

Novocastra™ Liquid Mouse Monoclonal Antibody ZAP-70

Product Code: NCL-L-ZAP-70

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 ZAP-70

Product Code: NCL-L-ZAP-70

Intended Use

For in vitro diagnostic use.

NCL-L-ZAP-70 is intended for the qualitative identification by light microscopy of ZAP-70 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

L453R

Immunogen

A prokaryotic recombinant protein corresponding to a portion of the N-terminus.

Specificity

Human ZAP-70.

Reagent Composition

NCL-L-ZAP-70 is a liquid tissue culture supernatant, dialyzed and diluted in PBS containing sodium azide as a preservative.

Ig Class

IgG2b (kappa)

Total Protein Concentration

Total Protein

Refer to vial label for lot specific total protein concentration.

Antibody Concentration

Greater than or equal to 449 mg/L. Refer to vial label for lot specific Ig concentration.

Recommendations On Use

Immunohistochemistry on paraffin sections.

Heat Induced Epitope Retrieval (HIER): Please follow the instructions for use in Novocastra Epitope Retrieval Solution pH 6.

Suggested dilution: 1:100 for 30 minutes at 25 °C. This is provided as a guide and users should determine their own optimal working dilutions.

Visualization: Please follow the instructions for use in the Novolink™ Polymer Detection Systems. For further product information or support, contact your local distributor or regional office of Leica Biosystems, or alternatively, visit the Leica Biosystems' Web site, www.LeicaBiosystems.com

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.

This reagent contains sodium azide. A Material Safety Data Sheet is available upon request or available from www.LeicaBiosystems.com

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 autopsies/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 tonsil.

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-ZAP-70 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 L453R detected the ZAP-70 protein in the cytoplasm and nucleus of T cells and NK cells. In benign lymphoid tissue paracortical T-lymphocytes and rare scattered small lymphocytes in the mantle zones and follicle centers were positive. In the normal tissue ZAP-70 cytoplasmic and/or nuclear staining was predominantly observed in infiltrating lymphocytes. Occasionally NK cells were stained and there was no staining of normal mature B-cells. Other than infiltrating lymphocytes, IHC studies have shown no unexpected reactivity, suggesting the clone is specific to ZAP-70 and not cross-reactive with Syk. (n=39).

Abnormal Tissues

Clone L453R stained 6/7 peripheral T-cell lymphomas, 1/1 T-lymphoblastic lymphoma, 1/1 angioimmunoblastic T-cell lymphoma, 1/1 NK/T cell lymphoma and 0/2 myeloid leukemias. In B-cell neoplasms, clone L453R stained 13/27 chronic lymphocytic leukemias, 2/2 mantle cell lymphomas, 1/4 anaplastic large cell lymphomas, 0/18 diffuse large cell B-cell lymphomas, 0/7 follicular lymphomas, 0/2 extranodal marginal zone B-cell lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue and 0/1 Burkitt's lymphoma. In Hodgkin's lymphoma, the neoplastic cells were negative in all cases studied (0/5). Except for infiltrating lymphocytes, no staining was seen in non-hematological malignancies (n=68).

NCL-L-ZAP-70 is recommended for the detection of human ZAP-70 protein in normal and neoplastic tissues, as an adjunct to conventional histopathology using non-immunologic histochemical stains.

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, Peters RL. 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. Orchard J, Ibbotson R, Best G, et al. ZAP-70 in B cell malignancies. *Leukaemia and Lymphoma* 2005; 46(12):1689–1698.
6. Wang J, Young L, Win W, et al. Distribution and ZAP-70 expression of WHO categories in Shanxi, China. *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology* 2005; 13(4):323–332.
7. Mustelin T and Tasken K. Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases. *Biochemical Journal* 2003; 371:15–27.
8. Van Oers N and Weiss A. The Syk/ZAP-70 protein tyrosine kinase connection to antigen receptor signalling processes. *Seminars in Immunology* 1995; 7:227–236.

Amendments to Previous Issue

Reagent Composition, Total Protein Concentration, Recommendations On Use, Warnings and Precautions.

Date of Issue

05 December 2018

Novocastra™ Anticorps Monoclonal Liquide de Souris ZAP-70

Référence du Produit: NCL-L-ZAP-70

Utilisation Prévue

Diagnostic in vitro.

Le NCL-L-ZAP-70 est destiné à l'identification qualitative par microscopie optique de la molécule ZAP-70 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

L453R

Immunogène

Protéine procaryote recombinante correspondant à une partie de l'extrémité N-terminale.

Spécificité

ZAP-70 humaine.

Composition du Réactif

Le NCL-L-ZAP-70 est un surnageant de culture tissulaire liquide, dialysée et diluée dans du PBS contenant de l'azide de sodium comme conservateur.

Classe d'Ig

IgG2b (kappa)

Concentration Totale en Protéines

Total Protein

La concentration totale en protéines, spécifique du lot, figure sur l'étiquette du flacon.

Concentration en Anticorps

Supérieure ou égale à 449 mg/L. La concentration totale en Ig, spécifique du lot, figure sur l'étiquette du flacon.

Recommandations d'utilisation

Immunohistochimie sur coupes en paraffine.

Restauration d'épitope induite par la chaleur (HIER): Veuillez respecter le mode d'emploi de Novocastra Epitope Retrieval Solution pH 6.

Dilution préconisée: 1:100 durant 30 minutes à 25 °C. Ceci n'est donné qu'à titre indicatif et les utilisateurs doivent déterminer leurs propres dilutions de travail optimales.

Visualisation: Veuillez respecter le mode d'emploi des Novolink™ Polymer Detection Systems. Pour plus d'informations sur le produit ou pour toute assistance, contactez votre représentant local ou le bureau régional de Leica Biosystems, ou sinon rendez vous sur le site www.LeicaBiosystems.com de Leica Biosystems.

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.

Ce réactif contient de l'azide de sodium. Une Fiche de données de sécurité est disponible sur demande ou sur le site www.LeicaBiosystems.com

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 tissus de contrôle positif recommandés sont les amygdales.

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 du 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-ZAP-70 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 L453R a détecté la protéine ZAP-70 dans le cytoplasme et le noyau de cellules T et de cellules NK. Dans les tissus lymphoïdes bénins, les lymphocytes T paracorticaux et de rares petits lymphocytes dispersés dans les régions du manteau et des centres folliculaires ont été positifs. Dans les tissus normaux, un marquage cytoplasmique et/ou nucléaire par la protéine ZAP-70 a été observé de façon prédominante dans les lymphocytes infiltrants. Parfois, des cellules NK ont été marquées. Aucun marquage des cellules B matures normales n'a été observé. Sauf en présence de lymphocytes infiltrants, les études IHC n'ont pas montré de réactivité inattendue, ce qui suggère que le clone est spécifique de la protéine ZAP-70 et ne présente pas de réactivité croisée avec la protéine Syk (n=39).

Tissus tumoraux

Le clone L453R a marqué des lymphomes à cellules T périphériques (6/7), des lymphomes lymphoblastiques T (1/1), des lymphomes à cellules T angioimmunoblastiques (1/1), des lymphomes à cellules NK/T (1/1) et des leucémies myéloïdes (0/2). Parmi les néoplasmes à cellules B, le clone L453R a marqué des leucémies lymphocytaires chroniques (13/27), des lymphomes des cellules du manteau (2/2), des lymphomes à grandes cellules anaplasiques (1/4), des lymphomes à grandes cellules B diffuses (0/18), des lymphomes folliculaires (0/7), des lymphomes à cellules B de la région marginale extranodale du tissu lymphoïde associé à la muqueuse (0/2) et des lymphomes de Burkitt (0/1). Dans les lymphomes de Hodgkin, les cellules néoplasiques ont été négatives dans tous les cas étudiés (0/5). Sauf en présence de lymphocytes infiltrants, aucun marquage n'a été observé dans les affections malignes non hématologiques (n=68).

Le NCL-L-ZAP-70 est recommandé pour la détection de la protéine ZAP-70 humaine dans les tissus normaux et néoplasiques, en complément à l'histopathologie traditionnelle utilisant des marqueurs histochimiques non immunologiques.

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, Peters RL. 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. Orchard J, Ibbotson R, Best G, et al. ZAP-70 in B cell malignancies. *Leukaemia and Lymphoma* 2005; 46(12):1689–1698.
6. Wang J, Young L, Win W, et al. Distribution and ZAP-70 expression of WHO categories in Shanxi, China. *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology* 2005; 13(4):323–332.
7. Mustelin T and Tasken K. Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases. *Biochemical Journal* 2003; 371:15–27.
8. Van Oers N and Weiss A. The Syk/ZAP-70 protein tyrosine kinase connection to antigen receptor signalling processes. *Seminars in Immunology* 1995; 7:227–236.

Amendements Apportés à la Version Précédente

Composition du Réactif, Concentration Totale en Protéines, Recommandations d'utilisation, Mises en Garde et Précautions.

Date de Publication

05 décembre 2018

Novocastra™ Anticorpo Monoclonale Murino Liquido

ZAP-70

Codice Del Prodotto: NCL-L-ZAP-70

Uso Previsto

Per uso diagnostico in vitro.

NCL-L-ZAP-70 è destinato all'identificazione qualitativa in microscopia ottica della molecole ZAP-70, 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

L453R

Immunogeno

Proteina ricombinante procariotica, corrispondente a una porzione della regione N-terminale.

Specificità

ZAP-70 umana.

Composizione Del Reagente

NCL-L-ZAP-70 è un supernatante liquido di coltura tissutale, dializzato e diluito in PBS, contenente di sodio azide come conservante.

Classe Ig

IgG2b (kappa)

Concentrazione Proteica Totale

Total Protein

Consultare l'etichetta del flacone per la concentrazione proteica totale specifica del lotto.

Concentrazione Anticorpale

Superiore o uguale a 449 mg/L. Consultare l'etichetta del flacone per la concentrazione di Ig specifica del lotto.

Raccomandazioni Per L'uso

Immunocitochimica su sezioni incluse in paraffina.

Smascheramento antigenico termoindotto (HIER): Si prega di seguire le istruzioni per l'uso fornite in Novocastra Epitope Retrieval Solution pH 6.

Diluizione raccomandata: 1:100 per 30 minuti a 25 °C. Queste raccomandazioni costituiscono delle semplici linee guida; spetta al singolo utente stabilire le diluizioni di lavoro ottimali.

Visualizzazione: Si raccomanda di seguire le istruzioni per l'uso dei Novolink™ Polymer Detection Systems. Per ulteriori informazioni sui prodotti o assistenza, contattare il distributore di zona o la sede regionale di Leica Biosystems, oppure visitare il sito internet di Leica Biosystems, www.LeicaBiosystems.com

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.

Questo reagente contiene sodio azide. Una scheda di sicurezza del prodotto (MSDS) è disponibile su richiesta o dal sito www.LeicaBiosystems.com

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. 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 la tonsilla.

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-ZAP-70. 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 L453R mette in evidenza la proteina ZAP-70 nel citoplasma e nel nucleo delle cellule T e delle cellule NK. Sono risultati positivi nel tessuto linfoide benigno i linfociti T paracorticali e rari piccoli linfociti sparsi nelle zone mantellari e nei centri follicolari. Nei tessuti normali, è stata osservata una colorazione citoplasmatica e/o nucleare da ZAP-70 soprattutto nei linfociti infiltranti. Occasionalmente, sono state colorate cellule NK e non si è osservata colorazione delle cellule B normali mature. A parte i linfociti infiltranti, gli studi di IHC non hanno mostrato altre reattività inattese, suggerendo la specificità del clone nei confronti di ZAP-70 e l'assenza di reattività crociata con Syk (n=39).

Tessuti tumorali

Il clone L453R ha colorato 6/7 linfomi periferici a cellule T, 1/1 linfoma linfoblastico a cellule T, 1/1 linfoma angioimmunoblastico a cellule T, 1/1 linfoma a cellule NK/T e 0/2 leucemie mieloidi. Nelle neoplasie a cellule B, il clone L453R ha colorato 13/27 leucemie linfocitiche croniche, 2/2 linfomi a cellule mantellari, 1/4 linfomi anaplastici a grandi cellule, 0/18 linfomi diffusi a grandi cellule B, 0/7 linfomi follicolari, 0/2 linfomi extranodali a cellule B della zona marginale del tessuto linfoide associato alla mucosa e 0/1 linfoma di Burkitt. Nel linfoma di Hodgkin, le cellule neoplastiche sono risultate negative in tutti i casi studiati (0/5). Non è stata osservata alcuna colorazione nelle neoplasie maligne non ematologiche, ad eccezione dei linfociti degli infiltrati (n=68).

L'uso di NCL-L-ZAP-70 è consigliato per il rilevamento della proteina ZAP-70 umana in tessuti normali e neoplastici, in aggiunta all'istopatologia convenzionale che si avvale di colorazioni istochimiche non immunologiche.

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, Peters RL. 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. Orchard J, Ibbotson R, Best G, et al. ZAP-70 in B cell malignancies. Leukaemia and Lymphoma 2005; 46(12):1689–1698.
6. Wang J, Young L, Win W, et al. Distribution and ZAP-70 expression of WHO categories in Shanxi, China. Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology 2005; 13(4):323–332.
7. Mustelin T and Tasken K. Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases. Biochemical Journal 2003; 371:15–27.
8. Van Oers N and Weiss A. The Syk/ZAP-70 protein tyrosine kinase connection to antigen receptor signalling processes. Seminars in Immunology 1995; 7:227–236.

Modifiche Alla Pubblicazione Precedente

Composizione Del Reagente, Concentrazione Proteica Totale, Raccomandazioni Per L'uso, Avvertenze E Precauzioni.

Data Di Pubblicazione

05 dicembre 2018

Novocastra™ Flüssiger Monoklonaler Maus-Antikörper

ZAP-70

Produkt-Nr.: NCL-L-ZAP-70

Verwendungszweck

Für *in-vitro*-Diagnostik.

NCL-L-ZAP-70 ist für den qualitativen Nachweis der ZAP-70-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

L453R

Immunogen

Ein prokaryotisches rekombinantes Protein, das einem Teil des N-Terminus entspricht.

Spezifität

Humanes ZAP-70.

Reagenzzusammensetzung

NCL-L-ZAP-70 ist ein flüssiger Gewebekulturüberstand, der in PBS dialysiert und verdünnt ist und Natriumazid als Konservierungsmittel enthält.

Ig-Klasse

IgG2b (kappa)

Gesamtproteinkonzentration Total Protein

Siehe Angaben auf dem Produktetikett bezüglich der chargenspezifischen Gesamtproteinkonzentration.

Antikörperkonzentration

Größer als oder gleich 449 mg/L. Hinsichtlich der chargenspezifischen Ig-Konzentration siehe Angaben auf dem Produktetikett.

Gebrauchsempfehlungen

Immunhistochemie in Paraffinschnitten

Hitzeinduzierte Epitopdemaskierung (HIER): Bitte Gebrauchsanweisung für Novocastra Epitope Retrieval Solution pH 6 befolgen.

Empfohlene Verdünnung: 1:100 über einen Zeitraum von 30 Minuten bei 25 °C. Dies ist nur eine Empfehlung, und die Benutzer sollten ihre eigenen optimalen Arbeitsverdünnungen bestimmen.

Visualisierung: Bitte Gebrauchsanweisung für Novolink™ Polymer Detection Systems befolgen. Wenn Sie weitere Produktinformationen oder Unterstützung wünschen, setzen Sie sich bitte mit ihrem Händler vor Ort oder mit der Zweigniederlassung von Leica Biosystems in Verbindung beziehungsweise besuchen Sie die Internetseite von Leica Biosystems, www.LeicaBiosystems.com

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.

Dieses Reagenz enthält Natriumazid. Ein Material Sicherheits-Datenblatt ist auf Anfrage von www.LeicaBiosystems.com 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 Gewebeparbeitung 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 Tonsillengewebe 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-ZAP-70 gefärbten Patientenproben müssen zuletzt untersucht werden. Eine positive Färbeintensität 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 L453R wies das ZAP-70-Protein im Zytoplasma und Nucleus von T-Zellen und NK-Zellen nach. In benignem lymphoidem Gewebe reagierten parakortikale T-Lymphozyten und vereinzelte kleine Lymphozyten in den Mantelzonen und Follikelzentren positiv. In normalen Geweben wurde eine Färbung mit ZAP-70 von Zytoplasma und/oder Nucleus vornehmlich bei infiltrierenden Lymphozyten beobachtet. Vereinzelt NK-Zellen wurden gefärbt, und es lag keine Färbung normaler ausgereifter B-Zellen vor. Abgesehen von infiltrierenden Lymphozyten weisen IHC-Studien keine sonstige unerwartete Reaktivität nach. Das legt den Schluss nahe, dass der Klon für ZAP-70 spezifisch ist und keine Kreuzreaktion mit Syk aufweist. (n=39).

Tumorgewebe

Klon L453R färbte 6/7 peripheren T-Zell-Lymphomen, 1/1 T-lymphoblastischen Lymphom, 1/1 angioimmunoblastischen T-Zell-Lymphom, 1/1 NK-/T-Zell-Lymphom und 0/2 myeloiden Leukämien. Bei B-Zell-Lymphomen färbte Klon L453R 13/27 chronischen, lymphozytischen Leukämien, 2/2 Mantelzell-Lymphomen, 1/4 anaplastischen großzelligen Lymphomen, 0/18 diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen, 0/7 follikulären Lymphomen, 0/2 extranodalen Randzonen-B-Zell-Lymphomen des Mukosa-assoziierten lymphoiden Gewebes und 0/1 Burkitt-Lymphom. Beim Hodgkin-Lymphom waren die neoplastischen Zellen in allen untersuchten Fällen negativ (0/5). Mit Ausnahme infiltrierender Lymphozyten wurde bei nicht hämatologischen malignen Erkrankungen keine Färbung beobachtet (n=68).

NCL-L-ZAP-70 wird für den Nachweis von ZAP-70-Protein in normalem und neoplastischem Gewebe als zusätzliches Hilfsmittel zur herkömmlichen Histopathologie unter Verwendung nicht-immunologischer histochemischer Färbemittel 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 wie 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, Peters RL. 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. Orchard J, Ibbotson R, Best G, et al. ZAP-70 in B cell malignancies. Leukaemia and Lymphoma 2005; 46(12):1689–1698.
6. Wang J, Young L, Win W, et al. Distribution and ZAP-70 expression of WHO categories in Shanxi, China. Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology 2005; 13(4):323–332.
7. Mustelin T and Tasken K. Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases. Biochemical Journal 2003; 371:15–27.
8. Van Oers N and Weiss A. The Syk/ZAP-70 protein tyrosine kinase connection to antigen receptor signalling processes. Seminars in Immunology 1995; 7:227–236.

Änderungen zur vorhergehenden Ausgabe

Reagenzzusammensetzung, Gesamtproteinkonzentration, Gebrauchsempfehlungen, Warnhinweise und Sicherheitsmaßnahmen.

Ausgabedatum

05 Dezember 2018

Novocastra™ Anticuerpos Monoclonal Líquidos de Ratón ZAP-70

Código De Producto: NCL-L-ZAP-70

Indicaciones De Uso

Para uso diagnóstico in vitro.

NCL-L-ZAP-70 está indicado para la identificación cualitativa en secciones de parafina, mediante microscopía óptica, de moléculas de ZAP-70. 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

L453R

Inmunógeno

Proteína recombinante procarciótica correspondiente a una porción del extremo N-terminal.

Especificidad

ZAP-70 humana.

Composición Del Reactivo

NCL-L-ZAP-70 es un sobrenadante de cultivo tisular líquido, dializado y diluido en PBS que contiene azida sódica como conservante.

Clase de Ig

IgG2b (kappa)

Concentración Total De Proteína Total Protein

Consulte la etiqueta del vial para ver la concentración total de proteína específica del lote.

Concentración De Anticuerpo

Igual o superior a 449 mg/L. Consulte en la etiqueta del vial la concentración de Ig específica del lote.

Recomendaciones De Uso

Inmunohistoquímica con secciones de parafina.

Recuperación de epítomos inducida por calor (HIER): Por favor, siga las instrucciones de uso de Novocastra Epitope Retrieval Solution pH 6.

Dilución sugerida: 1:100 durante 30 minutos a 25 °C. Esta es tan solo una pauta y cada usuario debe determinar sus propias diluciones de trabajo óptimas.

Visualización: Por favor, siga las instrucciones de uso de Novolink™ Polymer Detection Systems. Para obtener más información sobre el producto o para recibir soporte, póngase en contacto con su distribuidor local o con la oficina regional de Leica Biosystems, o bien visite el sitio web de Leica Biosystems, www.LeicaBiosystems.com

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.

Este reactivo contiene azida sódica. Está disponible una Hoja de información sobre la seguridad del material, previa petición, o en www.LeicaBiosystems.com

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 pipetee 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 amígdala palatina.

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 cerebello.

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 inmunoreactividad 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-ZAP-70 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 L453R detectó la proteína ZAP-70 en el citoplasma y el núcleo de células T y células NK. En el tejido linfóide benigno, los linfocitos T paracorticales y los linfocitos pequeños difusos aislados en las zonas del manto y los centros foliculares fueron positivos. En tejido normal, la tinción citoplasmática y/o nuclear de ZAP-70 se observó predominantemente en los linfocitos infiltrantes. En ocasiones las células NK se tiñeron y no se observó tinción de las células B maduras normales. Aparte de los linfocitos infiltrantes, estudios de IHC han mostrado una reactividad esperada, lo que sugiere que el clon es específico de ZAP-70 y no muestra reactividad cruzada con Syk. (n=39).

Tejidos tumorales

El clon L453R tiñó 6 de 7 linfomas periféricos de células T, 1 de 1 linfoma linfoblástico de células T, 1 de 1 linfoma angioinmunoblástico de células T, 1 de 1 linfoma de células T/NK y 0 de 2 leucemias mieloides. En las neoplasias de células B, el clon L453R tiñó 13 de 27 leucemias linfocíticas crónicas, 2 de 2 linfomas de células del manto, 1 de 4 linfomas anaplásicos de células grandes, 0 de 18 linfomas de células B de células grandes difusas, 0 de 7 linfomas foliculares, 0 de 2 linfomas de células B de la zona marginal extraganglionar del tejido linfóide asociado a la mucosa y 0 de 1 linfoma de Burkitt. En el linfoma de Hodgkin, las células neoplásicas fueron negativas en todos los casos estudiados (0 de 5). Salvo los linfocitos infiltrantes, no se observó tinción en las neoplasias no hematológicas (n=68).

El NCL-L-ZAP-70 está recomendado para la detección de la proteína ZAP-70 humana en tejidos normales y neoplásicos, como complemento de la histopatología tradicional con tinciones histoquímicas no inmunológicas.

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, Peters RL. 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. Orchard J, Ibbotson R, Best G, et al. ZAP-70 in B cell malignancies. *Leukaemia and Lymphoma* 2005; 46(12):1689–1698.
6. Wang J, Young L, Win W, et al. Distribution and ZAP-70 expression of WHO categories in Shanxi, China. *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology* 2005; 13(4):323–332.
7. Mustelin T and Tasken K. Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases. *Biochemical Journal* 2003; 371:15–27.
8. Van Oers N and Weiss A. The Syk/ZAP-70 protein tyrosine kinase connection to antigen receptor signalling processes. *Seminars in Immunology* 1995; 7:227–236.

Correcciones A La Publicación Anterior

Composición Del Reactivo, Concentración Total De Proteína, Recomendaciones De Uso, Advertencias Y Precauciones.

Fecha De Publicación

05 de diciembre de 2018

Novocastra™ Anticorpo Monoclonal Líquido de Ratinho ZAP-70

Código Do Produto: NCL-L-ZAP-70

Utilização prevista

Para utilização em diagnósticos in vitro.

NCL-L-ZAP-70 foi concebido para efectuar a identificação qualitativa da moléculas de ZAP-70 por microscopia óptica, em secções parafinizadas. 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 (IHC) 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

L453R

Imunogénio

Uma proteína recombinante procarciótica correspondendo a uma porção do terminal N.

Especificidade

ZAP-70 humana.

Composição Do Reagente

NCL-L-ZAP-70 é um sobrenadante da cultura de um tecido líquido, dializado e diluído em PBS, contendo de azida de sódio como conservante.

Classe De Ig

IgG2b (capa)

Concentração Total De Proteína Total Protein

Consultar a etiqueta da ampola para determinar a concentração total de proteína do lote específico.

Concentração De Anticorpo

Maior que ou igual a 449 mg/L. Consultar a etiqueta da ampola para determinar a concentração de Ig do lote específico.

Recomendações Sobre A Utilização

Imunohistoquímica em cortes de inclusões em parafina.

Recuperação de epitopos induzida pelo calor (HIER): Queira seguir as instruções de utilização de Novocastra Epitope Retrieval Solution pH 6.

Diluição sugerida: 1:100 durante 30 minutos a 25°C. Esta recomendação serve apenas de orientação e os utilizadores devem determinar as suas diluições óptimas de trabalho.

Visualização: Queira seguir as instruções de utilização de Novolink™ Polymer Detection Systems. Para informação adicional do produto ou assistência, contactar o seu distribuidor local ou escritório regional de Leica Biosystems ou, alternativamente, visitar o sítio web de Leica Biosystems, www.LeicaBiosystems.com

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.

Este reagente contém azida sódica. Encontra-se disponível uma Ficha de Dados de Segurança do Material, mediante pedido ou através do site www.LeicaBiosystems.com

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 a amígdala.

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 cerebelo.

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-ZAP-70 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 L453R detectou a proteína ZAP-70 no citoplasma e núcleo de células T e células NK. Em tecido linfóide benigno, os T-linfócitos paracorticais e alguns exemplos raros e disseminados de linfócitos pequenos, localizados nas regiões do manto e centros foliculares, deram resultados positivos. Nos tecidos normais analisados, observou-se a coloração citoplasmática e/ou nuclear de ZAP-70 predominantemente em linfócitos infiltrados. Ocasionalmente, as células NK sofreram coloração e não se observou a coloração das células B maduras normais. Para além de linfócitos infiltrantes, os estudos de imunohistoquímica não têm demonstrado qualquer reactividade inesperada, o que sugere que o clone é específico de ZAP-70 e não de uma reacção cruzada com Syk. (n=39)

Tecidos tumorais

O clone L453R corou 6/7 linfomas periféricos das células T, 1/1 linfoma T-linfoblástico, 1/1 linfoma angioimunoblástico das células T, 1/1 linfoma das células NK/T e 0/2 leucemias mielóides. Em neoplasmas das células B, o clone L453R corou 13/27 leucemias linfocíticas crónicas, 2/2 linfomas das células do manto, 1/4 linfomas anaplásticos de células grandes, 0/18 linfomas difusos de células B grandes, 0/7 linfomas foliculares, 0/2 linfomas extranodais da zona marginal de células B de tecido linfóide associado à mucosa e 0/1 linfoma de Burkitt. No linfoma de Hodgkin, as células neoplásticas deram resultados negativos em todos os casos estudados (0/5). Com excepção de leucócitos em infiltração, não se observou nenhuma coloração em malignidades não hematológicas (n=68).

O NCL-L-ZAP-70 é recomendado para a detecção da proteína ZAP-70 humana em tecidos normais e neoplásicos, como auxiliar da histopatologia convencional, através da utilização de corantes histoquímicos não imunológicos.

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 controlos 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, Peters RL. 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. Orchard J, Ibbotson R, Best G, et al. ZAP-70 in B cell malignancies. *Leukaemia and Lymphoma* 2005; 46(12):1689–1698.
6. Wang J, Young L, Win W, et al. Distribution and ZAP-70 expression of WHO categories in Shanxi, China. *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology* 2005; 13(4):323–332.
7. Mustelin T and Tasken K. Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases. *Biochemical Journal* 2003; 371:15–27.
8. Van Oers N and Weiss A. The Syk/ZAP-70 protein tyrosine kinase connection to antigen receptor signalling processes. *Seminars in Immunology* 1995; 7:227–236.

Emendas Da Edição Anterior

Composição Do Reagente, Concentração Total De Proteína, Recomendações Sobre A Utilização, Avisos E Precauções.

Data De Emissão

05 de Dezembro de 2018

Novocastra™ Flytande Monoklonal Musantikropp

ZAP-70

Produktkod: NCL-L-ZAP-70

Avsedd Användning

För in vitro diagnostisk användning.

NCL-L-ZAP-70 är avsedd för kvalitativ identifiering med ljusmikroskopi av ZAP-70-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

L453R

Immunogen

Et prokaryot rekombinant protein svarende til en del af N-terminus.

Specificitet

Humant ZAP-70.

Reagensinnehåll

NCL-L-ZAP-70 er en flydende vævskultursupernatant, dialyseret og fortyndet i PBS indeholdende natriumazid som konserveringsmiddel.

Ig-klass

IgG2b (kappa)

Total Proteinkoncentration

Se flaskans etikett för total specifik proteinkoncentration för satsen.

Antikropps-koncentration

Större än eller lika med 449 mg/L. Se flaskans etikett för specifik Ig-koncentration för satsen.

Rekommendationer Vid Användning

Immunhistokemi på paraffinsnitt.

Värmeinducerad epitopåtervinning (HIER): Vänligen följ instruktionerna för användning i Novocastra Epitope Retrieval Solution pH 6.

Föreslagen spädning: 1:100 i 30 minuter vid 25 °C. Detta är endast en riktlinje och användare bör själva fastställa den optimala bruksspädningen.

Visualisering: Vänligen följ instruktionerna för användning i Novolink™ Polymer Detection Systems. Om ytterligare produktinformation eller stöd behövs, kontakta då din lokala distributör eller Leica Biosystems regionalkontor, alternativt i på Leica Biosystems webbplats, www.LeicaBiosystems.com

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 paraffinbäddade vävnadssnitt är 10% neutralbuffrat formalin.

Varningar Och Försiktighetsåtgärder

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

Detta reagens innehåller natriumazid. Materialsäkerhetsdatablad finns att få på begäran eller från www.LeicaBiosystems.com

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. 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 färska 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

Tonsill 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-ZAP-70 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 L453R påviste ZAP-70 proteinet i cytoplasme och kerner i T-celler och NK-celler. I godartet lymfeväv var paracorticale T-lymfocyter och sjældne spredte små lymfocyter i mantelzoner och follicelcentre positive. I normale vævsprøver blev ZAP-70 cytoplasmiske og/eller nukleare farvning overvejende observeret i infiltrerende lymfocyter. Ind imellem blev NK-celler farvet, og der var ingen farvning af normale modne B-celler. Bortset fra infiltrering af lymfocyter har IHC-undersøgelser ikke vist uventet reaktivitet, der peger i retning af klonen er specifik til ZAP-70 og ikke er krydsreaktiv med Syk. (n=39).

Tumörvävnader

Klon L453R farvet 6/7 perifer T-celle-lymfomer, 1/1 T-lymfoblastisk lymfom, 1/1 angioimmunoblastisk T-cellelymfom, 1/1 NK/T-cellelymfom samt 0/2 myeloide leukæmier. I B-celle-neoplaser, farvede klon L453R 13/27 kroniske lymfocytiske leukæmier, 2/2-mantelcellymfomer, 1/4 anaplastiske storcellymfomer, 0/18 diffuse storcelle B-cellelymfomer, 0/7 follikulære lymfomer, 0/2 ekstranodale marginalzone B-cellelymfomer i mucosa associeret lymfevæv samt 0/1 Burkitts lymfoma. Ved Hodgkins lymfoma var alle neoplastiske celler negative i alle undersøgte tilfælde (0/5). Med undtagelse af infiltrerende lymfocyter sås ingen farvning i non-hæmatologiske maligniteter (n=68).

NCL-L-ZAP-70 rekommenderas för detektering av humant ZAP-70 protein i normal eller neoplastisk vävnad, som tillägg till konventionell histopatologi med användande av icke-immunologiska histokemiska färgstoffer.

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

Överflödiger 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 frysta eller paraffinbäddade snitt med specifika fixeringskrav. Öväntat 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, Peters RL. 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. Orchard J, Ibbotson R, Best G, et al. ZAP-70 in B cell malignancies. *Leukaemia and Lymphoma* 2005; 46(12):1689–1698.
6. Wang J, Young L, Win W, et al. Distribution and ZAP-70 expression of WHO categories in Shanxi, China. *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology* 2005; 13(4):323–332.
7. Mustelin T and Tasken K. Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases. *Biochemical Journal* 2003; 371:15–27.
8. Van Oers N and Weiss A. The Syk/ZAP-70 protein tyrosine kinase connection to antigen receptor signalling processes. *Seminars in Immunology* 1995; 7:227–236.

Rättelser Av Tidigare Utgivning

Reagensinnehåll, Total Proteinkoncentration, Rekommendationer Vid Användning, Varningar Och Försiktighetsåtgärder.

Utgivningsdatum

05 december 2018

Novocastra™ Υγρό μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού ZAP-70

Κωδικός είδους: NCL-L-ZAP-70

Χρήση Για Την Οποία Προορίζεται

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση.

Το NCL-L-ZAP-70 προορίζεται για την ποιοτική ταυτοποίηση με μικροσκοπία φωτός της ανθρώπινης Μόρια ZAP-70 σε τομές παραφίνης. 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 παθολογοανατόμο.

Αρχή Της Διαδικασίας

Οι τεχνικές ανοσοϊστοχημικής (IHC) χρώσης επιτρέπουν την οπτικοποίηση των αντιγόνων μέσω της διαδοχικής εφαρμογής ενός ειδικού αντισώματος στο αντιγόνο (πρωτογενές αντίσωμα), ενός δευτεροταγούς αντισώματος στο πρωτογενές 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 καλυπτήρια. 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

L453R

Ανοσογόνο

Προκαρμυτική ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη που αντιστοιχεί σε τμήμα του N-τελικού άκρου.

Ειδικότητα

Ανθρώπινη ZAP-70.

Σύνθεση Αντιδραστήριου

Το NCL-L-ZAP-70 είναι ένα υγρό υπερκείμενο ιστοκαλλιέργειας, διαλυμένο και αραιωμένο σε PBS που περιέχει αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό.

Τάξη Ig

IgG2b (kappa)

Ολική Συγκέντρωση Πρωτεΐνης Total Protein

Για την ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης που είναι ειδική για την εκάστοτε παρτίδα, ανατρέξτε στην ετικέτα του φιαλιδίου.

Συγκέντρωση Αντισώματος

Μεγαλύτερη ή ίση με 449 mg/L. Για τη συγκέντρωση Ig που είναι ειδική για την εκάστοτε παρτίδα, ανατρέξτε στην ετικέτα του φιαλιδίου.

Συστάσεις Για Τη Χρήση

Ανοσοϊστοχημεία σε παρασκευάσματα παραφίνης.

Ανάκτηση Επιτόπου με Θερμική Επαγωγή (HIER): Παρακαλούμε ακολουθήστε τις οδηγίες για τη χρήση στο Novocastra Epitope Retrieval Solution pH 6.

Προτεινόμενη διάλυση: 1:100 επί 30 λεπτά σε 25 °C. Παρέχεται ως οδηγός και οι χρήστες θα πρέπει να καθορίζουν τις δικές τους διαλύσεις εργασίας.

Απεικόνιση: Παρακαλούμε ακολουθήστε τις οδηγίες χρήσης στο Novolink™ Polymer Detection Systems. Για περισσότερες πληροφορίες για το προϊόν ή για υποστήριξη, επικοινωνήστε με τον τοπικό διανομέα ή το περιφερειακό γραφείο της Leica Biosystems ή εναλλακτικά επισκεφθείτε τον ιστότοπο της Leica Biosystems, www.LeicaBiosystems.com

Φύλαξη Και Σταθερότητα

Φυλάσσετε στους 2–8 °C. Μην καταψύχετε. Επαναφέρετε στους 2–8 °C αμέσως μετά τη χρήση. Μη 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.

Αυτό το αντιδραστήριο περιέχει αζίδιο του νατρίου. Δελτίο δεδομένων ασφαλείας υλικού διατίθεται κατόπιν αιτήματος ή από τη διεύθυνση www.LeicaBiosystems.com

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 μεταδόσης λοίμωξης και η απόρριψή τους να πραγματοποιείται λαμβάνοντας τις σωστές προφυλάξεις. 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 ιατρού.

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 εξική χρώση για βέλτιστο έλεγχο ποιότητας και για την ανίχνευση πολύ μικρών επιπέδων τυχόν αποδόμησης των αντιδραστηρίων.²

Συνιστώμενος ιστός θετικού μάρτυρα είναι ο Αμυγδαλή.

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 επισημάσεως του αντιγόνου-στόχου από το πρωτοταγές αντίσωμα.

Συνιστώμενος 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 άθικτα 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 προϊόντων αντίδρασης του υποστρώματος. Ενδέχεται επίσης να προκληθούν από ενδογενή ένζυμα, όπως η ψευδοϊπεροξειδάση (ερυθροκύτταρα), η ενδογενής υπεροξειδάση (κυτόχρωμα C) ή η ενδογενής βιοτίνη (π.χ. ήπαρ, μαστός, εγκέφαλος, νεφρός) ανάλογα με τον τύπο ανοσοχρώσης που χρησιμοποιείται. Για τη διαφοροποίηση της ενδογενούς ενζυμικής δραστηριότητας ή της μη ειδικής δέσμευσης των ενζύμων από ειδική ανοσοαντιδραστικότητα, είναι δυνατό να χρωματιστούν αποκλειστικά επιπλέον ιστού ασθενών με χρωμόγιο υποστρώματος ή ενζυμικά σύμπλοκα (αβιδίνη-βιοτίνη, στρεπταβιδίνη, σημασμένο πολυμερές) και υπόστρωμα-χρωμόγιο, 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

Εξετάστε τελευταία τα δείγματα ασθενούς που έχουν χρωματιστεί με το NCL-L-ZAP-70. 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 αντισωμάτων για την αναγνώριση ψευδώς αρνητικών αντιδράσεων.

Αναμενόμενα Αποτελέσματα

Φυσιολογικοί Ιστοί

Ο κλώνος L453R ανίχνευσε την πρωτεΐνη ZAP-70 στο κυτταροπλάσμα και τον πυρήνα των T κυττάρων και των NK κυττάρων. Σε καλοήγη λεμφικό ιστό, T-λεμφοκύτταρα του παραφολικού και σπάνια διάσπαρτα μικρά λεμφοκύτταρα στις ζώνες του μανδύα και σε κέντρα των θυλακίων ήταν θετικά. Στον φυσιολογικό ιστό παρατηρήθηκε κυτταροπλασματική και/ή πυρηνική χρώση με το ZAP-70 κυρίως σε διηθητικά λεμφοκύτταρα. Περιστασιακά χρωματίστηκαν NK κύτταρα και δεν υπήρχε χρώση των φυσιολογικών ώριμων B κυττάρων. Εκτός από τα διηθητικά λεμφοκύτταρα, ανοσοϊστοχημικές μελέτες δεν δείχνουν καμία άλλη αντιδραστικότητα, με αποτέλεσμα να θεωρείται ότι ο κλώνος είναι ειδικός για το ZAP-70 και ότι δεν παρουσιάζει διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με το Syk. (n=39).

Καρκινικοί Ιστοί

Ο κλώνος L453R χρωμάτισε 6/7 περιφερικά T-κυτταρικά λεμφώματα, 1/1 T-λεμφοβλαστικά λεμφώματα, 1/1 αγγειοανοσοβλαστικά T-κυτταρικά λεμφώματα, 1/1 NK/T-κυτταρικά λεμφώματα και 0/2 μυελοειδείς λευκαίμιες. Στα B-κυτταρικά νεοπλασμάτα, με τον κλώνο L453R χρωματίστηκαν 13/27 χρόνιες λεμφοκυτταρικές λευκαίμιες, 2/2 λεμφώματα κυττάρων του μανδύα, 1/4 αναπλαστικά μεγαλοκυτταρικά λεμφώματα, 0/18 διάχυτα μεγάλα B-κυτταρικά λεμφώματα, 0/7 θηλακίωδη λεμφώματα, 0/2 B-κυτταρικά λεμφώματα οριακής ζώνης εκτός των λεμφαδένων λεμφοειδούς ιστού που σχετίζεται με το βλεννογόνο και 0/1 λεμφώματα του Burkitt. Σε λέμφωμα Hodgkin τα νεοπλασματικά κύτταρα ήταν αρνητικά σε όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν (0/5). Εκτός από τα διηθητικά λεμφοκύτταρα, δεν παρατηρήθηκε καμία χρώση σε μη αιματολογικές κακοήθειες (n=68).

Το NCL-L-ZAP-70 συνιστάται για την ανίχνευση της ανθρωπίνης πρωτεΐνης ZAP-70 σε φυσιολογικούς και νεοπλασματικούς ιστούς, ως συμπλήρωμα της συμβατικής ιστοπαθολογίας χρησιμοποιώντας μη ανοσολογικές ιστοχημικές χρώσεις.

Γενικοί Περιορισμοί

Η ανοσοϊστοχημεία είναι μια διαγνωστική διεργασία πολλαπλών βημάτων, η οποία απαιτείται 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, κατάμειξη, αποξήξη, πλύση, στέγνωμα, θέρμανση, τομή ή μόλυνση με άλλους ιστούς ή υγρά ενδέχεται να παράγει μορφώματα, παγίδευση αντισώματος ή ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Τυχόν ασυνεπή 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 παθολογοανατόμο.

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, Ashcavaï M, Peters RL. 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. Orchard J, Ibbotson R, Best G, et al. ZAP-70 in B cell malignancies. *Leukaemia and Lymphoma* 2005; 46(12):1689–1698.
6. Wang J, Young L, Win W, et al. Distribution and ZAP-70 expression of WHO categories in Shanxi, China. *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology* 2005; 13(4):323–332.
7. Mustelin T and Tasken K. Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases. *Biochemical Journal* 2003; 371:15–27.
8. Van Oers N and Weiss A. The Syk/ZAP-70 protein tyrosine kinase connection to antigen receptor signalling processes. *Seminars in Immunology* 1995; 7:227–236.

Τροποποιήσεις Στην Προηγούμενη Έκδοση

Σύνθεση Αντιδραστηρίου, Ολική Συγκέντρωση Πρωτεΐνης, Συστάσεις Για Τη Χρήση, Προειδοποιήσεις Και Προφυλάξεις.

Ημερομηνία Έκδοσης

05 Δεκεμβρίου 2018

Novocastra™ Væskeformigt Monoklonalt Museantistof ZAP-70

Produktkode: NCL-L-ZAP-70

Tilsigtet Anvendelse

Til in vitro diagnostisk anvendelse.

NCL-L-ZAP-70 er beregnet til kvalitativ identifikation af ZAP-70-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

Immunhistokemi (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

L453R

Immunogen

Et prokaryot rekombinant protein svarende til en del af N-terminus.

Specifitet

Humant ZAP-70.

Reagenssammensætning

NCL-L-ZAP-70 er en flydende vævskultursupernatant, dialyseret og fortyndet i PBS indeholdende natriumazid som konserveringsmiddel.

Ig-klasse

IgG2b (kappa)

Totalproteinkoncentration

Total Protein

Se etiketten på hætteflasken for lotspecifik totalproteinkoncentration.

Antistofkoncentration

Større end eller lig med 449 mg/L. Se etiketten på hætteflasken for lotspecifik Ig-koncentration.

Anbefalinger Vedrørende Anvendelse

Immunhistokemi på paraffinsnit.

Varmeinduceret epitopgenfinding (HIER): Følg venligst vejledningen i Novocastra Epitope Retrieval Solution pH 6.

Foreslået fortynding: 1:100 ved 30 minutter ved 25 °C. Disse retningslinjer er vejledende, og brugeren bør selv bestemme egne optimale brugsopløsninger.

Visualisering: Følg venligst vejledningen i Novolink™ Polymer Detection Systems. Yderligere produktinformation og support fås ved henvendelse til lokal forhandler eller Leica-Biosystems regionskontor - samt på vores hjemmeside: www.LeicaBiosystems.com

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.

Denne reagens indeholder natriumazid. Et datablad for materialesikkerhed kan fås efter anmodning eller er tilgængeligt på www.LeicaBiosystems.com

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 farvningsteknikker.

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 tonsil.

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.

Det anbefalede negative kontrolvæv er lillehjerne.

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-ZAP-70 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 L453R påviste ZAP-70 proteinet i cytoplasme og kerner i T-celler og NK-celler. I godartet lymfevæv var paracorticale T-lymfocytter og sjældne spredte små lymfocytter i mantelzoner og follikelcentre positive. I normale vævsprøver blev ZAP-70 cytoplasmiske og/eller nuklear farvning overvejende observeret i infiltrerende lymfocytter. Ind imellem blev NK-celler farvet, og der var ingen farvning af normale modne B-celler. Bortset fra infiltrering af lymfocytter har IHC-undersøgelser ikke vist uventet reaktivitet, der peger i retning af klonen er specifik til ZAP-70 og ikke er krydsreaktiv med Syk. (n=39).

Tumorvæv

Klon L453R farvet 6/7 perifer T-celle-lymfomer, 1/1 T-lymfoblastisk lymfom, 1/1 angioimmunoblastisk T-cellelymfom, 1/1 NK/T-cellelymfom samt 0/2 myeloide leukæmier. I B-celle neoplasmer, farvede klon L453R 13/27 kroniske lymfocytiske leukæmier, 2/2-mantelcellelymfomer, 1/4 anaplastiske storcellelymfomer, 0/18 diffuse storcelle B-cellelymfomer, 0/7 follikulære lymfomer, 0/2 ekstranodale marginalzone B-cellelymfomer i mucosa associeret lymfevæv samt 0/1 Burkitts lymfoma. Ved Hodgkins lymfoma var alle neoplastiske celler negative i alle undersøgte tilfælde (0/5). Med undtagelse af infiltrerende lymfocytter sås ingen farvning i non-hæmatologiske maligniteter (n=68).

NCL-L-ZAP-70 anbefales til påvisning af humant ZAP-70-protein i normale og neoplastiske væv, som et hjælpemiddel til traditionel histopatologi ved brug af ikke-immunologiske histokemiske farvninger.

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 irregularetter 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 antigenekspression, 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, Peters RL. 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. Orchard J, Ibbotson R, Best G, et al. ZAP-70 in B cell malignancies. Leukaemia and Lymphoma 2005; 46(12):1689–1698.
6. Wang J, Young L, Win W, et al. Distribution and ZAP-70 expression of WHO categories in Shanxi, China. Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology 2005; 13(4):323–332.
7. Mustelin T and Tasken K. Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases. Biochemical Journal 2003; 371:15–27.
8. Van Oers N and Weiss A. The Syk/ZAP-70 protein tyrosine kinase connection to antigen receptor signalling processes. Seminars in Immunology 1995; 7:227–236.

Rettelser Til Tidligere Udgave

Reagenssammensætning, Totalproteinconcentration, Anbefalinger Vedrørende Anvendelse, Advarsler Og Forholdsregler.

Udgivelsesdato

05 december 2018

Novocastra™ vloeibaar monoklonaal muisantilichaam ZAP-70

Productcode: NCL-L-ZAP-70

Beoogd gebruik

Voor diagnostisch gebruik *in vitro*.

NCL-L-ZAP-70 is bedoeld voor de kwalitatieve identificatie van humane ZAP-70-moleculen in paraffinecoups door middel van lichtmicroscopie. 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 (primaire 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

L453R

Immunogeen

Prokaryotisch recombinant-eiwit overeenkomende met een deel van de N-terminus.

Specificiteit

Menselijk ZAP-70.

Reagenssamenstelling

NCL-L-ZAP-70 is een vloeibaar supernatant uit weefselkweek, gedialyseerd en verdund in PDS met natriumazide als conserveermiddel.

Ig-klasse

IgG2b (kappa)

Totale eiwitconcentratie Total Protein

Zie het etiket van de flacon voor de totale eiwitconcentratie van de partij.

Antilichaamconcentratie

Groter dan of gelijk aan 449 mg/l. Zie het etiket van de flacon voor de totale Ig-concentratie van de partij.

Aanbevelingen voor het gebruik

Immunohistochemie op paraffinecoups.

Warmte-geïnduceerd epitoopherstel (Heat Induced Epitope Retrieval, HIER): Volg de aanwijzingen voor gebruik in Novocastra Epitope Retrieval Solution pH 6.

Vorgestelde verdunning: 1:100 gedurende 30 minuten bij 25 °C. Dit is een richtsnoer en gebruikers moeten zelf de voor hen optimale werkverdunding bepalen.

Visualisatie: Volg de instructies voor het gebruik in de Novolink™ Polymer Detection Systems. Voor verdere productinformatie of -ondersteuning kunt u contact opnemen met uw lokale distributeur of de regionale vestiging van Leica Biosystems of u kunt naar de Leica Biosystems Website gaan, www.LeicaBiosystems.com.

Opslag en stabiliteit

Bewaren 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.

Specimenpreparatie

Het aanbevolen fixeermiddel is 10% neutraal gebufferde formaline voor in paraffine ingebedde weefselcoups.

Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

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

Dit reagens bevat natriumazide. Er is een veiligheidsinformatieblad verkrijgbaar op verzoek of via www.LeicaBiosystems.com 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 specimen. 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 hierdoor 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 als aanvulling op de volgende procedures. Controles zijn verse autopsie-/biopsie-/chirurgische specimens 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 tonsil.

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 cellypen 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 overmatig 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-ZAP-70 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 L453R detecteerde het ZAP-70-eiwit in het cytoplasma en de kern van T-cellen en NK-cellen. In goedaardig lymfoïde weefsel waren paracorticale T-lymfocyten en zeldzame verspreide kleine lymfocyten in de mantelzones en de follicelcentra positief. In het normale weefsel werd ZAP-70 cytoplasmatische en/of nucleaire kleuring voornamelijk waargenomen in infiltrerende lymfocyten. Occasioneel werden NK-cellen gekleurd en was er geen kleuring van normale rijpe B-cellen. Andere dan infiltrerende lymfocyten, hebben IHC-onderzoeken geen onverwachte reactiviteit aangetoond, wat suggereert dat de kloon specifiek is voor ZAP-70 en niet kruisreactief is met Syk. (n=39).

Abnormale weefsels

Kloon L453R kleurde 6/7 T-cellymomen, 1/1 T-lymfoblastisch lymfoom, 1/1 angioimmunoblastisch T-cellymoom, 1/1 NK/T-cellymoom en 0/2 myeloïde leukemieën. In B-celneoplasma's kleurde kloon L453R 13/27 chronische lymfatische leukemieën, 2/2 mantelcellymomen, 1/4 anaplastische grote cellymomen, 0/18 diffuse grote cel B-cellymomen, 0/7 folliculaire lymfomen, 0/2 extranodale marginale zone B-cellymomen van met mucosa geassocieerd lymfoïde weefsel en 0/1 Burkitt's lymfoom. In het lymfoom van Hodgkin waren de neoplastische cellen in alle onderzochte gevallen negatief (0/5). Uitgezonderd voor infiltrerende lymfocyten, werd er geen kleuring waargenomen in niet-hematologische maligniteiten (n=68).

NCL-L-ZAP-70 wordt aanbevolen voor het detecteren van humaan ZAP-70-eiwit in normale en neoplastische weefsels, als aanvulling op conventionele histopathologie waarbij niet-immunologische histochemische kleuringen worden gebruikt.

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-objectglasjes 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 een kleuring of de afwezigheid hiervan moet worden aangevuld met morfologische studies en de juiste controles. Ook moeten er evaluaties worden uitgevoerd binnen de context van de klinische voorgeschiedenis van de patiënt en andere diagnostische tests uitgevoerd 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 neoplasma's. 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. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. 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. Orchard J, Ibbotson R, Best G, et al. ZAP-70 in B cell malignancies. Leukaemia and Lymphoma 2005; 46(12):1689–1698.
6. Wang J, Young L, Win W, et al. Distribution and ZAP-70 expression of WHO categories in Shanxi, China. Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology 2005; 13(4):323–332.
7. Mustelin T and Tasken K. Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases. Biochemical Journal 2003; 371:15–27.
8. Van Oers N and Weiss A. The Syk/ZAP-70 protein tyrosine kinase connection to antigen receptor signalling processes. Seminars in Immunology 1995; 7:227–236.

Aanpassingen ten opzichte van de vorige uitgave

Reagentiasamenstelling, Totale proteïneconcentratie, Aanbevelingen voor gebruik, Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen.

Datum uitgave

05 december 2018

Novocastra™ Flytende murint monoklonalt antistoff

ZAP-70

Produktkode: NCL-L-ZAP-70

Tiltenkt bruk

Til in vitro-diagnostisk bruk.

NCL-L-ZAP-70 skal brukes til kvalitativ identifikasjon av ZAP-70-molekyler i parafinsnitt ved lysmikroskopi. 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 sykehistorie 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 et lysmikroskop og bidrar til differensialdiagnosen for patofysiologiske prosesser, som kan være tilknyttet et spesielt antigen eller ikke.

Klon

L453R

Immunogen

Et prokaryotisk rekombinant protein som tilsvarer en del av N-terminus.

Spesifisitet

Humant ZAP-70.

Reagenssammensetning

NCL-L-ZAP-70 er en flytende kultursupernatant, dialysert og fortynnet i PBS som inneholder natriumazid som konserveringsmiddel.

Ig-klasse

IgG2b (kappa)

Total proteinkonsentrasjon Total Protein

Se etiketten på hetteglasset for partispesifikk totalproteinkonsentrasjon.

Antistoffkonsentrasjon

Større enn eller lik 449 mg/l. Se etiketten på hetteglasset for partispesifikk Ig-konsentrasjon.

Anbefalinger for bruk

Immunhistokjemi på parafinsnitt.

Varmeindusert epitopgjenfinning (Heat Induced Epitope Retrieval, HIER): Følg bruksanvisningen for Novocastra Epitope Retrieval Solution pH 6.

Foreslått fortynning: 1:100 i 30 minutter ved 25 °C. Dette er kun veiledende, og brukerne bør fastslå egne optimale fortynninger for sitt arbeid.

Visualisering: Følg bruksanvisningen for Novolink™ Polymer Detection Systems. Hvis du ønsker ytterligere produktinformasjon eller -støtte, kan du kontakte din lokale forhandler eller regionkontoret til Leica Biosystems, eller du kan besøke Leica Biosystems' nettsted på www.LeicaBiosystems.com

Oppbevaring og stabilitet

Oppbevares ved 2–8 °C. Skal 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 % nøytralbufret formalin for parafinnstøpte 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.

Denne reagensen inneholder natriumazid. Et sikkerhetsdatablad er tilgjengelig på forespørsel eller tilgjengelig fra www.LeicaBiosystems.com

Følg nasjonale og lokale forskrifter for avfallshåndtering av bestanddeler som kan være giftige.

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, skyl med rikelige mengder vann. Kontakt lege.

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

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

Kvalitetskontroll

Forskjeller i vevprosessering 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 formalinfisert, behandlet og parafinvoksinntøpt så snart som mulig på samme måte som pasientprøven(e).

Positivt kontrollvev

Brukes for å indikere riktig klargjorte vev og riktige fargingsteknikker.

Ett positivt kontrollvev 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 mandel.

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

Negativt kontrollvev

Skal undersøkes etter det positive kontrollvevet 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.

Uspesifikk 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 pseudoperoksidase (erytrocytter), 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-ZAP-70 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

Klone L453R oppdaget ZAP-70 proteinet i cytoplasma og kjerne av T-celler og NK-celler. I godartet lymfoidvevs-parakortiske T-lymfocytter og sjeldne spredte små lymfocytter i mantelsonen og follikkentrene var positive. I det normale vevet ble ZAP-70 cytoplasmatiske og/eller nukleusfarging hovedsakelig observert i infiltrerende lymfocytter. Noen ganger ble NK-celler farget, og ingen farging av normale, modne B-celler. Annet enn infiltrerende lymfocytter, har IHC-studier ikke vist uventet reaktivitet, noe som tyder på at klonen er spesifikk for ZAP-70 og ikke kryssreaktiv med Syk. (n=39).

Unormale vev

Klone L453R farget 6/7 perifer T-cellelymfomer, 1/1 T-lymfoblastisk lymfom, 1/1 angioimmunoblastisk T-cellelymfom, 1/1 NK/T-cellelymfom og 0/2 myeloide leukemier. I B-celle-neoplasmer farget klon L453R 13/27 kroniske lymfocytiske leukemier, 2/2 mantelcellymfomer, 1/4 anaplastiske storcellymfomer, 0/18 diffuse B-cellelymfomer med store celler, 0/7 follikulære lymfomer, 0/2 ekstranodale marginalsoner B-cellelymfomer av slimhinneassosiert lymfoidvev og 0/1 Burkitt-lymfom. I Hodgkins lymfom var neoplastiske celler negative i alle studerte tilfeller (0/5). Bortsett fra infiltrerende lymfocytter ble det ikke sett farging i ikke-hematologiske maligniteter (n = 68).

NCL-L-ZAP-70 anbefales for deteksjon av humant ZAP-70-protein i normalt og neoplastisk vev, i tillegg til konvensjonell histopatologi med bruk av ikke-immunologiske histokjemiske farger.

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 for 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 tolkingen 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 sykehistorie og andre diagnostiske tester.

Antistoffer fra Leica Biosystems Newcastle Ltd er til bruk, som indisert, på enten frosne eller parafininntøpte snitt med spesifikke fikseringskrav. Det kan forekomme uventet antigenuttrykk, spesielt i neoplasmer. Den kliniske tolkingen 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. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. 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. Orchard J, Ibbotson R, Best G, et al. ZAP-70 in B cell malignancies. *Leukaemia and Lymphoma* 2005; 46(12):1689–1698.
6. Wang J, Young L, Win W, et al. Distribution and ZAP-70 expression of WHO categories in Shanxi, China. *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology* 2005; 13(4):323–332.
7. Mustelin T and Tasken K. Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases. *Biochemical Journal* 2003; 371:15–27.
8. Van Oers N and Weiss A. The Syk/ZAP-70 protein tyrosine kinase connection to antigen receptor signalling processes. *Seminars in Immunology* 1995; 7:227–236.

Endringer på tidligere utgave

Reagenssammensetning, Totalproteinkonsentrasjon, Anbefalinger for bruk, Advarsler og forholdsregler.

Utstedelsesdato

05 desember 2018

Novocastra™ Likit Monoklonal Fare Antikor ZAP-70

Ürün Kodu: NCL-L-ZAP-70

Kullanım Amacı

In vitro diagnostik kullanım içindir.

NCL-L-ZAP-70, parafin bölümlerindeki ZAP-70 moleküllerinin ışık mikroskopisi ile nitel tanımlanması için öngörülmüştür. Herhangi bir boyamanın veya boyama yokluğunun klinik yorumu, morfolojik çalışmalar ve uygun kontrollerle tamamlanmalıdır ve nitelikli bir patoloj tarafından hastanın klinik öyküsü ve diğer tanı testleri bağlamında değerlendirilmelidir.

Prosedür İlikesi

İmmünohistokimyasal (IHC) boyama teknikleri, antijene ardışık olarak belirli bir antikorun uygulanması (birincil antikor), birincil antikora ikincil bir antikorun uygulanması ve aralardaki yıkama adımları ile, antijenlerin kromojenik substratlı bir enzim kompleksi yoluyla görselleştirilmesine olanak tanır. Kromojenin enzimle etkinleştirilmesi, antijen alanında gözle görülür bir tepkiye yol açar. Örnek daha sonra karşıt boyanabilir ve lamelle örtülebilir. Sonuçlar bir ışık mikroskobu kullanılarak yorumlanır ve belirli bir antijen ile ilişkili olabileceği veya olmayabileceği patofizyolojik süreçlerin ayrıncı tanısına yardımcı olur.

Clone

L453R

İmmünojen

N ucunun bir kısmına karşılık gelen prokaryotik rekombinant protein.

Özgüllük

İnsan ZAP-70.

Reaktif Bileşimi

NCL-L-ZAP-70, koruyucu olarak sodyum azid içeren PBS içinde diyalize edilmiş ve seyreltilmiş bir sıvı doku kültürü süpernatanttır.

Ig Sınıfı

IgG2b (kappa)

Toplam Protein Konsantrasyonu Total Protein

Lota özgül toplam protein konsantrasyonu için flakon etiketine başvurun.

Antikor Konsantrasyonu

449 mg/L'ye eşit veya bu değerden yüksek. Lota özgül Ig konsantrasyonu için flakon etiketine başvurun.

Kullanım Önerileri

Parafin kesitlerinde immünohistokimya.

Isı İndüklü Epitop Alımı (Heat Induced Epitope Retrieval, HIER): Novocastra Epitope Retrieval Solution pH 6 içinde kullanım için lütfen talimatları takip edin.

Önerilen dilüsyon: 25°C'de 30 dakika süreyle 1:100. Bu, kılavuz olarak verilmiştir ve kullanıcılar kendi optimal çalışma seyreltilerini belirlemelidir.

Görselleştirme: Lütfen Novolink™ Polymer Detection Systems'in kullanım talimatlarını izleyin. Ürünle ilgili daha fazla bilgi veya destek için yerel distribütörünüzle veya Leica Biosystems bölgesi ofisiyle iletişime geçebilirsiniz ya da bunun yerine Leica Biosystems Web sitesini ziyaret edebilirsiniz: www.LeicaBiosystems.com

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.

Örnek Hazırlama

Önerilen fiksatif, parafine gömülmüş doku kesitleri için %10 nötr tamponlu formalindir.

Uyarılar ve Önlemler

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

Bu reaktif sodyum azid içerir. Malzeme Güvenlik Bilgileri Formu, talep üzerine sağlanabilir ve www.LeicaBiosystems.com sitesinde mevcuttur. Potansiyel olarak toksik bileşenlerin atılmasıyla ilgili yerel, ulusal veya bölgesel düzenlemeleri dikkate alın.

Fiksasyondan önce ve sonra örnekler ve onlara maruz kalmış bütün materyaller, enfeksiyon yayabileceği 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 mikrobiyal 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

Kullanıcı laboratuvarında doku işleme ve teknik prosedürlerdeki farklılıklar sonuçlarda, aşağıdaki prosedürlere ek olarak kurum içi kontrollerin düzenli performansını gerektiren anlamlı değişkenliğe yol açabilir.

Kontroller, hasta numunesinde/numunelerinde yapıldığı gibi mümkün olan en kısa sürede dondurulan formalinle fikse edilmiş, parafin mumuna gömülmüş, taze otopsi numuneleri/biyopsi numuneleri/cerrahi örnekler olmalıdır.

Pozitif Doku Kontrolü

Doğru 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.²

Önerilen pozitif kontrol dokusu bademciktir.

Pozitif doku kontrolü pozitif boyama göstermezse test örneklerinin 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 beyinciktir.

Alternatif olarak, doku kesitlerinin çoğunda bulunan farklı hücre tipi çeşitleri sıklıkla negatif kontrol bölgeleri sunar ancak bu kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır.

Olduğu durumda, spesifik olmayan boyamanın görünümü genelde diffüzdür. Aşırı formalin fiksasyonlu dokulardan kesitlerde bağ dokusunun sporadik boyanması da görülebilir. Boyama sonuçlarının yorumlanması için intakt 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 psödo peroksizid (eritrositler), endojen peroksizid (sitokrom C) veya endojen biotin (örn. karaciğer, meme, beyin, böbrek) gibi endojen enzimlerden de kaynaklanabilir. Endojen enzim aktivitesini veya nonspesifik enzim bağlanmasını spesifik immünoreaktiviteden 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 olursa hasta örneklerinin sonuçları geçersiz kabul edilmelidir.

Negatif Reaktif Kontrolü

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

Hasta Dokusu

NCL-L-ZAP-70 ile boyanmış hasta numunelerini en son inceleyin. Pozitif boyama yoğunluğu, negatif reaktif kontrolünün spesifik olmayan herhangi bir arka plan boyanması bağlamında değerlendirilmelidir. Her immünohistokimyasal testte olduğu gibi negatif bir sonuç antijenin saptanmadığı anlamına gelir, antijenin miktar tayinine tabi tutulan hücrelerde/dokuda bulunmadığı anlamına gelmez. Gerekirse yanlış negatif reaksiyonların belirlenmesi için antikor paneli kullanın.

Öngörülen Sonuçlar

Normal Doku

Klon L453R, T hücreleri ve NK hücrelerinin sitoplazma ve nükleusunda ZAP-70 proteinini saptamıştır. Benign lenfoid dokuda parakortikal T-lenfositler ve mantle bölgeleri ile folikül merkezlerindeki nadir dağınık küçük lenfositler pozitifdir. Normal dokuda ZAP-70 sitoplazmik ve/veya nükleer lekelenme baskın olarak infiltre edici lenfositlerde gözlenmiştir. NK hücreleri nadiren boyanmıştır ve normal matür B hücrelerinde boyama yoktur. IHC araştırmaları, infiltre edici lenfositler dışında beklenmedik bir reaktivite göstermemiştir, bu da klonun ZAP-70'e spesifik olduğunu ve Syk ile çapraz reaktif olmadığını göstermektedir. (n=39).

Anormal Dokular

Klon L453R; 6/7 periferik T hücreli lenfoma, 1/1 T-lenfoblastik lenfoma, 1/1 anjiyoimmünoblastik T hücreli lenfoma, 1/1 NK/T hücreli lenfoma ve 0/2 miyeloid lösemi boyamıştır. B hücreli neoplazmalarında klon L453R; 13/27 kronik lenfositik lösemiler, 2/2 mantle hücre lenfomalari, 1/4 anaplastik büyük hücreli lenfomalari, 0/18 yaygın geniş hücreli B hücreli lenfomalari, 0/7 foliküler lenfomalari, 0/2 mukoza ile ilişkili lenfoid dokunun ekstranodal marjinal bölge B hücreli lenfomalari ve 0/1 Burkitt lenfoması boyamıştır. Hodgkin lenfomasında, araştıran tüm olgularda neoplastik hücreler negatifdir (0/5). İnfiltratif lenfositler hariç, hematolojik olmayan çeşitli malignitelere boyama görülmemiştir (n=68).

NCL-L-ZAP-70 . immünoojik olmayan histokimyasal boyamalar kullanılarak yapılan geleneksel histopatolojiye ek olarak normal ve neoplastik dokularda insan ZAP-70 proteininin saptanması için önerilir.

Genel Sınırlamalar

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

Doku boyama, boyama öncesinde dokunun kullanımına ve işlenmesine bağlıdır. Uygun olmayan fiksasyon, dondurma, çözme, yıkama, kurutma, ısıtma, kesit alma veya diğer dokular veya sıvıların kontaminasyon artefaktları, antikor tutulmasına veya yanlış negatif sonuçlara yol açabilir. Tutarsız sonuçlar, fiksasyon ve gömme yöntemlerindeki değişikliklerden ya da dokunun yapısından kaynaklanan düzensizliklerden kaynaklanabilir.⁴

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

Herhangi bir boyamanın veya boyama yokluğunun klinik yorumu, morfolojik çalışmalar ve uygun kontrollerle tamamlanmalıdır ve nitelikli bir patolog tarafından hastanın klinik öyküsü ve diğer tanı testleri bağlamında değerlendirilmelidir.

Leica Biosystems Newcastle Ltd'in antikorları, belirtilen şekilde, özel fiksasyon gereklilikleriyle parafine gömülü veya dondurulmuş kesitler üzerinde kullanılır. Özellikle neoplazmlarda beklenmeyen antijen ekspresyonu oluşabilir. Boyanmış herhangi bir doku kesitinin klinik yorumu, morfolojik analizi ve uygun kontrollerin değerlendirilmesini içermelidir.

Kaynakça - 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, Peters RL. 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. Orchard J, Ibbotson R, Best G, et al. ZAP-70 in B cell malignancies. Leukaemia and Lymphoma 2005; 46(12):1689–1698.
6. Wang J, Young L, Win W, et al. Distribution and ZAP-70 expression of WHO categories in Shanxi, China. Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology 2005; 13(4):323–332.
7. Mustelin T and Tasken K. Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases. Biochemical Journal 2003; 371:15–27.
8. Van Oers N and Weiss A. The Syk/ZAP-70 protein tyrosine kinase connection to antigen receptor signalling processes. Seminars in Immunology 1995; 7:227–236.

Önceki Sayıya Göre Değişiklikler

Reaktif Kompozisyonu, Toplam Protein Konsantrasyonu, Kullanım Tavsiyeleri, Uyarılar ve Önlemler.

Yayın Tarihi

05 Aralık 2018

Течно мише моноклонално антитяло Novocastra™

ZAP-70

Код на продукта: NCL-L-ZAP-70

Предназначение

За употреба при *in vitro* диагностика.

NCL-L-ZAP-70 е предназначен за качествено определяне с оптична микроскопия на ZAP-70 молекули 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 (ИHC) 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

L453R

Имуноген

Прокариотен рекомбинантен протеин, съответстващ на част от N-терминала.

Специфичност

Човешки ZAP-70.

Състав на реагента

NCL-L-ZAP-70 е течен супернатант от тъканна култура, диализиран и разреден в PBS (фосфатно буферизиран физиологичен разтвор), съдържащ натриев азид като консервант.

Имуноглобулинов клас

IgG2b (капа антитяло)

Обща концентрация на протеин Total Protein

Вижте етикета на флакона относно специфичната за партидата концентрация на общ протеин.

Концентрация на антитела

По-голяма или равна на 449 mg/L. Вижте етикета на флакона за специфичната за партидата концентрация на имуноглобулин.

Препоръки за употреба

Имунохистохимия върху парафинови срези.

Термично индуцирано извличане на епитоп (Heat Induced Epitope Retrieval, HIER): Моля, спазвайте инструкциите за употреба, включени в опаковката на Novocastra Epitope Retrieval Solution pH 6.

Предложение за разреждане: 1:100 за 30 минути при 25°C. Това е дадено като указание, като потребителите трябва сами да определят техни собствени оптимални работни разреждания.

Визуализация: Спазвайте инструкциите за употреба, приложени към Novolink™ Polymer Detection Systems. За допълнителна информация за продукта или помощ, свържете се с вашия локален дистрибутор или местния офис на Leica Biosystems или пък посетете уебсайта на Leica Biosystems, www.LeicaBiosystems.com

Съхранение и стабилност

Да се съхранява при температура 2 – 8°C. Да не се замразява. 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 буферизиран 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.

Този реагент съдържа натриев азид. Информационният лист за безопасност на материалите е наличен при запитване или от www.LeicaBiosystems.com.

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 Никога 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, в противен случай 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 сливица.

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 антияло.

Препоръчителната тъкан за негативна контрола е малкият мозък.

Алтернативно, разнообразието 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 ендегенни ензими, като например псевдопероксидаза (еритроцити), ендегенна пероксидаза (цитохром С) или ендегенен биотин (напр. черен дроб, гърда, мозък, бъбрек) в зависимост от типа на използваното имуно оцветяване. За диференциране на ендегенна 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 антияло, 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

Изследвайте спесимените на пациенти, оцветени последно с NCL-L-ZAP-70. 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 анализираните клетки/тъкан. Ако се налага, използвайте панел от антитела за идентифициране на фалшиво отрицателни реакции.

Очаквани резултати

Нормални тъкани

Клонинг L453R открива протеина ZAP-70 в цитоплазмата и ядрото на Т клетки и НК клетки. Позитивен е в паракортикални Т-лимфоцити от доброкачествена лимфоидна тъкан и редки разпръснати дребноклетъчни лимфоцити в зоните на мантията и фоликулните центрове. При нормална тъкан ZAP-70 оцветяване на цитоплазмата и/или ядрата се наблюдава предимно при инфилтриращите лимфоцити. Понякога НК клетки се оцветяват, но няма оцветяване на нормални зрели В клетки. Освен инфилтриращите лимфоцити ИНС проучванията не показват неочаквана реактивност, което предполага, че клонингът е специфичен за ZAP-70 и не дава кръстосана реакция със Syk. (n=39).

Абнормни тъкани

Клонинг L453R оцветява 6/7 периферни Т-клетъчни лимфома, 1/1 Т-лимфобластен лимфом, 1/1 ангиоимунобластен лимфом на Т-клетките, 1/1 лимфом на НК/Т клетките и 0/2 миелоидни левкемии. В неоплазмите на В-клетките клонинг L453R оцветява 13/27 хронични лимфоцитни левкемии, 2/2 лимфома на клетките от мантията, 1/4 анапластични едроклетъчни лимфома, 0/18 дифузни едроклетъчни лимфома на В-клетките, 0/7 фоликуларни лимфома, 0/2 екстранодални В-клетъчни лимфома на маргиналната зона на свързаната с лигавицата лимфоидна тъкан и 0/1 лимфом на Бърикт. При лимфома на Ходжкин неопластичните клетки са негативни във всички изследвани случаи (0/5). С изключение на неопластичните лимфоцити те не наблюдава оцветяване при нехематологични злокачествени образувания (n=68).

Продуктът NCL-L-ZAP-70 се препоръчва за откриване на човешки протеин ZAP-70 в нормални и неопластични тъкани като допълнение към конвенционалната хистопатология с използване на неимунологични хистохимични оцветявания.

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 предметното стъкло за имунохистохимия 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, срязване 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 – основна

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, Peters RL. 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. Orchard J, Ibbotson R, Best G, et al. ZAP-70 in B cell malignancies. *Leukaemia and Lymphoma* 2005; 46(12):1689–1698.
6. Wang J, Young L, Win W, et al. Distribution and ZAP-70 expression of WHO categories in Shanxi, China. *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology* 2005; 13(4):323–332.
7. Mustelin T and Tasken K. Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases. *Biochemical Journal* 2003; 371:15–27.
8. Van Oers N and Weiss A. The Syk/ZAP-70 protein tyrosine kinase connection to antigen receptor signalling processes. *Seminars in Immunology* 1995; 7:227–236.

Изменения на предишно издание

Състав на реагента, Обща концентрация на протеин, Препоръки за употреба, Предупреждения и предпазни мерки.

Дата на издаване

05 декември 2018

Novocastra™ folyékony egér monoklonális antitest

ZAP-70

Termékkód: NCL-L-ZAP-70

Alkalmazási terület

In vitro diagnosztikai használatra.

Az NCL-L-ZAP-70 a ZAP-70 molekulák fénymikroszkóppal végzett kvalitatív azonosítására szolgál paraffinos metszetekben. Minden festődés megletlének 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.

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 patofiziológiás folyamatok differenciáldiagnózisa során, amely folyamatok az esetek egy részében konkrét antigénhez kapcsolódnak.

Klón

L453R

Immunogén

Az N-terminális egy szakaszának megfelelő prokarióta eredetű rekombináns fehérje.

Specifikitás

Humán ZAP-70.

A reagens összetétele

Az NCL-L-ZAP-70 egy tartósítószerként nátrium-azidot tartalmazó, dializált és PBS-ben hígított folyékony szövetkultúra felülúszó.

Ig-osztály

IgG2b (kappa)

Összfehérje-koncentráció

Total Protein

A sarzsspecifikus összfehérje-koncentrációt lásd az üveg címkéjén.

Antitest-koncentráció

Legalább 449 mg/l. A sarzsspecifikus Ig-koncentrációt lásd az üveg címkéjén.

Felhasználási javaslatok

Immunhisztokémia paraffinos metszeteken.

Höindukált epitópfeltárás (heat induced epitope retrieval, HIER): Kövesse a Novocastra Epitope Retrieval Solution pH 6 termék használati útmutatóját.

Javasolt hígítás: 1:100, 30 percen át, 25 °C-on. Az adatok csak útmutatásul szolgálnak, a felhasználóknak kell meghatározniuk saját optimális munkaadataikat.

Megjelenítés: Kövesse a Novolink™ Polymer Detection Systems rendszerek használati útmutatóját. Ha további termékinformációra vagy támogatásra van szüksége, forduljon a Leica Biosystems helyi forgalmazójához vagy regionális irodájához, vagy keresse fel a Leica Biosystems weboldalát a www.LeicaBiosystems.com címen.

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.

Ez a reagens nátrium-azidot tartalmaz. Az anyagbiztonsági adatlap kérésre rendelkezésre áll, vagy letölthető a www.LeicaBiosystems.com oldalról.

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 reagenset, továbbá kerülje a bőr és a nyálkahártyák érintkezését a reagenssel és a mintákkal. Ha a reagens vagy minták érzékeny területtel érintkeznek, bő vízzel mossa le az érintett területet. Forduljon orvoshoz.

Minimálisan kell csökkenteni a reagens 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, amelyekkel a lehető leghamarabb a betegmintákkal megegyező módon kell formalinban fixálni, feldolgozni és paraffiniaszba ágyazni.

Posztív szövETFkontroll

A megfelelő szövETF-előkészítés és festési technikák ellenőrzésére használatos.

Minden tesztelési körülménygyűttes esetében és minden megfestési sorozatban kell alkalmazni egy pozitív szövETFkontrollt.

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

A javasolt pozitív kontrollszövetet a tonsilla.

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

Negatív szövETFkontroll

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

A javasolt negatív kontrollszövetet a kisagy.

Ezenkívül a legtöbb szövETFmetszetben jelen lévő különböző sejttípusok gyakran használhatók negatív kontrollként, de ezeket a felhasználónak kell ellenőrizni.

Ha van nem specifikus festődés, az rendszerint diffúz megjelenésű. A formalinban túlfixált szövETFekből származó metszeteknél a kötőszövet szövTFványos festődése is megfigyelhető. A festési eredmények értelmezésére ép sejteket 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 (citokróm 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 szövETFkontroll specifikus festődést mutat, a betegminták eredményeit érvénytelennek kell tekinteni.

Negatív reagenskontroll

A nem specifikus festődés kiértékeléséhez és az antigén helyén létrejövő specifikus festődés jobb értelmezéséhez minden betegminta esetén egy metszetben alkalmazzon az elsődleges antitest helyett nem specifikus negatív reagenskontrollt.

Betegszövet

Az NCL-L-ZAP-70 reagenssel festett betegmintákat vizsgálja meg utolsóként. 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 volt kimutatható, nem pedig azt, hogy az antigén nem volt jelen a vizsgált sejtekben/szövetben. Szükség esetén az álnegatív reakciók azonosítására használjon antitestpanelt.

Várható eredmények

Normál szövETFek

Az L453R klón kimutatta a ZAP-70 fehérjét T-sejtek és NK-sejtek citoplazmájában és sejtmagjában. A köpenyzónákban és a follikuláris központokban a jóindulatú limfoid szövETFekben a parakortikális T-limfociták és ritkás, szórt kis limfociták pozitívak voltak. Az egészséges szövETFekben megfigyelt ZAP-70 citoplazmikus és/vagy magfestődését főként az infiltráló limfociták okozták. Esetenként NK-sejtek is megfestődtek, és nem volt festődés a normál, érett B-sejtek esetén. Az infiltráló limfociták megfestődésén kívül az IHC vizsgálatok nem mutattak váratlan reaktivitást, ami arra utal, hogy a klón kizárólag a ZAP-70-re specifikus, és nem lép keresztreakcióba a Syk-kel. (n = 39).

Kóros szövETFek

Az L453R klón megfestett 6/7 perifériás T-sejtes limfómát, 1/1 T-limfoblasztos limfómát, 1/1 angioimmunoblasztos T-sejtes limfómát, 1/1 NK/T-sejtes limfómát és 0/2 mieloid leukémiát. B-sejtes daganatoknál az L453R klón megfestett 13/27 krónikus limfocitás leukémiát, 2/2 köpenysejtes limfómát, 1/4 anaplasztikus nagysejtes limfómát, 0/18 diffúz nagy B-sejtes limfómát, 0/7 follikuláris limfómát, 0/2 nyálkahártya-asszociált limfoid szövETFek extranodális marginális zónai B-sejtes limfómáját és 0/1 Burkitt-limfómát. Hodgkin-limfómánál a tumoros sejtek minden vizsgált esetben negatívak voltak (0/5). Az infiltráló limfocitáktól eltekintve számos további nem hematológiai malignitásban nem volt észlelhető festődés (n = 68).

Az NCL-L-ZAP-70 a humán ZAP-70 fehérje detektálására ajánlott egészséges és tumoros szövETFekben, a nem immunológiai hisztokémiai festést használó hagyományos körszöveteti eljárások kiegészítéseként.

Általános korlátozások

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

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

A túlzott vagy hiányos kontrasztfestés ronthatja az eredmények megfelelő értelmezését.

Minden festődés megjelétének 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 dagاناتok esetében. Bármely festett szövetmetszet 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, Peters RL. 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. Orchard J, Ibbotson R, Best G, et al. ZAP-70 in B cell malignancies. Leukaemia and Lymphoma 2005; 46(12):1689–1698.
6. Wang J, Young L, Win W, et al. Distribution and ZAP-70 expression of WHO categories in Shanxi, China. Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology 2005; 13(4):323–332.
7. Mustelin T and Tasken K. Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases. Biochemical Journal 2003; 371:15–27.
8. Van Oers N and Weiss A. The Syk/ZAP-70 protein tyrosine kinase connection to antigen receptor signalling processes. Seminars in Immunology 1995; 7:227–236.

Módosítások az előző változathoz képest

A reagens összetétele, Összfehérje-koncentráció, Felhasználási javaslatok, Figyelmeztetések és óvintézkedések.

Kiadás dátuma

05 december 2018

Novocastra™ Anticorp lichid monoclonal de șoarece

ZAP-70

Cod produs: NCL-L-ZAP-70

Utilizare prevăzută

Pentru diagnosticare in vitro.

NCL-L-ZAP-70 este destinat identificării calitative, prin intermediul microscopiei optice, a moleculelor de ZAP-70 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

L453R

Imunogen

O proteină recombinantă procariotică corespunzând unei porțiuni a N-terminus.

Specificitate

ZAP-70 uman.

Compoziția reactivului

NCL-L-ZAP-70 este un supernatant de cultură tisulară lichid, dializat și diluat în SSTF, care conține azidă de sodiu drept conservant.

Clasa Ig

IgG2b (kappa)

Concentrație proteină totală Total Protein

Consultați eticheta flaconului pentru concentrația proteinelor totale specifică lotului.

Concentrație anticorpi

Mai mare decât sau egală cu 449 mg/L. Consultați eticheta flaconului pentru concentrația Ig specifică lotului.

Recomandări privind utilizarea

Imunohistochimie pe secțiuni de parafină.

Recuperarea indusă de căldură a epitopilor (HIER): Urmați instrucțiunile de utilizare din Novocastra Epitope Retrieval Solution pH 6.

Diluție sugerată: 1:100 timp de 30 de minute la 25 °C. Aceste informații sunt furnizate cu rol de îndrumare, iar utilizatorii trebuie să-și stabilească singuri propriile diluții de lucru optime.

Vizualizare: Respectați instrucțiunile de utilizare din Novolink™ Polymer Detection Systems. Pentru informații sau asistență suplimentare cu privire la produs, luați legătura cu distribuitorul dvs. local sau cu biroul regional al Leica Biosystems sau, ca alternativă, vizitați site-ul web al Leica Biosystems, www.LeicaBiosystems.com.

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 neutru 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.

Acest reactiv conține azidă de sodiu. O Fișă tehnică de securitate a materialului este disponibilă la cerere sau pe site-ul www.LeicaBiosystems.com

Consultați reglementările naționale sau locale pentru informații privind eliminarea la deșeurile a tuturor componentelor potențial toxice. Probele, înainte și după fixare, precum și toate materialele expuse la acestea, trebuie manipulate ca și când ar avea potențialul de a transmite infecții și trebuie eliminate la deșeurile luând măsurile de precauție adecvate.¹ Nu pipetați niciodată reactivii cu gura și evitați contactul reactivilor și probelor 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 minimum 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

Folosii 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 de amigdale.

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 cerebelul.

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, encefal, 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 non-specific în locul anticorpului primar cu o secțiune din fiecare specimen al pacientului pentru a evalua colorația nespecifică și a permite o mai bună interpretare a colorării specifice la situsul antigenului.

Țesutul pacientului

Examinați speciimenele pacientului colorate cu NCL-L-ZAP-70 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 panel pentru anticorpi pentru identificarea reacțiilor fals negative.

Rezultate așteptate

Țesuturi normale

Clona L453R a detectat proteina ZAP-70 în citoplasma și nucleul celulelor T și celulelor NK. În țesutul limfoid benign, limfocitele T paracorticale și rare limfocite mici distribuite în zonele de manta și centrele foliculare au fost pozitive. În țesut normal, colorarea citoplasmatică și/sau nucleară cu ZAP-70 a fost observată predominant în limfocitele infiltrate. Ocazional au fost colorate celule NK și nu a avut loc vreo colorare a celulelor B mature normale. În afara limfocitelor infiltrate, studiile IHC nu au prezentat vreo reactivitate neașteptată, sugerând faptul că clona este specifică pentru ZAP-70 și nu este reactivă încrucișat cu Syk. (n=39).

Țesuturi anormale

Clona L453R a colorat 6/7 limfoame periferice cu celule T, 1/1 limfom T-limfoblastic, 1/1 limfom angioimunoblastic cu celule T, 1/1 limfom cu celule NK/T și 0/2 leucemii mieloide. În neoplazmele cu celule B, clona L453R a colorat 13/27 leucemii limfocitare cronice, 2/2 limfoame cu celule de manta, 1/4 limfoame anaplastice cu celule mari, 0/18 limfoame difuze cu celule B mari, 0/7 limfoame foliculare, 0/2 limfoame extranodale ale zonei marginale cu celule B ale țesutului limfoid asociat cu mucoasa și 0/1 limfom Burkitt. În limfomul Hodgkin, celulele neoplazice au fost negative în toate cazurile studiate (0/5). Cu excepția limfocitelor infiltrate, nu a fost observată vreo colorare în malignități non-hematologice (n=68).

NCL-L-ZAP-70 este recomandat pentru detectarea proteinei umane ZAP-70 în țesuturile normale și neoplazice, ca adjuvant al histopatologiei convenționale, utilizând coloranți histochimici non-immunologici.

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.

Anticorpul 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, Peters RL. 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. Orchard J, Ibbotson R, Best G, et al. ZAP-70 in B cell malignancies. *Leukaemia and Lymphoma* 2005; 46(12):1689–1698.
6. Wang J, Young L, Win W, et al. Distribution and ZAP-70 expression of WHO categories in Shanxi, China. *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology* 2005; 13(4):323–332.
7. Mustelin T and Tasken K. Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases. *Biochemical Journal* 2003; 371:15–27.
8. Van Oers N and Weiss A. The Syk/ZAP-70 protein tyrosine kinase connection to antigen receptor signalling processes. *Seminars in Immunology* 1995; 7:227–236.

Amendamente la ediția anterioară

Compoziția reactivului, Concentrația totală de proteine, Recomandări pentru utilizare, Avertizări și măsuri de precauție.

Data publicării

05 decembrie 2018

Жидкая форма моноклональных антител мыши Novocastra™ ZAP-70

Код продукта: NCL-L-ZAP-70

Назначение

Для диагностики in vitro

Препарат NCL-L-ZAP-70 предназначена для качественного определения молекул ZAP-70 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

L453R

Иммуноген

Рекомбинантный белок из прокариотических клеток, соответствующий участку N-конца молекулы.

Специфичность

Человеческие антитела ZAP-70 (Human CD123).

Состав реактива

NCL-L-ZAP-70 является супернатантом жидкой культуры тканей, диализированным и разведенным в фосфатном буферном растворе, содержащим азид натрия в качестве консерванта.

Класс иммуноглобулинов

Иммуноглобулин G2b, каппа

Общая концентрация белка Total Protein

Общая концентрация белка в каждой партии указана на этикетке флакона.

Концентрация антитела

Концентрация выше или эквивалентна 449 мг/л. Общая концентрация иммуноглобулина в каждой партии указана на этикетке флакона.

Рекомендации по применению

Иммуногистохимическое окрашивание парафиновых срезов.

Тепловая демаскировка эпитопа (Heat Induced Epitope Retrieval, HIER): выполняйте инструкцию по применению, прилагаемую к препарату Novocastra Epitope Retrieval Solution pH 6.

Рекомендуемое разведение: 1:100 в течение 30 минут при температуре 25 °С. Данная информация носит рекомендательный характер, и пользователям следует самостоятельно определять оптимальные рабочие разведения.

Визуализация: Следуйте инструкциям по применению, которые прилагаются к системам визуализации Novolink™ Polymer Detection Systems. Для получения дополнительной информации о продукции и технической поддержке обратитесь к местному дистрибьютору или в региональный офис компании Leica Biosystems либо, в качестве альтернативы, посетите веб-сайт компании Leica Biosystems: www.LeicaBiosystems.com

Хранение и стабильность

Хранить при температуре 2–8 °С. Не замораживать. После использования незамедлительно 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 пользователями.

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.

Этот реактив содержит азид натрия. Паспорт безопасности химической продукции предоставляется по запросу или доступен на сайте www.LeicaBiosystems.com

В отношении утилизации любых потенциально опасных компонентов следуйте требованиям федеральных, региональных и 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.

Сведите к минимуму микробное загрязнение реактивов во избежание усиления неспецифического окрашивания. 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 ткань миндалин.

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 фиксированных 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 иммуореактивности, 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 образцы взятой у пациента ткани, которые окрашены с помощью NCL-L-ZAP-70, в 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 L453R обнаружил белок ZAP-70 в цитоплазме и ядрах Т-клеток и NK-клеток. В доброкачественной лимфоидной ткани паракортикальные Т-лимфоциты и редкие рассеянные малые лимфоциты в мантийных зонах и центрах фолликулов имели положительное окрашивание. В нормальной ткани цитоплазматическое и/или ядерное окрашивание ZAP-70 наблюдалось преимущественно в инфильтрирующих лимфоцитах. Окрашивание наблюдалось в случайных NK-клетках, а в нормальных зрелых В-лимфоцитах окрашивание отсутствовало. За исключением этих инфильтрирующих лимфоцитов, исследование методом ИГХ не выявило неожиданной реактивности, на основании чего высказано предположение, что клон специфичен к ZAP-70 и не вступает в перекрестную реакцию с тирозинкиназой селезенки. (n=39).

Патологически измененные ткани

Клон L453R окрасил 6/7 случаев периферийной Т-клеточной лимфомы, 1/1 случая Т-лимфобластной лимфомы, 1/1 случая ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомы, 1/1 случая NK/T-клеточной лимфомы и 0/2 случаев миелоидного лейкоза. В новообразованных В-клеток клон L453R окрасил 13/27 случаев хронического лимфоцитарного лейкоза, 2/2 случая лимфомы клеток мантийной зоны, 1/4 случаев анапластической крупноклеточной лимфомы, 0/18 случаев диффузной крупноклеточной В-лимфоцитарной лимфомы, 0/7 случаев фолликулярной лимфомы, 0/2 случаев экстранодальной В-клеточной лимфомы из

клеток маргинальной зоны лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистой оболочкой, и 0/1 случая лимфомы Беркитта. В отношении лимфомы Ходжкина для клеток новообразований был получен отрицательный результат во всех исследованных случаях (0/5). За исключением инфильтрирующих лимфоцитов, окрашивания не наблюдалось в злокачественных образованиях негематологической природы (n=68).

NCL-L-ZAP-70 рекомендуется использовать для обнаружения белка ZAP-70 человека в здоровых и пораженных опухолю тканей в качестве дополнения к обычным гистопатологическим исследованиям с неиммунным гистохимическим окрашиванием.

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.

Литература — 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. Nadjji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. 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. Orchard J, Ibbotson R, Best G, et al. ZAP-70 in B cell malignancies. Leukaemia and Lymphoma 2005; 46(12):1689–1698.
6. Wang J, Young L, Win W, et al. Distribution and ZAP-70 expression of WHO categories in Shanxi, China. Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology 2005; 13(4):323–332.
7. Mustelin T and Tasken K. Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases. Biochemical Journal 2003; 371:15–27.
8. Van Oers N and Weiss A. The Syk/ZAP-70 protein tyrosine kinase connection to antigen receptor signalling processes. Seminars in Immunology 1995; 7:227–236.

Дополнения к предыдущему выпуску

Состав реактивов, Суммарная концентрация белка, Рекомендации по использованию, Предупреждения и меры предосторожности.

Дата выпуска

05 декабря 2018

Płynne mysie przeciwciało monoklonalne Novocastra™

ZAP-70

Kod produktu: NCL-L-ZAP-70

Przeznaczenie

Do diagnostyki *in vitro*.

Preparat NCL-L-ZAP-70 jest przeznaczony do jakościowej identyfikacji za pomocą mikroskopii świetlnej cząsteczek ZAP-70 w skrawkach zatopionych w parafinie. Kliniczną interpretację barwienia lub jego braku należy uzupełnić badaniami morfologicznymi oraz odpowiednimi kontrolami. Ocena powinna być przeprowadzona przez wykwalifikowanego patologa 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

L453R

Immunogen

Prokariotyczne rekombinowane białko odpowiadające części N-końca.

Swoistość

Ludzkie ZAP-70.

Skład odczynnika

NCL-L-ZAP-70 jest płynnym supernatantem hodowli tkankowej, dializowanym i rozcieńczonym w PBS, zakonserwowanym azydkiem sodu.

Klasa Ig

IgG2b (kappa)

Całkowite stężenie białka

Total Protein

Całkowite stężenie białka w danej serii podano na etykiecie fiołki.

Stężenie przeciwciała

Większe lub równe 449 mg/l. Stężenie Ig w danej serii podano na etykiecie fiołki.

Zalecenia dotyczące stosowania

Badanie immunohistochemiczne skrawków zatopionych w parafinie.

Ciepłe odmaskowywanie epitopu (HIER): Należy postępować zgodnie z instrukcją stosowania załączoną do roztworu Novocastra Epitope Retrieval Solution pH 6.

Sugerowane rozcieńczenie: 1:100 przez 30 minut w temperaturze 25 °C. Te informacje stanowią jedynie wskazówkę – użytkownicy powinni sami określić swoje optymalne rozcieńczenie robocze.

Wizualizacja: Należy postępować zgodnie z instrukcją stosowania dołączoną do Novolink™ Polymer Detection Systems. W sprawie dodatkowych informacji o produkcie lub w celu uzyskania pomocy należy kontaktować się z lokalnym dystrybutorem lub z regionalnym biurem firmy Leica Biosystems lub odwiedzić stronę firmy Leica Biosystems www.LeicaBiosystems.com.

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

Zalecany 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.

Ten odczynnik zawiera azydki sodu. Karta charakterystyki jest dostępna na życzenie lub dostępna na stronie www.LeicaBiosystems.com. 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.

Chronić odczynniki przed skażeniem drobnoustrojami, ponieważ może ono doprowadzić do zwiększonego barwienia niespecyficznego.

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

Kontrola jakości

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

Kontrole należy przeprowadzać jak najszybciej 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 migdałek.

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 pseudoperoxydaza (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 pobrane od pacjenta barwione NCL-L-ZAP-70 należy badać jako ostatnie. Intensywność barwienia pozytywnego należy oceniać 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 L453R wykrył białko ZAP-70 w błonie komórkowej i jądrze limfocytów T i NK. Wynik pozytywny wystąpił w łagodnych tkankach limfatycznych okołokorowych limfocytach T i rzadkich rozproszonych limfocytach małych w strefach płaszczka oraz w centrach grudkowych. W tkance prawidłowej ZAP-70 stwierdzono przede wszystkim barwienie cytoplazmy i/lub barwienie jądro naciekających limfocytów. Niekiedy występowało barwienie limfocytów NK i nie wystąpiło barwienie prawidłowych dojrzałych limfocytów B. Poza naciekającymi limfocytami badania IHC (badania immunochemiczne) nie wykazały żadnej nieoczekiwanej reaktywności, co sugeruje, że klon jest specyficzny dla ZAP-70 i nie reaguje krzyżowo z Syk. (n=39).

Tkanki nieprawidłowe

Klon L453R wybarwił 6/7 chłoniaków z obwodowych limfocytów T, 1/1 chłoniaka limfoblastycznego z limfocytów T, 1/1 chłoniaka angioimmunoblastycznego z limfocytów T, 1/1 chłoniaka z limfocytów NKT i 0/2 białaczek szpikowych. W nowotworach z limfocytów B klon L453R wybarwił 13/27 przewlekłych białaczek limfatycznych, 2/2 chłoniaki z komórek płaszczka, 1/4 chłoniaka anaplastycznego z dużych limfocytów, 0/18 chłoniaków z dużych limfocytów B, 0/7 chłoniaków grudkowych, 0/2 pozawęzłowych chłoniaków strefy brzeżnej z limfocytów B tkanki limfatycznej związanej z błoną śluzową i 0/1 chłoniaków Burkitta. W chłoniaku Hodgkina komórki nowotworowe dały wynik negatywny we wszystkich badanych przypadkach (0/5). Z wyjątkiem naciekających limfocytów nie stwierdzono barwienia w niehematologicznych nowotworach złośliwych (n=68).

Zaleca się stosowanie NCL-L-ZAP-70 do wykrywania ludzkiego białka ZAP-70 w tkankach zdrowych i rakowych, jako uzupełnienia konwencjonalnego badania histopatologicznego opartego na nieimmunologicznym barwieniu histologicznym.

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 tkanką⁴

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. Ocenę 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, Peters RL. 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. Orchard J, Ibbotson R, Best G, et al. ZAP-70 in B cell malignancies. *Leukaemia and Lymphoma* 2005; 46(12):1689–1698.
6. Wang J, Young L, Win W, et al. Distribution and ZAP-70 expression of WHO categories in Shanxi, China. *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology* 2005; 13(4):323–332.
7. Mustelin T and Tasken K. Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases. *Biochemical Journal* 2003; 371:15–27.
8. Van Oers N and Weiss A. The Syk/ZAP-70 protein tyrosine kinase connection to antigen receptor signalling processes. *Seminars in Immunology* 1995; 7:227–236.

Zmiany wprowadzone do poprzedniego wydania

Skład odczynnika, Całkowite stężenie białka, Zalecenia dotyczące stosowania, Ostrzeżenia i środki ostrożności.

Data publikacji

05 grudnia 2018

Tekoče mišje monoklonsko protitelo Novocastra™

ZAP-70

Koda izdelka: NCL-L-ZAP-70

Predvidena uporaba

Za diagnostično uporabo *in vitro*.

Izdelek NCL-L-ZAP-70 je namenjen za kvalitativno identifikacijo molekul ZAP-70 v parafinskih rezinah s pomočjo svetlobne mikroskopije.

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.

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

L453R

Imunogen

Prokariontski rekombinantni fuzijski protein, ki ustreza N-terminalnemu koncu.

Specifičnost

Človeški ZAP-70.

Sestava reagenta

NCL-L-ZAP-70 je tekočinski supernatant kulture tkiva, dializiran in razredčen v fiziološki raztopini s fosfatnim pufrom (PBS), ki vsebuje natrijev azid kot konzervans.

Razred Ig

IgG2b (kapa)

Skupna koncentracija beljakovin Total Protein

Skupna koncentracija beljakovin v določeni seriji je navedena na oznaki na viali.

Koncentracija protiteles

Višja ali enaka 449 mg/l. Glejte oznako na viali za koncentracijo Ig določene serije.

Priporočila za uporabo

Imunohistokemija parafinskih rezin.

Toplotno pridobivanje epitopa (HIER): Upoštevajte navodila za uporabo raztopine za pridobivanje epitopov Novocastra Epitope Retrieval Solution pH 6.

Predlagano redčenje: 1:100 za 30 minut pri 25 °C. To so samo smernice; uporabniki naj poiščejo svoje lastne najbolj učinkovite delovne razredčine.

Vizualizacija: Upoštevajte navodila za uporabo sistemov za zaznavanje polimerov Novolink™ Polymer Detection Systems. Za več podatkov o izdelku ali podporo se obrnite na svojega lokalnega distributerja ali regionalno pisarno podjetja Leica Biosystems, lahko pa tudi obiščete spletno mesto podjetja Leica Biosystems na www.LeicaBiosystems.com.

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 fiksirna 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.

Ta reagent vsebuje natrijev azid. Varnostni list je na voljo na zahtevo ali na naslovu www.LeicaBiosystems.com. Upoštevajte zvezne, državne ali lokalne predpise za odstranjevanje vseh morebitnih strupenih sestavin.

Z vzorci, pred fiksiranjem in po njem, in vsemi materiali, s katerimi so prišli v stik, morate rokovati, kot da bi lahko prenašali okužbe, in pri njihovem odstranjevanju slediti ustreznim previdnostnim ukrepom.¹ Nikoli ne pipetirajte reagentov skozi usta; 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. Poiščite zdravniško pomoč.

Pazite, da ne pride do mikrobnih okužbe reagentov, saj lahko povzroči nespecifično barvanje.

Če uporabite čas ali temperature 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 razkroja reagenta je bolj primerno uporabiti tkivo s šibkim pozitivnim obarvanjem kot tkivo z močnim pozitivnim obarvanjem.²

Za pozitivni kontrolni vzorec tkiva priporočamo tkivo tonzil.

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

Negativni kontrolni vzorci tkiva

Pregledate 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 neimunološke 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 imunske reaktivnosti, lahko barvate dodatna tkiva bolnika izključno ali s kromogenim substratom ali encimskimi kompleksi (avidin-biotin, streptavidin, označeni polimer) in kromogenim 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-ZAP-70. 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 L453R je zaznal protein ZAP-70 v citoplazmi in jedru celic T in celic NK. V benignem limfnem tkivu so bili pozitivni parakortikalni limfociti T, redki razpršeni mali limfociti v plaščnem območju ter folikularna središča. V normalnem tkivu so obarvanje citoplazme in/ali jedra z izdelkom ZAP-70 opazili predvsem pri infiltrirajočih limfocitih. Občasno so se obarvale celice NK, pri normalnih zrelih celicah B pa ni bilo obarvanja. Razen pri infiltrirajočih limfocitih študije IHC niso pokazale nepričakovanega obarvanja, kar pomeni, da je klon specifičen za ZAP-70 in navzkrižno ne reagira s Syk. (n = 39).

Neormalna tkiva

Klon L453R je obarval 6/7 limfomov perifernih celic T, 1/1 limfoblastnega limfoma celic T, 1/1 angioimunoblastnega limfoma celic T, 1/1 limfoma celic NK/T in 0/2 mieloidnih levkemij. Pri neoplazmah celic B je klon L453R obarval 13/27 kroničnih limfocitnih levkemij, 2/2 limfomov plaščnih celic, 1/4 anaplastičnih velikoceličnih limfomov, 0/18 difuznih velikoceličnih limfomov B, 0/7 folikularnih limfomov, 0/2 ekstranodalnih limfomov obrobni celic B s sluznico povezanega limfoidnega tkiva ter 0/1 Burkittovega limfoma. Pri Hodgkinovem limfomu so bile neoplastične celice pri vseh preučevanih primerih negativne (0/5). Z izjemo infiltrirajočih limfocitov pri nehematoloških malignostih niso zaznali barvanja (n = 68).

Izdelek NCL-L-ZAP-70 se priporoča za zaznavanje človeške beljakovine ZAP-70 v normalnih in neoplastičnih tkivih kot dodatna analiza ob konvencionalni histopatologiji z uporabo neimunskih histokemijskih barvil.

Splošne 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 povzročijo 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 zamrzjenih ali v parafin vstavljenih rezinah z določenimi zahtevami za fiksiranje. Lahko pride do nepričakovanega obarvanja antigena, zlasti pri neoplazmah. Pri klinični razlagi obarvane rezine tkiva morate upoštevati morfološko analizo in oceno ustreznih kontrolnih vzorcev.

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, Peters RL. 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. Orchard J, Ibbotson R, Best G, et al. ZAP-70 in B cell malignancies. Leukaemia and Lymphoma 2005; 46(12):1689–1698.
6. Wang J, Young L, Win W, et al. Distribution and ZAP-70 expression of WHO categories in Shanxi, China. Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology 2005; 13(4):323–332.
7. Mustelin T and Tasken K. Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases. Biochemical Journal 2003; 371:15–27.
8. Van Oers N and Weiss A. The Syk/ZAP-70 protein tyrosine kinase connection to antigen receptor signalling processes. Seminars in Immunology 1995; 7:227–236.

Dodatki in spremembe k prejšnji izdaji

Sestava reagentov, Skupna koncentracija beljakovin, Priporočila za uporabo, Opozorila in previdnostni ukrepi.

Datum izdaje

05 december 2018

Novocastra™ Tekutá myší monoklonální protilátka ZAP-70

Kód výrobku: NCL-L-ZAP-70

Zamýšlené použití

Pro diagnostické použití in vitro.

Produkt NCL-L-ZAP-70 je určen ke kvalitativnímu stanovení molekul ZAP-70 světelnou mikroskopií na parafinových řezech. Klinickou interpretaci jakéhokoli 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.

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

L453R

Imunogen

Prokaryotický rekombinantní protein odpovídající části N-terminu.

Specifita

Lidský ZAP-70.

Složení reagentie

NCL-L-ZAP-70 je tekutý supernatant z tkáňové kultury dialyzovaný a naředěný fosfátem pufovaným fyziologickým roztokem (PBS), který obsahuje jako konzervační prostředek azid sodný.

Třída Ig

IgG2b, kappa

Koncentrace celkového proteinu

Total Protein

Koncentrace celkového proteinu specifická pro šarži je uvedena na štítku na lahvičce.

Koncentrace protilátek

449 mg/l nebo vyšší. Koncentrace imunoglobulinu (Ig) specifická pro šarži je uvedena na štítku na lahvičce.

Doporučení k použití

Imunohistochemické vyšetření na parafinových řezech.

Teplem indukované odmaskování epitopu (Heat Induced Epitope Retrieval, HIER): Postupujte podle pokynů k použití k roztoku Novocastra Epitope Retrieval Solution pH 6.

Doporučené ředění: 1:100 po dobu 30 minut při 25 °C. Toto doporučení je uvedeno jako vodítko; uživatelé musí stanovit vlastní optimální pracovní ředění.

Vizualizace: Postupujte podle návodu k použití k systémům Novolink™ Polymer Detection Systems. Další informace o produktu nebo podporu si vyžádejte od místního distributora nebo regionální kanceláře společnosti Leica Biosystems, nebo alternativně navštivte web www.LeicaBiosystems.com.

Skladování a stabilita

Skladujte 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.

Tato reagentie obsahuje azid sodný. Bezpečnostní list materiálu je k dispozici na požádání nebo je dostupný na webu www.LeicaBiosystems.com

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.* 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/zvorky 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 tonzila.

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 v většině tkáňových řezů, to ale musí uživatel validovat.

Nespecifické barvení, je-li přítomno, má obvykle difúzní vzhled. V řezech ze tkání nadměrně fixovaných formalínem 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 (erythrocyty), endogenní peroxidáza (cytochrom C) nebo endogenní biotin (např. játra, prs, mozek, ledviny), podle typu použitého imunobarvíva. K odlišení aktivity endogenních enzymů či nespecifické vazby enzymů od specifické imunoreaktivity mohou být barveny další tkáně pacienta vylučně 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-ZAP-70. Intenzita pozitivního barvení musí být zhodnocena v kontextu se vším specifickým 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 L453R detekoval protein ZAP-70 v cytoplasmě a jádře T buněk a NK buněk. V benigní lymfoidní tkáni byly pozitivní parakortikální T lymfocyty a vzácně roztroušené malé lymfocyty v pláštových zónách a centrech folikulu. V normální tkáni bylo cytoplazmatické a/nebo barvení jádra ZAP-70 pozorováno především v infiltrujících lymfocytech. Přiležitostně byly barveny NK buňky a u normálních zralých B-buněk k zabarvení nedošlo. Kromě infiltrujících lymfocytů neprokázaly studie IHC žádnou neočekávanou reaktivitu, což značí, že je klon specifický pro ZAP-70 a nereaguje zkříženě se Syk. (n=39).

Abnormální tkáně

Klon L453R obarvil 6/7 periferních T-lymfomů, 1/1 lymfoblastický T-lymfom, 1/1 angioimmunoblastický T-lymfom, 1/1 NK/T-lymfom a 0/2 myeloidních leukemií. V neoplazmatech z B-buněk obarvil klon L453R 13/27 chronických lymfocytárních leukemií, 2/2 lymfomů z pláštových buněk, 1/4 anaplastických velkobuněčných lymfomů, 0/18 difúzních velkobuněčných B-lymfomů, 0/7 folikulárních lymfomů, 0/2 extranodálních lymfomů z buněk marginální zóny v lymfoidní tkáni asociované s mukózou a 0/1 Burkittův lymfom. U Hodgkinova lymfomu byly neoplastické buňky negativní ve všech vyšetřovaných případech (0/5). S výjimkou infiltrujících lymfocytů nebylo barvení pozorováno nehematologických malignit (n = 68).

NCL-L-ZAP-70 se doporučuje k detekci lidského proteinu ZAP-70 v normálních a neoplastických tkáních jako doplněk ke konvenční histopatologii s použitím neimunologických histochemických nátěrů.

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 kontaminaci 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 zalití v konzervačním médiu, 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, Peters RL. 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. Orchard J, Ibbotson R, Best G, et al. ZAP-70 in B cell malignancies. Leukaemia and Lymphoma 2005; 46(12):1689–1698.
6. Wang J, Young L, Win W, et al. Distribution and ZAP-70 expression of WHO categories in Shanxi, China. Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology 2005; 13(4):323–332.
7. Mustelin T and Tasken K. Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases. Biochemical Journal 2003; 371:15–27.
8. Van Oers N and Weiss A. The Syk/ZAP-70 protein tyrosine kinase connection to antigen receptor signalling processes. Seminars in Immunology 1995; 7:227–236.

Opravy předchozího vydání

Složení reagentie, Koncentrace celkového proteinu, Doporučení k použití, Varování a bezpečnostní opatření.

Datum vydání

05 prosince 2018

Tekutá myšia monoklonálna protilátka Novocastra™

ZAP-70

Kód produktu: NCL-L-ZAP-70

Zamýšľané použitie

Na diagnostické použitie *in vitro*.

NCL-L-ZAP-70 slúži na kvalitatívnu identifikáciu molekúl ZAP-70 v parafínových rezoch pomocou svetelnej mikroskopie. Klinická interpretácia akéhokoľvek farbenia alebo jeho absencie musí byť kombinovaná s morfológickými výšetreniami za použitia zodpovedajúcich kontrol. Výsledky je nutné vyhodnotiť v kontexte klinickej anamnézy pacienta a iných 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

L453R

Imunogén

Prokaryotický rekombinantný proteín zodpovedajúci časti N-koncovky.

Špecificita

Ľudský ZAP-70.

Zloženie činidla

NCL-L-ZAP-70 je tekutý supernatant na tkanivovú kultiváciu, dialyzovaný a zriedený v PBS, obsahujúci azid sodný ako konzervačnú látku.

Trieda Ig

IgG2b (kappa)

Celková koncentrácia proteínov Total Protein

Celkovú koncentráciu proteínov špecifickú pre šaržu nájdete na štítku fľaštičky.

Koncentrácia protilátok

Väčšia alebo rovná 449 mg/l. Koncentráciu Ig špecifickú pre šaržu nájdete na štítku fľaštičky.

Odporúčania na použitie

Imunohistochemia parafínových rezov.

Záchyt epitopov s tepelnou indukciou (HIER): Postupujte podľa návodu na použitie systému Novocastra Epitope Retrieval Solution pH 6.

Odporúčané riešenie: 1 : 100 po dobu 30 minút pri teplote 25 °C. Táto hodnota je orientačná, používatelia si musia stanoviť svoje vlastné optimálne pracovné riešenia.

Vizualizácia: Postupujte podľa návodu na použitie systémov Novolink™ Polymer Detection Systems. Ďalšie informácie o produkte alebo podporu vám poskytne váš miestny distribútor alebo lokálne zastúpenie spoločnosti Leica Biosystems. Takisto môžete navštíviť internetovú stránku spoločnosti Leica Biosystems: www.LeicaBiosystems.com

Uskladnenie 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.

Toto činidlo obsahuje azid sodný. Materiálový bezpečnostný list je k dispozícii na požiadanie alebo na stránkach www.LeicaBiosystems.com.

Likvidáciu 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 dób 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/biopsické/chirurgické vzorky fixované čo najskôr formálnom a spracované zaliatím do parafínu rovnakým spôsobom ako vzorky pacienta.

Pozitívna kontrola tkanívom

Identifikuje správne pripravené tkanivá a správne techniky zafarbenia.

Každá súprava testových podmienok v každom cykle zafarbenia musí obsahovať jednu pozitívnu kontrolu tkanívom.

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 tonzila.

Ak pozitívna kontrola tkanívom nebude vykazovať pozitívne zafarbenie, výsledky testovaných vzoriek je nutné považovať za neplatné.

Negatívna kontrola tkanívom

Nutné vyšetriť po pozitívnej kontrole tkanívom 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 difúznu 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 farbja 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 (erythrocyty), endogénnou peroxidázou (cytochróm C) alebo endogénnym biotínom (napr. pečeň, prsník, mozog, oblička) v závislosti od typu imunologického farbenia. S cieľom diferencovať endogénnu 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 špecifického farbenia v negatívnej kontrole tkanívom 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 špecifického farbenia na mieste antigénu.

Tkanivo pacienta

Pacientske vzorky zafarbené prípravkom NCL-L-ZAP-70 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.

Očakávaný výsledky

Normálne tkanivá

Klon L453R detegoval proteín ZAP-70 v cytoplazme a jadre T-buniek a NK-buniek. V benignom lymfoidnom tkanive boli pozitívne parakortikálne T-lymfocyty a zriedkavé rozptýlené malé lymfocyty v plášťových zónach a folikulových centrách. V normálnom tkanive bolo cytoplazmatické a/alebo nukleárne zafarbenie proteínom ZAP-70 prevažne pozorované v infiltrujúcich lymfocytoch. Príležitostne boli zafarbené NK-bunky a nepozorovalo sa žiadne zafarbenie normálnych zreých B-buniek. Okrem infiltrujúcich lymfocytov sa v štúdiách IHC neprekázala žiadna neočakávaná reaktivita, čo naznačuje, že klon je špecifický pre ZAP-70 a nemá krížovú reakciu so Syk. (n=39).

Abnormálne tkanivá

Klon L453R zafarbil 6/7 periférnych T-bunkových lymfómov, 1/1 T-lymfoblastového lymfómu, 1/1 angioimunoblastového T-bunkového lymfómu, 1/1 NK/T-bunkového lymfómu a 0/2 myeloidných leukémií. V B-bunkových neoplazmách klon L453R zafarbil 13/27 chronických lymfocytárných leukémií, 2/2 lymfómov z plášťových buniek, 1/4 anaplastických veľkobunkových lymfómov, 0/18 difúzných veľkobunkových B-lymfómov, 0/7 folikulárných lymfómov, 0/2 extranodálnych B-bunkových lymfómov okrajovej zóny lymfoidného tkaniva asociovaného so sliznicou a 0/1 Burkittovho lymfómu. Pri Hodgkinových lymfómoch boli neoplastické bunky vo všetkých testovaných prípadoch negatívne (0/5). Okrem infiltrujúcich lymfocytov nebolo pozorované žiadne zafarbenie nehematologických malignít (n = 68).

NCL-L-ZAP-70 je odporúčaným prostriedkom na detekciu proteínu ľudského ZAP-70 v normálnych a neoplastických tkanivách ako doplnok ku konvenčnej histopatológii za použitia neimunologických histochemických farbení.

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 sklíčka 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 výsledkom. Inkonzistentné výsledky môžu byť spôsobené zmenami metód fixácie a montáže preparátov alebo inherentnými nepravidelnosťami v tkanive.⁴

Nadmerné alebo neúplné kontrastné farbenie môže narušiť správnosť interpretácie výsledkov.

Klinická interpretácia akéhokoľvek farbenia alebo jeho absencie musí byť kombinovaná s morfológickými vyšetreniami za použitia zodpovedajúcich kontrol. Výsledky je nutné vyhodnotiť v kontexte klinickej anamnézy pacienta a iných diagnostických testov vedených kvalifikovaným patológom.

Prilátky spoločnosti Leica Biosystems Newcastle Ltd sú určené na použitie na zmrazených rezoch alebo rezoch zaliatych 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, Peters RL. 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. Orchard J, Ibbotson R, Best G, et al. ZAP-70 in B cell malignancies. *Leukaemia and Lymphoma* 2005; 46(12):1689–1698.
6. Wang J, Young L, Win W, et al. Distribution and ZAP-70 expression of WHO categories in Shanxi, China. *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology* 2005; 13(4):323–332.
7. Mustelin T and Tasken K. Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases. *Biochemical Journal* 2003; 371:15–27.
8. Van Oers N and Weiss A. The Syk/ZAP-70 protein tyrosine kinase connection to antigen receptor signalling processes. *Seminars in Immunology* 1995; 7:227–236.

Úpravy predchádzajúceho vydania

Zloženie činidla, Celková koncentrácia proteínu, Odporúčania na použitie, Varovania a bezpečnostné opatrenia.

Dátum vydania

05 decembra 2018

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