoden må brukerne være opplært i immunhistokjemiske teknikker.

Brukerne skal fastslå optimale fortyninger for antistoffer. Med mindre annet er angitt, utføres alle trinn ved romtemperatur (25 °C).

Epitop demaskering

Følg bruksanvisningen for Epitope Retrieval Solutions, RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119 eller RE7122.

Visualisering

Følg bruksanvisningen for Novolink™ polymerdeteksjonssystemer, RE7280–K (1250 tester), RE7150–K (500 tester), RE7140–K (250 tester) eller RE7290–K (50 tester).

Endringer på tidligere utgave

Ikke relevant

Utstedelsesdato

23. april 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

Novocastra™ Likit Monoklonal Fare Antikoru

Inhibin Alpha

Ürün Kodu: NCL-L-InhibinA

Kullanım Amacı

In vitro diagnostik kullanım içindir.

NCL-L-InhibinA, parafin bölümlerindeki inhibin alfa moleküllerinin ışık mikroskopisi ile kalitatif tanımlanması için tasarlanmıştır. Herhangi bir boyanın veya yokluğunun klinik yorumlaması hastanın klinik yüküsü ve diğer tanısal testler bağlamında nitelikli bir patoloji uzmanı tarafından değerlendirilmeli ve uygun kontroller kullanılarak morfolojik çalışmalarla desteklenmelidir.

İşlem Prensipleri

İmmünohistokimyasal (İHK) boyama teknikleri, antijene ardışık olarak belirli bir antikoru uygulaması (birincil antikor), birincil antikora ikincil bir antikorun uygulanması ve aralaradaki yıkama adımları ile, antijenlerin kromojenik substratı bir enzim kompleksi yoluyla görselleştirilmesine olanak tanır. Kromojenin enzimle etkinleştirilmesi, antijen alanında gözle görülür bir tepkiye yol açar. Numune daha sonra karşıt boyanabilir ve lamelle örtülebilir. Sonuçlar bir ışık mikroskopu kullanılarak yorumlanır ve belirli bir antijen ile ilişkili olabilecek veya olmayabilecek patofizyolojik süreçlerin ayrıntı tanısına yardımcı olur.

Clone

AMY82

İmmünojen

İnsan inhibin alfanın 134 aminoasidine karşılık gelen prokaryotik remkobinant protein.

Özgüllük

İnsan inhibin alfa

Reaktif Bileşimi

NCL-L-InhibinA koruyucu olarak 15 mM sodyum azit içeren bir sıvı doku kültürü süpernatantıdır.

Ig Sınıfı

IgG1

Toplam Protein Konsantrasyonu Total Protein

1,0-8,0 g/l Lota özgü toplam protein konsantrasyonu için flakon etiketine başvurun.

Antikor Konsantrasyonu

ELISA tarafından belirlendiği gibi 214 mg/L'ye eşit veya bu değerden yüksek. Seriyeye özgü Ig konsantrasyonu için flakon etiketine bakın.

Kullanım Önerileri

Parafin kesitlerinde immünohistokimya (bkz **Metodoloji**), parafin bölümü Önerilen dilüsyon: 25°C'de 30 dakika boyunca 1:100. Epitope Retrieval Solution pH 6,0 RE7113 veya RE7114 kullanılarak Isı İndüklü Epitop Alımı Görüntüleme. Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 test), RE7150-K (500 test), RE7140-K (250 test) veya RE7290-K'de (500 test) kullanım için lüfen talimatları izleyin.

Saklama ve Stabilite

2-8°C'de saklayın. Dondurmayın. Kullanımdan hemen sonra 2-8°C'ye geri alın. Flakon etiketinde belirtilen son kullanma tarihinden sonra kullanmayın. Yukarıda belirtilenler dışında saklama koşulları kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır.

Numune Hazırlama

Parafine gömülü doku kesitleri için önerilen fiksatif %10 nötr tamponlanmış formalindir.

Uyarılar ve Önlemler

Bu reaktif hücre kültürü süpermatanından hazırlanmıştır. Biyolojik bir ürün olduğundan, elleçleme sırasında makul düzeyde dikkatli olunmalıdır.

Sodyum azitin molaritesi bu reaktifte 15 mM'dir. Sodyum azit için Malzeme Güvenlik Bilgileri Formu (MSDS), talep üzerine sağlanmaktadır.

Olası toksik bileşenlerin atılması ile ilgili yerel, bölgesel veya ulusal düzenlemelere başvurun.

Fiksasyondan önce ve sonra örnekler ve onlara maruz kalmış bütün materyaller, enfeksiyon yayabilecekmiş gibi işlem görmelidir ve gerekli önlemler alınarak atılmalıdır.¹ Reaktifleri hiçbir zaman ağızla pipetlemeyin. Cildin ve mukoz membranların reaktifler ve örneklerle temas etmesini önleyin. Reaktifler veya numuneler hassas bölgelere temas ederse bol miktarda suyla yıkayın. Tıbbi yardım isteyin. Reaktiflerin mikrobik kontaminasyonunu minimize edin, aksi takdirde spesifik olmayan boyamada bir artış meydana gelebilir.

Belirtilenler dışındaki inkübasyon süreleri veya sıcaklıklar hatalı sonuçlara yol açabilir. Bu tür değişiklikler kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır.

Kalite Kontrol

Kullanıcının laboratuvarında doku işleme ve teknik işlemlerdeki farklar sonuçlarda önemli değişkenliğe neden olabilir ve aşağıdaki işlemlere ek olarak düzenli şekilde tesis içi kontrollerin kullanılmasını gerektirir.

Kontroller, hasta numunesi/numuneleriyle aynı şekilde mümkün olduğunca kısa süre içinde formalin fiksasyonlu, işlenmiş ve parafine gömülü taze otopsi/biyopsi/cerrahi materyal olmalıdır.

Pozitif Doku Kontrolü

Dođru hazırlanmış dokuları ve uygun boyama tekniklerini belirtmek için kullanılır.

Her boyama döngüsünde her test koşulu setine bir pozitif doku kontrolü dahil edilmelidir.

Zayıf pozitif boyama yapılmış doku, optimal kalite kontrolü ve minör reaktif bozunma düzeylerini saptamak için güçlü pozitif boyama yapılmış dokudan daha uygundur.?

Önerilen pozitif kontrol dokusu testistir.

Eđer pozitif doku kontrolü pozitif boyanma göstermezse, test numunelerinin sonuçları geçersiz kabul edilmelidir.

Negatif Doku Kontrolü

Primer antikor tarafından hedef antijenin etiketlenmesinin spesifikliğini doğrulamak için, pozitif doku kontrolünden sonra incelenmelidir. Önerilen negatif kontrol dokusu serebellumdur.

Alternatif olarak çođu doku kesitinde bulunan farklı hücre tiplerinin çeşitliliđi sıklıkla negatif kontrol bölgeleri sunar ama bu durum kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır.

Eđer varsa nonspesifik boyanmanın görünümü genellikle difüzdür. Aşırı formalin fiksasyonlu dokulardan kesitlerde bağ dokusunun sporadik boyanması da görülebilir. Boyanma sonuçlarının yorumlanması için sağlam hücreler kullanın. Nekrotik ve dejenere hücreler genellikle spesifik olmayan şekilde boyanır.³ Proteinlerin veya substrat reaksiyon ürünlerinin immünoojik olmayan bağlanması nedeniyle yanlış pozitif sonuçlar görülebilir. Bu sonuçlar ayrıca, kullanılan immün-boyaya bağlı olarak psödoperoksidaz (eritrositler), endojen peroksidaz (sitokrom C) veya endojen biotin (örn. karaciđer, meme, beyin, böbrek) gibi endojen enzimlerden de kaynaklanabilir. Endojen enzim aktivitesini veya nonspesifik enzim bağlanmasını spesifik immünoreaktiveden ayırmak için ek hasta dokuları sırasıyla sadece substrat kromojen veya enzim kompleksleri (avidin-biotin, streptavidin, etiketli polimer) ve substrat kromojen ile boyanabilir. Negatif doku kontrolünde spesifik boyanma oluřursa hasta numunelerinin sonuçları geçersiz kabul edilmelidir.

Negatif Reaktif Kontrolü

Spesifik olmayan boyamayı deđerlendirmek ve antijen bölgesinde spesifik boyanmayı daha iyi yorumlayabilmek için her hasta örneđi kesitinde primer antikor yerine spesifik olmayan bir negatif reaktif kontrolü kullanın.

Hasta Dokusu

NCL-L-InhibinA ile boyanmış hasta numunelerini en son inceleyin. Pozitif boyama yoğunluđu, negatif reaktif kontrolünün spesifik olmayan herhangi bir arka plan boyaması bağlamında deđerlendirilmelidir. Her immünohistokimyasal testle olduđu gibi negatif bir sonuç antijenin saptanmadıđı anlamına gelir ve antijenin çalışılan hücrelerde/dokuda bulunmadıđı anlamına gelmez. Gerekirse yalnızca negatif reaksiyonları tanımlamak için bir antikor paneli kullanın.

Öngörülen Sonuçlar

Normal Dokular

Klon AMY82 testisting Sertoli ve Leydig hücrelerinde, adrenal bezin korteksi ve medullasında ve yumurtalıđın teka internasında inhibin alfa protein saptamıştır. (Toplam vaka sayısı = 38).

Anormal Dokular

Klon AMY82 17/44 benign teka hücreli tümörler, 4/6 malign teka hücreli tümör, 2/9 kist, 3/3 granüöz hücre tümörleri ve 1/5 berrak hücre karsinomu dahil olmak üzere deđerlendirilen 27/105 anormal yumurtalık dokusunda inhibin alfa protein saptamıştır. Seröz adenokarsinomlar (0/8), endometriyal adenokarsinomlar (0/6), transiyonal hücre karsinomları (0/5), yolk sac tümörler (0/4), disgerminomlar (0/3), fibromlar (0/2), musinöz kistadenomlar (0/2), musinöz adenokarsinom (0/2), musinöz kistadenokarsinom (0/2), seröz kistadenokarsinom (0/1), seröz papiller kistadenom (0/1), Brenner tümörü (0/1) ve bir musinöz borderline tümörde (0/1) boyama gözlenmemiştir. Skuamöz hücreli karsinomlar (0/10), tiroid tümörleri (0/4), karaciđer tümörleri (0/4), lenfomalar (0/3), kolorektal tümörler (0/3), beyin tümörleri (0/2), meme tümörleri (0/2), mide tümörleri (0/2), pankreatik tümörler (0/2), akciđer tümörleri (0/2), böbrek tümörleri (0/2), prostat tümörleri (0/2) ve belirtilmemiş metastatik tümörler (0/2) dahil olmak üzere çeşitli ek tümörlerde boyama saptanmamıştır. (Toplam vaka sayısı = 145).

NCL-L-InhibinA normal ve neoplastik dokularda inhibin alfa saptaması için tavsiye edilir.

Genel Sınırlamalar

İmmünohistokimya; uygun reaktiflerin seçimi, doku seçimi, fiksasyonu ve işlenmesi, IHC slaytının hazırlanması ve boyama sonuçlarının yorumlanması alanlarında özel eđitmeden oluřan, çok adımlı bir diagnostik süreçtir.

Doku boyama, boyama öncesinde dokunun kullanımına ve işlenmesine bađlıdır. Uygun olmayan fiksasyon, dondurma, çözme, yıkama, kurutma, ısıtma, kesit alma veya diđer dokular veya sıvıların kontaminasyonu artefaktlara, antikor tutulmasına veya yalnızca negatif sonuçlara yol açabilir. Tutarsız sonuçlar, fiksasyon ve gömme yöntemlerindeki deđişikliklerden ya da dokunun yapısından kaynaklanan dözensizliklerden kaynaklanabilir.⁴

Aşırı ya da tam olmayan karşıt boyama, sonuçların düđügn yorumlanmasını olumsuz etkileyebilir.

Herhangi bir boyanmanın veya yokluđunun klinik yorumlaması hastanın klinik öyküsü ve diđer tanısal testler bağlamında nitelikli bir patoloji uzmanı tarafından deđerlendirilmeli ve uygun kontroller kullanılarak morfolojik çalışmalarla desteklenmelidir.

Leica Biosystems Newcastle Ltd'in antikorları, belirtilen şekilde, özel fiksasyon gereklilikleriyle parafine gömüldü veya dondurulmuş kesitler üzerinde kullanılır. Özellikle neoplazmlarda beklenmeyen antijen ekspresyonu oluřabilir. Herhangi bir boyanmış doku kesitinin klinik yorumu morfolojik analizi ve uygun kontrollerin deđerlendirilmesini içermelidir.

Kaynaçça - Genel

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.

5. Robertson D, Burger H and Fuller P. Inhibin/activin and ovarian cancer. *Endocrine-Related Cancer*. 2004; 11:35–49.
6. Bernard J, Chapman S and Woodruff T. Mechanisms of inhibin signal transduction. *Recent Progress in Hormone Research*. 2001; 56:417–450.

Önceki Sayıya Göre Değişiklikler

Geçerli değildir

Yayın Tarihi

15 Nisan 2019

Isı İndüklü Epitop Alımı Tekniğinden faydalanılarak Parafine Gömülmüş Dokuda Novocastra™ Antikorları İçin İmmünohistokimya Yöntemi.

Gereken ancak sağlanmayan reaktifler

1. İmmünohistokimyada kullanılan standart çözücüler.
2. 50 mM Tris Tamponlu Salin (TBS) pH 7,6.
3. Epitop Geri Kazanım Çözeltisi (bkz. Epitop Geri Kazanım Çözeltileri).
4. Antikor seyreltici, Novocastra IHC Diluent, RE7133.
5. Görüntüleme sistemi, Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 test), RE7150-K (500 test), RE7140-K (250 test) veya RE7290-K (50 test).
6. Monte etme çözümü - üreticinin önerdiği şekilde kullanın.

Gereken ancak sağlanmayan ekipman

1. 25°C'ye ayarlı inkübatör.
2. Epitop geri kazanımı için ısıtıcı cihaz: Su banyosu, buhar makinesi, basınçlı pişirici veya diğer sıcaklık kontrollü laboratuvar ekipmanı.
3. Genel immünohistokimya laboratuvar ekipmanı.

Epitop Geri Kazanım Çözeltileri (bkz. aşağıdakilerden birinin Kullanım Önerileri)

RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 L	Süpfaktan içeren sitrat bazlı tampon
RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml	
RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 L	
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 L	Süpfaktan içerek EDTA bazlı tampon
RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 L	
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 L	Süpfaktan içerek Tirs/EDTA bazlı tampon
RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 L	

Metodoloji

Kullanıcılar, bu yöntemi uygulamadan önce, immünohistokimya teknikleri konusunda gerekli eğitimi almış olmalıdır.

Antikorlar için optimal dilüsyonları kullanıcıların kendileri belirlemelidir. Aksi belirtilmedikçe tüm adımlar oda sıcaklığında (25°C) gerçekleştirilir.

Epitop Geri Kazanımı

Epitope Retrieval Solutions, RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119 veya RE7122'de kullanım için lütfen talimatları izleyin.

Görüntüleme

Novolink Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 test), RE7150-K (500 test), RE7140-K (250 test) veya RE7290-K'de (50 test) kullanım için lütfen talimatları izleyin.

Önceki Sayıya Göre Değişiklikler

Geçerli değildir

Yayın Tarihi

23 Nisan 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

Течно мише моноклонално антитяло Novocastra™

Inhibin Alpha

Код на продукта: NCL-L-InhibinA

Предназначение

За употреба при *in vitro* диагностика.

Продуктът NCL-L-InhibinA е предназначен за качествено идентифициране посредством оптична микроскопия на молекули инхибин алфа в парафинови срези. Клиничната интерпретация на всяко оцветяване или неговата липса следва да бъде допълнена от морфологични проучвания с помощта на подходящи контроли и трябва да се оценява в контекста на клиничната история на пациента и други диагностични изследвания от квалифициран патолог.

Принцип на процедурата

Техниките на имунохистохимично (IHC) оцветяване позволяват визуализация на антигени чрез последователно приложение на специфично антитяло на антигена (първично антитяло), вторично антитяло на първичното антитяло и ензимен комплекс с хромогенен субстрат, с междинни стъпки на промиване. Ензимното активиране на хромогена води до видим реакционен продукт на мястото на антигена. След това може да се направи контраоцветяване на спесимена и да се постави покривно стъкло. Резултатите се интерпретират с използване на оптичен микроскоп и са в помощ при диференциалната диагностика на патологични процеси, които може да са или да не са свързани с определен антиген.

Клонинг

AMУ82

Имуноген

Прокариотен рекомбинантен протеин, съответстващ на 134 аминокиселини от човешката молекула инхибин алфа.

Специфичност

Човешки инхибин алфа.

Състав на реагента

NCL-L-InhibinA е течен супернатант от тъканна култура, съдържащ 15 mM натриев азид като консервант.

Имуноглобулинов клас

IgG1

Обща концентрация на протеин

Total Protein

1,0 – 8,0 g/L. Вижте етикета на флакона относно специфичната за партидата концентрация на общ протеин.

Концентрация на антитела

По-висока или равна на 214 mg/L, както е определено от ELISA. Вижте етикета на флакона относно специфичната за партидата концентрация на имуноглобулин.

Препоръки за употреба

Имунохистохимия (вж **Методология**) върху парафинови срези. Предложение за разреждане: 1:100 за 30 минути при температура 25 °C. Термично индуцирано извличане на епитоп, използвайки Epitope Retrieval Solution pH 6,0 (RE7113 или RE7114).

Визуализация. Следвайте инструкциите за употреба в Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 теста), RE7150-K (500 теста), RE7140-K (250 теста) или RE7290-K (50 теста).

Съхранение и стабилност

Съхранявайте при температура 2 – 8 °C. Не замразявайте. Да се върне на температура 2 – 8 °C веднага след употреба. Да не се използва след срока на годност, отбелязан върху етикета на флакона. Други условия на съхранение, освен посочените по-горе, трябва да бъдат проверени от потребителя.

Подготовка на спесимени

Препоръчителният фиксиращ разтвор е неутрален буфериран формалин 10% за тъканни срези, вградени в парафин.

Предупреждения и предпазни мерки

Този реагент е приготвен от супернатант от клетъчна култура. Тъй като е биологичен продукт, необходимо е повишено внимание при работа с него.

Молярността на натриевия азид в този реагент е 15 mM. При поискване е налице информационен лист за безопасност на материалите (MSDS) за натриевия азид.

Консултирайте се с федералните, държавните или местните регламенти относно изхвърлянето на потенциално токсични компоненти.

Всички спесимени преди и след фиксация, както и всички материали, изложени на тях, трябва да се третират като възможни преносители на инфекция и да се изхвърлят, като се вземат правилни предпазни мерки.¹ Никого не пипетирайте реагенти с уста и избягвайте контакт на кожата и лигавиците с реагенти и спесимени. При контакт на реагенти или спесимени с чувствителни зони измийте зоните с обилно количество вода. Потърсете медицинска помощ.

Свеждайте до минимум микробната контаминация на реагентите, иначе може да се появи увеличаване на неспецифичното оцветяване.

Инкубационни времена или температури, различни от посочените, могат да доведат до грешни резултати. Всички подобни промени трябва да бъдат валидирани от потребителя.

Качествен контрол

Различията в обработката на тъканите и техническите процедури в лабораторията на потребителя могат да доведат до значително вариране на резултатите, налагащо редовно извършване на вътрешен контрол в допълнение към следните процедури.

Контролите трябва да са свежи спесимени, взети по време на аутопсия/биопсия/операция, фиксирани във формалин, обработени и вградени в парафинов восък, възможно най-бързо, по същия начин като проба(та) на пациента(ите).

Позитивна тъканна контрола

Използва се, за да се покажат правилно приготвени тъкани и правилни техники на оцветяване.

Една позитивна тъканна контрола трябва да бъде включена за всеки сет с тестови условия при всяка серия проби за оцветяване.

Тъкан със слабо позитивно оцветяване е по-подходяща от тъкан със силно позитивно оцветяване за оптимален качествен контрол и за откриване на по-малки нива на деградация на реагента.²

Препоръчителната позитивна тъканна контрола е тестис.

Ако позитивната тъканна контрола не показва позитивно оцветяване, резултатите от спесимените, включени в теста, трябва да се считат за невалидни.

Негативна тъканна контрола

Трябва да се изследва след позитивната тъканна контрола, за да се провери специфичността на беляването на таргетния антиген от първичното анти тяло.

Препоръчителната тъкан за негативна контрола е малкият мозък.

Алтернативно, разнобразието от различни видове клетки, присъстващи в повечето тъканни срези, често предлага места за негативна контрола, но това трябва да се провери от потребителя.

Неспецифичното оцветяване, ако присъства, обикновено е дифузно на вид. Спорадично оцветяване на съединителна тъкан може да се наблюдава и в части от прекомерно фиксирани във формалин тъкани. Използвайте интактни клетки за интерпретация на резултатите от оцветяването. Некротичните или дегенериралите клетки често се оцветяват неспецифично.³ Може да се видят неверни позитивни резултати поради неимунологично свързване на протеини или реакционни продукти на субстрата. Те може да са причинени и от ендогенни ензими, като например псевдопероксидаза (еритроцити), ендогенна пероксидаза (цитохром С) или ендогенен биотин (напр. черен дроб, гърда, мозък, бъбрек) в зависимост от типа на използваното имуно оцветяване. За диференциране на ендогенна ензимна активност или неспецифично ензимно свързване от специфична имуна реактивност ексклузивно може да се оцветят допълнителни тъкани от пациента, съответно със субстрат-хромоген или с ензимни комплекси (авидин-биотин, стрептавидин, маркиран полимер) и субстрат-хромоген. Ако се появи специфично оцветяване в негативната тъканна контрола, резултатите от спесимените на пациентите трябва да се считат за невалидни.

Негативна контрола на реагента

Използвайте неспецифична негативна контрола на реагента вместо първичното анти тяло със срез от всеки спесимен на пациента, за да се направи оценка на неспецифичното оцветяване и да се даде по-добра интерпретация на специфичното оцветяване на мястото на антигена.

Тъкан от пациента

Спесимените на пациенти, оцветени с NCL-L-InhibinA, трябва да се изследват последни. Наситеността на позитивното оцветяване трябва да бъде оценена в контекста на всяко неспецифично фоново оцветяване на негативната контрола на реагента. Както при всеки имунохистохимичен тест, един отрицателен резултат означава, че антигенът не е открит, а не че антигенът отсъства в анализирани клетки/тъкан. Ако се налага, използвайте панел от анти тела за идентифициране на фалшиво отрицателни реакции.

Очаквани резултати

Нормални тъкани

Клонинг AMY82 открива протеина инхибин алфа в клетките на Сертоли и Лайдиг в тестисите, в кортекса и медулата на надбъбречната жлеза и във вътрешната обвивка на яйчника. (Общ брой на случаите = 38).

Абнормни тъкани

Клонинг AMY82 открива протеина инхибин алфа в 27/105 оценени абнормни овариални тъкани, включващи 17/44 доброкачествени тумора на тека клетките, 4/6 злокачествени тумора на тека клетките, 2/9 кисти, 3/3 тумора на гранулозните клетки и 1/5 светлоклетъчни карцинома. Не се наблюдава оцветяване в серозните аденокарциноми (0/8), аденокарциномите на ендометриума (0/6), преходноклетъчните карциноми (0/5), туморите на жлъчната торбичка (0/4), дисгерминомите (0/3), фибромите (0/2), муцинозните цистаденоми (0/2), муцинозните аденокарциноми (0/2), муцинозните цистаденокарциноми (0/2), серозните цистаденокарциноми (0/1), муцинозните папиларни цистаденоми (0/1), тумор на Бренер (0/1) и муцинозен граничен тумор (0/1). Не се открива оцветяване при редица допълнителни тумори, включително плоскоклетъчни карциноми (0/10), тумори на щитовидната жлеза (0/4), черnodробни тумори (0/4), лимфоми (0/3), колоректални тумори (0/3), мозъчни тумори (0/2), тумори на гърдата (0/2), тумори на стомаха (0/2), тумори на панкреаса (0/2), тумори на белия дроб (0/2), тумори на бъбреците (0/2), тумори на простатата (0/2) и неуточнени метастатични тумори (0/2). (Общ брой на случаите = 145).

Продуктът NCL-L-InhibinA се препоръчва за откриване на инхибин алфа в нормални и неопластични тъкани.

Общи ограничения

Имунохистохимията е многостъпков диагностичен процес, който се състои от специализирано обучение за избор на подходящи реагенти, избор на тъкани, фиксация и обработка, подготовка на ИНС предметно стъкло и интерпретация на резултатите от оцветяването.

Тъканното оцветяване зависи от боравенето с тъканта и нейната обработка преди оцветяването. Неправилната фиксация, замразяване, размразяване, промиване, изсушаване, затопляне, сръзване или контаминацията с други тъкани или течности може да причини поява на артефакти, блокиране на антителата или фалшиво отрицателни резултати. Несъответстващите резултати може да се дължат на вариации в методите на фиксация и вграждане или на присъща нерегулярност в тъканта.⁴ Прекомерното или непълно контраоцветяване може да попречи на правилната интерпретация на резултатите.

Клиничната интерпретация на всяко оцветяване или неговата липса следва да бъде допълнена от морфологични проучвания с помощта на подходящи контроли и трябва да се оценява в контекста на клиничната история на пациента и други диагностични изследвания от квалифициран патолог.

Антителата от Leica Biosystems Newcastle Ltd са предназначени за употреба, както е указано, върху замразени или вградени в парафин срези със специфични изисквания за фиксация. Възможно е да настъпи неочаквана антигенна експресия, особено при неоплазми. Клиничната интерпретация на всеки оцветен тъканен срез трябва да включва морфологичен анализ и оценката на подходящи контроли.

Библиография – обща

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29–P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio–Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Robertson D, Burger H and Fuller P. Inhibin/activin and ovarian cancer. Endocrine-Related Cancer. 2004; 11:35–49.
6. Bernard J, Chapman S and Woodruff T. Mechanisms of inhibin signal transduction. Recent Progress in Hormone Research. 2001; 56:417–450.

Изменения на предишно издание

Не е приложимо

Дата на издаване

15 Април 2019

Имунохистохимична методология за антитела Novocastra™ върху вградени в парафин тъкани, използвайки техниката за термично индуцирано извличане на епитоп.

Необходими, но непредоставени реагенти

1. Стандартни разтворители, използвани с имунохистохимията.
2. 50 mM трометамин-буфериран физиологичен разтвор (TBS) pH 7,6.
3. Разтвор за извличане на епитоп (вж. С. Разтвори за извличане на епитоп).
4. Разределител за антитела, Novocastra IHC Diluent, RE7133.
5. Система за визуализация, Novolink® Polymer Detection Systems, RE7280–K (1250 теста), RE7150–K (500 теста), RE7140–K (250 теста) или RE7290–K (50 теста).
6. Микроскопски препарат – използвайте според препоръките на производителя.

Необходимо, но непредоставено оборудване

1. Инкубатор, настроен на температура 25°C.
2. Загривач уред за извличане на епитоп: водна вана, изпарител, съд за загряване под налягане или друго лабораторно оборудване с контролирана температура.
3. Общо имунохистохимично лабораторно оборудване.

Разтвори за извличане на епитоп (вж. Препоръки за употреба за един от следните)

RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 L	Базиран на цитрат буфер, съдържащ повърхностно активно вещество
RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 mL	
RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (готов за употреба) 1 L	
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 L	Базиран на етилендиаминтетраоцетна киселина буфер, съдържащ повърхностно активно вещество
RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (готов за употреба) 1 L	
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 L	Базиран на трометамин-буфериран физиологичен разтвор/Етилендиаминтетраоцетна киселина буфер, съдържащ повърхностно активно вещество
RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (готов за употреба) 1 L	

Методология

Преди прилагането на тази методология потребителите трябва да бъдат обучени за имунохистохимичните техники.

Потребителите трябва да определят оптималните разтвори за антитела. Освен ако не е указано друго, всички стъпки се извършват при стайна температура (25 °C).

Извличане на епитоп.

Моля, следвайте инструкциите за употреба в Разтвори за извличане на епитоп RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119 или RE7122.

Визуализация

Моля, следвайте инструкциите за употреба в Novolink Polymer Detection Systems, RE7280–K (1250 теста), RE7150–K (500 теста), RE7140–K (250 теста) или RE7290–K (50 теста).

Изменения на предишно издание

Не е приложено

Дата на издаване

23 април 2008 г. (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

Novocastra™ folyékony egér monoklonális antitest

Inhibin Alpha

Termékkód: NCL-L-InhibinA

Alkalmazási terület

In vitro diagnosztikai használatra.

Az NCL-L-InhibinA az inhibin-alfa molekulák fénymikroszkóppal végzett kvalitatív azonosítására szolgál paraffinos metszetekben. Minden festődés meglétének vagy hiányának klinikai értelmezését morfológiai vizsgálatokkal és megfelelő kontrollokkal kell kiegyesíteni, valamint az értékelést a beteg klinikai kórtörténete és egyéb diagnosztikai vizsgálatok figyelembevételével, képzett patológusnak kell elvégeznie.

Az eljárás elve

Az immunhisztokémiai (immunohistochemical, IHC) megfestési technikák az antigén elleni specifikus antitest (elsődleges antitest), az elsődleges antitest elleni másodlagos antitest és egy enzim kromogén szubsztráttal alkotott komplexének egymás után következő alkalmazásán keresztül, közbeiktatott mosási lépések mellett lehetővé teszik az antigének megjelenítését. A kromogén enzimaktiválása látható reakcióterméket eredményez az antigén helyén. Ezután a minta kontrasztfesthető és lefedhető. Az eredmények fénymikroszkóp használatával értelmezhetők, majd segítségül használhatók a patofiziológias folyamatok differenciáldiagnózisa során, amely folyamatok az esetek egy részében konkrét antigénhez kapcsolódnak.

Klón

AMY82

Immunogén

A humán inhibin-alfa molekula 134 aminosavának megfelelő prokarióta eredetű rekombináns fehérje.

Specifititás

Humán inhibin-alfa.

A reagens összetétele

Az NCL-L-InhibinA egy tartósítószerként 15 mM nátrium-azidot tartalmazó folyékony szövetkultúra felülúszó.

Ig-osztály

IgG1

Összfehérje-koncentráció

Total Protein

1,0–8,0 g/l. A sarzsspecifikus összfehérje-koncentrációt lásd az üveg címkéjén.

Antitest-koncentráció

Legalább 214 mg/l, ELISA módszerrel meghatározva. A sarzsspecifikus Ig-koncentrációt lásd az üveg címkéjén.

Felhasználási javaslatok

Immunhisztokémia (lásd **Módszer**) paraffinos metszeteken. Javasolt hígítás: 1:100, 30 percen át, 25 °C-on. Hőindukált epitópfeltárás Epitope Retrieval Solution pH 6,0 (RE7113 vagy RE7114) alkalmazásával.

Megjelenítés. Kövesse a Novolink™ Polymer Detection System RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests), illetve RE7290-K (50 tests) használati útmutatóját.

Tárolás és stabilitás

2–8 °C-on tárolandó. Tilos fagyasztani. Felhasználás után azonnal tegye vissza 2–8 °C közötti hőmérsékletre. Ne használja az üveg címkéjén feltüntetett lejárati dátum után. A fentiekben előírtaktól eltérő tárolási feltételeket a felhasználónak ellenőriznie kell.

A minták előkészítése

A javasolt fixálószer a paraffinba ágyazott szövetmetszeteknél 10%-os, semleges pufferolású formalin.

Figyelmeztetések és óvintézkedések

Ez a reagens a sejtkultúra felülúszójából készült. Mivel biológiai termék, kezelésekor ésszerű körültekintéssel kell eljárni.

A reagensben lévő nátrium-azid molaritása 15 mM. A nátrium-azidra vonatkozó anyagbiztonsági adatlapot (Material Safety Data Sheet, MSDS) igény esetén rendelkezésre bocsátjuk.

Minden potenciálisan toxikus összetevő ártalmatlanításával kapcsolatban kövesse a szövetségi, állami és helyi előírásokat.

A mintákat fixálás előtt és után, valamint a velük érintkező összes anyagot fertőzések terjesztésére képes anyagként kell kezelni, és megfelelő körültekintéssel kell ártalmatlanítani.¹ Soha ne pipettázza szájjal a reagenseket, továbbá kerülje a bőr és a nyálkahártyák érintkezését a reagensekkel és a mintákkal. Ha a reagensek vagy minták érzékeny területtel érintkeznek, bő vízzel mossa le az érintett területet. Forduljon orvoshoz.

Minimálisan kell csökkenteni a reagensek mikrobiális szennyeződését, különben megnövekedhet a nem specifikus festődés.

A megadottaktól eltérő inkubációs idők és hőmérsékletek hibás eredményekhez vezethetnek. A felhasználónak minden ilyen jellegű változtatást validálnia kell.

Minőség-ellenőrzés

A felhasználó laboratóriumában alkalmazott szövetfeldolgozási és technikai eljárások eltérései jelentős különbséget okozhatnak az eredményekben, ami az alábbi eljárásokon túl belső kontrollok rendszeres futtatását teszi szükségessé.

Kontrollként friss boncolási/biopsziás/sebészeti mintákat kell használni, amelyeket a lehető leghamarabb a betegmintákkal megegyező módon kell formalinban fixálni, feldolgozni és paraffiniaszba ágyazni.

Posztív szövetkontroll

A megfelelő szövet-előkészítés és festési technikák ellenőrzésére használatos.

Minden tesztelési körülménygyűtes esetében és minden megfestési sorozatban kell alkalmazni egy pozitív szövetkontrollt.

A gyengén pozitív festődésű szövet alkalmasabb az erősebben pozitív festődésű szövetnél az optimális minőség-ellenőrzéshez, valamint a kismértékű reagensbomlás észleléséhez.²

A javasolt pozitív kontrollszövet a here.

Ha a pozitív szövetkontroll nem mutat pozitív festődést, a vizsgált minták eredményeit érvénytelennek kell tekinteni.

Negatív szövetkontroll

A pozitív szövetkontroll után azért kell megvizsgálni, hogy a vizsgált antigén elsődleges antitest segítségével történő jelölésének specificitását ellenőrizni lehessen.

A javasolt negatív kontrollszövet a kisagy.

Ezenkívül a legtöbb szövetszövetben jelen lévő különböző sejttypusok gyakran használhatók negatív kontrollként, de ezeket a felhasználónak kell ellenőriznie.

Ha van nem specifikus festődés, az rendszerint diffúz megjelenésű. A formalinban túlfixált szövetekből származó metszeteknél a kötőszövet szórányos festődése is megfigyelhető. A festési eredmények értelmezésére ép sejtek használjon. A nekrotizált vagy degenerálódott sejtek gyakran nem specifikusan festődnek meg.³ A fehérjék vagy a szubsztrát reakciótermékeinek nem immunológiai kötődése miatt álpozitív eredmények jelentkezhetnek. Az alkalmazott immunfestés típusától függően álpozitív eredményeket okozhatnak olyan endogén enzimek is, mint a pszeudoperoxidáz (vörösvérsejtek), endogén peroxidáz (citokrom C), illetve endogén biotin (pl. máj, emlő, agy, vese). Az endogén enzim aktivitásának vagy az enzimek nem specifikus kötődésének a specifikus immunreakciótól való megkülönböztetésére további betegszövetek festhetők kizárólag szubsztrát–kromogén oldattal vagy enzimkomplexekkel (avidin-biotin, sztreptavidin, jelölt polimer) és szubsztrát–kromogénnel. Ha a negatív szövetkontroll specifikus festődést mutat, a betegminták eredményeit érvénytelennek kell tekinteni.

Negatív reagenskontroll

Az elsődleges antitest helyett nem specifikus negatív reagenskontrollt alkalmazzon mindegyik betegminta metszeténél, hogy a nem specifikus festődést kiértékelhesse, és hogy lehetővé váljon a specifikus festődés jobb értelmezése az antigén helyén.

Betegszövet

Az NCL-L-InhibinA-val festett betegmintákat utolsóként vizsgálja meg. A pozitív festődés intenzitását a negatív reagenskontroll esetleges nem specifikus háttérfestődésének viszonylatában értékelje. Mint minden immunhisztokémiai vizsgálatnál, a negatív eredmény azt jelenti, hogy az antigén nem vonzható, nem pedig azt, hogy az antigén nem volt jelen a vizsgált sejtekben/szövetben. Szükség esetén az álnegatív reakciók azonosítására használjon antitestpanelt.

Várható eredmények

Normál szövetek

Az AMY82 klón kimutatta az inhibin-alfa fehérjét a here Sertoli- és Leydig-sejtjeiben, a mellékvesekéregben és -velőben, valamint a petefészek theca internájában. (Összesített esetszám = 38).

Kóros szövetek

Az AMY82 kimutatta az inhibin-alfa fehérjét a 27/105 kiértékelt kóros petefészekszövetben, beleértve 17/44 jóindulatú theca sejtjes daganat, 4/6 rosszindulatú theca sejtjes daganat, 2/9 ciszta, 3/3 granulosa sejtjes daganat és 1/5 világossejtes karcinóma esetén. Nem figyeltek meg festődést szerózus adenokarcinóma (0/8), endometrium-adenokarcinóma (0/6), átmeneti sejtjes karcinóma (0/5), szikszák-daganat (0/4), diszgerminóma (0/3), fibróma (0/2), mucinózus cisztadenóma (0/2), mucinózus adenokarcinóma (0/2), mucinózus cisztadenokarcinóma (0/2), szerózus cisztadenokarcinóma (0/1), szerózus papilláris cisztadenóma (0/1), Brenner-tumor (0/1) és mucinózus borderline daganat (0/1) esetén. Nem volt festődés észlelhető további daganatok, beleértve laphámsejtjes karcinóma (0/10), pajzsmirigy-daganat (0/4), májdaganat (0/4), limfóma (0/3), kolorektális daganat (0/3), agydaganat (0/2), emlődaganat (0/2), gyomordaganat (0/2), hasnyálmirigy-daganat (0/2), tüdő-daganat (0/2), vesedaganat (0/2), prosztata-daganat (0/2) és közelebről meg nem határozott áttétes daganat (0/2) esetén. (Összesített esetszám = 145).

Az NCL-L-InhibinA az inhibin-alfa kimutatására ajánlott egészséges és tumoros szövetekben.

Általános korlátozások

Az immunhisztokémia több lépésből álló diagnosztikai folyamat, amely a következőket foglalja magában: speciális képzés alapján a megfelelő reagens kiválasztása; a szövetek kiválasztása, fixálása és feldolgozása; az IHC tárgyilemez előkészítése; és a festési eredmények értelmezése.

A szövet festődése függ a szövet festés előtti kezelésétől és feldolgozásától. A nem megfelelő fixálás, a fagyasztás, olvasztás, mosás, szárítás, melegítés, metszetkészítés, illetve a más szövetekkel vagy folyadékokkal történő szennyezés műtermékeket, az antitestek befogását, illetve álnegatív eredményeket okozhat. Ellentmondó eredményekhez vezethetnek a fixálási vagy beágyazási módszerek eltérései, illetve a szövet eredendő rendellenességei.⁴

A túlzott vagy hiányos kontrasztfestés ronthatja az eredmények megfelelő értelmezését.

Minden festődés meglétének vagy hiányának klinikai értelmezését morfológiai vizsgálatokkal és megfelelő kontrollokkal kell kiegészíteni, valamint az értékelést a beteg klinikai kórtörténete és egyéb diagnosztikai vizsgálatok figyelembevételével, képzett patológusnak kell elvégeznie.

A Leica Biosystems Newcastle Ltd által biztosított antitestek specifikus fixálási követelmények mellett, az utasításoknak megfelelően fagyasztott vagy paraffinba ágyazott metszeteken történő felhasználásra szolgálnak. Időnként váratlan antigén-expresszió fordulhat elő, különösen daganatok esetében. Bármely festett szövetszövet klinikai értelmezéséhez morfológiai elemzést is kell végezni, és ki kell értékelni a megfelelő kontrollokat.

Bibliográfia – általános

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29–P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio–Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Robertson D, Burger H and Fuller P. Inhibin/activin and ovarian cancer. Endocrine-Related Cancer. 2004; 11:35–49.
6. Bernard J, Chapman S and Woodruff T. Mechanisms of inhibin signal transduction. Recent Progress in Hormone Research. 2001; 56:417–450.

Módosítások az előző változathoz képest

Nem alkalmazható

Kiadás dátuma

15 április 2019

A Novocastra™ antitestek paraffinba ágyazott szöveten történő felhasználásának immunhisztokémiai módszere hőindukált epitópfeltárással.

Szükséges, de nem szállított reagensek

1. Az immunhisztokémiában alkalmazott standard oldószerek.
2. 50 mM tris-pufferelt sóoldat (Tris-buffered saline, TBS), pH 7,6.
3. Epitópfeltárási oldat (lásd C. Epitópfeltárási oldatok).
4. Antitesthígító, Novocastra IHC Diluent, RE7133.
5. Megjelenítő rendszer: Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests), illetve RE7290-K (50 tests).
6. Fedőanyag – a gyártó javaslatának megfelelően használandó.

Szükséges, de nem szállított felszerelés

1. 25 °C-ra beállított inkubátor.
2. Melegítő készülék az epitópfeltáráshoz: vízfürdő, gőzölő, kukta vagy egyéb szabályozott hőmérsékletű laboratóriumi eszköz.
3. Általános immunhisztokémiai laboratóriumi felszerelés.

Epitópfeltárási oldatok (lásd Felhasználási javaslatok az adott oldat esetében)

RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 l	Felületaktív anyagot tartalmazó, citrátalapú puffer
RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 mL	
RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 l	
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 l	Felületaktív anyagot tartalmazó, EDTA-alapú puffer
RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 l	
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 l	Felületaktív anyagot tartalmazó, tris/EDTA-alapú puffer
RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 l	

Módszertan

A módszer végrehajtása előtt a felhasználóknak képzésben kell részesülniük az immunhisztokémiai módszerekkel kapcsolatban.

A felhasználóknak kell meghatározniuk az optimális antitesthígításokat. Ha nincs másként feltüntetve, minden lépést szobahőmérsékleten (25 °C) kell végrehajtani.

Epitópfeltárási

Kövesse az RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119, illetve RE7122 számú epitópfeltárási oldatok használati útmutatóját.

Megjelenítés

Kövesse a Novolink Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests), illetve RE7290-K (50 tests) használati útmutatóját.

Előző kiadás módosításai

Nem alkalmazható

Kiadás időpontja

2008. április 23. (CE-protokoll/HTAUT+Novolink).

Novocastra™ Anticorp monoclonal lichid de șoarece Inhibin Alpha

Cod produs: NCL-L-InhibinA

Utilizare prevăzută

Pentru diagnosticare in vitro.

NCL-L-InhibinA este destinat identificării calitative, prin intermediul microscopiei optice, a moleculelor de inhibină alfa în secțiunile de parafină. Interpretarea clinică a oricărei colorări sau a absenței acesteia trebuie completată cu studii morfologice utilizând controale adecvate și trebuie evaluată în contextul antecedentelor clinice ale pacientului, precum și al altor teste de diagnosticare efectuate de către un patolog calificat.

Principiul de procedură

Tehnicele de colorare imunohistochimică (IHC) permit vizualizarea antigenilor prin aplicarea secvențială a unui anumit anticorp pe antigen (anticorp primar), a unui anticorp secundar pe anticorpul primar și a unui complex enzimatic cu un substrat cromogen, cu etape de spălare intercalate. Activarea enzimatică a cromogenului duce la un produs de reacție vizibil la locul aplicării antigenului. Specimenul poate fi apoi contracolorat și acoperit cu lamelă. Rezultatele sunt interpretate folosind un microscop optic și ajută la diagnosticul diferențial al proceselor patofiziologice, care pot sau nu să fie asociate cu un anumit antigen.

Clonă

AMY82

Imunogen

Proteină procariotică recombinantă corespunzând la 134 de aminoacizi din molecula de inhibină alfa umană.

Specificitate

Inhibină alfa umană.

Compoziția reactivului

NCL-L-b-InhibinA este un supernatant de cultură tisulară lichid, care conține azidă de sodiu 15 mM drept conservant.

Clasa Ig

IgG1

Concentrație proteină totală

Total Protein

1,0–8,0 g/l. Consultați eticheta flaconului pentru concentrația proteinelor totale specifică lotului.

Concentrație anticorpi

Mai mare sau egală cu 214 mg/L, așa cum este determinată prin ELISA. Consultați eticheta flaconului pentru concentrația Ig specifică lotului.

Recomandări privind utilizarea

Imunohistochimie (a se vedea **Metodologie**) pe secțiuni în parafină. Diluție sugerată: 1:100 timp de 30 de minute la 25 °C. Recuperarea indusă de căldură a epitopilor utilizând Soluție de recuperare a epitopilor pH 6,0 (RE7113 sau RE7114).

Vizualizare. Urmați instrucțiunile de utilizare pentru Novolink™ Polymer Detection System RE7280-K (1250 teste), RE7150-K (500 teste), RE7140-K (250 teste) sau RE7290-K (50 teste).

Depozitare și stabilitate

A se depozita la 2–8 °C. A nu se congela. A se returna la 2–8 °C imediat după utilizare. A nu se utiliza după data expirării indicată pe eticheta flaconului. Alte condiții de depozitare decât cele specificate mai sus trebuie verificate de către utilizator.

Pregătirea specimenului

Mediul de fixare recomandat este formalină tamponată neutră 10% pentru secțiunile de țesut încorporate în parafină.

Avertismente și precauții

Acest reactiv a fost pregătit din supernatantul culturii celulare. Întrucât este un produs biologic, trebuie să se acționeze cu prudență rezonabilă la manipularea sa.

Molaritatea azidei de sodiu din acest reactiv este 15 mM. Fișa tehnică de securitate a materialului (FTSM) referitoare la azida de sodiu este disponibilă la cerere.

Consultați reglementările naționale, județene sau locale pentru informații privind eliminarea la deșeurii a oricăror componente cu potențial toxic.

Specimenele, înainte și după fixare, precum și toate materialele expuse la acestea, trebuie manevrate ca și când ar avea potențialul de a transmite infecții și trebuie eliminate luând măsurile de precauție adecvate. Nu pipetați niciodată reactivii cu gura și evitați contactul reactivilor și specimenelor cu pielea și membranele mucoase. Dacă reactivii sau probele vin în contact cu suprafețele sensibile, spălați cu apă din abundență. Solicitați asistență medicală.

Reduceți la minim contaminarea microbiană a reactivilor, în caz contrar poate apărea o creștere a colorării nespecifice.

Timpii sau temperaturile de incubație care diferă de valorile specificate pot genera rezultate eronate. Orice astfel de modificări trebuie validate de către utilizator.

Controlul calității

Diferențele în ceea ce privește procesarea țesutului și procedurile tehnice în laboratorul utilizatorului pot cauza o variabilitate semnificativă a rezultatelor, necesitând efectuarea cu regularitate de controale interne, în plus față de următoarele proceduri. Probele de control trebuie să fie probe proaspete de autopsie/biopsie/chirurgicale, fixate în formalină, procesate și încorporate în ceară de parafină cât mai curând posibil și în aceeași manieră ca și probele pacientului.

Țesutul de control pozitiv

Folosit pentru a indica țesuturile pregătite corect și tehnicile de colorare adecvate.

O probă de țesut de control pozitiv trebuie să fie inclusă pentru fiecare set de condiții de testare în fiecare etapă de colorare.

Un țesut cu colorare pozitivă slabă este mai adecvat decât un țesut cu colorare pozitivă puternică în vederea unui control optim al calității și pentru a detecta nivelurile minore de degradare a reactivului.²

Țesutul de control pozitiv recomandat este cel testicular.

Dacă țesutul de control pozitiv nu demonstrează colorația pozitivă, rezultatele obținute cu acele probe de testare trebuie considerate nevalide.

Țesutul de control negativ

Trebuie examinat după țesutul de control pozitiv pentru a verifica specificitatea informațiilor de etichetare ale antigenului țintă în funcție de anticorpii primari.

Țesutul de control negativ recomandat este creierul.

Ca alternativă, varietatea de tipuri diferite de celule prezente în majoritatea secțiunilor tisulare oferă frecvent locuri de control negativ, dar acest lucru trebuie verificat de către utilizator.

Colorația nespecifică, dacă este prezentă, are, de obicei, un aspect difuz. Colorația sporadică a țesutului conjunctiv poate fi observată, de asemenea, în secțiuni de țesuturi fixate în mod excesiv în formalină. Folosiți celule intacte pentru interpretarea rezultatelor de colorare. Celulele necrotice sau degenerate se colorează deseori într-un mod nespecific.³ Se pot observa rezultate fals pozitive ca urmare a legării non-immunologice a proteinelor sau produșilor de reacție ai substratului. Acestea pot fi cauzate, de asemenea, de enzimele endogene precum pseudoperoxidaza (eritrocite), peroxidaza endogenă (citocromul C) sau biotina endogenă (de exemplu, ficat, sân, creier, rinichi), în funcție de tipul de imunocolorație folosit. Pentru a diferenția activitatea enzimelor endogene sau legarea nespecifică a enzimelor de imunoreactivitatea specifică, pot fi colorate țesuturi suplimentare de la pacient numai cu substrat-cromogen sau, respectiv, complexe enzimatic (avidină-biotină, streptavidină, polimer etichetat) și substrat-cromogen. În cazul în care colorația specifică are loc în țesutul de control negativ, rezultatele obținute pe probele pacientului trebuie să fie considerate nevalide.

Reactivul de control negativ

Folosiți un reactiv de control negativ nespecific în locul anticorpului primar cu o parte din fiecare specimen al pacientului pentru a evalua colorația nespecifică și a permite o mai bună interpretare a colorației specifice la situsul antigenului.

Țesutul pacientului

Examinați speciimenele pacientului colorate cu NCL-L-InhibinA ultimele. Intensitatea colorației pozitive trebuie evaluată în contextul oricărei colorații de fond nespecifice a reactivului de control negativ. La fel ca în cazul oricărui test imunohistochimic, un rezultat negativ înseamnă că antigenul nu a fost detectat, și nu că antigenul a fost absent în celulele/țesuturile analizate. Dacă este necesar, folosiți un panou pentru anticorpi pentru identificarea reacțiilor fals negative.

Rezultate așteptate

Țesuturi normale

Clona AMY82 a detectat proteina de inhibină alfa în celulele Sertoli și celulele Leydig ale testiculului, în cortexul și medula glandei suprarenale și în teaca internă a ovarului. (Numărul total al cazurilor = 38).

Țesuturi anormale

Clona AMY82 a detectat proteina de inhibină alfa în 27/105 țesuturi ovariene anormale evaluate incluzând 17/44 tumori benigne cu celule tecale, 4/6 tumori maligne cu celule tecale, 2/9 chisturi, 3/3 tumori cu celule granuloase și 1/5 carcinoame cu celule clare. Nu a fost observată vreo colorare în adenocarcinoame seroase (0/8), adenocarcinoame endometriale (0/6), carcinoame cu celule tranziționale (0/5), tumori ale sacului vitelin (0/4), disgeminioame (0/3), fibroame (0/2), chistadenoame mucinoase (0/2), adenocarcinoame mucinoase (0/2), chistadenocarcinoame mucinoase (0/2), chistadenocarcinom seros (0/1), chistadenoma papilar seros (0/1), tumoră Brenner (0/1) și o tumoră mucinoasă de limită (0/1). Nu a fost detectată vreo colorare într-o varietate de alte tumori incluzând carcinoame cu celule scuamoase (0/10), tumori tiroidiene (0/4), tumori hepatice (0/4), limfoame (0/3), tumori colorectale (0/3), tumori cerebrale (0/2), tumori mamare (0/2), tumori gastrice (0/2), tumori pancreatice (0/2), tumori pulmonare (0/2), tumori renale (0/2), tumori prostatice (0/2) și tumori metastatice nespecificate (0/2). (Numărul total al cazurilor = 145).

NCL-L-InhibinA este recomandat pentru detectarea inhibinei alfa în țesuturi normale și neoplazice.

Limitări generale

Imunohistochimia este un proces de diagnostic cu mai multe etape, care constă din instruirea specializată în ceea ce privește alegerea reactivilor adecvați; alegerea, fixarea și procesarea țesutului; prepararea lamei IHC; și interpretarea rezultatelor de colorare.

Colorarea tisulară depinde de manipularea și procesarea țesutului înainte de colorare. Fixarea, congelarea, dezghețarea, spălarea, uscarea, încălzirea, secționarea necorespunzătoare sau contaminarea cu alte țesuturi ori fluide pot cauza artefacte, captura anticorpilor sau rezultate fals negative. Rezultatele inconsecvente pot fi atribuite diferențelor în ceea ce privește metodele de fixare și încorporare, ori neregularităților inerente ale țesutului.⁴

Contra-colorația excesivă sau incompletă poate compromite interpretarea adecvată a rezultatelor.

Interpretarea clinică a oricărei colorări sau a absenței acesteia trebuie completată cu studii morfologice utilizând controale adecvate și trebuie evaluată în contextul antecedentelor clinice ale pacientului, precum și al altor teste de diagnosticare efectuate de către un patolog calificat.

Anticorpii de la Leica Biosystems Newcastle Ltd sunt destinați utilizării, conform indicațiilor, fie pe secțiuni congelate, fie pe secțiuni încorporate în parafină cu cerințe de fixare specifice. Poate apărea exprimarea neașteptată a antigenului, în special în neoplasme. Interpretarea clinică a oricărei secțiuni tisulare colorate trebuie să includă analiza morfologică și evaluarea probelor de control adecvate.

Bibliografie - General

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Robertson D, Burger H and Fuller P. Inhibin/activin and ovarian cancer. Endocrine-Related Cancer. 2004; 11:35-49.
6. Bernard J, Chapman S and Woodruff T. Mechanisms of inhibin signal transduction. Recent Progress in Hormone Research. 2001; 56:417-450.

Amendamente la ediția anterioară

Nu este cazul

Data publicării

15 aprilie 2019

Metodologie imunohistochimică pentru Anticorpi Novocasta™ pe țesut încorporat în parafină utilizând tehnica de recuperare indusă de căldură a epitopilor.

Reactivi necesari care nu sunt însă furnizați

1. Solvenți standard folosiți în imunohistochimie.
2. soluție salină tamponată cu trometamină (SSTT) 50 mM, pH 7,6.
3. Soluție de recuperare a epitopilor (a se vedea C. Soluții de recuperare a epitopilor).
4. Diluant pentru anticorpi, Novocasta IHC Diluent, RE7133.
5. Sistem de vizualizare, Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 teste), RE7150-K (500 teste), RE7140-K (250 teste) sau RE7290-K (50 teste).
6. Mediu de montare - a se utiliza conform recomandărilor producătorului.

Echipe necesare care nu sunt însă furnizate

1. Incubator setat la 25 °C.
2. Dispozitiv de încălzire pentru recuperarea epitopilor: baie de apă, vas de aburi, vas sub presiune sau alte echipamente de laborator cu temperatură controlată.
3. Echipament de laborator general pentru imunohistochimie.

Soluții de recuperare a epitopilor (a se vedea Recomandări de utilizare pentru una din următoarele)

RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 L	Soluție tampon bazată pe citrat conținând surfactant
RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 mL	
RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 L	
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 L	Soluție tampon bazată pe EDTA conținând surfactant
RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 L	
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 L	Soluție tampon bazată pe Trometamină/EDTA conținând surfactant
RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 L	

Metodologie

Înainte de a aplica această metodologie, utilizatorii trebuie să fie instruiți în ceea ce privește tehnicile imunohistochimice.

Utilizatorii trebuie să stabilească diluțiile optime în funcție de anticorpi. Dacă nu se indică altfel, toate etapele se efectuează la temperatura camerei (25 °C).

Recuperarea epitopilor

Urmați instrucțiunile de utilizare pentru Soluții de recuperare a epitopilor, RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119 sau RE7122.

Vizualizare

Urmați instrucțiunilor de utilizare pentru Novolink Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 teste), RE7150-K (500 teste), RE7140-K (250 teste) sau RE7290-K (50 teste).

Amendamente la ediția anterioară

Nu este cazul

Data publicării

23 aprilie 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

Жидкая форма моноклональных антител мыши Novocastra™ Inhibin Alpha

Код продукта: NCL-L-InhibinA

Назначение

Для диагностики in vitro

Препарат NCL-L-InhibinA предназначен для качественной идентификации молекул альфа-субъединицы ингибина в парафиновых срезах методом световой микроскопии. Клиническая интерпретация любого окрашивания или его отсутствия должна быть дополнена морфологическими исследованиями с надлежащими контролями и должна быть оценена квалифицированным патологом с учетом анамнеза пациента и других диагностических тестов.

Принцип метода

Иммуногистохимические (ИГХ) методы окрашивания позволяют визуализировать антигены путем последовательного связывания специфического антитела с антигеном (первичное антитело), вторичного антитела с первичным антителом и ферментного комплекса с хромогенным субстратом. Между этими этапами выполняется промежуточная промывка. Ферментная активация хромогена приводит к образованию видимого продукта реакции в месте расположения антигена. После этого образцы можно подвергать контрастному окрашиванию и заключить под покровную пленку. Интерпретацию результатов выполняют под световым микроскопом и используют для дифференциальной диагностики патофизиологических процессов, которые могут быть связаны или не связаны с конкретным антигеном.

Клон

AMУ82

Иммуноген

Рекомбинантный белок из прокариотических клеток, соответствующий 134 аминокислотам молекулы альфа-единицы ингибина человека.

Специфичность

Альфа-единицы ингибина человека.

Состав реактива

NCL-L-InhibinA является супернатантом жидкой культуры тканей, содержащим 15 мМ азида натрия в качестве консерванта.

Класс иммуноглобулинов

IgG1

Общая концентрация белка Total Protein

1,0–8,0 г/л. Общая концентрация белка в каждой партии указана на этикетке флакона.

Концентрация антитела

Не менее 214 мг/л при измерении методом ИФА. Концентрация иммуноглобулина, соответствующая данной серии, указана на этикетке флакона.

Рекомендации по применению

Иммуногистохимия парафиновых срезов (смотрите **Методология**). Рекомендуемое разведение: 1: 100 в течение 30 минут при температуре 25 °С. Тепловая демаскировка эпителиев с использованием раствора для демаскирования эпителиев (Epitope Retrieval Solution), pH 6,0 (RE7113 или RE7114).

Визуализация. Следуйте инструкциям по использованию систем для визуализации Novolink™ Polymer Detection System RE7280–K (1250 исследований), RE7150–K (500 исследований), RE7140–K (250 исследований) или RE7290–K (50 исследований).

Хранение и стабильность

Хранить при температуре 2–8 °С. Не замораживать. После использования немедленно вернуть на хранение при температуре 2–8 °С. Не использовать после указанной на этикетке флакона даты истечения срока годности. Условия хранения, отличающиеся от указанных выше, должны быть проверены пользователем.

Подготовка образцов

Для приготовления залитых в парафин срезов тканей рекомендуется фиксация в 10 % нейтральном забуференном формалине.

Предупреждения и меры предосторожности

Этот реактив был изготовлен из супернатанта культуры клеток. При обращении с этим продуктом, как и с другими биологическими продуктами, следует соблюдать разумную осторожность.

Молярность азида натрия в данном реактиве составляет 15 мМ. Паспорт безопасности химической продукции, составленный на азид натрия, предоставляется по запросу.

По вопросам утилизации любых возможно токсических компонентов выполняйте требования федеральных, региональных или местных нормативных документов.

С образцами (до и после фиксации) и всеми материалами, которые находятся под их воздействием, следует обращаться как со способными к передаче инфекции и утилизировать, соблюдая соответствующие меры предосторожности.¹ Никогда не набирайте реактивы в пипетку ртом и не допускайте контакта реактивов и образцов с кожей и слизистыми оболочками. В случае контакта реактивов или образцов с чувствительными зонами промойте их большим количеством воды. Обратитесь за медицинской помощью.

Минимизируйте микробную контаминацию реактивов, чтобы не усилить неспецифическое окрашивание.

Инкубация при сроках и температурах, отличных от указанных в инструкции, может дать ошибочные результаты. Любые подобные изменения должны быть валидированы пользователем.

Контроль качества

Различия в методах обработки тканей и технических процедурах, выполняемых в лаборатории пользователя, могут привести к существенной вариабельности результатов, в связи с чем требуется регулярное выполнение внутрिलाбораторных контролей в дополнение к указанным ниже процедурам.

В качестве контролей следует использовать свежие образцы, полученные при аутопсии, биопсии или хирургических процедурах, фиксированные в формалине, обработанные и как можно скорее залитые в парафин так же, как были обработаны полученные у пациентов образцы.

Положительный контроль ткани

Применяется для проверки правильности подготовки тканей и методов окрашивания.

В каждый набор условий теста при каждом цикле окрашивания следует включать один срез ткани для положительного контроля. Для оптимального контроля качества и обнаружения незначительных уровней деградации реактива более подходит ткань со слабым положительным окрашиванием, чем ткань с сильным положительным окрашиванием.²

В качестве положительного контроля рекомендуется использовать ткани яичек.

При отсутствии положительного окрашивания ткани, используемой в качестве положительного контроля, результаты, полученные с исследуемыми образцами, считаются недействительными.

Отрицательный контроль ткани

Этот тест необходимо выполнять после положительного контроля ткани для проверки специфичности мечения целевого антигена первичным антителом.

В качестве отрицательного контроля рекомендуется ткань мозжечка.

Кроме того, разнообразные типы клеток для отрицательного контроля можно часто найти в большинстве срезов тканей, однако такие препараты должны быть проверены пользователем.

Неспецифическое окрашивание, если оно присутствует, обычно выглядит диффузным. В срезах тканей, избыточно окрашиваемых формалином, можно также иногда увидеть окрашивание соединительной ткани. Для интерпретации результатов окрашивания используйте интактные клетки. Некротизированные или разрушенные клетки часто окрашиваются неспецифически.³

Неиммунное связывание белков или продуктов реакции с субстратом может привести к ложноположительным результатам.

Такие же результаты могут быть связаны с эндогенными ферментами, например псевдопероксидазой (в эритроцитах), эндогенной пероксидазой (цитохром С) или эндогенным биотином (например, в печени, молочной железе, головном мозге или почке) в зависимости от типа использованного иммунного окрашивания. Чтобы отличить активность эндогенных ферментов или неспецифическое связывание ферментов от специфической иммунореактивности, можно выполнить окрашивание дополнительных тканей пациента исключительно хромогенным субстратом или ферментными комплексами (авидин-биотин, стрептавидин, меченый полимер) и хромогенным субстратом соответственно. При наличии специфического окрашивания в отрицательном контроле ткани результаты исследования полученных у пациентов образцов считаются недействительными.

Отрицательный контроль реактива

Для оценки неспецифического окрашивания и лучшей интерпретации специфического окрашивания в области связывания антигена, исследуя срезы каждого образца, взятого у пациента, вместо первичных антител используйте реактив, служащий в качестве неспецифического отрицательного контроля.

Ткань, полученная у пациента

Исследуйте полученные у пациентов образцы, окрашенные NCL-L-InhibinA, последнюю очередь. Интенсивность положительного результата окрашивания следует оценивать с учетом любого неспецифического фонового окрашивания реактива, представляющего собой отрицательный контроль. Как и при любом иммуногистохимическом исследовании, отрицательный результат означает необнаружение антигена, но не его отсутствие в исследованных клетках или ткани. При необходимости следует использовать панель антител для выявления ложноотрицательных реакций.

Ожидаемые результаты

Нормальные ткани

Клон AMY82 обнаружил белок альфа-единицы ингибина в клетках Сертоли и Лейдига яичек, в коре и медуллярной зоне надпочечников и во внутренней оболочке яичников. (Общее число исследованных образцов = 38).

Патологически измененные ткани

Клон AMY82 обнаружил белок альфа-единицы ингибина в 27/105 случаях исследованных патологически измененных тканей, включая 17/44 случаев доброкачественной текаклеточной опухоли, 4/6 случаев злокачественной текаклеточной опухоли, 2/9 случаев кисты, 3/3 случаев гранулезоклеточной опухоли яичников и 1/5 случаев светлоклеточной карциномы. Окрашивание не наблюдалось в серозных аденокарциномах (0/8), эндометриальных аденокарциномах (0/6), карциномах переходных клеток (0/5), опухолях желточного мешка (0/4), дистерминамах (0/3), фибромах (0/2), муцинозных цистаденомах (0/2), муцинозных аденокарциномах (0/2), муцинозных цистаденокарциномах (0/2), серозной цистаденокарциноме (0/1), серозной папиллярной цистаденоме (0/1), опухоли Бреннера (0/1) и пограничной муцинозной опухоли (0/1). Не обнаружено окрашивания в различных других исследованных опухолях, в том числе плоскоклеточных карциномах (0/10), опухолях щитовидной железы (0/4), опухоли печени (0/4), лимфомах (0/3), колоректальных опухолях (0/3), опухолях мозга (0/2), опухолях молочной железы (0/2), опухоли желудка (0/2), опухолях поджелудочной железы (0/2), опухолях легких (0/2), опухолях почек (0/2), опухолях простаты (0/2) и неуточненных метастатических опухолях (0/2). (Общее число исследованных образцов = 145).

NCL-L-InhibinA рекомендуется использовать для выявления альфа-единиц ингибина в здоровых и пораженных опухолью тканях.

Общие ограничения

Иммуногистохимическое исследование является многостадийным диагностическим процессом, требующим специальных навыков в выборе надлежащих реактивов; выборе, фиксации и обработке тканей; приготовлении среза с ИГХ препаратом; интерпретации результатов окрашивания.

Окрашивание тканей зависит от обращения с тканями и их обработкой перед окрашиванием. Неправильные процедуры фиксации, замораживания, оттаивания, промывки, сушки, нагрева, приготовления срезов, а также загрязнение другими тканями или жидкостями могут приводить к артефактам, захвату антител или ложноотрицательным результатам. Противоречивые результаты могут быть обусловлены различиями методов фиксации и заливки препарата или присущей тканям внутренней неравномерностью структуры.⁴

Чрезмерное или неполное контрастирование может негативно отразиться на точности интерпретации результатов.

Клиническая интерпретация любого окрашивания или его отсутствия должна быть дополнена морфологическими исследованиями с надлежащими контролями и должна быть оценена квалифицированным патологом с учетом анамнеза пациента и других диагностических тестов.

Изготовленные компанией Leica Biosystems Newcastle Ltd антитела предназначены, как указано выше, для применения на замороженных или залитых в парафин срезах и требуют выполнения конкретных требований по фиксации. Возможна непредвиденная экспрессия антигена, особенно в опухолях. Клиническая интерпретация любого окрашенного среза ткани должна включать морфологический анализ и оценку соответствующих контролей.

Библиография — общая

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29–P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio–Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Robertson D, Burger H and Fuller P. Inhibin/activin and ovarian cancer. Endocrine-Related Cancer. 2004; 11:35–49.
6. Bernard J, Chapman S and Woodruff T. Mechanisms of inhibin signal transduction. Recent Progress in Hormone Research. 2001; 56:417–450.

Дополнения к предыдущему выпуску

не применимо

Дата выпуска

15 Апрель 2019

Методика иммуногистохимического исследования антител Novocastra™ в залитых в парафин тканях с использованием технологии тепловой демаскировки эпитопа.

Необходимые реактивы, не входящие в комплект поставки

1. Стандартные растворители, использующиеся в иммуногистохимических исследованиях.
2. 50 мМ трис-буферный солевой раствор (TBS), pH 7,6.
3. Раствор для демаскирования эпитопов (смотрите раздел «Растворы для демаскирования эпитопов»).
4. Разбавитель антител, Novocastra IHC Diluent, RE7133.
5. Система визуализации, предназначенная для детекции полимеров, Novolink™ RE7280-K (1250 исследований), RE7150-K (500 исследований), RE7140-K (250 исследований) или RE7290-K (50 исследований).
6. Среда для заливки препаратов: используйте в соответствии с рекомендациями производителя.

Необходимое оборудование, не входящее в комплект поставки

1. Инкубатор, установленный на 25 °С.
2. Устройства для нагревания, использующиеся при демаскировании антигенов: водяная баня, паогенератор, скороварка или иное лабораторное оборудование, снабженное регулятором температуры.
3. Стандартное лабораторное оборудование для иммуногистохимических исследований.

Растворы для демаскировки эпитопов (см. рекомендации по использованию одного из следующих)

Раствор для демаскирования эпитопов RE7113 Epitope Retrieval Solution, pH 6, (10-кратный концентрат), 1 л	Буфер на основе лимонной кислоты, содержащий сурфактант
Раствор для демаскирования эпитопов RE7114 Epitope Retrieval Solution, pH 6, (10-кратный концентрат), 500 мл	
Раствор для демаскирования эпитопов RE7115 Epitope Retrieval Solution, pH 6, (готовый к использованию реактив), 1 л	
Раствор для демаскирования эпитопов RE7116 Epitope Retrieval Solution, pH 8, (10-кратный концентрат), 1 л	Буфер на основе EDTA, содержащий сурфактант
Раствор для демаскирования эпитопов RE7118 Epitope Retrieval Solution, pH 8, (готовый к использованию реактив), 1 л	
Раствор для демаскирования эпитопов RE7119 Epitope Retrieval Solution, pH 9, (10-кратный концентрат), 1 л	Буфер на основе EDTA / Трис, содержащий сурфактант
Раствор для демаскирования эпитопов RE7122 Epitope Retrieval Solution, pH 9, (готовый к использованию реактив), 1 л	

Методика

Прежде чем применять эту методику, пользователи должны научиться проводить иммуногистохимические исследования.

Пользователи должны определить оптимальные разведения препаратов антител. Если не указано иное, выполняйте все этапы при комнатной температуре (25 °C).

Демаскирование эпитопа

Пожалуйста, следуйте инструкциям по использованию растворов для демаскирования эпитопов RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119 или RE7122.

Визуализация

Пожалуйста, следуйте инструкциям по использованию систем визуализации Novolink Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 исследований), RE7150-K (500 исследований), RE7140-K (250 исследований) или RE7290-K (50 исследований).

Дополнения к предыдущему выпуску

не применимо

Дата выпуска

23 апреля 2008 г. (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

Płynne mysie przeciwciało monoklonalne Novocastra™

Inhibin Alpha

Kod produktu: NCL-L-InhibinA

Przeznaczenie

Do diagnostyki *in vitro*.

NCL-L-InhibinA jest przeznaczony do jakościowej identyfikacji za pomocą mikroskopii świetlnej cząsteczek inhibiny alfa w skrawkach parafinowych. Klinczną interpretację barwienia lub jego braku należy uzupełnić badaniami morfologicznymi oraz odpowiednimi kontrolami. Ocenę powinien przeprowadzić wykwalifikowany patolog w kontekście historii choroby pacjenta oraz innych badań diagnostycznych.

Zasady postępowania

Metody barwienia immunohistochemicznego (IHC) umożliwiają wizualizację antygenów dzięki zastosowaniu – po kolei – swoistego przeciwciała przeciwko antygenowi (przeciwciała pierwszorzędowego), przeciwciała drugorzędowego przeciwko przeciwciału pierwszorzędowemu i kompleksu enzymu z substratem chromogennym z etapami przemycania. Aktywacja enzymatyczna chromogenu prowadzi do wytworzenia widocznego produktu reakcji w miejscu antygeny. Następnie można wykonać barwienie kontrastowe próbki i zakryć ją szkiełkiem nakrywkowym. Wyniki są interpretowane przy użyciu mikroskopu świetlnego i pomagają w diagnostyce różnicowej procesów patofizjologicznych, które mogą mieć związek z określonym antygenem.

Klon

AMY82

Immunogen

Prokariotyczne rekombinowane białko odpowiadające 134 aminokwasom ludzkiej inhibiny alfa.

Swoistość

Ludzka inhibina alfa.

Skład odczynnika

NCL-L-InhibinA jest płynnym supernatantem hodowli tkankowej konserwowanym 15 mM azydku sodu.

Klasa Ig

IgG1

Całkowite stężenia białka

Total Protein

1,0–8,0 g/L. Całkowite stężenie białka w danej serii podano na etykiecie fiołki.

Stężenie przeciwciał

Większe lub równe 214 mg/L oznaczone za pomocą testu ELISA. Stężenie Ig w danej serii podano na etykiecie fiołki.

Zalecenia dotyczące stosowania

Badanie immunohistochemiczne (zob **Metodologia**) skrawków parafinowych. Sugerowane rozcieńczenie: 1:100 przez 30 minut w temperaturze 25 °C. Ciepłe odmaskowywanie epitopu przy użyciu roztworu Epitope Retrieval Solution pH 6.0 (RE7113 lub RE7114).

Wizualizacja. Należy postępować zgodnie z instrukcją stosowania dołączonej do Novolink™ Polymer Detection System RE7280-K (1250 testów), RE7150-K (500 testów), RE7140-K (250 testów) lub RE7290-K (50 testów).

Przechowywanie i trwałość

Przechowywać w temperaturze 2–8 °C. Nie zamrażać. Niezwłocznie po użyciu ponownie umieścić w temperaturze 2–8°C. Nie używać po upływie daty ważności podanej na etykiecie fiołki. Przechowywanie w warunkach innych od wskazanych powyżej wymaga weryfikacji użytkownika.

Przygotowanie próbek

Zalecanym utrwalaczem jest 10-procentowa obojętna buforowana formalina do zatopionych w parafinie skrawków tkankowych.

Ostrzeżenia i środki ostrożności

Odczynnik został przygotowany z supernatantu hodowli tkankowej. Ponieważ jest to produkt biologiczny, podczas jego używania należy zachować odpowiednie środki ostrożności.

Stężenie molarne azydku sodu w tym odczynniku wynosi 15 mM. Karta charakterystyki azydku sodu jest udostępniana na żądanie.

Wszelkie potencjalnie toksyczne składniki należy utylizować zgodnie z krajowymi lub lokalnymi przepisami.

Próbki przed i po utrwaleniu oraz wszelkie materiały narażone na kontakt z nimi należy traktować jak materiały potencjalnie zakaźne i należy je utylizować z zachowaniem odpowiednich środków ostrożności. Podczas pobierania pipetą nie wolno zasysać odczynników ustami i należy unikać kontaktu odczynników i preparatów ze skórą oraz błonami śluzowymi. W razie kontaktu odczynników lub próbek ze szczególnie narażonymi miejscami przemyć miejsce kontaktu dużą ilością wody. Należy zasięgnąć porady lekarza. Należy chronić odczynnik przed skażeniem drobnoustrojami, ponieważ może to doprowadzić do natężonego barwienia niespecyficznego.

Zastosowanie okresów inkubacji i temperatur innych niż te podane w instrukcji może spowodować błędne wyniki. Wszelkie zmiany tego typu muszą zostać zweryfikowane przez użytkownika.

Kontrola jakości

Różnice w przetwarzaniu tkanek i dodatkach technicznych w laboratorium użytkownika mogą doprowadzić do znacznej zmienności wyników, co oznacza konieczność dodatkowego przeprowadzania regularnych kontroli wewnątrznych.

Kontrolie należy przeprowadzać jak najrybciej na świeżych próbkach z autopsji/biopsji/operacji chirurgicznej utrwalonych, przetworzonych i zatopionych w parafinie, taką samą metodą, jaką badane są pobrane tkanki.

Tkankowa kontrola pozytywna

Stosowana w celu wskazania prawidłowo przygotowanych tkanek i prawidłowych technik barwienia.

W każdej serii barwienia każdy zestaw warunków testowych powinien uwzględniać jedną tkankową kontrolę pozytywną.

Do optymalnej kontroli jakości i do wykrywania niewielkich poziomów degradacji odczynników bardziej nadaje się tkanka o słabym barwieniu pozytywnym niż tkanka o silnym barwieniu pozytywnym.²

Tkankowa kontrola pozytywna powinna obejmować jądra.

Jeśli tkankowa kontrola pozytywna nie wykaże odpowiedniego barwienia pozytywnego, wyniki testu przeprowadzonego na próbkach pobranych od pacjenta należy uznać za nieważne.

Tkankowa kontrola negatywna

Należy ją wykonać po tkankowej kontroli pozytywnej, aby sprawdzić swoistość znakowania docelowego antygeny przez przeciwciała pierwszorzędowe.

Tkankowa kontrola negatywna powinna obejmować mózdzek.

Ewentualnie tkankowa kontrola negatywna może obejmować różne typy komórek obecne w większości skrawków tkankowych, jednak powinno to zostać zweryfikowane przez użytkownika.

Barwienie niespecyficzne, jeżeli jest obecne, zwykle ma charakter rozproszony. Na skrawkach wykonanych z materiału tkankowego nadmiernie utrwalonego w formalinie można również zaobserwować sporadyczne barwienie tkanki łącznej. Do interpretacji wyników barwienia należy używać nieuszkodzonych komórek. Komórki martwicze lub zdegenerowane często powodują barwienie niespecyficzne.³ Wyniki fałszywie pozytywne mogą pojawić się w następstwie nieimmunologicznego wiązania białek lub występowania produktów reakcji substratów. Mogą być również spowodowane przez endogenne enzymy, takie jak pseudoperoksydaza (erytrocyty), endogenna peroksydaza (cytochrom C) lub endogenna biotylna (np. wątroba, piersi, mózg, nerki), w zależności od zastosowanego barwnika immunohistochemicznego. Aby odróżnić endogenną aktywność enzymatyczną lub niespecyficzne wiązanie enzymów od swoistej immunoreaktywności, dodatkowe tkanki pacjenta mogą być barwione wyłącznie substratem chromogenem lub kompleksem enzymatycznym (awidyna-biotyna, streptawidyna, znakowany polimer) i substratem-chromogenem. Jeśli w trakcie tkankowej kontroli negatywnej nastąpi barwienie specyficzne, wyniki testu przeprowadzonego na próbkach pobranych od pacjenta należy uznać za nieważne.

Negatywna kontrola odczynnika

Aby przeprowadzić ocenę barwienia niespecyficznego oraz umożliwić lepszą interpretację barwienia specyficznego na każdym skrawku z próbki pobranej od pacjenta należy przeprowadzić nieswoistą kontrolę negatywną odczynnika w miejscu wiązania przeciwciała pierwszorzędowego.

Tkanka pacjenta

Próbki pacjenta wybarwione testem NCL-L-InhibinA należy badać jako ostatnie. Intensywność barwienia pozytywnego należy ocenić w kontekście ewentualnego barwienia niespecyficznego tła w negatywnej kontroli odczynnika. Tak jak we wszystkich innych badaniach immunohistochemicznych wynik ujemny oznacza, że antygen nie został wykryty, co jednak nie oznacza, że jest on nieobecny w badanych komórkach/tkankach. W razie konieczności do identyfikacji reakcji fałszywie negatywnych należy wykorzystać panel przeciwciał.

Oczekiwane wyniki

Tkanki prawidłowe

Klon AMY82 wykrył białko inhibiny alfa w komórkach Sertolego i Leydiga w jądrach, w korze mózgowej i rdzeniu nadnerczy i komórkach osłonki wewnątrznej jajnika. (Łączna liczba przypadków = 38).

Tkanki nieprawidłowe

Klon AMY82 wykrył białko inhibinę alfa w 27/105 nieprawidłowych ocenianych tkankach jajnika, w tym 17/44 łagodnych nowotworach wywodzących się z otoczki wewnątrznej, 4/6 złośliwych nowotworach wywodzących się z otoczki wewnątrznej, 2/9 torbieli, 3/3 nowotworach wywodzących się z warstwy ziarnistej i 1/5 raka jasnokomórkowego. Nie stwierdzono barwienia gruczolakoraków surowicznych (0/8), gruczolakoraków endometrium (0/6), raków przejściowokomórkowych (0/5), guzów pęcherzyka Żółtkowego (0/4), rozrodczaków (0/3), włókniaków (0/2), torbielakogruczolaków śluzowych (0/2), gruczolakoraków śluzowych (0/2), torbielakogruczolakoraków śluzowych (0/2), torbielakogruczolakoraków surowicznych (0/1), torbielakogruczolaków brodawkowatego surowiczego (0/1), guz Brennera (0/1) i raka granicznego śluzowego (0/1). Nie stwierdzono barwienia w wielu dodatkowych nowotworach, w tym rakach płaskonabłonkowych (0/10), guzach tarczycy (0/4), guzach wątroby (0/4), chłoniakach (0/3), guzach jelita grubego (0/3) guzach mózgu (0/2), guzach sutka (0/2), guzach Żołądka (0/2), guzach trzustki (0/2), guzach płuc (0/2), guzach nerek (0/2), guzach prostaty (0/2) i guzach przerzutowych nieznanego pochodzenia (0/2). (Łączna liczba przypadków = 145).

Zaleca się stosowanie NCL-L-InhibinA do wykrywania inhibiny alfa w tkankach prawidłowych i nowotworowych.

Ograniczenia ogólne

Badanie immunohistochemiczne to wieloetapowy proces diagnostyczny, który wymaga specjalistycznego szkolenia w zakresie doboru odpowiednich odczynników i tkanek, utrwalania i przetwarzania tkanek, przygotowywania preparatów immunohistochemicznych oraz interpretacji wyników barwienia.

Barwienie tkanek zależy od postępowania z tkanką i jej przetwarzania przed barwieniem. Nieprawidłowe utrwalanie, zamrażanie, rozmrażanie, przemywanie, suszenie, podgrzewanie, ścinanie skrawków lub skażenie innymi tkankami lub płynami może powodować artefakty, zatrzymywanie przeciwciał lub wyniki fałszywie negatywne. Niespójne wyniki mogą wynikać z różnic w metodach utrwalania i zatapiania lub nieprawidłowości związanej z tkanką.⁴ Nadmierne lub niepełne barwienie kontrastowe może negatywnie wpływać na właściwą interpretację wyników.

Kliniczną interpretację barwienia lub jego braku należy uzupełnić badaniami morfologicznymi oraz odpowiednimi kontrolami. Ocena powinien przeprowadzić wykwalifikowany patolog w kontekście historii choroby pacjenta oraz innych badań diagnostycznych. Przeciwciała firmy Leica Biosystems Newcastle Ltd są przeznaczone do badania skrawków zamrożonych lub zatopionych w parafinie, które utrwalono zgodnie z określonymi wymogami. Może wystąpić nieoczekiwana ekspresja antygenu, szczególnie w przypadku nowotworów. Interpretacja kliniczna wybarwionych skrawków musi obejmować analizę morfologiczną oraz ocenę przeprowadzoną w ramach odpowiednich kontroli.

Piśmiennictwo - ogólne

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Robertson D, Burger H and Fuller P. Inhibin/activin and ovarian cancer. Endocrine-Related Cancer. 2004; 11:35–49.
6. Bernard J, Chapman S and Woodruff T. Mechanisms of inhibin signal transduction. Recent Progress in Hormone Research. 2001; 56:417–450.

Zmiany wprowadzone do poprzedniego wydania

Nie dotyczy

Data publikacji

15 kwietnia 2019

Metodologia badań immunohistochemicznych wykorzystujących przeciwciała Novocastra™ do badania tkanek zatopionych w parafinie techniką ciepłego odmaskowywania epitopów.

Odczynniki wymagane, lecz niedostarczane

1. Standardowe rozpuszczalniki stosowane w immunohistochemii.
2. 50 mM roztworu soli fizjologicznej buforowanego odczynnikiem Tris (TBS) pH 7.6.
3. Epitope Retrieval Solution (zob.: C. Roztwory do odmaskowywania epitopu).
4. Rozcieńczalnik do przeciwciał, Novocastra IHC Diluent, RE7133.
5. System wizualizacji, Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 testów), RE7150-K (500 testów), RE7140-K (250 testów) lub RE7290-K (50 testów).
6. Środek do zamykania preparatów mikroskopowych - należy zastosować zgodnie z zaleceniami producenta.

Sprzęt wymagany, lecz niedostarczany

1. Inkubator ustawiony na 25°C.
2. Urządzenie grzewcze do odmaskowywania epitopu: łaźnia wodna, parowar, szybkowar lub inne urządzenie laboratoryjne z kontrolowaną temperaturą.
3. Ogólne wyposażenie laboratorium immunohistochemicznego.

Roztwory do odmaskowywania epitopu (zob. Zalecenia dotyczące stosowania dla jednego z poniższych)

RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 l	Bufor na bazie cytrynianu zawierający surfaktant
RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml	
RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 l	
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 l	Bufor na bazie EDTA zawierający surfaktant
RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 l	
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 l	Bufor na bazie Tris/EDTA zawierający surfaktant
RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 l	

Metodologia

Przed przystąpieniem do działań w ramach niniejszej metodologii użytkownik powinien zostać przeszkolony w zakresie technik immunohistochemicznych.

Użytkownicy powinni określić optymalne rozcieńczenia dla przeciwciał. O ile nie wskazano inaczej, wszystkie etapy należy przeprowadzać w temperaturze pokojowej (25 °C).

Odmaskowywanie epitopu

Należy postępować zgodnie z instrukcją stosowania dołączonej do roztworów Epitope Retrieval Solutions, RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119 lub RE7122.

Wizualizacja

Należy postępować zgodnie z instrukcją stosowania dołączonej do Novolink Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 testów), RE7150-K (500 testów), RE7140-K (250 testów) lub RE7290-K (50 testów).

Zmiany wprowadzone do poprzedniego wydania

Nie dotyczy

Data publikacji

23 kwietnia 2008 r. (CEprotocol/HTAUT + Novolink).

Tekoče mišje monoklonsko protitelo Novocastra™

Inhibin Alpha

Koda izdelka: NCL-L-InhibinA

Predvidena uporaba

Za *diagnostično uporabo in vitro*.

Izdelek NCL-L-InhibinA je namenjen za kvalitativno identifikacijo molekul inhibina alfa v parafinskih rezinah s pomočjo svetlobne mikroskopije. Klinično razlago obarvanja ali odsotnosti le-tega morajo dopoljevati morfološke študije ustreznih kontrolnih vzorcev, ki jih v okviru klinične anamneze bolnika in drugih diagnostičnih testov oceni usposobljen patolog.

Načelo postopka

Imunohistokemijske (IHC) tehnike barvanja omogočajo vizualizacijo antigenov z izvajanjem zaporednega nanosa - z vmesnimi koraki izpiranja - specifičnega protitelesa na antigen (primarno protitelo), sekundarnega protitelesa na primarno protitelo in encimskega kompleksa s kromogenim substratom. Encimska aktivacija kromogena povzroči vidno reakcijo izdelka na mestu antigena. Tak vzorec lahko nato nasprotno barvamo in pokrijemo s krovnim stekelcem. Rezultate nato obdelamo s pomočjo svetlobnega mikroskopa in jih uporabimo pri diferencialni diagnozi patološko-fizioloških procesov, ki so morda povezani z določenim antigenom ali pa tudi ne.

Klon

AMY82

Imunogen

Prokariontski rekombinantni protein, ki ustreza 134 aminokislinskim molekulam humanega inhibina alfa.

Specifičnost

Humani inhibin alfa.

Sestava reagenta

NCL-L-InhibinA je tekočinski supernatant kulture tkiva in vsebuje 15 mM natrijev azid kot konzervans.

Razred Ig

IgG1

Skupna koncentracija beljakovin

Total Protein

1,0–8,0 g/l. Skupna koncentracija beljakovin v določeni seriji je navedena na oznaki na viali.

Koncentracija protiteles

Višja ali enaka 214 mg/l, določena s testom ELISA. Za specifično koncentracijo Ig v seriji glejte oznako na viali.

Priporočila za uporabo

Imunohistokemija (glejte **Metodologija**) parafinskih rezin. Predlagano redčenje: 1 : 100, 30 minut pri 25 °C. Toplotno pridobivanje epitopa z raztopino Epitope Retrieval Solution pH 6,0 (RE7113 ali RE7114).

Vizualizacija. Upoštevajte navodila za uporabo sistema za zaznavanje polimerov Novolink™ Polymer Detection System, RE7280–K (1250 testov), RE7150–K (500 testov), RE7140–K (250 testov) ali RE7290–K (50 testov).

Shranjevanje in stabilnost

Hraniti pri temperaturi 2–8 °C. Ne zamrzujte. Takoj po uporabi ohladite na temperaturo 2–8 °C. Ne uporabljajte po datumu izteka roka uporabnosti, ki je naveden na oznaki na viali. Uporabnik naj preveri pogoje shranjevanja, ki se razlikujejo od zgoraj navedenih.

Priprava vzorcev

Priporočena fiksna raztopina je 10-% formalin v nevtralnem pufru za tkivne rezine, vstavljene v parafin.

Opozorila in previdnostni ukrepi

Vir priprave tega reagenta je supernatant celične kulture. Ker je to biološki izdelek, je treba z njim ravnati z ustrežno skrbnostjo.

Molarnost natrijevega azida v tem reagentu je 15 mM. Varnostni list za natrijev azid je na voljo na zahtevo.

Sledite zveznim, državnim ali lokalnim predpisom za odstranjevanje katerih koli morebitno strupenih sestavin.

Z vzorci, pred fiksiranjem in po njem, in vsemi materiali, s katerimi so prišli v stik, morate ravnati previdno, kot da bi lahko prenašali okužbe, in pri njihovem odstranjevanju slediti ustreznim previdnostnim ukrepom.¹ Nikoli ne pipetirajte reagentov z ustji; pazite, da reagenti in vzorci ne pridejo v stik s kožo in sluznicami. Če reagenti ali vzorci pridejo v stik z občutljivimi deli, jih izperite z obilo vode. Poišcite zdravniško pomoč.

Pazite, da ne pride do mikrobne okužbe reagentov, drugače se lahko pojavi nespecifično obarvanje.

Če uporabite čas ali temperaturo inkubacije, ki se razlikujejo od navedenih, lahko pridobite napačne rezultate. Uporabnik mora validirati morebitne spremembe.

Kontrola kakovosti

Razlike pri obdelavi tkiva in tehničnih postopkih v laboratoriju uporabnika lahko vodijo do precejšnje variabilnosti rezultatov, kar zahteva redne interne kontrole učinkovitosti poleg spodaj navedenih postopkov.

Kontrolni vzorci morajo biti sveži vzorci, pridobljeni z obdukcijo/biopsijo/kirurškim posegom, fiksirani s formalinom, obdelani in shranjeni v parafinskem vosku kakor hitro je mogoče ter na isti način, kot vzorci bolnikov.

Pozitivni kontrolni vzorci tkiva

Uporabite jih za opredelitev pravilno pripravljenih tkiv in ustreznih tehnik barvanja.

Pri vsakem postopku barvanja morate vsakemu sklopu preizkusnih pogojev dodati en pozitiven kontrolni vzorec tkiva.

Za kar najboljšo kontrolo kakovosti in boljše zaznavanje manjših stopenj razvoja reagenta je bolj primerno uporabiti tkivo s šibkim pozitivnim obarvanjem kot tkivo z močnim pozitivnim obarvanjem.²

Za pozitivni kontrolni vzorec tkiva priporočamo tkivo testisa.

Če pozitivni kontrolni vzorci tkiva ne pokažejo pozitivnega obarvanja, morate rezultate preizkusnih vzorcev zavreči kot neveljavne.

Negativni kontrolni vzorci tkiva

Pregledati jih morate po pregledu pozitivnih kontrolnih vzorcev tkiva, da preverite specifičnost oznake ciljnega antigena glede na primarno protiteleso.

Za negativni kontrolni vzorec tkiva priporočamo tkivo malih možganov.

Drugače pa se kot negativni kontrolni vzorci pogosto uporablja vrsta različnih celic, ki so prisotne v večini rezin tkiv, vendar pa mora tako uporabo preveriti uporabnik.

Nespecifično barvanje, če je prisotno, je običajno razpršeno. Opazite lahko tudi posamično obarvanje vezivnega tkiva v rezinah tkiv, kot posledica premočnega fiksiranja s formalinom. Za razlago rezultatov obarvanja uporabite nespremenjene celice. Obarvanje nekrotičnih ali degeneriranih celic je pogosto nespecifično.³ Lažno pozitivni rezultati se lahko pojavijo zaradi ne-immunološke vezave proteinov ali produktov reakcije substrata. Povzročijo jih lahko tudi endogeni encimi, kot so psevdoperoksidaza (eritrociti), endogena peroksidaza (citokromni C) ali endogeni biotin (npr. jetra, dojke, možgani, ledvice), odvisno od vrste uporabljenega imunskega barvila. Za razlikovanje med endogeno aktivnostjo encimov ali nespecifično vezavo encimov zaradi specifične imunске reaktivnosti, lahko barvate dodatna tkiva bolnika izključno ali s kromogenskim substratom ali encimskimi kompleksi (avidin-biotin, streptavidin, označeni polimer) in kromogenskim substratom. Če pride do specifičnega obarvanja negativnih kontrolnih vzorcev tkiva, morate rezultate vzorcev bolnika zavreči kot neveljavne.

Negativni kontrolni reagent

Za oceno nespecifičnega barvanja in boljšo razlago specifičnega obarvanja na antigenem mestu uporabite nespecifični negativni kontrolni reagent namesto primarnega protitelesa z eno rezino vsakega vzorca bolnika.

Bolnikovo tkivo

Nazadnje preglejte bolnikove vzorce, obarvane z izdelkom NCL-L-InhibinA. Intenzivnost pozitivnega obarvanja ocenite v okviru morebitnega nespecifičnega obarvanja ozadja z negativnim kontrolnim reagentom. Tako kot pri vseh imunohistokemijskih preizkusih negativen rezultat pomeni, da antigen ni bil zaznan, ne pa odsotnosti antigena v testiranih celicah/tkivih. Po potrebi uporabite nabor protiteles za opredelitev napačnih negativnih reakcij.

Pričakovani rezultati

Normalna tkiva

Klon AMY82 je zaznal protein inhibin alfa v Sertolijevih in Leydigovih celicah testisov, skorji in meduli nadledvične žleze in notranji teki v jajčnikih. (Skupno število primerov = 38).

Neormalna tkiva

Klon AMY82 je zaznal protein inhibin alfa pri 27/105 ocenjenih neormalnih tkiv jajčnikov, vključno s 17/44 benignih tumorjev celic teka, 4/6 malignih tumorjev celic teka, 2/9 cist, 3/3 tumorjev granuloznih celic in 1/5 svetloceličnih karcinomov. Obarvanja niso opazili pri seroznih adenokarcinomih (0/8), endometrijskih adenokarcinomih (0/6), karcinomih prehodnih celic (0/5), tumorjih hranilnih mešičkov (0/4), disgerminomih (0/3), fibromih (0/2), mucinoznih cistadenomih (0/2), mucinoznih adenokarcinomih (0/2), mucinoznih cistadenokarcinomih (0/2), seroznem cistadenokarcinomu (0/1), seroznem papilarnem cistadenomu (0/1), Brennerjevem tumorju (0/1) in mucinoznem tumorju mejnega območja (0/1). Obarvanja niso opazili pri različnih dodatnih tumorjih, vključno s ploščatoceličnimi karcinomi (0/10), tumorji ščitnice (0/4), jetrnimi tumorji (0/4), limfomi (0/3), kolorektalnimi tumorji (0/3), možganskimi tumorji (0/2), tumorji dojk (0/2), želodčnimi tumorji (0/2), tumorji trebušne slinavke (0/2), pljučnimi tumorji (0/2), ledvičnimi tumorji (0/2), tumorji prostate (0/2) in nespecificiranimi metastatskimi tumorji (0/2). (Skupno število primerov = 145).

NCL-L-InhibinA se priporoča za zaznavanje inhibina alfa v normalnih in neoplastičnih tkivih.

Spološne omejitve

Imunohistokemija je diagnostični postopek z več koraki, ki zahteva specializirano usposabljanje za izbiro ustreznih reagentov, izbiro, fiksiranje in obdelavo tkiv, pripravo IHC preparata in razlago rezultatov obarvanja.

Obarvanje tkiva je odvisno od rokovanja s tkivom in njegovo obdelavo pred barvanjem. Nepravilno fiksiranje, zamrzovanje, odtajanje, izpiranje, sušenje, segrevanje, rezanje ali okužba z drugimi tkivi ali tekočinami lahko povzroči nastanek artefaktov, lovljenje protitelesa ali lažne negativne rezultate. Nedosledni rezultati so lahko posledica razlik pri metodah fiksiranja in priprave ali pa so del nepravilnosti tkiva samega.⁴ Prekomerno ali nepopolno nasprotno barvanje lahko neugodno vpliva na pravilno tolmačenje rezultatov.

Klinično razlago obarvanja ali odsotnosti le-tega morajo dopolnjevati morfološke študije ustreznih kontrolnih vzorcev, ki jih v okviru klinične anamneze bolnika in drugih diagnostičnih testov oceni usposobljen patolog.

Protitelesa družbe Leica Biosystems Newcastle Ltd so namenjena uporabi, kot je navedeno, na zamrznjenih ali v parafin vstavljenih rezinah z določeni zahtevami za fiksiranje. Lahko pride do nepričakovanega izražanja antigena, zlasti pri klinični razlagi obarvane rezine tkiva morate upoštevati morfološko analizo in oceno ustreznih kontrol.

Splošna literatura

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Robertson D, Burger H and Fuller P. Inhibin/activin and ovarian cancer. Endocrine-Related Cancer. 2004; 11:35–49.
6. Bernard J, Chapman S and Woodruff T. Mechanisms of inhibin signal transduction. Recent Progress in Hormone Research. 2001; 56:417–450.

Dodatki in spremembe k prejšnji izdaji

Ni primerno

Datum izdaje

15 april 2019

Imunohistokemijska metodologija za uporabo protiteles Novocastra™ pri tkivu, vstavljenem v parafin, s tehniko toplotnega pridobivanja epitopa.

Potrebni reagenti, ki niso priloženi

1. Standardna topila, ki se uporabljajo v imunohistokemiji.
2. Fiziološka raztopina s 50 mM pufru tris (TBS), pH 7,6.
3. Epitope Retrieval Solution (glejte C. Raztopine za pridobivanje epitopa).
4. Redčilo za protitelesa, Novocastra IHC Diluent, RE7133.
5. Sistem za vizualizacijo, Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 testov), RE7150-K (500 testov), RE7140-K (250 testov) ali RE7290-K (50 testov).
6. Medij za pritrjevanje – uporabljajte skladno s priporočili izdelovalca.

Potrebna oprema, ki ni priložena

1. Inkubator, nastavljen na 25 °C.
2. Grelnik za pridobivanje epitopa: vodna kopel, parni kuhalnik, tlačni lonec ali druga laboratorijska oprema z nadzorom temperature.
3. Splošna oprema za imunohistokemijski laboratorij.

Epitope Retrieval Solution (glejte priporočila za uporabo enega izmed naslednjih izdelkov)

RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 L	Citratni pufer, ki vsebuje surfaktant
RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 mL	
RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 L	
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 L	Pufer z EDTA, ki vsebuje surfaktant
RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 L	
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 L	Pufer s tris/EDTA, ki vsebuje surfaktant
RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 L	

Metodologija

Preden uporabniki začnejo uporabljati to metodologijo, morajo biti usposobljeni za delo z imunohistokemijskimi tehnikami.

Uporabniki morajo sami določiti optimalne razredčitve protiteles. Vse korake izvajajte pri sobni temperaturi (25 °C), razen če je navedeno drugače.

Pridobivanje epitopov

Upoštevajte navodila za uporabo raztopin za pridobivanje epitopov Epitope Retrieval Solutions, RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119 ali RE7122.

Vizualizacija

Upoštevajte navodila za uporabo sistemov za zaznavanje polimerov Novolink Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 testov), RE7150-K (500 testov), RE7140-K (250 testov) ali RE7290-K (50 testov).

Dodatki in spremembe k prejšnji izdaji

Ni primerno

Datum izdaje

23. april 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

Novocastra™ Tekutá myší monoklonální protilátka

Inhibin Alpha

Kód výrobku: NCL-L-InhibinA

Zamýšlené použití

Pro diagnostické použití in vitro.

Produkt NCL-L-InhibinA je určen ke kvalitativnímu stanovení molekul inhibinu alfa světelnou mikroskopií na parafinových řezech. Klinickou interpretaci jakéhokoli barvení nebo jeho nepřítomnosti je nutné doplnit morfoloogickým vyšetřením s použitím správných kontrol a zhodnotit je musí kvalifikovaný patolog v kontextu s klinickou anamnézou pacienta a jinými diagnostickými testy.

Princip metody

Imunohistochemické (IHC) barvicí techniky umožňují vizualizaci antigenů pomocí sekvenční aplikace specifické protilátky proti antigenu (primární protilátka), sekundární protilátky proti primární protilátce a enzymového komplexu s chromogenním substrátem s interponovanými omývacími kroky. Enzymatická aktivace chromogenu má za následek viditelnou reakci produktu v místě antigenu. Vzorek pak může být kontrastně nabarven a překryt krycím sklíčkem. Výsledky se interpretují ve světlém mikroskopu; jsou pomůckou v diferenciální diagnostice patofyziologických procesů, které mohou, ale nemusí, souviset s příslušným antigenem.

Klon

AMY82

Imunogen

Prokaryotický rekombinantní protein odpovídající 134 aminokyselinám molekuly lidského inhibinu alfa.

Specifita

Lidský inhibin alfa.

Složení reagentie

NCL-L-InhibinA je tekutý supernatant z tkáňové kultury obsahující jako konzervační prostředek 15mM roztok azidu sodného.

Třída Ig

IgG1

Koncentrace celkového proteinu

Total Protein

1,0–8,0 g/l. Koncentrace celkového proteinu specifická pro šarži je uvedena na štítku na lahvičce.

Koncentrace protilátek

214 mg/l nebo vyšší, stanovená metodou ELISA. Koncentrace imunoglobulinu (Ig) specifická pro šarži je uvedena na štítku na lahvičce.

Doporučení k použití

Imunohistochemické vyšetření (viz **Metodika**) na parafinových řezech. Doporučené ředění: 1:100 po dobu 30 minut při 25 °C. Teplem indukované odmaskování epitopu s použitím odmaskovacího roztoku epitopu pH 6,0 (RE7113 nebo RE7114).

Vizualizace. Postupujte podle návodu k použití k systému Novolink™ Polymer Detection System, RE7280–K (1 250 tests), RE7150–K (500 tests), RE7140–K (250 tests) nebo RE7290–K (50 tests).

Skladování a stabilita

Uchovávejte při teplotě 2–8 °C. Nezmrazujte. Okamžitě po použití vraťte do teploty 2–8 °C. Nepoužívejte po uplynutí data expirace uvedeného na štítku na lahvičce. Podmínky skladování jiné než výše uvedené musí uživatel validovat.

Příprava vzorku

Fixační roztok doporučený pro řezy tkáně zalité v parafinu je 10% formalin pufovaný na neutrální pH.

Varování a bezpečnostní opatření

Tato reagentie byla připravena ze supernatantu z buněčné kultury. Protože jde o biologický produkt, je nutno manipulaci s ní věnovat náležitou pozornost.

Molarita azidu sodného v této reagentii je 15 mM. Bezpečnostní list materiálu (MSDS) pro azid sodný je k dispozici na vyžádání.

Údaje o likvidaci jakýchkoli potenciálně toxických komponent prostudujte ve federálních, státních nebo místních nařízeních.

Se vzorky, před fixací i po fixaci, a se všemi materiály jim vystavenými, je nutno zacházet, jako by mohly způsobit přenos infekce, a likvidovat je s náležitými bezpečnostními opatřeními.¹ Reagentie nikdy nepipetujte ústy a zabraňte styku reagentií a vzorků s kůží a sliznicemi. Pokud se reagentie nebo vzorky dostanou do kontaktu s citlivými oblastmi, omyjte je velkým množstvím vody. Vyhledejte lékařskou pomoc.

Minimalizujte mikrobiální kontaminaci reagentií, mohlo by dojít ke zvýšení výskytu nespecifického barvení.

Inkubační doby nebo teploty jiné než předepsané mohou vést k chybným výsledkům. Všechny takové změny musí být uživatelem validovány.

Kontrola jakosti

Rozdíly ve zpracování tkání a v technických postupech v laboratoři uživatele mohou způsobit významnou variabilitu výsledků, což vyžaduje kromě níže uvedených postupů i pravidelné provádění kontrol v laboratoři.

Kontroly musí být čerstvé pitevni/bioptické/operační vzorky co nejdříve fixované formalínem, zpracované a zalité do parafinového vosku, stejným způsobem jako vzorek/vzorky pacienta.

Pozitivní tkáňová kontrola

Používá se k průkazu správně připravených tkání a správných barvicích technik.

V každém barvicím cyklu musí být použita jedna pozitivní tkáňová kontrola pro každý soubor testovacích podmínek.

Pro optimální kontrolu jakosti a k detekci menšího stupně degradace reagenzie je vhodnější tkáň se slabým pozitivním barvením než tkáň se silným pozitivním barvením.²

Doporučená pozitivní tkáňová kontrola je varle.

Pokud pozitivní tkáňová kontrola nevykazuje pozitivní barvení, musí být výsledky testovaných vzorků považovány za neplatné.

Negativní tkáňová kontrola

Musí být vyšetřena po pozitivní tkáňové kontrole k ověření specificity označení cílového antigenu primární protilátkou.

Doporučená negativní tkáňová kontrola je mozeček.

Alternativně často představuje místa negativní kontroly řada různých typů buněk přítomných ve většině tkáňových řezů, to ale musí uživatel validovat.

Nespecifické barvení, je-li přítomno, má obvykle difúzní vzhled. V řezech ze tkání nadměrně fixovaných formalinem může být také zjištěno sporadické barvení pojivové tkáně. K interpretaci výsledků barvení použijte neporušené buňky. Nekrotické nebo degenerované buňky se často barví nespecificky.³ Falešně pozitivní výsledky mohou být důsledkem neimunologické vazby proteinů nebo produktů reakčního substrátu. Mohou být také způsobeny endogenními enzymy, jako je např. pseudoperoxidáza (erytrocyty), endogenní peroxidáza (cytochrom C) nebo endogenní biotin (např. játra, prs, mozek, ledviny), podle typu použitého imunobarviva. K odlišení aktivity endogenních enzymů či nespecifické vazby enzymů od specifické imunoreaktivity mohou být barveny další tkáně pacienta výlučně chromogenním substrátem, případně enzymovými komplexy (avidin-biotin, streptavidin, značený polymer) a chromogenním substrátem. Pokud dojde v negativní tkáňové kontrole ke specifickému barvení, musí být výsledky vzorků pacienta považovány za neplatné.

Negativní reagenční kontrola

K vyhodnocení nespecifického barvení a umožnění lepší interpretace specifického barvení v místě antigenu použijte na řezu z každého vzorku pacienta nespecifickou negativní reagenční kontrolu místo primární protilátky.

Tkáň pacienta

Nakonec vyšetřete vzorky pacienta barvené pomocí NCL-L-InhibinA. Intenzita pozitivního barvení musí být zhodnocena v kontextu se vším nespecifickým barvením pozadí u negativní reagenční kontroly. Jako u každého imunohistochemického vyšetření, negativní výsledek znamená, že antigen nebyl zjištěn, nikoli, že antigen není ve vyšetřovaných buňkách/tkáňích přítomen. V případě potřeby použijte k identifikaci falešně negativních reakcí panel protilátek.

Očekávané výsledky

Normální tkáně

Klon AMY82 detekoval protein inhibinu alfa v Sertolliho a Leydigových buňkách varlat a nadvarlat, v kůře a dřeni nadledvin a v theca interna vaječníků. (Celkový počet tkání = 38).

Abnormální tkáně

Klon AMY82 detekoval protein inhibinu alfa u 27/105 vyšetřovaných vzorků abnormálních tkání vaječníků, včetně 17/44 benigních nádorů theca interna, 4/6 maligních nádorů theca interna, 2/9 cyst, 3/3 nádorů z granulózních buněk a 1/5 karcinomu jasných buněk. Barvení nebylo zjištěno u serózních adenokarcinomů (0/8), endometriálních adenokarcinomů (0/6), karcinomů přechodných buněk močového měchýře (0/5), nádorů žloutkového váčku (0/4), dysgerminomů (0/3), fibromů (0/2), mucinózních cystadenomů (0/2), mucinózních adenokarcinomů (0/2), mucinózních cystadenokarcinomů (0/2), serózního cystadenokarcinomu (0/1), serózního papilárního cystadenomu (0/1), Brennerova nádoru (0/1) a hraničního mucinózního nádoru (0/1). Barvení nebylo zjištěno u řady dalších nádorů, včetně karcinomů skvamózních buněk (0/10), nádorů štítné žlázy (0/4), nádorů jater (0/4), lymfomů (0/3), kolorektálních nádorů (0/3), nádorů mozku (0/2), nádorů prsu (0/2), nádorů žaludku (0/2), nádorů pankreatu (0/2), nádorů plic (0/2), nádorů ledvin (0/2), nádorů prostaty (0/2) a nespecifických metastatických nádorů (0/2). (Celkový počet tkání = 145).

NCL-L-InhibinA se doporučuje ke stanovení inhibinu alfa u normálních a neoplastických tkání.

Obecná omezení

Imunohistochemické vyšetření je víceokrový diagnostický proces, který spočívá ve specializovaném školení ve výběru vhodných reagenzií; výběru, fixaci a zpracování tkání; přípravě imunohistochemického sklíčka; a v interpretaci výsledků barvení. Barvení tkáně závisí na manipulaci s tkání a jejím zpracování před barvením. Nesprávným postupem při fixaci, zmrazení, rozmrazení, omývání, sušení, zahřívání, krájení řezů nebo kontaminací jinými tkáněmi či tekutinami mohou vzniknout artefakty, může dojít k vychytávání protilátek nebo k falešně negativním výsledkům. Nekonzistentní výsledky mohou být důsledkem odchylek ve fixačních metodách a metodách zailit, nebo přirozených odchylek ve tkáni.⁴ Nadměrné nebo nedostatečné kontrastní barvení může narušit správnou interpretaci výsledků.

Klinickou interpretaci jakéhokoliv barvení nebo jeho nepřítomnosti je nutné doplnit morfologickým vyšetřením s použitím správných kontrol a zhodnotit je musí kvalifikovaný patolog v kontextu s klinickou anamnézou pacienta a jinými diagnostickými testy.

Protilátky společnosti Leica Biosystems Newcastle Ltd se používají, jak bylo uvedeno, u zmrazených nebo u parafinových řezů se specifickými požadavky na fixaci. Může dojít k expresi neočekávaných antigenů, zejména u nádorů. Klinická interpretace jakéhokoliv barveného tkáňového řezu musí zahrnovat morfologickou analýzu a zhodnocení příslušných kontrol.

Literatura – všeobecná

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29–P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio–Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Robertson D, Burger H and Fuller P. Inhibin/activin and ovarian cancer. Endocrine-Related Cancer. 2004; 11:35–49.
6. Bernard J, Chapman S and Woodruff T. Mechanisms of inhibin signal transduction. Recent Progress in Hormone Research. 2001; 56:417–450.

Opravy předchozího vydání

Nevztahuje se

Datum vydání

15 duben 2019

Imunohistochemická metodika při použití protilátek Novocastra™ u tkáně zalité v parafínu s použitím techniky teplem indukovaného odmaskování epitopu.

Potřebné reagensie, které nejsou součástí dodávky

1. Standardní rozpouštědla používaná v imunohistochemii.
2. Fyziologický roztok pufovaný 50mM roztokem tris-pufuru (TBS), pH 7,6.
3. Odmaskovací roztok epitopu (viz C. Roztoky Epitope Retrieval Solutions).
4. Ředící roztok na protilátky, Novocastra IHC Diluent, RE7133.
5. Vizualizační systém, Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1 250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) nebo RE7290-K (50 tests).
6. Fixační médium – použijte podle doporučení výrobce.

Potřebné vybavení, které není dodáno

1. Inkubátor nastavený na 25 °C.
2. Zahřívací zařízení k odmaskování epitopu: vodní lázeň, sterilizační přístroj, tlakový hrnec nebo jiné laboratorní vybavení s kontrolovanou teplotou.
3. Obecné vybavení imunohistochemické laboratoře.

Roztoky k odmaskování epitopu (viz Doporučení k použití pro jeden z následujících roztoků)

RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 koncentrát) 1 l	Citrátový pufr s obsahem surfaktantu
RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml	
RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (roztok připravený k použití) 1 l	
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 koncentrát) 1 l	EDTA pufr s obsahem surfaktantu
RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (roztok připravený k použití) 1 l	
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 koncentrát) 1 l	Tris/EDTA pufr s obsahem surfaktantu
RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (roztok připravený k použití) 1 l	

Metodika

Než uživatelé přistoupí k této metodice, musí být proškoleni v imunohistochemických technikách.

Uživatelé musí stanovit optimální ředění pro protilátky. Pokud není uvedeno jinak, provádějí se všechny kroky při pokojové teplotě (25 °C).

Odmaskování epitopu

Postupujte podle pokynů k roztokům Epitope Retrieval Solutions, RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119 nebo RE7122.

Vizualizace

Postupujte podle návodu k použití k systému Novolink Polymer Detection System, RE7280-K (1 250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) nebo RE7290-K (50 tests).

Opravy předchozího vydání

Nevztahuje se

Datum vydání

23. dubna 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

Tekutá myšia monoklonálna protilátka Novocastra™

Inhibin Alpha

Kód produktu: NCL-L-InhibinA

Zamýšľané použitie

Na diagnostické použitie *in vitro*.

NCL-L-InhibinA slúži na kvalitatívnu identifikáciu molekúl inhibínu alfa v parafínových rezoch pomocou svetelnej mikroskopie. Klinická interpretácia akéhokoľvek zafarbenia alebo jeho absencie musí byť kombinovaná s morfológickými vyšetreniami pri použití zodpovedajúcich kontrol. Výsledky je nutné vyhodnotiť v kontexte klinickej anamnézy pacienta a ďalších diagnostických testov vedených kvalifikovaným patológom.

Princíp postupu

Techniky imunohistochemického (IHC) zafarbenia umožňujú vizualizáciu antigénov sekvenčnou aplikáciou špecifickej protilátky proti antigénu (primárna protilátka), sekundárnej protilátky proti primárnej protilátke a enzymatického komplexu s chromogénnym substrátom. Medzi jednotlivými krokmi prebieha premývanie. Enzymatická aktivácia chromogénu vytvára v mieste antigénu viditeľné produkty reakcie. Môžete doplniť kontrastné zafarbenie vzorky a zakryť ju krycím sklíčkom. Výsledky sa interpretujú pomocou svetelného mikroskopu a napomáhajú pri diferenciálnej diagnostike patofyziologických procesov, ktoré môžu, ale nemusia byť spojené s určitým antigénom.

Klon

AMY82

Imunogén

Prokaryotický rekombinantný proteín zodpovedajúci 134 aminokyselinám ľudskej molekuly inhibínu alfa.

Špecificita

Ľudský inhibin alfa.

Zloženie činidla

NCL-L-InhibinA je tekutý supernatant na tkanivovú kultiváciu obsahujúci 15 mM azidu sodného ako konzervačnej látky.

Trieda Ig

IgG1

Celková koncentrácia proteínov

Total Protein

1,0 – 8,0 g/l. Celkovú koncentráciu proteínov špecifickú pre šaržu nájdete na štítku fľaštičky.

Koncentrácia protilátok

Vyššia alebo rovná 214 mg/l podľa ELISA. Koncentráciu Ig špecifickú pre šaržu nájdete na štítku fľaštičky.

Odporúčania na použitie

Imunohistochemia (pozri **Metóda**) parafínových rezov. Odporúčané riedenie: 1 : 100 po dobu 30 minút pri teplote 25 °C. Záchyt epitopov s tepelnou indukciou sa odporúča pomocou prípravku Epitope Retrieval Solution pH 6.0 (RE7113 alebo RE7114).

Vizualizácia. Postupujte podľa návodu na použitie v systémoch Novolink™ Polymer Detection System RE7280-K (1250 testov), RE7150-K (500 testov), RE7140-K (250 testov) alebo RE7290-K (50 testov).

Ukladenie a stabilita

Skladujte pri teplote 2 – 8 °C. Nezmrazujte. Okamžite po použití vráťte do teploty 2 – 8 °C. Nepoužívajte po uplynutí dátumu expirácie uvedeného na štítku fľaštičky. Iné než vyššie uvedené podmienky skladovania si vyžadujú validáciu používateľom.

Príprava vzorky

Odporúčaný fixačný prípravok je 10 % neutrálny pufovaný formalín pre bločky tkaniva zaliate do parafínu.

Varovania a bezpečnostné opatrenia

Toto činidlo bolo pripravené zo supernatantu bunkovej kultúry. Keďže ide o biologický produkt, pri manipulácii je nutné vynaložiť zodpovedajúcu starostlivosť.

Molarita azidu sodného v tomto činidle je 15 mM. Materiálový bezpečnostný list (MSDS) k azidu sodnému je k dispozícii na požiadanie. Likvidácia prípadných potenciálne toxických súčastí definujú federálne, štátne alebo miestne predpisy.

So vzorkami pred fixáciou a po nej a všetkými materiálmi, ktoré s nimi prišli do kontaktu, je nutné manipulovať ako s potenciálne infekčnými a zlikvidovať ich pri dodržaní zodpovedajúcich bezpečnostných opatrení.¹ Činidlá nikdy nepipetujte ústami a zabráňte kontaktu činidiel a vzoriek s kožou a sliznicami. Ak sa činidlá alebo vzorky dostanú do kontaktu s citlivými oblasťami, umyte ich veľkým množstvom vody. Vyhľadajte lekársku pomoc.

Minimalizujte mikrobiálnu kontamináciu činidiel. V opačnom prípade môže dôjsť k zvýšeniu nešpecifického zafarbenia.

Nedodržanie predpísaných inkubačných dĺžok alebo teplôt môže viesť k nesprávnym výsledkom. Všetky takéto zmeny si vyžadujú validáciu používateľom.

Kontrola kvality

Rozdiely v spracovaní tkaniva a technických postupoch v laboratóriu používateľa môžu viesť k významnému kolísaniu výsledkov, čo si vyžaduje, okrem nasledujúcich postupov, aj pravidelné interné kontroly.

Kontroly by mali byť čerstvé pitevné/bioptické/chirurgické vzorky fixované čo najskôr formálnom a spracované zaliatím do parafínu rovnakým spôsobom ako vzorky pacienta.

Positívna kontrola tkanivom

Identifikuje správne pripravené tkanivá a správne techniky zafarbenia.

Každá súprava testových podmienok v každom cykle zafarbenia musí obsahovať jednu pozitívnu kontrolu tkanivom.

Tkanivo so slabým pozitívnym farbením je pre optimálnu kontrolu kvality a na detekciu slabšej degradácie činidla vhodnejšie než tkanivo so silným pozitívnym farbením.²

Odporúčané tkanivo na pozitívnu kontrolu je semenník.

Ak pozitívna kontrola tkanivom nebude vykazovať pozitívne zafarbenie, výsledky testovaných vzoriek je nutné považovať za neplatné.

Negatívna kontrola tkanivom

Nutné vyšetrieť po pozitívnej kontrole tkanivom s cieľom overiť špecificitu značenia cieľového antigénu primárnou protilátkou.

Odporúčané tkanivo na negatívnu kontrolu je mozoček.

Ako negatívnu kontrolu je možné použiť aj rôzne typy buniek prítomné vo väčšine tkanivových rezov, takýto postup si však vyžaduje validáciu používateľom.

Prípadné nešpecifické farbenie má obvykle difúzny vzhľad. V rezoch tkanív silne fixovaných formálnom môže byť pozorované sporadické farbenie spojiva. Na interpretáciu výsledkov farbenia používajte intaktné bunky. Nekrotické alebo degenerované bunky sa často farbia nešpecificky.³ Falošne pozitívne výsledky môžu byť pozorované v dôsledku neimunologickej väzby proteínov alebo produktov reakcie substrátu. Môžu byť spôsobené aj endogénnymi enzýmami, ako napr. pseudoperoxidázou (erytrocyty), endogénnou peroxidázou (cytochrom C) alebo endogénnym biotínom (napr. pečeň, prsník, mozog, oblička) v závislosti od typu imunologickeho farbenia. S cieľom diferencovať endogénu enzymatickú aktivitu alebo nešpecifickú väzbu enzýmov od špecifickej imunoreaktivity môžete nafarbiť ďalšie vzorky tkanív pacienta výhradne substrátovým chromogénom alebo enzymatickými komplexmi (avidín-biotín, streptavidín, značený polymér), resp. substrátovým chromogénom. V prípade špecifickeho farbenia v negatívnej kontrole tkanivom je nutné výsledky vzoriek pacienta považovať za neplatné.

Negatívna kontrola činidlom

Na vyhodnotenie nešpecifického zafarbenia použite nešpecifickú negatívnu kontrolu činidlom miesto primárnej protilátky s rezom jednotlivých vzoriek pacienta, čo umožní lepšiu interpretáciu špecifickeho farbenia na mieste antigénu.

Tkanivo pacienta

Pacientske vzorky zafarbené prípravkom NCL-L-InhibinA preskúmajte ako posledné. Intenzitu pozitívneho farbenia je nutné vyhodnotiť v kontexte prípadného

nešpecifického zafarbenia negatívnej kontroly činidlom na pozadí. Podobne ako pri všetkých imunohistochemických testoch znamená negatívny výsledok, že antigén nebol detegovaný. Nepotvrďuje jeho absenciu v testovaných bunkách/tkanivách. V prípade potreby identifikujte falošne negatívne reakcie pomocou panelu protilátok.

Očakávané výsledky

Normálne tkanivá

Klon AMY82 detegoval proteín inhibínu alfa v Sertolliho a Leydigových bunkách semenníkov, v kôre a dreni nadobličiek a vnútornom obale vaječníkov. (Celkový počet prípadov = 38).

Abnormálne tkanivá

Klon AMY82 detegoval proteín inhibínu alfa v 27/105 hodnotených abnormálnych tkanivách vaječníkov vrátane 17/44 benigných nádorov tekálnych buniek, 4/6 malígnych nádorov tekálnych buniek, 2/9 cýst, 3/3 nádorov z granulárnych buniek a 1/5 karcinómov zo svetlých buniek. Žiadne zafarbenie nebolo pozorované pri serózných adenokarcinómoch (0/8), adenokarcinómoch endometria (0/6), karcinómoch prechodných buniek (0/5), nádoroch žltkového vaku (0/4), dysgerminómoch (0/3), fibrómoch (0/2), mucinózných cystadenómoch (0/2), mucinózných adenokarcinómoch (0/2), mucinózných cystadenokarcinómoch (0/2), seróznom cystadenokarcinóme (0/1), seróznom papilárnom cystadenóme (0/1), Brennerovom nádore (0/1) a mucinóznom hraničnom nádore (0/1). Nezistilo sa žiadne zafarbenie pri rôznych ďalších nádoroch vrátane skvamocelulárnych karcinómoch (0/10), nádorov šitlnej žľazy (0/4), nádorov pečene (0/4), lymfómoch (0/3), kolorektálnych nádorov (0/3), nádorov mozgu (0/2), nádorov prsníka (0/2), nádorov žalúdka (0/2), nádorov pankreasu (0/2), nádorov pľúc (0/2), nádorov obličiek (0/2), nádorov prostaty (0/2) a nešpecifikovaných metastatických nádorov (0/2). (Celkový počet prípadov = 145).

NCL-L-InhibinA sa odporúča na detekciu inhibínu alfa v normálnych a neoplastických tkanivách.

Všeobecné limitácie

Imunohistochemia je diagnostický postup pozostávajúci z viacerých krokov, ktorý si vyžaduje špecializované zaškolenie vo výbere zodpovedajúcich činidiel, výbere tkanív, fixácie a spracovania, príprave IHC sklička a interpretácii výsledkov farbenia.

Farbenie tkaniva závisí od manipulácie s tkanivom a od jeho spracovania pred farbením. Nesprávna fixácia, zmrazovanie, rozmrazovanie, premývanie, sušenie, ohrievanie, rezanie alebo kontaminácia inými tkanivami či tekutinami môžu viesť k vzniku artefaktov, záchytu protilátok alebo falošne negatívny výsledok. Inkonzistentné výsledky môžu byť spôsobené zmenami metód fixácie a montáže preparátov alebo inherentnými nepravdivosťami v tkanive.⁴

Nadmerné alebo neúplné kontrastné farbenie môže narušiť správnosť interpretácie výsledkov.

Klinická interpretácia akéhokoľvek zafarbenia alebo jeho absencie musí byť kombinovaná s morfológickými vyšetreniami pri použití zodpovedajúcich kontrol. Výsledky je nutné vyhodnotiť v kontexte klinickej anamnézy pacienta a ďalších diagnostických testov vedených kvalifikovaným patológom.

Protilátky spoločnosti Leica Biosystems Newcastle Ltd sú určené na použitie na zmrazených rezoch alebo rezoch zaliatých parafínom so špecifickými požiadavkami na fixáciu, ako uvádza tento dokument. Najmä pri neopláziách môže dôjsť k nečakanej expresii antigénov. Klinická interpretácia akýchkoľvek farbených tkanivových rezov musí zahŕňať morfológickú analýzu a vyhodnotenie zodpovedajúcich kontrol.

Bibliografia – všeobecne

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29–P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio–Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Robertson D, Burger H and Fuller P. Inhibin/activin and ovarian cancer. Endocrine-Related Cancer. 2004; 11:35–49.
6. Bernard J, Chapman S and Woodruff T. Mechanisms of inhibin signal transduction. Recent Progress in Hormone Research. 2001; 56:417–450.

Úpravy predchádzajúceho vydania

Neuplatňuje sa

Dátum vydania

15 apríl 2019

Imunohistochemická metóda spracovania protilátok Novocastra™ na tkanive zaliatom v parafíne pomocou techniky záchytu epitopov s tepelnou indukciou.

Požadované, ale nedodávané činidlá

1. Štandardné rozpúšťadlá používané v imunohistochemii
2. 50mM tris-pufrovaný fyziologický roztok (TBS), pH 7,6
3. Roztok na záchyt epitopov (pozri časť C. Roztoky na záchyt epitopov)
4. Zriedčovoadlo protilátok, Novocastra IHC Diluent, RE7133
5. Vizualizačný systém, Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280–K (1250 testov), RE7150–K (500 testov), RE7140–K (250 testov) alebo RE7290–K (50 testov).
6. Upevňovacie médium – používajte podľa odporúčania výrobcu.

Požadované, ale nedodávané vybavenie

1. Inkubátor nastavený na teplotu 25 °C.
2. Ohrievač na záchyt epitopov: vodný kúpeľ, naparovač, tlakový hrniec alebo iné laboratórne vybavenie s reguláciou teploty
3. Všeobecné vybavenie imunohistochemického laboratória

Roztoky na záchyt epitopov (pozri časť Odporúčania na použitie pre niektorý z nasledujúcich produktov)

RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 L	Pufor na báze citranu obsahujúci surfaktant
RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 mL	
RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 L	
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 L	Pufor na báze EDTA obsahujúci surfaktant
RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 L	
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 L	Pufor na báze tris/EDTA obsahujúci surfaktant
RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 L	

Metóda

Používatelia musia byť vyškolení v oblasti imunohistochemických techník skôr, než pristúpia k tejto metóde.

Používateľ musí stanoviť optimálne riedenie protilátok. Ak nie je uvedené inak, všetky kroky sa vykonávajú pri izbovej teplote (25 °C).

Záchyt epitopov

Postupujte podľa návodu na použitie v časti Roztoky na záchyt epitopov, RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119 alebo RE7122.

Vizualizácia

Postupujte podľa návodu na použitie v systémoch Novolink Polymer Detection Systems, RE7280–K (1250 testov), RE7150–K (500 testov), RE7140–K (250 testov) alebo RE7290–K (50 testov).

Úpravy predchádzajúceho vydania

Neuplatňuje sa

Dátum vydania

23. apríla 2008 (CE protokol/HTAUT+Novolink).

Leica Biosystems Newcastle Ltd
Balliol Business Park
Benton Lane
Newcastle Upon Tyne NE12 8EW
United Kingdom
☎ +44 191 215 4242



Leica Biosystems Canada
71 Four Valley Drive
Concord, Ontario L4K 4V8
Canada
☎ +1 800 248 0123

Leica Biosystems Inc
1700 Leider Lane
Buffalo Grove IL 60089
USA
☎ +1 800 248 0123

Leica Biosystems Melbourne
Pty Ltd
495 Blackburn Road
Mt Waverley VIC 3149
Australia
☎ +61 2 8870 3500