

Novocastra™ Liquid Mouse Monoclonal Antibody Cytokeratin 20

Product Code: NCL-L-CK20-561

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 Cytokeratin 20

Product Code: NCL-L-CK20-561

Intended Use

For in vitro diagnostic use.

NCL-L-CK20-561 is intended for the qualitative identification by light microscopy of Cytokeratin 20 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

PW31

Immunogen

Prokaryotic recombinant protein corresponding to a 70 amino acid component of the N-terminal region of the cytokeratin 20 intermediate filament protein.

Specificity

Human cytokeratin 20 intermediate filament protein.

Reagent Composition

NCL-L-CK20-561 is a liquid tissue culture supernatant containing 15 mM sodium azide as a preservative.

Ig Class

IgG1

Total Protein Concentration Total Protein

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

Antibody Concentration

Greater than or equal to 37 mg/L as determined by ELISA. Refer to vial label for batch specific Ig concentration.

Recommendations On Use

Immunohistochemistry (see **Methodology**) on paraffin sections. Suggested dilution: 1:100 for 30 minutes at 25 °C. Heat induced epitope retrieval using Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114 or RE7115. This is provided as a guide and users should determine their own optimal working dilutions.

Storage and Stability

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

Specimen Preparation

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

Warnings and Precautions

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

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

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

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

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

Quality Control

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

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

Positive Tissue Control

Used to indicate correctly prepared tissues and proper staining techniques.

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

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

Recommended positive control tissue is small intestine.

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-CK20-561 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 PW31 detects cytokeratin 20 in the cytoplasm of normal gastric, small and large bowel epithelium, urothelium and Merkel cells of the skin (n=100).

Abnormal Tissues

Clone PW31 stained carcinomas of the colon (60/65) and bladder (1/2) and a Merkel cell tumor. Focal immunostaining was seen in lung squamous cell carcinomas (3/7). It did not stain a range of other tumors (n=99), including breast carcinomas, renal clear cell carcinoma, prostate adenocarcinomas, pancreatic adenocarcinoma, endometrial carcinoma, thyroid carcinomas, lung small cell carcinomas and adenocarcinomas, melanomas and sarcomas.

NCL-L-CK20-561 is recommended for use as part of an antibody panel in the characterization of tumors originating from urothelium, intestinal epithelium and Merkel cells.

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. Campbell F and Herrington CS. Application of cytokeratin 7 and 20 immunohistochemistry to diagnostic pathology. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:113-122.
6. Leech SN, Kolar AJO, Barrett PD, et al. Merkel cell carcinoma can be distinguished from metastatic small cell carcinoma using antibodies to cytokeratin 20 and thyroid transcription factor 1. Journal of Clinical Pathology. 2001; 54:727-729.

Amendments to Previous Issue

Not applicable.

Date of Issue

07 November 2018

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

Reagents Required but not Supplied

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

Equipment Required but not Supplied

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

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

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

Methodology

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

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

Epitope Retrieval

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

Visualization

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

Amendments to Previous Issue

Not applicable

Date of Issue

23 April 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

Novocastra™ Anticorps Monoclonal liquide de Souris

Cytokeratin 20

Référence du Produit: NCL-L-CK20-561

Utilisation Prévue

Diagnostic in vitro.

Le NCL-L-CK20-561 est destiné à l'identification qualitative par microscopie optique de la molécule Cytokeratin 20 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

PW31

Immunogène

Protéine procaryote recombinante correspondant à un fragment composé de 70 acides aminés de la région N terminale de la protéine filamentaire intermédiaire de cytotkératine 20.

Spécificité

Protéine filamentaire intermédiaire de cytotkératine 20 humaine.

Composition du Réactif

Le NCL-L-CK20-561 est un surnageant de culture tissulaire liquide contenant une solution d'azide de sodium 15 mM comme conservateur.

Classe d'Ig

IgG1

Concentration Totale en Protéines Total Protein

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

Concentration en Anticorps

Supérieure ou égale à 37 mg/l, déterminée par la méthode ELISA. La concentration totale en Ig, spécifique du lot, figure sur l'étiquette du flacon.

Recommandations d'utilisation

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

Restauration de l'épitope par la chaleur à l'aide des Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114 ou RE7115. Ceci n'est donné qu'à titre indicatif et les utilisateurs doivent déterminer leurs propres dilutions de travail optimales.

Conservation et Stabilité

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

Préparation des Spécimens

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

Mises en Garde et Précautions

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

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

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

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

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

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

Contrôle de Qualité

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

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

Tissu de Contrôle Positif

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

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

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

Le tissu de contrôle positif recommandé est l'intestin grêle.

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

Tissu de Contrôle Négatif

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

Le cervelet constitue le tissu de contrôle négatif recommandé.

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

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

Réactif de Contrôle Négatif

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

Tissu du Patient

Examiner les échantillons du patient marqués au NCL-L-CK20-561 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 PW31 détecte la cytokeratine 20 dans le cytoplasme des épithéliums normaux de l'estomac, de l'intestin grêle et du gros intestin, de l'urothélium et des cellules de Merkel de la peau (n=100).

Tissus tumoraux

Le clone PW31 a marqué les carcinomes du côlon (60/65) et de la vessie (1/2) et une tumeur des cellules de Merkel. Un immunomarquage focal a été observé dans deux carcinomes des cellules squameuses du poumon (3/7). Il n'a pas marqué diverses autres tumeurs (n=99), dont des carcinomes mammaires, des carcinomes rénaux à cellules claires, des adénocarcinomes de la prostate, des adénocarcinomes du pancréas, des carcinomes endométriaux, des carcinomes de la thyroïde, des carcinomes et des adénocarcinomes pulmonaires à petites cellules, des mélanomes et des sarcomes.

L'utilisation du NCL-L-CK20-561 est recommandée dans le cadre d'un panel d'anticorps lors de la caractérisation des tumeurs issues de l'urothélium, de l'épithélium intestinal et des cellules de Merkel.

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. Campbell F and Herrington CS. Application of cytokeratin 7 and 20 immunohistochemistry to diagnostic pathology. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:113-122.
6. Leech SN, Kolar AJO, Barrett PD, et al. Merkel cell carcinoma can be distinguished from metastatic small cell carcinoma using antibodies to cytokeratin 20 and thyroid transcription factor 1. Journal of Clinical Pathology. 2001; 54:727-729.

Amendements Apportés à la Version Précédente

Non applicable.

Date de Publication

07 novembre 2018

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

Réactifs nécessaires mais non fournis

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

Equipements nécessaires mais non fournis

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

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

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

Méthodologie

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

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

Restauration de l'épitope

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

Révélation

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

Amendements apportés à la version précédente

Non applicable.

Date de publication

23 avril 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

Novocastra™ Anticorpo Monoclonale Murino Liquido

Cytokeratin 20

Codice Del Prodotto: NCL-L-CK20-561

Uso Previsto

Per uso diagnostico in vitro.

NCL-L-CK20-561 è destinato all'identificazione qualitativa in microscopia ottica della molecole Cytokeratin 20, 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 immunostochimica (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

PW31

Immunogeno

Proteina ricombinante procariotica, corrispondente a un frammento composto da 70 aminoacidi della regione N-terminale del filamento intermedio proteico citocheratina 20.

Specificità

Filamento intermedio proteico citocheratina 20 umana.

Composizione Del Reagente

NCL-L-CK20-561 è un supernatante liquido di coltura tissutale, contenente 15 mM di sodio azide come conservante.

Classe Ig

IgG1

Concentrazione Proteica Totale Total Protein

1,0–8,0 g/L. Consultare l'etichetta del flacone per la concentrazione proteica totale specifica del lotto.

Concentrazione Anticorpale

Superiore o uguale a 37 mg/L, come determinato mediante test ELISA. Consultare l'etichetta del flacone per la concentrazione di Ig specifica del lotto.

Raccomandazioni Per L'uso

Immunostochimica (vedere **Metodologia**) sulle sezioni in paraffina. Diluizione raccomandata: 1:100 per 30 minuti a 25 °C. Smascheramento ad alta temperatura dell'epitopo mediante Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114 o RE7115. Queste raccomandazioni costituiscono delle semplici linee guida; spetta al singolo utente stabilire la diluizione di lavoro ottimale.

Conservazione E Stabilità

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

Preparazione Del Campione Biologico

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

Avvertenze E Precauzioni

Questo reagente è stato preparato dal supernatante di coltura cellulare. Trattandosi di un prodotto biologico, va maneggiato con cautela.

La molarità della sodio azide nel reagente corrisponde a 15 mM. Su richiesta, è disponibile una scheda dei dati di sicurezza del materiale (MSDS) per la sodio azide.

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

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

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

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

Controllo Qualità

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

Controllo Positivo Del Tessuto

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

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

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

Il tessuto raccomandato per il controllo positivo è l'intestino tenue.

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-CK20-561. 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 PW31 mette in evidenza la citocheratina 20 nel citoplasma delle cellule normali dell'epitelio gastrico, dell'intestino tenue e crasso, dell'urotelio e nelle cellule di Merkel della cute (n=100).

Tessuti tumorali

Il clone PW31 ha colorato 60 di 65 carcinomi del colon, 1 di 2 carcinomi della vescica e 1 di 1 tumore a cellule di Merkel. È stata osservata un'immunocolorazione focale nei carcinomi polmonari a cellule squamose (3/7). Il clone non ha colorato una serie di altri tumori (n=99), che comprendeva carcinomi mammari, carcinoma renale a cellule chiare, adenocarcinomi prostatici, adenocarcinoma pancreatico, carcinoma endometriale, carcinomi tiroidei, carcinomi polmonari a piccole cellule e adenocarcinomi, melanomi e sarcomi.

Si raccomanda l'uso di NCL-L-CK20-561 come parte di un pannello anticorpale nella caratterizzazione dei tumori a origine dall'urotelio, dall'epitelio intestinale e dalle cellule di Merkel.

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, in 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. Campbell F and Herrington CS. Application of cytokeratin 7 and 20 immunohistochemistry to diagnostic pathology. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:113-122.
6. Leech SN, Kolar AJO, Barrett PD, et al. Merkel cell carcinoma can be distinguished from metastatic small cell carcinoma using antibodies to cytokeratin 20 and thyroid transcription factor 1. Journal of Clinical Pathology. 2001; 54:727-729.

Modifiche Alla Pubblicazione Precedente

Non applicabile.

Data Di Pubblicazione

07 novembre 2018

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

Reagenti necessari ma non forniti

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

Attrezzature necessarie ma non fornite

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

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

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

Metodologia

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

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

Smascheramento dell'epitopo

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

Visualizzazione

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

Modifiche alla pubblicazione precedente

Non applicabile.

Data di pubblicazione

23 aprile 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

Novocastra™ Flüssiger Monoklonaler Maus-Antikörper Cytokeratin 20 Produkt-Nr.: NCL-L-CK20-561

Verwendungszweck

Für *in-vitro*-Diagnostik.

NCL-L-CK20-561 ist für den qualitativen Nachweis der Cytokeratin 20-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

PW31

Immunogen

Prokaryotisches rekombinantes Protein, das einem aus 70 Aminosäuren bestehenden Teil der N-terminalen Region des intermediären Filamentproteins von Zytokeratin 20 entspricht.

Spezifität

Intermediäres Filamentprotein des humanen Zytokeratins 20.

Reagenzzusammensetzung

NCL-L-CK20-561 ist ein flüssiger Gewebekulturüberstand, der 15 mmol/l Natriumazid als Konservierungsmittel enthält.

Ig-Klasse

IgG1

Gesamtproteinkonzentration Total Protein

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

Antikörperkonzentration

Größer als oder gleich 37 mg/l laut ELISA-Bestimmung. Hinsichtlich der chargenspezifischen Ig-Konzentration siehe Angaben auf dem Produktetikett.

Gebrauchsempfehlungen

Immunhistochemie (siehe **Vorgehensweise**) auf Paraffinschnitten. Empfohlene Verdünnung: 1:100 über einen Zeitraum von 30 Minuten bei 25 °C. Wärmeinduzierte Epitopdemaskierung unter Verwendung von Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114 oder RE7115. Dies ist nur eine Empfehlung, und die Benutzer sollten ihre eigenen optimalen Arbeitsverdünnungen bestimmen.

Lagerung und Stabilität

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

Probenvorbereitung

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

Warnhinweise und Sicherheitsmaßnahmen

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

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

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

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

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

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

Qualitätskontrolle

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

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

Positive Gewebekontrolle

Zeigt korrekt vorbereitete Gewebe und korrekte Färbetechniken an.

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

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

Für die positive Gewebekontrolle wird Dünndarmgewebe 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-CK20-561 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 PW31 weist Zytokeratin 20 im Zytoplasma normaler Magen-, Dün- und Dickdarmepithelien, normalen Urothels und normaler Merkelzellen der Haut nach (n=100).

Tumorgewebe

Klon PW31 färbte Karzinome von Kolon (60/65) und Harnblase (1/2) sowie einen Merkelzell-Tumor. Eine fokale Immunfärbung wurde bei Plattenzellkarzinomen der Lunge beobachtet (3/7). Der Klon zeigte bei einer Reihe sonstiger Tumoren keine Färbung (n=99), einschließlich Brustkrebs, Klarzellenkarzinom der Niere, Prostata-Adenokarzinom, Bauchspeicheldrüsen-Adenokarzinom, Endometriumkarzinom, Schilddrüsenkarzinom, kleinzelligem Lungenkarzinom und -adenokarzinom, Melanomen und Sarkomen.

NCL-L-CK20-561 wird für den Einsatz als Teil eines Antikörper-Panels bei der Charakterisierung von Tumoren empfohlen, die aus Urothel, Darmepithel und Merkelzellen entstanden sind.Allgemeine Beschränkungen

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. Campbell F and Herrington CS. Application of cytokeratin 7 and 20 immunohistochemistry to diagnostic pathology. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:113-122.
6. Leech SN, Kolar AJO, Barrett PD, et al. Merkel cell carcinoma can be distinguished from metastatic small cell carcinoma using antibodies to cytokeratin 20 and thyroid transcription factor 1. Journal of Clinical Pathology. 2001; 54:727-729.

Änderungen zur vorhergehenden Ausgabe

Keine.

Ausgabedatum

07 November 2018

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

Erforderliche, jedoch nicht mitgelieferte Reagenzien

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

Erforderliche, jedoch nicht mitgelieferte Ausrüstung

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

Epitopdemaskierungslösungen (siehe Gebrauchsempfehlungen für eines der folgenden Produkte)

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

Vorgehensweise

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

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

Epitopdemaskierungsverfahren

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

Visualisierung

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

Änderungen zur vorherigen Ausgabe

Keine.

Ausgabedatum

23 April 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

Novocastra™ Anticuerpos Monoclonal líquidos de Ratón

Cytokeratin 20

Código De Producto: NCL-L-CK20-561

Indicaciones De Uso

Para uso diagnóstico in vitro.

NCL-L-CK20-561 está indicado para la identificación cualitativa en secciones de parafina, mediante microscopía óptica, de moléculas de Cytokeratin 20. 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

PW31

Inmunógeno

Proteína recombinante procarciática correspondiente a un fragmento de 70 aminoácidos de la región N terminal de la proteína-filamento intermedio citoqueratina 20 humana.

Especificidad

Proteína-filamento intermedio citoqueratina 20 humana.

Composición Del Reactivo

NCL-L-CK20-561 es un sobrenadante de cultivo tisular líquido que contiene azida sódica 15 mM como conservante.

Clase de Ig

IgG1

Concentración Total De Proteína

Total Protein

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

Concentración De Anticuerpo

Igual o superior a 37 mg/L según se ha determinado mediante ELISA. Consulte en la etiqueta del vial la concentración de Ig específica del lote.

Recomendaciones De Uso

Inmunohistoquímica (ver **Metodología**) con secciones de parafina. Dilución sugerida: 1:100 durante 30 minutos a 25 °C. Recuperación de epitopos inducida por calor utilizando los productos Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114 o RE7115. Ésta es tan solo una pauta y cada usuario debe determinar sus propias diluciones de trabajo óptimas.

Almacenamiento Y Estabilidad

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

Preparación De Las Muestras

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

Advertencias Y Precauciones

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

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

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

Las muestras, antes y después de ser fijadas, así como todos los materiales expuestos a ellas, deben manipularse como susceptibles de transmitir una infección, y se deben desechar tomando las precauciones adecuadas.¹ No 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 el intestino delgado.

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

Control Tisular Negativo

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

El tejido de control negativo recomendado es cerebelo.

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

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

Control De Reactivo Negativo

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

Tejido Del Paciente

Examine las muestras del paciente o pacientes teñidas con NCL-L-CK20-561 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 PW31 detecta citoqueratina 20 en el citoplasma del epitelio gástrico, epitelio del intestino delgado, epitelio del intestino grueso, urotelio, y células de Merkel de la piel (todas ellas normales) (n=100).

Tejidos tumorales

Carcinomas del colon (60 de 65) y de la vejiga (1 de 2) y un tumor de células de Merkel teñidos con Clon PW31. Se observó inmunotinción focal en carcinomas pulmonares de células escamosas (3/7). No teñió una amplia gama de diversos tumores distintos de éstos (n=99), como los carcinomas de mama, carcinomas de células claras del riñón, adenocarcinomas de próstata, adenocarcinomas pancreáticos, carcinoma endometrial, carcinomas de tiroides, carcinomas y adenocarcinomas de células pequeñas pulmonares, melanomas y sarcomas.

NCL-L-CK20-561 está recomendado para utilizarse como parte de un panel de anticuerpos en la caracterización de tumores originados en el urotelio, epitelio intestinal y células de Merkel.

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 contraindicación 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. Campbell F and Herrington CS. Application of cytokeratin 7 and 20 immunohistochemistry to diagnostic pathology. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:113-122.
6. Leech SN, Kolar AJO, Barrett PD, et al. Merkel cell carcinoma can be distinguished from metastatic small cell carcinoma using antibodies to cytokeratin 20 and thyroid transcription factor 1. Journal of Clinical Pathology. 2001; 54:727-729.

Correcciones A La Publicación Anterior

No aplicable.

Fecha De Publicación

07 de noviembre de 2018

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

Reactivos necesarios que no se suministran

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

Equipo necesario que no se suministra

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

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

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

Metodología

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

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

Recuperación de epítomos

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

Visualización

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

Correcciones con respecto a la publicación anterior

No aplicable.

Fecha de publicación

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

Novocastra™ Anticorpo Monoclonal líquido de Ratinho

Cytokeratin 20

Código Do Produto: NCL-L-CK20-561

Utilização prevista

Para utilização em diagnósticos in vitro.

NCL-L-CK20-561 foi concebido para efectuar a identificação qualitativa da moléculas de Cytokeratin 20 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 (IHQ) permitem que se faça a visualização de antígenos por meio da aplicação sequencial de um anticorpo específico do antígeno (o anticorpo primário), de um anticorpo secundário ao anticorpo primário, e de um complexo enzimático com um substrato cromogénico e etapas de lavagem de permeio. A activação enzimática do cromogénio resulta num produto de reacção visível no local do antígeno. A amostra pode então ser contrastada e coberta com uma lamela. Os resultados são interpretados por meio de um microscópio óptico, e ajudam a formular o diagnóstico diferencial dos processos fisiopatológicos, os quais podem ou não estar associados a antígenos específicos.

Clone

PW31

Imunogénio

Proteína recombinante procarriótica correspondendo a um componente de 70 aminoácidos da região do terminal N da proteína dos filamentos intermediários da citoqueratina 20.

Especificidade

Proteína dos filamentos intermediários da citoqueratina 20 humana.

Composição Do Reagente

NCL-L-CK20-561 é o sobrenadante líquido da cultura de um tecido contendo 15 mM de azida de sódio como produto conservante.

Classe De Ig

IgG1

Concentração Total De Proteína Total Protein

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

Concentração De Anticorpo

Maior que ou igual a 37 mg/L, conforme determinado por ELISA. Consultar a etiqueta da ampola para determinar a concentração de Ig do lote específico.

Recomendações Sobre A Utilização

Imunohistoquímica (ver **Metodologia**) em secções de parafina. Diluição sugerida: 1:100 durante 30 minutos a 25 °C. Recuperación de epítomos inducida por calor utilizando los productos Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114 o RE7115. Esta recomendação é apenas uma directriz e o utilizador deve determinar qual a diluição ideal para o trabalho específico.

Armazenamento E Estabilidade

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

Preparação Das Amostras

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

Avisos E Precauções

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

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

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

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

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

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

Controlo Da Qualidade

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

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

Controlo De Tecido Positivo

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

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

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

O tecido de controlo positivo recomendado é o intestino delgado.

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-CK20-561 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 PW31 detecta a citoqueratina 20 no citoplasma das células normais do epitélio gástrico, do epitélio dos intestinos delgado e grosso, do urotélio, e das células de Merkel (n=100).

Tecidos tumorais

O clone PW31 marcou carcinomas do cólon (60/65) e da bexiga (1/2) e um tumor das células de Merkel. Observou-se uma imunocoloração focal em carcinomas das células escamosas pulmonares (3/7). O clone não corou uma série de outros tumores (n=99), incluindo carcinomas mamários, carcinomas renais de células claras, adenocarcinomas da próstata, adenocarcinomas pancreáticos, carcinomas endometriais, carcinomas da tiróide, carcinomas pulmonares de células pequenas e adenocarcinomas, melanomas e sarcomas.

A NCL-L-CK20-561 é recomendada para utilizar como parte de um painel de anticorpos na caracterização dos tumores que têm origem no urotélio, no epitélio intestinal e nas células de Merkel.

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. Campbell F and Herrington CS. Application of cytokeratin 7 and 20 immunohistochemistry to diagnostic pathology. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:113-122.
6. Leech SN, Kolar AJO, Barrett PD, et al. Merkel cell carcinoma can be distinguished from metastatic small cell carcinoma using antibodies to cytokeratin 20 and thyroid transcription factor 1. Journal of Clinical Pathology. 2001; 54:727-729.

Emendas Da Edição Anterior

Não é aplicável.

Data De Emissão

07 de Novembro de 2018

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

Reagentes necessários mas não fornecidos

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

Equipamento necessário mas não fornecido

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

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

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

Metodologia

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

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

Recuperação de epítomos

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

Visualização

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

Emendas da edição anterior

Não é aplicável.

Data de emissão

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

Novocastra™ Flytande Monoklonal Musantikropp

Cytokeratin 20

Produktkod: NCL-L-CK20-561

Avsedd Användning

För in vitro diagnostisk användning.

NCL-L-CK20-561 är avsedd för kvalitativ identifiering med ljusmikroskopi av Cytokeratin 20-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 patolg 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

PW31

Immunogen

Prokaryotiskt rekombinant protein motsvarande ett 70 aminosyreportion av N-terminala regionen av cytokeratin 20-molekylens intermediära filament.

Specificitet

Intermediärt filamentprotein från humant cytokeratin 20.

Reagensinnehåll

NCL-L-CK20-561 är en flytande supernatant från vävnadsodling som innehåller 15 mM natriumazid som konserveringsmedel.

Ig-klass

IgG1

Total Proteinkoncentration

Total Protein

1,0–8,0 g/L. Se flaskans etikett för total specifik proteinkoncentration för satsen.

Antikropps-koncentration

Större än eller lika med 37 mg/l fastställt genom ELISA. Se flaskans etikett för specifik Ig-koncentration för satsen.

Rekommendationer Vid Användning

Immunhistokemi (se **Metodologi**) på paraffinsnitt. Föreslagen spädning: 1:100 i 30 minuter vid 25 °C. Värmeinducerad epitopåtervinning med e Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114 eller RE7115. Detta är endast en riktlinje och användare bör själva fastställa den optimala bruksspädningen.

Förvaring Och Stabilitet

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

Preparation Av Prov

Rekommenderat fixeringsmedel för paraffininbäddade vävnadssnitt är 10% neutralbuffrat formalin.

Varningar Och Försiktighetsåtgärder

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

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

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

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

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

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

Kvalitetskontroll

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

Kontroller bör vara färsk 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

Tunntarmen 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 färgas 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-CK20-561 sist. Positiv färgningsintensitet bör utvärderas inom ramen för all ospecifik bakgrundsfärgning 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 PW31 upptäcker cytotokeratin 20 i cytoplasmat hos normala gastriska, små och stora tarmepitel, urotel och hudens Merkelceller (n=100).

Tumörvävnader

Klon PW31 färgade karcinom i kolon (60/65) och urinblåsa (1/2) och en Merkelcellstumör. Fokal immunfärgning syntes hos skvamosa lungcelskarcinom (3/7). Det färgade inte en rad andra tumörer (n=99), inklusive bröstcarcinom, renala klarcellskarcinom, prostata adenomkarcinom, pankreatiska adenokarcinom, endometriala karcinom, tyroida karcinom, små lungcelskarcinom och adenokarcinom, melanom och sarkom.

NCL-L-CK20-561 rekommenderas för användning som del av en antikroppspanel vid karakterisering av tumörer som härstammar från urotel, intestinalt epitel och Merkelceller.

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

Överflödiga 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. Campbell F and Herrington CS. Application of cytokeratin 7 and 20 immunohistochemistry to diagnostic pathology. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:113-122.
6. Leech SN, Kolar AJO, Barrett PD, et al. Merkel cell carcinoma can be distinguished from metastatic small cell carcinoma using antibodies to cytokeratin 20 and thyroid transcription factor 1. *Journal of Clinical Pathology*. 2001; 54:727-729.

Rättelser Av Tidigare Utgivning

Gäller inte.

Utgivningsdatum

07 november 2018

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

Reagens som krävs men inte tillhandahålls

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

Utrustning som krävs men inte tillhandahålls

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

Epitopåtervinningslösningar (se Rekommendationer för användning för en av följande)

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

Metodologi

Innan metoden tillämpas måste användarna vara utbildade i immunhistokemiska tekniker.

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

Epitopåtervinning

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

Visualisering

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

Rättelser av tidigare utgivning

Inte tillämpligt.

Utgivningsdatum

23 April 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink)

Novocastra™ Υγρό μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού Cytokeratin 20 Κωδικός είδους: NCL-L-CK20-561

Χρήση Για Την Οποία Προορίζεται

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση.

Το NCL-L-CK20-561 προορίζεται για την ποιοτική ταυτοποίηση με μικροσκοπία φωτός της ανθρώπινης Μόριας Cytokeratin 20 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 (πρωτοταγές αντίσωμα), ενός δευτεροταγούς αντισώματος στο πρωτοταγές αντίσωμα και ενός ενζυμικού συμπλόκου με χρωμογόνο υπόστρωμα με παρεμβαλλόμενα βήματα πλύσης. Η ενζυμική ενεργοποίηση του χρωμογόνου έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός ορατού προϊόντος αντίδρασης στη θέση του αντιγόνου. Το δείγμα μπορεί κατόπιν να υποβληθεί σε αντίχρωση και να καλυφθεί με καλυπτρίδα. Τα αποτελέσματα ερμηνεύονται με χρήση μικροσκοπίου φωτός και βοηθούν στη διαφορική διάγνωση παθοφυσιολογικών εξεργασιών, οι οποίες ενδέχεται ή όχι να σχετίζονται με ένα συγκεκριμένο αντιγόνο.

Κλώνος

PW31

Ανοσογόνο

Προκαρμική ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη που αντιστοιχεί σε ένα συστατικό 70 αμινοξέων της N-τελικής περιοχής της ενδιάμεσης ινδιακής πρωτεΐνης κυτοκερατίνης 20.

Ειδικότητα

Ενδιάμεση ινδιακή πρωτεΐνη ανθρώπινη κυτοκερατίνη 20.

Σύνθεση Αντιδραστηρίου

Το NCL-L-CK20-561 είναι ένα υγρό υπερκείμενο ιστοκαλλιέργειας που περιέχει 15 mM αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό.

Τάξη Ig

IgG1

Ολική Συγκέντρωση Πρωτεΐνης

Total Protein

1,0–8,0 g/L. Για την ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης που είναι ειδική για την εκάστοτε παρτίδα, ανατρέξτε στην ετικέτα του φιαλιδίου.

Συγκέντρωση Αντισώματος

Μεγαλύτερη ή ίση με 37 mg/L, όπως προσδιορίζεται με ELISA. Για τη συγκέντρωση Ig που είναι ειδική για την εκάστοτε παρτίδα, ανατρέξτε στην ετικέτα του φιαλιδίου.

Συστάσεις Για Τη Χρήση

Ανοσοϊστοχημεία (δείτε την **Μεθοδολογία**) σε τομές παραφίνης. Προτεινόμενη αραιώση: 1:100 επί 30 λεπτά στους 25 °C. Θερμικά επαγόμενη ανάκτηση επιτόπου με χρήση των Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114 ή RE7115. Αυτό παρέχεται ως οδηγός και οι χρήστες θα πρέπει να προσδιορίζουν τις δικές τους βέλτιστες αραιώσεις εργασίας.

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 κυταροκαλλιέργειας. Επειδή είναι βιολογικό προϊόν, θα πρέπει να γίνεται εύλογη προσοχή κατά το χειρισμό του.

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

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

Ο χειρισμός δειγμάτων, πριν και μετά τη μονιμοποίηση, καθώς και όλων των υλικών που έχουν εκτεθεί σε αυτά, θα πρέπει να γίνεται ως εάν ήταν δυνητικά μετάδοσης λοίμωξης και η απόρριψή τους να πραγματοποιείται λαμβάνοντας τις σωστές προφυλάξεις.¹ Μην αναρροφάτε ποτέ με πιπέτα αντιδραστήρια με το στόμα και αποφύγετε την επαφή του δέρματος και των βλεννογόνων με αντιδραστήρια και δείγματα. Εάν τα αντιδραστήρια ή τα δείγματα έλθουν σε επαφή με ευαίσθητες περιοχές, πλύνετε με άφθονες ποσότητες νερού. Ζητήστε τη συμβουλή 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 θετική χρώση για βέλτιστο έλεγχο ποιότητας και για την ανίχνευση πολύ μικρών επιπέδων τυχόν αποδόμησης των αντιδραστηρίων.²

Συνιστώμενος ιστός θετικού μάρτυρα είναι το λεπτό έντερο.

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 επισήμανσης του αντιγόνου-στόχου από το πρωτοταγές αντισώμα.

Συνιστώμενος ιστός αρνητικού μάρτυρα είναι η παρεγκεφαλίδα.

Χημικά, 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 ψευδοπεροξειδάση (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 ασθενούς με χρωμογόνο υποστρώματος ή ενζυμικά σύμπλοκα (αβιδίνη-βιοτίνη, στρεπταβιδίνη, σημασμένο πολυμερές) και υπόστρωμα-χρωμογόνο, αντίστοιχα. Εάν παρουσιαστεί ειδική χρώση στον αρνητικό μάρτυρα ιστού, τα αποτελέσματα με τα δείγματα ασθενούς θα πρέπει να θεωρούνται άκυρα.

Αρνητικός Μάρτυρας Αντιδραστηρίου

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

Ιστός Ασθενούς

Εξετάστε τελευταία τα δείγματα ασθενούς που έχουν χρωματιστεί με το NCL-L-CK20-561. Η ένταση της θετικής χρώσης θα πρέπει να εκτιμάται στα πλαίσια τυχόν 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 Ιστού

Ο κλώνος PW31 ανιχνεύει την κυτοκερατίνη 20 στο κυτταρόπλασμα του φυσιολογικού γαστρικού επιθηλίου, του επιθηλίου του λεπτού και του παχώς εντέρου, του επιθηλίου της ουροδόχου κύστης και των κυττάρων Merkel του δέρματος (n=100).

Καρκινικοί Ιστού

Με τον κλώνο PW31 χρωματίστηκαν καρκινώματα του κόλου (60/65) και της κύστης (1/2), καθώς και ένας όγκος κυττάρων του Merkel. Εστιακή ανοσοχρώση παρατηρήθηκε σε ακανθοκυτταρικά καρκινώματα του πνεύμονα (3/7). Δε χρωμάτισε μια σειρά άλλων όγκων (n=99), συμπεριλαμβανομένων των καρκινωμάτων του μαστού, νεφρικού διαφανοκυτταρικού καρκινώματος, αδενοκαρκινωμάτων του προστάτη, παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος, ενδομήτριου καρκινώματος, καρκινωμάτων θυρεοειδούς, μικροκυτταρικών καρκινωμάτων και αδενοκαρκινωμάτων του πνεύμονα, μελανωμάτων και σαρκωμάτων.

Το NCL-L-CK20-561 συνιστάται για χρήση ως μέρος μιας σειράς αντισωμάτων στο χαρακτηρισμό όγκων που προέρχονται από επιθήλιο της ουροδόχου κύστης, εντερικό επιθήλιο και κύτταρα του Merkel.

Γενικοί Περιορισμοί

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

Η χρώση του ιστού εξαρτάται από το χειρισμό και την επεξεργασία του ιστού πριν από τη χρώση. Τυχόν εσφαλμένη μονιμοποίηση, κατάμυξη, απόψυξη, 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 διακυβευθεί τη σωστή ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

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

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

Βιβλιογραφία - Γενική

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, 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. Campbell F and Herrington CS. Application of cytokeratin 7 and 20 immunohistochemistry to diagnostic pathology. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:113-122.
6. Leech SN, Kolar AJO, Barrett PD, et al. Merkel cell carcinoma can be distinguished from metastatic small cell carcinoma using antibodies to cytokeratin 20 and thyroid transcription factor 1. Journal of Clinical Pathology. 2001; 54:727-729.

Τροποποιήσεις Στην Προηγούμενη Έκδοση

Δεν έχει εφαρμογή.

Ημερομηνία Έκδοσης

07 Νοεμβρίου 2018

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

Αντιδραστήρια που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

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

Εξοπλισμός που απαιτείται αλλά δεν παρέχεται

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

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

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

Μεθοδολογία

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

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

Ανάκτηση επιτόπου

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

Απεικόνιση

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

Τροποποιήσεις στην προηγούμενη έκδοση

Δεν έχει εφαρμογή.

Ημερομηνία έκδοσης

23 Απρίλιος 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

Novocastra™ Flydende Monoklonalt Antistof Fra Mus Cytokeratin 20 Produktkode: NCL-L-CK20-561

Tilsigtet Anvendelse

Til in vitro diagnostisk anvendelse.

NCL-L-CK20-561 er beregnet til kvalitativ identifikation af Cytokeratin 20-molekyler i paraffinsnit ved lysmikroskopi. Klinisk fortolkning af farvning eller mangel derpå skal suppleres med morfologiske undersøgelser under anvendelse af passende kontroller og bør evalueres i sammenhæng med patientens kliniske historie og andre diagnostiske tests af en kvalificeret patolog.

Procedureprincip

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

Klon

PW31

Immunogen

Prokaryot rekombinant fusionsprotein svarende til en 70 aminosyrer stor komponent af N-terminalen af intermediært cytokeratin 20-filamentprotein.

Specifitet

Humant intermediært cytokeratin 20-filamentprotein.

Reagenssammensætning

NCL-L-CK20-561 er en flydende vævskultursupernatant indeholdende 15 mM natriumazid som konserveringsmiddel.

Ig-klasse

IgG1

Totalproteinkoncentration

Total Protein

1,0–8,0 g/L. Se etiketten på hætteflasken for lotspecifik totalproteinkoncentration.

Antistofkoncentration

Større end eller lig med 37 mg/l som bestemt ved ELISA. Se etiketten på hætteflasken for lotspecifik Ig-koncentration.

Anbefalinger Vedrørende Anvendelse

Immunhistokemi (se **Metodologi**) på paraffinsnit. Foreslået fortynding: 1:100 ved 30 minutter ved 25 °C. Varmeinduceret epitopgenfinding ved brug af Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114 eller RE7115. Disse retningslinier er vejledende, og brugeren bør selv bestemme egne optimale brugsopløsninger.

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 anbefales fiksativ er 10% neutralbufferjusteret formalin til paraffinindstøbte vævssnit.

Advarsler Og Forholdsregler

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

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

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

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

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

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

Kvalitetskontrol

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

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

Positiv Vævskontrol

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

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 fortolking 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 fortolking af specifik farvning på antigenstedet.

Patientvæv

Eksaminer patientprøver farvet med NCL-L-CK20-561 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 PW31 påviser cytokeratin 20 i cytoplasmaet i normalt mave-, tynd- og tyktarmsepitel, urotel og Merkels celler i huden (n=100).

Tumorvæv

Klon PW31 farvede carcinomer fra kolon (60/65) og blære (1/2) og en Merkel-celletumor. Der blev ligeledes set fokal immunofarvning i lungepladecellecarcinomer (3/7). Den farvede ikke en række andre tumorer (n=99) inklusive brystcarcinomer, klart nyrecellecarcinom, prostata-adenocarcinomer, pancreatiske adenocarcinomer, endometrie carcinom, thyroideacarcinomer, småcellede lungecarcinomer og -adenocarcinomer, melanomer og sarkomer.

NCL-L-CK20-561 anbefales anvendt som ét ud af et panel af antistoffer til karakterisering af tumorer, der stammer fra urotel, tarmpapillet og Merkels celler.

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 fortolking af farvningsresultaterne.

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

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

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

Antistoffer fra Leica Biosystems Newcastle Ltd er som angivet beregnet til anvendelse på enten frosne eller paraffinindstøbte vævssnit med specifikke krav til fiksering. Der kan forekomme uventet antigenekspresion, navnlig i neoplasmer. Den kliniske fortolking 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. Campbell F and Herrington CS. Application of cytokeratin 7 and 20 immunohistochemistry to diagnostic pathology. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:113-122.
6. Leech SN, Kolar AJO, Barrett PD, et al. Merkel cell carcinoma can be distinguished from metastatic small cell carcinoma using antibodies to cytokeratin 20 and thyroid transcription factor 1. *Journal of Clinical Pathology*. 2001; 54:727-729.

Rettelser Til Tidligere Udgave

Ingen rettelser.

Udgivelsesdato

07 november 2018

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

Nødvendige reagenser, der ikke medfølger

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

Nødvendigt udstyr, der ikke medfølger

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

Antigenfindingsopløsninger (se Anbefalinger vedrørende anvendelse for en af følgende)

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

Fremgangsmåde

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

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

Epitopgenfindning

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

Visualisering

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

Rettelser til tidligere udgave

Ingen rettelser.

Udgivelsesdato

23 April 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

Novocastra™ vloeibaar monoklonaal muisantilichaam

Cytokeratin 20

Productcode: NCL-L-CK20-561

Beoogd gebruik

Voor gebruik bij *in-vitro*diagnostiek

NCL-L-CK20-561 is bedoeld voor de kwalitatieve identificatie, door middel van lichtmicroscopie, van cytokeratine 20-moleculen in paraffinecoupes. De klinische interpretatie van elke kleuring of het ontbreken hiervan moet worden aangevuld door morfologische studies met de juiste controles en moet binnen de context van de klinische voorgeschiedenis van de patiënt en andere diagnostische tests worden geëvalueerd door een bevoegd patholoog.

Principe van de procedure

Immunohistochemische (IHC) kleuringstechnieken maken het mogelijk om antigenen te visualiseren via de sequentiële toepassing van een specifiek antilichaam op het antigeen (primaair 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 lichtmicroscopie en helpen bij de differentiële diagnose van pathofysiologische processen, die al dan niet met een bepaald antigeen kunnen worden geassocieerd.

Kloon

PW31

Immunogeen

Prokaryotisch recombinant eiwit dat overeenkomt met een 70-aminozuurcomponent van het terminusgebied van het cytokeratine-20 intermediair filamenteiwit.

Specificiteit

Humaan cytokeratine-20 intermediair filamenteiwit.

Reagenssamenstelling

NCL-L-CK20-561 is a liquid tissue culture supernatant containing sodium azide as a preservative.

Ig-klasse

IgG1

Totale eiwitconcentratie

Total Protein

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

Antilichaamconcentratie

Groter dan of gelijk aan 37 mg/L zoals bepaald door ELISA. Zie het flaconlabel voor specifieke Ig-concentratie van de partij.

Aanbevelingen voor het gebruik

Immunohistochemie (zie **D. Methodologie**) op paraffinecoupes. Voorgestelde verdunning: 1:100 gedurende 30 minuten bij 25 °C. Warmte-geïnduceerd epitooferstel met Epitope Retrieval Solution pH 9.0 RE7114 of RE7115. Dit is een richtsnoer en gebruikers moeten zelf de voor hen optimale werkverdunning bepalen.

Opslag en stabiliteit

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

Monsterpreparatie

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

Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

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

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

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

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

Minimaliseer de kans op microbiële contaminatie van reagentia omdat 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 in aanvulling op de volgende procedures.

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

Positieve weefselcontrole

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

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

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

Aanbevolen positief controleweefsel is dunne darm.

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.

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

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

Negatieve reagenscontrole

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

Patiëntweefsel

Onderzoek de patiëntmonsters die met NCL-L-CK20-561 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 PW31 detecteert cytokeratine 20 in het cytoplasma van normale epitheelcellen van maag, dunne en dikke darm, van urotheelcellen en van merkelcellen van de huid (n=100).

Afwijkende weefsels

Kloon PW31 kleurt carcinoomen van de dikke darm (60/65) en blaas (1/2) en een Merkelceltumor. Er werd focale immunokleuring waargenomen in long plaveiselcelcarcinoomen (3/7). Verschillende andere tumoren (n=99) werden niet gekleurd, inclusief borstcarcinoomen, 'clear cell'-carcinoomen van de nier, prostaataденоcarcinoomen, pancreasadenocarcinoom, endometrische carcinoom, schildkliercarcinoomen, long kleine celcarcinoomen en adenocarcinoomen, melanomen en sarcomen.

NCL-L-CK20-561 wordt aanbevolen voor gebruik als onderdeel van een panel antilichamen voor het classificeren van tumoren die oorspronkelijk afkomstig zijn van urotheel, darmepitheel en merkelcellen.

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, ontdooien, wassen, drogen, verwarmen, snijden, of contaminatie met andere weefsels of vloeistoffen kan tot artefacten, insluiting van antilichamen of fout-negatieve resultaten leiden. Inconsistente resultaten kunnen te wijten zijn aan variaties in de fixatie- en inbeddingsmethodes, of aan intrinsieke onregelmatigheden in het weefsel.⁴

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

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

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

Literatuurlijst – algemeen

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. 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. Campbell F and Herrington CS. Application of cytokeratin 7 and 20 immunohistochemistry to diagnostic pathology. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:113-122.
6. Leech SN, Kolar AJO, Barrett PD, et al. Merkel cell carcinoma can be distinguished from metastatic small cell carcinoma using antibodies to cytokeratin 20 and thyroid transcription factor 1. Journal of Clinical Pathology. 2001; 54:727-729.

Aanpassingen ten opzichte van de vorige uitgave

Niet van toepassing.

Datum uitgave

07 november 2018

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

Benodigde, maar niet inbegrepen reagentia

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

Benodigde, maar niet inbegrepen apparatuur

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

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

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

Methodologie

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

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

Epitoopherstel

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

Visualisatie

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

Aanpassingen ten opzichte van de vorige uitgave

Niet van toepassing

Datum uitgave

23 April 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

Novocastra™ flytende murint monoklonalt antistoff

Cytokeratin 20

Produktkode: NCL-L-CK20-561

Tiltenkt bruk

Til in vitro-diagnostisk bruk.

NCL-L-CK20-561 skal brukes til kvalitativ identifikasjon av humane cytokeratin 20-molekyler i parafinsnitt ved lysmikroskopering. Den kliniske tolkningen av en farging eller uteblitt farging skal suppleres av morfologiske studier ved bruk av riktige kontroller og skal evalueres av en kvalifisert patolog innenfor sammenhengen av pasientens kliniske historie og andre diagnostiske tester.

Prinsipp for prosedyren

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

Klon

PW31

Immunogen

Prokaryotisk rekombinant protein som tilsvarer en 70 aminosyre-komponent i den N-terminale regionen av cytokeratin 20 intermediært filamentprotein.

Spesifisitet

Humant cytokeratin 20, intermediært filamentprotein.

Reagenssammensetning

NCL-L-CK20-561 er en flytende vevskultursupernatant som inneholder natriumazid som konserveringsmiddel.

Ig-klasse

IgG1

Totalproteinkonsentrasjon Total Protein

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

Antistoffkonsentrasjon

Større enn eller lik 19 mg/l som fastslått av ELISA. Se etiketten på hetteglasset for batchspesifikk Ig-konsentrasjon.

Anbefalinger for bruk

Immunhistokjemi (se **Metode**) på parafinsnitt. Foreslått fortynning: 1:100 i 30 minutter ved 25 °C. Varmeindusert epitop demaskering med Epitope Retrieval Solution pH 9.0 RE7114 eller RE7115. Dette er kun veiledende, og brukerne bør fastslå egne optimale fortynninger for sitt arbeid.

Oppbevaring og stabilitet

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

Prøveklargjøring

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

Advarsler og forholdsregler

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

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

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

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

Minimer mikrobiell kontaminering av reagenser, ellers kan det forekomme en økning i ikke-spesifikk farging.

Andre inkubasjonstider 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 formalinfiksert, behandlet og parafinvoxsinnstøpt så snart som mulig på samme måte som pasientprøven(e).

Positiv vevkontroll

Brukes for å indikere riktig klargjorte vev og riktige fargingsteknikker.

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

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

Anbefalt positivt kontrollvev er tynnarm.

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

Negativ vevkontroll

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

Anbefalt negativt kontrollvev er cerebellumvev.

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

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

Negativ reagenskontroll

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

Pasientvev

Undersøk pasientprøver farget med NCL-L-CK20-561 sist. Positiv fargingsintensitet skal vurderes i lys av eventuell ikke-spesifikk bakgrunnsfarging i den negative reagenskontrollen. På samme måte som for alle andre immunhistokjemiske tester betyr et negativt resultat at antigenet ikke ble påvist, ikke at antigenet ikke var til stede i cellene / det analyserte vevet. Om nødvendig, skal det brukes et panel med antistoffer til å identifisere falske negative reaksjoner.

Forventede resultater

Normale vev

Klon PW31 detekterer cytokeratin 20 i cytoplasmaet i normalt epitel i mage, tynnarm og tykktarm, urotel og hudens Merkel-celler (n=100).

Unormale vev

Klon PW31-farget karsinomer i tykktarmen (60/65) og blære (1/2) og en Merkel-celletumor. Fokal immunfarging ble observert i lungekreftceller (3/7). Den farget ikke en rekke andre tumorer (n=99), inkludert brystkarsinomer, renalcellekarsinom, prostataadenokarsinomer, pankreatisk adenokarsinom, endometrisk karsinom, skjoldbruskarsinomer, lungecellekarsinomer og adenokarsinomer, melanomer og sarkomer.

NCL-L-CK20-561 anbefales til bruk som en del av et antistoffpanel til karakterisering av tumorer med opprinnelse i urotel, tarmepitel og Merkel-celler.

Generelle begrensninger

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

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

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

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

Bibliografi – 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. Campbell F and Herrington CS. Application of cytokeratin 7 and 20 immunohistochemistry to diagnostic pathology. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:113-122.
6. Leech SN, Kolar AJO, Barrett PD, et al. Merkel cell carcinoma can be distinguished from metastatic small cell carcinoma using antibodies to cytokeratin 20 and thyroid transcription factor 1. Journal of Clinical Pathology. 2001; 54:727-729.

Endringer på tidligere utgave

Ikke relevant.

Utstedelsesdato

07 november 2018

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

Nødvendige reagenser som ikke følger med

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

Nødvendig utstyr som ikke følger med

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

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

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

Metodikk

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

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

Epitop demaskering

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

Visualisering

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

Endringer på tidligere utgave

Ikke relevant

Utstedelsesdato

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

Novocastra™ Likit Monoklonal Fare Antikoru

Cytokeratin 20

Ürün Kodu: NCL-L-CK20-561

Kullanım Amacı

In vitro diagnostik kullanım içindir.

NCL-L-CK20-561, parafin bölümlerindeki Sitokeratin 20 moleküllerinin ışık mikroskopisi ile kalitatif tanımlanması için tasarlanmıştır. Herhangi bir boyanmanın veya yokluğunun klinik yorumlaması hastanın klinik öyküsü ve diğer tanısal testler bağlamında nitelikli bir patoloji uzmanı tarafından değerlendirilmeli ve uygun kontroller kullanılarak morfolojik çalışmalarla desteklenmelidir.

İşlem Prensipleri

İmmünohistokimyasal (İHK) boyama teknikleri, antijene ardışık olarak belirli bir antikoru uygulanması (birincil antikor), birincil antikora ikincil bir antikorun uygulanması ve aralardaki yıkama adımları ile, antijenlerin kromojenik substratı bir enzim kompleksi yoluyla görselleştirilmesine olanak tanır. Kromojenin enzimle etkinleştirilmesi, antijen alanında gözle görüldür bir tepkiye yol açar. Numune 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

PW31

İmmünojen

Sitokeratin 20 ara filament proteininin N-terminal bölgesindeki 70 aminoasit bileşenine karşılık gelen prokaryotik rekombinant protein.

Özgüllük

İnsan sitokeratin 20 ara filament proteini.

Reaktif Bileşimi

NCL-L-CK20-561, prezervatif olarak sodyum azit içeren supernatant bir likit doku kültürüdür.

Ig Sınıfı

IgG1

Toplam Protein Konsantrasyonu Total Protein

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

Antikor Konsantrasyonu

ELISA tarafından belirlendiği gibi 37 mg/L'ye eşit veya bu değerden yüksek. Seriyeye özgü Ig konsantrasyonu için flakon etiketine bakın.

Kullanım Önerileri

Parafin kesitlerinde immünohistokimya (bkz **Metodoloji**), parafin bölümü Önerilen dilüsyon: 25°C'de 30 dakika boyunca 1:100. Epitope Retrieval Solution pH 9,0 RE7114 veya RE7115 kullanılarak Isı İndüklü Epitop Alımı Bu, kılavuz olarak verilmiştir ve kullanıcılar kendi optimal çalışma seyreltilerini belirlemelidir.

Saklama ve Stabiliteleri

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

Numune Hazırlama

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

Uyarılar ve Önlemler

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

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

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

Fiksasyondan önce ve sonra örnekler ve onlara maruz kalmış bütün materyaller, enfeksiyonu yayabilecekmiş gibi işlem görmelidir ve gerekli önlemler alınarak atılmalıdır. 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 mikrobiyel kontaminasyonunu minimuma indirin yoksa nonspesifik boyanmada bir artış olabilir.

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

Kalite Kontrol

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

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

Pozitif Doku Kontrolü

Dođru hazırlanmış dokuları ve uygun boyama tekniklerini belirtmek için kullanılır.

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

Zayıf pozitif boyama yapılmış doku, optimal kalite kontrolü ve minör reaktif bozunma düzeylerini saptamak için güçlü pozitif boyama yapılmış dokudan daha uygundur.²

Recommended positive control tissue is ince bağırsak.

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

Negatif Doku Kontrolü

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

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

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

Negatif Reaktif Kontrolü

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

Hasta Dokusu

NCL-L-CK20-561 ile boyanmış hasta numunelerini en son inceleyin. Pozitif boyama yoğunluđu, negatif reaktif kontrolünün spesifik olmayan herhangi bir arka plan boyaması bağlamında deđerlendirilmelidir. Her immünohistokimyasal testle olduđu gibi negatif bir sonuç antijenin saptanmadıđı anlamına gelir ve antijenin çalışılan hücrelerde/dokuda bulunmadıđı anlamına gelmez. Gerekirse yalnızca negatif reaksiyonun tanımlamak için bir antikor paneli kullanın.

Öngörülen Sonuçlar

Normal Dokular

Klon PW31 normal gastrik, ince ve kalın bağırsak epiteli, ürotelyum ve cilt Merkel hücrelerinin sitoplazmasındaki sitokeratin 20'yi saptar (n=100).

Anormal Dokular

Klon PW31, kolon (60/65) ve mesane (1/2) karsinomlarını ve bir Merkel hücre tümörünü boyamıştır. Fokal immünoboyama, akciđer skuamöz hücreli karsinomlarda (3/7) görülmüştür. Meme karsinomları, renal berrak hücre karsinomu, prostat adenokarsinomu, pankreatik adenokarsinom, endometriyal karsinom, tiroid karsinomları, akciđer küçük hücre karsinomları ve adenokarsinomlar melanomlar ve sarkomlar dahil olmak üzere çeşitli diđer tümörleri (n=99) boyamamıştır.

NCL-L-CK20-561'nin, ürotelyum, bağırsak epiteli ve Merkel hücrelerinden kaynaklanan tümörlerin karakterizasyonunda bir antikor panelinin parçası olarak kullanılması tavsiye edilmektedir.

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 diđer dokular veya sıvılarla kontaminasyon artefaktları, antikor tutulmasına veya yalnızca negatif sonuçlara yol açabilir. Tutarsız sonuçlar, fiksasyon ve gömme yöntemlerindeki deđişikliklerden ya da dokunun yapısından kaynaklanan düzensizliklerden kaynaklanabilir.⁴

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

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

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

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, Ashcavi 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. Campbell F and Herrington CS. Application of cytokeratin 7 and 20 immunohistochemistry to diagnostic pathology. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:113-122.

6. Leech SN, Kolar AJO, Barrett PD, et al. Merkel cell carcinoma can be distinguished from metastatic small cell carcinoma using antibodies to cytokeratin 20 and thyroid transcription factor 1. Journal of Clinical Pathology. 2001; 54:727-729.

Önceki Sayıya Göre Değişiklikler

Geçerli değildir.

Yayın Tarihi

07 Kasım 2018

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

Gereken ancak sağlanmayan reaktifler

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

Gereken ancak sağlanmayan ekipman

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

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

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

Metodoloji

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

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

Epitop Geri Kazanımı

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

Görüntüleme

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

Önceki Sayıya Göre Değişiklikler

Geçerli değildir

Yayın Tarihi

23 Nisan 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

Течно мише моноклонално антитяло Novocastra™

Cytokeratin 20

Код на продукта: NCL-L-CK20-561

Предназначение

За употреба при *in vitro* диагностика.

Продуктът NCL-L-CK20-561 е предназначен за качествено идентифициране посредством оптична микроскопия на молекули цитокератин 20 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 (ИНС) 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

PW31

Имуноген

Прокраинтен рекомбинантен протеин, съответстващ на 70 аминокиселинен компонент от N-терминалния регион на интермедиерен филamentos протеин цитокератин 20.

Специфичност

Човешки цитокератин 20 интермедиерен филamentos протеин.

Състав на реагента

NCL-L-CK20-561 е супернатантна течност от тъканна култура, съдържаща 15 mM натриев азид като консервант.

Имуноглобулинов клас

IgG1

Обща концентрация на протеин

Total Protein

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

Концентрация на антитела

По-висока или равна на 37 mg/L, както е определено от ELISA. Вижте етикета на флакона относно специфичната за партидата концентрация на имуноглобулин.

Препоръки за употреба

Имунохистохимия (вж **Методология**) върху парафинови срези. Предложение за разреждане: 1:100 за 30 минути при температура 25°C. Термично индуцирано извличане на епитоп чрез използване на разтворите за извличане на епитопи RE7113, RE7114 или RE7115. Това е дадено като указание, като потребителите трябва сами да определят техни собствени оптимални работни разреждания.

Съхранение и стабилност

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

Подготовка на спесимени

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

Предупреждения и предпазни мерки

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

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

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

Всички спесимени преди и след фиксация, както и всички материали, изложени на тях, трябва да се третират като възможни преносители на инфекция и да се изхвърлят, като се вземат правилни предпазни мерки.¹ 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 тъкан за позитивна контрола е тънко черво.

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 ендогенни ензими, като например псевдопероксидаза (еритроцити), ендогенна пероксидаза (цитохром С) или ендогенен биотин (напр. черен дроб, гърда, мозък, бъбрек) в зависимост от типа на използваното имуноно оцветяване. За диференциране на ендогенна ензимна активност или неспецифично ензимно свързване от специфична имуна реактивност ексклузивно може да се оцветят допълнителни тъкани от пациента, съответно със субстрат-хромоген или с ензимни комплекси (авидин-биотин, стрептавидин, маркиран полимер) и субстрат-хромоген. Ако се появи специфично оцветяване в негативната тъканна контрола, резултатите от спесимените на пациентите трябва да се считат за невалидни.

Негативна контрола на реагента

Използвайте неспецифична негативна контрола на реагента, вместо първичното 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-CK20-561. 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 анализираният клетки/тъкан. Ако се налага, използвайте панел от антигела за идентифициране на фалшиво отрицателни реакции.

Очаквани резултати

Нормални тъкани

Клонинг PW31 открива цитокератин 20 в цитоплазмата на нормален стомашен епител, епител от тънкото и дебелото черво, уроепител и клетки на Меркел от кожата (n=100).

Абнормни тъкани

Клонинг PW31 оцветява карциноми на ободното черво (60/65) и пикочния мехур (1/2) и тумор на клетките на Меркел. Наблюдава се фокално имунооцветяване при плоскоклетъчни карциноми на белия дроб (3/7). Не оцветява редица други тумори (n=99), в това число карциноми на гърдата, светлоклетъчен карцином на бъбреците, аденокарцином на простатата, аденокарцином на панкреаса, карцином на ендометриума, карциноми на щитовидната жлеза, дребноклетъчни карциноми и аденокарциноми на белия дроб, меланоми и саркоми.

Продуктът NCL-L-CK20-561 се препоръчва за употреба като част от панел от антигела при характеризирането на тумори с произход от уроепитела, чревния епител и клетките на Меркел.

Общи ограничения

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

Тъканното оцветяване зависи от боравенето с тъканта и нейната обработка преди оцветяването. Неправилната фиксация, замразяване, размразяване, промиване, изсушаване, затопляне, срязване или контаминацията с други тъкани или течности може да причини поява на артефакти, блокиране на антигелата 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. Campbell F and Herrington CS. Application of cytokeratin 7 and 20 immunohistochemistry to diagnostic pathology. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:113-122.
6. Leech SN, Kolar AJO, Barrett PD, et al. Merkel cell carcinoma can be distinguished from metastatic small cell carcinoma using antibodies to cytokeratin 20 and thyroid transcription factor 1. *Journal of Clinical Pathology*. 2001; 54:727-729.

Изменения на предишно издание

Не е приложимо.

Дата на издаване

07 Ноември 2018

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

Необходими, но непредоставени реагенти

1. Стандартни разтворители, използвани с имунохистохимията.
2. 50 mM трометамин-буфериран физиологичен разтвор (TBS) pH 7.6.
3. Разтвор за извличане на епитоп (вж. С. Разтвори за извличане на епитоп).
4. Разредител за антитела, Novocastra IHC Diluent, RE7133.
5. Система за визуализация, Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 теста), RE7150-K (500 теста), RE7140-K (250 теста) или RE7290-K (50 теста).
6. Микроскопски препарат – използвайте според препоръките на производителя.

Необходимо, но непредоставено оборудване

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

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

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

Методология

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

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

Извличане на епитоп

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

Визуализация

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

Изменения на предишно издание

Не е приложимо

Дата на издаване

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

Novocastra™ folyékony egér monoklonális antitest

Cytokeratin 20

Termékkód: NCL-L-CK20-561

Alkalmazási terület

In vitro diagnosztikai használatra.

Az NCL-L-CK20-561 a citokeratin 20 molekulák fénymikroszkóppal végzett kvalitatív azonosítására szolgál paraffinos metszetekben. Minden festődés meglétének vagy hiányának klinikai értelmezését morfológiai vizsgálatokkal és megfelelő kontrollokkal kell kiegészíteni, valamint az értékelést a beteg klinikai kórtörténete és egyéb diagnosztikai vizsgálatok figyelembevételével, képzett patológusnak kell elvégeznie.

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 szubsztrátal alkotott komplexének egymás után következő alkalmazásán keresztül, közébeiktatott mosási lépések mellett lehetővé teszik az antigének megjelenítését. A kromogén enzimaktiválása látható reakcióterméket eredményez az antigén helyén. Ezután a minta kontrasztfesthető és lefedhető. Az eredmények fénymikroszkóp használatával értelmezhetők, majd segítségül használhatók a patofiziológias folyamatok differenciáldiagnózisa során, amely folyamatok az esetek egy részében konkrét antigénhez kapcsolódnak.

Klón

PW31

Immunogén

A citokeratin 20 intermedier filamentum fehérje N-terminális régiójában található, 70 aminosavból álló szakaszának megfelelő prokarióta eredetű rekombináns fehérje.

Specifitás

Humán citokeratin 20 intermedier filamentum fehérje.

A reagens összetétele

Az NCL-L-CK20-561 tartósítószerként 15 mM nátrium-azidot tartalmazó folyékony szövetkultúra felülúszó.

Ig-osztály

IgG1

Összfehérje-koncentráció

Total Protein

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

Antitest-koncentráció

Legalább 37 mg/l ELISA módszerrel meghatározva. A sarzsspecifikus Ig-koncentrációt lásd az üveg címkéjén.

Felhasználási javaslatok

Immunhisztokémia (lásd **Módszer**) paraffinos metszeteken. Javasolt hígítás: 1:100, 30 percen át, 25 °C-on. Hőindukált epitópfeltárás Epitope Retrieval Solution RE7113, RE7114 vagy RE7115 alkalmazásával. Az adatok csak útmutatásul szolgálnak, a felhasználóknak kell meghatározniuk saját optimális munkaadataikat.

Tárolás és stabilitás

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

A minták előkészítése

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

Figyelmeztetések és óvintézkedések

Ez a reagens a sejtkultúra felülúszójából készült. Mivel biológiai termék, kezelésekor ésszerű körültekintéssel kell eljárni. A reagensben lévő nátrium-azid molaritása 15 mM. A nátrium-azidra vonatkozó anyagbiztonsági adatlapot (Material Safety Data Sheet, MSDS) igény esetén rendelkezésre bocsátjuk. Minden potenciálisan toxikus összetevő ártalmatlanításával kapcsolatban kövesse a szövetségi, állami és helyi előírásokat. A mintákat fixálás előtt és után, valamint a velük érintkező összes anyagot fertőzések terjesztésére képes anyagként kell kezelni, és megfelelő körültekintéssel kell ártalmatlanítani.¹ Soha ne pipettázza szájjal a reagenseket, továbbá kerülje a bőr és a nyálkahártyák érintkezését a reagensekkel és a mintákkal. Ha a reagensek vagy minták érzékeny területtel érintkeznek, bő vízzel mossa le az érintett területet. Forduljon orvoshoz. Minimálisan kell csökkenteni a reagensek mikrobiális szennyeződését, különben megnövekedhet a nem specifikus festődés. A megadottaktól eltérő inkubációs idők és hőmérsékletek hibás eredményekhez vezethetnek. A felhasználónak minden ilyen jellegű változtatást validálnia kell.

Minőség-ellenőrzés

A felhasználó laboratóriumában alkalmazott szövetfeldolgozási és technikai eljárások eltérései jelentős különbséget okozhatnak az eredményekben, ami az alábbi eljárásokon túl belső kontrollok rendszeres futtatását teszi szükségessé. Kontrollként friss boncolási/biopsziás/sébészeti mintákat kell használni, amelyeket a lehető leghamarabb a betegmintákkal megegyező módon kell formalinban fixálni, feldolgozni és paraffiniaszba ágyazni.

Posztív szövetroktrroll

A megfelelő szöveto-előkészítés és festési technikák ellenőrzésére használatos.

Minden tesztelési körülményegüttes esetében és minden megfestési sorozatban kell alkalmazni egy pozitív szövetroktrrollt.

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

A javasolt pozitív kontrollszövet a vékonybél.

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

Negatív szövetroktrroll

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

A javasolt negatív kontrollszövet a kisagy.

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

Ha van nem specifikus festődés, az rendszerint diffúz megjelenésű. A formalinban túlfixált szövetrokból származó metszeteknél a kötőszövet szorványos festődése is megfigyelhető. A festési eredmények értelmezésére ép sejteket használjon. A nekrotizált vagy degenerálódtó sejtek gyakran nem specifikusan festődnek meg.³ A fehérjék vagy a szubsztrát reakciótermékeinek nem immunológiai kötődése miatt áipozítív eredmények jelentkezhetnek. Okozhatják ezt olyan endogén enzimek is, mint a pszeudoperoxidáz (eritrociták), endogén peroxidáz (citokrórn C), illetve endogén biotin (pl. máj, mell, agy, vese), az alkalmazott immunmegfestés típusától függően. 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 szövetroktrroll specifikus festődést mutat, a betegminták eredményeit érvénytelennek kell tekinteni.

Negatív reagensktrroll

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

Betegszövet

Az NCL-L-CK20-561 reagenssel festett betegmintákat vizsgálja meg utolsóként. A pozitív festődés intenzitását a negatív reagensktrroll 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 szövetrok

A PW31 klón kimutatja az egészséges gyomor-, vékonybél- és vastagbél-hámsejtek, az urotélium és a bőr Merkel-sejtjeinek citoplazmájában lévő citokeratin 20-at (n = 100).

Kóros szövetrok

A PW31 klón festődést mutatott vastagbél-karcinóma (60/65), húgyhólyag-karcinóma (1/2) és egy Merkel-sejtes daganat esetén. Focalis immunfestődés volt látható laphámsejtes tüdőkarcinómák (3/7) esetén. Nem volt festődés megfigyelhető számos egyéb daganat esetén (n = 99), beleértve az alábbiakat: emlőkarcinómák, vesesejtes karcinóma, prosztata-adenokarcinómák, hasnyálmirigy-adenokarcinóma, endometrium-karcinóma, pajzsmirigy-karcinóma, kissejtes tüdőkarcinómák és adenokarcinómák, melanómák és szarkómák.

Az NCL-L-CK20-561 alkalmazása az urotéliumból, a bélhámsejtekből, illetve a Merkel-sejtekből kiinduló daganatok jellemzését szolgáló antitestpanel részeként javasolt.

Általános korlátozások

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

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

A túlzott vagy hiányos kontrasztfestés ronthatja az eredmények megfelelő értelmezését.

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

A Leica Biosystems Newcastle Ltd által biztosított antitestek specifikus fixálási követelmények mellett, az utasításoknak megfelelően fagyasztott vagy paraffinba ágyazott metszeteken történő felhasználásra szolgálnak. Időnként váratlan antigén-expresszió fordulhat elő, különösen daganatok esetében. Bármely festett szövetroktrroll 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. Campbell F and Herrington CS. Application of cytokeratin 7 and 20 immunohistochemistry to diagnostic pathology. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:113-122.
6. Leech SN, Kolar AJO, Barrett PD, et al. Merkel cell carcinoma can be distinguished from metastatic small cell carcinoma using antibodies to cytokeratin 20 and thyroid transcription factor 1. *Journal of Clinical Pathology*. 2001; 54:727-729.

Módosítások az előző változathoz képest

Nem alkalmazható.

Kiadás dátuma

07 november 2018

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

Szükséges, de nem biztosított reagensek

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

Szükséges, de nem biztosított felszerelés

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

Epitópfeltáró oldatok (lásd Felhasználási javaslatok az adott oldat esetében)

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

Módszertan

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

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

Epitópfeltárás

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

Megjelenítés

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

Előző kiadás módosításai

Nem alkalmazható

Kiadás időpontja

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

Novocastra™ Anticorp monoclonal lichid de șoarece Cytokeratin 20

Cod produs: NCL-L-CK20-561

Utilizare prevăzută

Pentru diagnosticare in vitro.

NCL-L-CK20-561 este destinat identificării calitative, prin intermediul microscopiei optice, a moleculelor de Citokeratină 20 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

PW31

Imunogen

Proteină procariotă recombinantă, corespunzând unei porțiuni de 70 de aminoacizi din regiunea N-terminală a proteinei filamentoase intermediare de citokeratină 20.

Specificitate

Proteină filamentoasă intermediară 20 de citokeratină umană.

Compoziția reactivului

NCL-L-CK20-561 este un supernatant de cultură tisulară lichid, care conține 15 mM azidă de sodiu drept conservant.

Clasa Ig

IgG1

Concentrație proteină totală

Total Protein

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

Concentrație anticorpi

Mai mare sau egală cu 37 mg/L, așa cum este determinată prin ELISA. Consultați eticheta flaconului pentru concentrația Ig specifică lotului.

Recomandări privind utilizarea

Imunohistochimie (a se vedea **Metodologie**) pe secțiuni în parafină. Diluție sugerată: 1:100 timp de 30 de minute la 25 °C. Recuperarea indusă de căldură a epitopilor utilizând Soluțiile de recuperare a epitopilor RE7113, RE7114 sau RE7115. Aceste informații sunt furnizate cu rol de îndrumare, iar utilizatorii trebuie să-și stabilească singuri propriile diluții de lucru optime.

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.

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

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

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

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

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

Controlul calității

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

Țesutul de control pozitiv

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

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

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

Țesutul de control pozitiv recomandat este intestinul subțire.

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, creier, rinichi), în funcție de tipul de imunocolorație folosit. Pentru a diferenția activitatea enzimelor endogene sau legarea nespecifică a enzimelor de imunoreactivitatea specifică, pot fi colorate țesuturi suplimentare de la pacient numai cu substrat-cromogen sau, respectiv, complexe enzimatic (avidină-biotină, streptavidină, polimer etichetat) și substrat-cromogen. În cazul în care colorația specifică are loc în țesutul de control negativ, rezultatele obținute pe probele pacientului trebuie să fie considerate nevalide.

Reactivul de control negativ

Folosiți un reactiv de control negativ 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-CK20-561 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 PW31 detectează citokeratina 20 în citoplasma celulelor normale gastrice, ale epitelului intestinului subțire și gros, uroteliului și a celulelor Merkel ale pielii (n=100).

Țesuturi anormale

Clona PW31 a colorat carcinoame ale colonului (60/65) și vezicii urinare (1/2) și o tumoră cu celule Merkel. A fost observată o imunocolorare focală în carcinoame pulmonare cu celule scuamoase (3/7). Nu a colorat diverse alte tumori (n=99), incluzând carcinoame mamare, carcinom renal cu celule clare, adenocarcinoame de prostată, adenocarcinom pancreatic, carcinom endometrial, carcinoame tiroidiene, carcinoame pulmonare cu celule mici și adenocarcinoame, melanoame și sarcoame.

NCL-L-CK20-561 este recomandat pentru utilizare ca parte a unui panel de anticorpi pentru a ajuta la caracterizarea tumorilor având originea în uroteliu, epitelul intestinal și celulele Merkel.

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

Contracolorația excesivă sau incompletă poate compromite interpretarea adecvată a rezultatelor.

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

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

Bibliografie - General

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, 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. Campbell F and Herrington CS. Application of cytokeratin 7 and 20 immunohistochemistry to diagnostic pathology. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:113-122.
6. Leech SN, Kolar AJO, Barrett PD, et al. Merkel cell carcinoma can be distinguished from metastatic small cell carcinoma using antibodies to cytokeratin 20 and thyroid transcription factor 1. Journal of Clinical Pathology. 2001; 54:727-729.

Amendamente la ediția anterioară

Nu este cazul.

Data publicării

07 noiembrie 2018

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

Reactivi necesari care nu sunt însă furnizați

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

Echipamente necesare care nu sunt însă furnizate

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

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

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

Metodologie

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

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

Recuperarea epitopilor

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

Vizualizare

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

Amendamente la ediția anterioară

Nu este cazul

Data publicării

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

Жидкая форма моноклональных антител мыши Novocastra™ Cytokeratin 20

Код продукта: NCL-L-CK20-561

Назначение

Для диагностики in vitro

Препарат NCL-L-CK20-561 предназначен для качественного определения молекул Cytokeratin 20 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

PW31

Иммуноген

Рекомбинантный белок из прокариотических клеток, соответствующий участку длиной 70 аминокислот N-концевой области белка промежуточного филамента цитокератина 20.

Специфичность

Цитокератин 20 — белок промежуточных филаментов клеток человека.

Состав реактива

NCL-L-CK20-561 является супернатантом жидкой культуры тканей, который в качестве консерванта содержит азид натрия в концентрации 15 мМ.

Класс иммуноглобулинов

IgG1

Общая концентрация белка Total Protein

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

Концентрация антитела

Не менее 37 мг/л при измерении методом ИФА. Концентрация иммуноглобулина, соответствующая данной серии, указана на этикетке флакона.

Рекомендации по применению

Иммуногистохимия парафиновых срезов (смотрите **Методология**). Рекомендуемое разведение: 1: 100 в течение 30 минут при температуре 25 °С. Тепловая демаскировка эпителий с использованием растворов для демаскирования эпителий (Epitope Retrieval Solutions) RE7113, RE7114 или RE7115. Данная информация носит рекомендательный характер, и пользователям следует самостоятельно определять оптимальные рабочие разведения.

Хранение и стабильность

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

Подготовка образцов

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

Предупреждения и меры предосторожности

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

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

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

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

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 ткань тонкого кишечника.

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 иммунореактивности, можно выполнить окрашивание дополнительных тканей пациента исключительно хромогенным субстратом или ферментными комплексами (авидин-биотин, стрептавидин, меченый полимер) и хромогенным субстратом соответственно. При наличии специфического окрашивания в отрицательном контроле ткани результаты исследования полученных у пациентов образцов считаются недействительными.

Отрицательный контроль реактива

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

Ткань, полученная у пациента

Исследуйте образцы взятой у пациента ткани, которые окрашены с помощью NCL-L-CK20-561, в последнюю очередь. Интенсивность положительного окрашивания следует оценивать с учетом любого неспецифического фонового окрашивания отрицательного контроля реактива. 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 RW31 обнаруживает цитокератин 20 в цитоплазме здоровых клеток желудка, эпителии тонкой и толстой кишки, в уротелии, а также в клетках Меркеля кожи (n=100).

Патологически измененные ткани

Клон RW31 окрасил карциномы толстого кишечника (60/65) и мочевого пузыря (1/2) и опухоль клеток Меркеля. Фокальное иммуногистохимическое окрашивание наблюдалось в плоскоклеточных карциномах легких (3/7). Окрашивание не наблюдалось в ряде других опухолей (n=99), включая карциномы молочной железы, светлоклеточную почечную карциному, аденокарциному простаты, аденокарциному поджелудочной железы, карциному эндометрия, карциномы щитовидной железы, мелкоклеточные карциномы и аденокарциномы легких, меланомы и саркомы.

NCL-L-CK20-561 рекомендуется использовать в составе панели антител в качестве средства, которое может помочь определить свойства опухолей, имеющих следующее происхождение: уротелий, эпителий тонкой кишки и клетки Меркеля.

Общие ограничения

Имуногистохимическое 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. 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. Campbell F and Herrington CS. Application of cytokeratin 7 and 20 immunohistochemistry to diagnostic pathology. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:113-122.
6. Leech SN, Kolar AJO, Barrett PD, et al. Merkel cell carcinoma can be distinguished from metastatic small cell carcinoma using antibodies to cytokeratin 20 and thyroid transcription factor 1. Journal of Clinical Pathology. 2001; 54:727-729.

Дополнения к предыдущему выпуску

Не применимо.

Дата выпуска

07 Ноябрь 2018

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

Необходимые реактивы, не входящие в комплект поставки

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

Необходимое оборудование, не входящее в комплект поставки

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

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

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

Методика

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

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

Демаскирование эпитопа

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

Визуализация

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

Дополнения к предыдущему выпуску

не применимо

Дата выпуска

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

Płynne mysie przeciwciało monoklonalne Novocastra™ Cytokeratin 20

Kod produktu: NCL-L-CK20-561

Przeznaczenie

Do diagnostyki *in vitro*.

Preparat NCL-L-CK20-561 jest przeznaczony do jakościowej identyfikacji za pomocą mikroskopii świetlnej cząsteczek cytokeratyny 20 w skrawkach parafinowych. 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.

Zasady postępowania

Metody barwienia immunohistochemicznego (IHC) umożliwiają wizualizację antygenów dzięki zastosowaniu – po kolei – swoistego przeciwciała przeciwko antygenowi (przeciwciała pierwszorzędowego), przeciwciała drugorzędowego przeciwciała 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

PW31

Immunogen

Prokariotyczne białko rekombinowane odpowiadające fragmentowi 70 aminokwasu regionu N-końca białka pośredniego filamentu cytokeratyny 20.

Swoistość

Ludzkie białko filamentów pośrednich cytokeratyny 20.

Skład odczynnika

NCL-L-CK20-561 jest płynnym supernatantem hodowli tkankowej zakonserwowanym 15 mM azydkiem sodu.

Klasa Ig

IgG1

Całkowite stężenia białka

Total Protein

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

Stężenie przeciwciał

Większe lub równe 37 mg/L oznaczone za pomocą testu ELISA. Stężenie Ig w danej serii podano na etykiecie fiołki.

Zalecenia dotyczące stosowania

Badanie immunochemiczne (zob **Metodologia**) skrawków parafinowych. Sugerowane rozcieńczenie: 1:100 przez 30 minut w temperaturze 25 °C. Ciepłe odmaskowywanie epitopu przy użyciu roztworu Epitope Retrieval Solution RE7113, RE7114 lub RE7115. Te informacje stanowią jedynie wskazówkę – użytkownicy powinni sami określić swoje optymalne rozcieńczenie robocze.

Przechowywanie i trwałość

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

Przygotowanie próbek

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

Ostrzeżenia i środki ostrożności

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

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

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

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

Chronicznie 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 jakości wewnętrznych.

Kontrolę należy przeprowadzać jak najszybciej na świeżych próbkach z autopsji/biopsji/operacji chirurgicznej utwralonych, 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 jellito cienkie.

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 utwralonego w formalinie można również zaobserwować sporadyczne barwienie tkanki łącznej. Do interpretacji wyników barwienia należy używać nieuszkodzonych komórek. Komórki martwicze lub zdegenerowane często powodują barwienie niespecyficzne.³ Wyniki fałszywie pozytywne mogą pojawić się w następstwie nieimmunologicznego wiązania białek lub występowania produktów reakcji substratów. Mogą być również spowodowane przez endogenne enzymy, takie jak pseudoperoksydaza (erytrocyty), endogenna peroksydaza (cytochrom C) lub endogenna biotylna (np. wątroba, piersi, mózg, nerki), w zależności od zastosowanego barwnika immunohistochemicznego. Aby odróżnić endogenną aktywność enzymatyczną lub niespecyficzne wiązanie enzymów od swoistej immunoreaktywności, dodatkowe tkanki pacjenta mogą być barwione wyłącznie substratem chromogenem lub kompleksem enzymatycznych (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-CK20-561 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 PW31 wykrywa cytokeratynę 20 w cytoplazmie prawidłowych komórek nabłonka żołądka, jelita cienkiego i grubego, komórek nabłonka i komórek Merkla (n=100).

Tkanki nieprawidłowe

Klon PW31 wybarwił raki okrężnicy (60/65) i pęcherza moczowego (1/2) oraz guza z komórek Merkla. Punktowe immunobarwienie zaobserwowano w przypadku raka płaskonabłonkowego płuca (3/7). Klon nie wybarwił szeregu innych nowotworów (n = 99), w tym raka sutki, raka jasnokomórkowego nerki, gruczolakoraka gruczołu krokowego, gruczolakoraka trzustki, raka endometrium, raków tarczycy, drobnokomórkowego raka płuc i gruczolakoraków płuc, czerniaków i mięsaków.

Zaleca się stosowanie NCL-L-CK20-561 w ramach panelu przeciwciał pomocniczo w charakteryzowaniu raków pochodzących z nabłonka dróg moczowych, nabłonka jelitowego i komórek Merkla.

Ograniczenia ogólne

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

Barwienie tkanek zależy od postępowania z tkanką i jej przetwarzania przed barwieniem. Nieprawidłowe utwralenie, zamrażanie, rozmarzanie, 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 utwralania i zatapiania lub nieprawidłowości związanej z tkanką.⁴

Nadmierne lub niepełne barwienie kontrastowe może negatywnie wpływać na właściwą interpretację wyników.

Kliniczną interpretację barwienia lub jego braku należy uzupełnić badaniami morfologicznymi oraz odpowiednimi kontrolami. 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 utwralono zgodnie z określonymi wymogami. Może wystąpić nieoczekiwana ekspresja antygeny, 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. Campbell F and Herrington CS. Application of cytokeratin 7 and 20 immunohistochemistry to diagnostic pathology. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:113-122.
6. Leech SN, Kolar AJO, Barrett PD, et al. Merkel cell carcinoma can be distinguished from metastatic small cell carcinoma using antibodies to cytokeratin 20 and thyroid transcription factor 1. Journal of Clinical Pathology. 2001; 54:727-729.

Zmiany wprowadzone do poprzedniego wydania

Nie dotyczy.

Data publikacji

07 listopada 2018

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

Odczynniki wymagane, lecz niedostarczane

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

Sprzęt wymagany, lecz niedostarczany

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

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

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

Metodologia

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

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

Odmaskowywanie epitopu

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

Wizualizacja

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

Zmiany wprowadzone do poprzedniego wydania

Nie dotyczy

Data publikacji

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

Tekoče mišje monoklonsko protitelo Novocastra™

Cytokeratin 20

Koda izdelka: NCL-L-CK20-561

Predvidena uporaba

Za diagnostično uporabo *in vitro*.

Izdelek NCL-L-CK20-561 je namenjen za kvalitativno identifikacijo molekul citokeratina 20 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

PW31

Imunogen

Prokarionski rekombinantni protein, ki ustreza fragmentu 70 aminokislin N-terminalnega dela intermediarnega filamentnega proteina citokeratin 20.

Specifičnost

Protein intermediarnega filameta človeškega citokeratina 20.

Sestava reagenta

NCL-L-CK20-561 je tekočinski supernatant kulture tkiva in vsebuje 15 mM natrijev azid kot konzervans.

Razred Ig

IgG1

Skupna koncentracija beljakovin

Total Protein

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

Koncentracija protiteles

Višja ali enaka 37 mg/l, določena s testom ELISA. Za specifično koncentracijo Ig v seriji glejte oznako na viali.

Priporočila za uporabo

Imunohistokemija (glejte **Metodologija**) parafinskih rezin. Predlagano redčenje: 1:100, 30 minut pri 25 °C. Toplotno pridobivanje epitopa z raztopinami Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114 ali RE7115. To so samo smernice; uporabnik naj poiščejo svoje lastne najbolj učinkovite delovne razreditve.

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.

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

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

Z vzorci, pred fiksiranjem in po njem, in vsemi materiali, s katerimi so prišli v stik, morate 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 mikrobne 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 tankega črevesa.

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

Negativni kontrolni vzorci tkiva

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

Za negativni kontrolni vzorec tkiva priporočamo tkivo malih možganov.

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

Nespecifično barvanje, če je prisotno, je običajno razpršeno. Opazite lahko tudi posamično obarvanje vezivnega tkiva v rezinah tkiv, kot posledica premočnega fiksiranja s formalinom. Za razlago rezultatov obarvanja uporabite nespremenjene celice. Obarvanje nekrotičnih ali degeneriranih celic je pogosto nespecifično.³ Lažno pozitivni rezultati se lahko pojavijo zaradi ne-immunološke vezave proteinov ali produktov reakcije substrata. Povzročijo jih lahko tudi endogeni encimi, kot so psevdoperoksidaza (eritrociti), endogena peroksidaza (citokromni C) ali endogeni biotin (npr. jetra, dojke, možgani, ledvice), odvisno od vrste uporabljenega imunskega barvila. Za razlikovanje med endogeno aktivnostjo encimov ali nespecifično vezavo encimov zaradi specifične imunске reaktivnosti, lahko barvanje 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 antigenskem 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-CK20-561. 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 PW31 zazna citokeratin 20 v citoplazmi celic normalnega epitelija želodca, tankega črevesa in debelega črevesa, uroepitelija in Merklvih celic kože (n = 100).

Nenormalna tkiva

Klon PW31 je obarval karcinome kolona (60/65) in sečnega mehurja (1/2) ter tumor Merklvih celic. Točkasto immunsko obarvanje so opazili pri pljučnih ploščatoceličnih karcinomih (3/7). Obarval ni številnih drugih tumorjev (n = 99), vključno s karcinomi dojke, svetloceličnim karcinomom ledvičnih celic, adenokarcinomi prostate, adenokarcinomom trebušne slinavke, karcinomom endometrija, karcinomi ščitnice, drobnoceličnimi karcinomi in adenokarcinomi, melanomi in sarkomi.

NCL-L-CK20-561 se priporoča za uporabo kot del nabora protiteles za pomoč pri karakterizaciji tumorjev, ki izvirajo iz urotelija, črevesnega epitelija ali Merklvih celic.

Spošne omejitve

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

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

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

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

Spošna 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. Nadjj 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. Campbell F and Herrington CS. Application of cytokeratin 7 and 20 immunohistochemistry to diagnostic pathology. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:113-122.

6. Leech SN, Kolar AJO, Barrett PD, et al. Merkel cell carcinoma can be distinguished from metastatic small cell carcinoma using antibodies to cytokeratin 20 and thyroid transcription factor 1. *Journal of Clinical Pathology*. 2001; 54:727-729.

Dodatki in spremembe k prejšnji izdaji

Navedba smiselno ni potrebna.

Datum izdaje

07 november 2018

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

Potrebni reagenti, ki niso priloženi

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

Potrebna oprema, ki ni priložena

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

C. Epitope Retrieval Solutions (glejte priporočila za uporabo enega izmed naslednjih izdelkov)

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

Metodologija

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

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

Pridobivanje epitopov

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

Vizualizacija

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

Dodatki in spremembe k prejšnji izdaji

Ni primerno

Datum izdaje

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

Novocastra™ Tekutá myší monoklonální protilátka

Cytokeratin 20

Kód výrobku: NCL-L-CK20-561

Zamýšlené použití

Pro diagnostické použití in vitro.

Produkt NCL-L-CK20-561 je určen ke kvalitativnímu stanovení molekul Cytokeratin 20 světelnou mikroskopií na parafinových řezech. 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.

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 omyvacími 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

PW31

Imunogen

Prokaryotický rekombinantní protein odpovídající N terminální oblasti se 70 aminokyselinami molekuly intermediárního filamenta cytokeratinu 20.

Specifita

Protein intermediálních filament lidského cytokeratinu 20.

Složení reagentie

NCL-L-CK20-561 je tekutý supernatant z tkáňové kultury obsahující jako konzervační prostředek 15mM roztok azidu sodného.

Třída Ig

IgG1

Koncentrace celkového proteinu

Total Protein

1,0–8,0 g/l. Koncentrace celkového proteinu specifická pro šarži je uvedena na štítku na lahvičce.

Koncentrace protilátek

37 mg/l nebo vyšší, stanovená metodou ELISA. Koncentrace imunoglobulinu (Ig) specifická pro šarži je uvedena na štítku na lahvičce.

Doporučení k použití

Imunohistochemické vyšetření (viz **Metodika**) na parafinových řezech. Doporučené ředění: 1:100 po dobu 30 minut při 25 °C. Teplem indukované odmaskování epitopu s použitím odmaskovacího roztoku epitopu RE7113, RE7114 nebo RE7115. Toto doporučení je uvedeno jako vodítko; uživatelé musí stanovit vlastní optimální pracovní ředění.

Skladování a stabilita

Uchovávejte při teplotě 2–8 °C. Nezmrazujte. Okamžitě po použití vraťte do teploty 2–8 °C. Nepoužívejte po uplynutí data expirace uvedeného na štítku na lahvičce. Podmínky skladování jiné než výše uvedené musí uživatel validovat.

Příprava vzorku

Fixační roztok doporučený pro řezy tkáně zalité v parafinu je 10% formalin pufovaný na neutrální pH.

Varování a bezpečnostní opatření

Tato reagentie byla připravena ze supernatantu z buněčné kultury. Protože jde o biologický produkt, je nutno manipulaci s ní věnovat náležitou pozornost.

Molarita azidu sodného v této reagentii je 15 mM. Bezpečnostní list materiálu (MSDS) pro azid sodný je k dispozici na vyžádání.

Údaje o likvidaci jakýchkoli potenciálně toxických komponent prostudujte ve federálních, státních nebo místních nařízeních.

Se vzorky, před fixací i po fixaci, a se všemi materiály jim vystavenými, je nutno zacházet, jako by mohly způsobit přenos infekce, a likvidovat je s náležitými bezpečnostními opatřeními.¹ Reagentie nikdy nepipetujte ústy a zabraňte styku reagentií a vzorků s kůží a sliznicemi. Pokud se reagentie nebo vzorky dostanou do kontaktu s citlivými oblastmi, omyjte je velkým množstvím vody. Vyhledejte lékařskou pomoc.

Minimalizujte mikrobiální kontaminaci reagentií, mohlo by dojít ke zvýšení výskytu nespecifického barvení.

Inkubační doby nebo teploty jiné než předepsané mohou vést k chybným výsledkům. Všechny takové změny musí být uživatelem validovány.

Kontrola jakosti

Rozdíly ve zpracování tkání a v technických postupech v laboratoři uživatele mohou způsobit významnou variabilitu výsledků, což vyžaduje kromě níže uvedených postupů i pravidelné provádění kontrol v laboratoři.

Kontroly musí být čerstvé pitevni/biopsické/operační vzorky co nejdříve fixované formalínem, zpracované a zalité do parafinového vosku, stejným způsobem jako vzorek/vzorky pacienta.

Pozitivní tkáňová kontrola

Používá se k průkazu správně připravených tkání a správných barvicích technik.

V každém barvicím cyklu musí být použita jedna pozitivní tkáňová kontrola pro každý soubor testovacích podmínek.

Pro optimální kontrolu jakosti a k detekci menšího stupně degradace reagentie je vhodnější tkáň se slabým pozitivním barvením než tkáň se silným pozitivním barvením.²

Doporučenou pozitivní tkáňovou kontrolou je tenké střevo.

Pokud pozitivní tkáňová kontrola nevykazuje pozitivní barvení, musí být výsledky testovaných vzorků považovány za neplatné.

Negativní tkáňová kontrola

Musí být vyšetřena po pozitivní tkáňové kontrole k ověření specificity označení cílového antigenu primární protilátkou.

Doporučená negativní tkáňová kontrola je mozeček.

Alternativně často představuje místa negativní kontroly řada různých typů buněk přítomných ve většině tkáňových řezů, to ale musí uživatel validovat.

Nespecifické barvení, je-li přítomno, má obvykle difúzní vzhled. V řezech ze tkání nadměrně fixovaných formalinem může být také zjištěno sporadické barvení pojivové tkáně. K interpretaci výsledků barvení použijte neporušené buňky. Nekrotické nebo degenerované buňky se často barví nespecificky.³ Falešně pozitivní výsledky mohou být důsledkem imunologické 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 imunobarviva. K odlišení aktivity endogenních enzymů či nespecifické vazby enzymů od specifické imunoreaktivity mohou být barveny další tkáně pacienta výlučně chromogenním substrátem, případně enzymovými komplexy (avidin-biotin, streptavidin, značený polymer) a chromogenním substrátem. Pokud dojde v negativní tkáňové kontrole ke specifickému barvení, musí být výsledky vzorků pacienta považovány za neplatné.

Negativní reagenční kontrola

K vyhodnocení nespecifického barvení a umožnění lepší interpretace specifického barvení v místě antigenu použijte na řezu z každého vzorku pacienta nespecifickou negativní reagenční kontrolu místo primární protilátky.

Tkáň pacienta

Nakonec vyšetřete vzorky pacienta barvené pomocí NCL-L-CK20-561. Intenzita pozitivního barvení musí být zhodnocena v kontextu se vším nespecifickým barvením pozadí u negativní reagenční kontroly. Jako u každého imunohistochemického vyšetření, negativní výsledek znamená, že antigen nebyl zjištěn, nikoli, že antigen není ve vyšetřovaných buňkách/tkáňích přítomen. V případě potřeby použijte k identifikaci falešně negativních reakcí panel protilátek.

Očekávané výsledky

Normální tkáně

Klon PW31 detekuje cytokeratin 20 v cytoplazmě normálních gastrických buněk, epitelu tenkého a tlustého střeva, uretulu a Merkelových buňkách (n = 200).

Abnormální tkáně

Klon PW31 barvil karcinom kolon (60/65) a močového měchýře (1/2) a tumor z Merkelových buněk. Fokální imunologické barvení bylo pozorováno u skvamocelulárních karcinomů plic (3/7). Nebarvil spektrum jiných tumorů (n = 99), včetně karcinomů prsu, renálního karcinomu ze světlých buněk, adenokarcinomů prostaty, adenokarcinomu pankreatu, endometriálního karcinomu, karcinomů štítné žlázy, malobuněčných karcinomů a adenokarcinomů plic, melanomů a sarkomů.

NCL-L-CK20-561 se doporučuje použít jako pomocnou součást panelu protilátek při charakterizaci tumorů původem z uretulu, střevního epitelu a Merkelových buněk.

Obecná omezení

Imunohistochemické vyšetření je víceokrový diagnostický proces, který spočívá ve specializovaném školení ve výběru vhodných reagentů; výběru, fixaci a zpracování tkání; přípravě imunohistochemického sklíčka; a v interpretaci výsledků barvení. Barvení tkáně závisí na manipulaci s tkání a jejím zpracování před barvením. Nesprávným postupem při fixaci, zmrazení, rozmrazení, omývání, sušení, zahřívání, krájení řezů nebo kontaminací jinými tkáněmi či tekutinami mohou vzniknout artefakty, může dojít k vychytávání protilátek nebo k falešně negativním výsledkům. Nekonzistentní výsledky mohou být důsledkem odchylek ve fixačních metodách a metodách zalití, 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. Nadj M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavi 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. Campbell F and Herrington CS. Application of cytokeratin 7 and 20 immunohistochemistry to diagnostic pathology. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:113-122.

- Leech SN, Kolar AJO, Barrett PD, et al. Merkel cell carcinoma can be distinguished from metastatic small cell carcinoma using antibodies to cytokeratin 20 and thyroid transcription factor 1. *Journal of Clinical Pathology*. 2001; 54:727-729.

Opravy předchozího vydání

Nevztahuje se.

Datum vydání

07 listopad 2018

Imunohistochemická metodika při použití protilátek Novocastra™ tkáň zalité v parafínu s použitím techniky teplem indukovaného odmaskování epitopu.

Potřebné reagenty, které nejsou součástí dodávky

1. Standardní rozpouštědla používaná v imunohistochemii.
2. Fyziologický roztok pufovaný 50mM roztokem tris-pufu (TBS), pH 7,6.
3. Odmaskovací roztok epitopu (viz C. Roztoky Epitope Retrieval Solutions).
4. Ředící roztok na protilátky, Novocastra IHC Diluent, RE7133.
5. Vizualizační systém, Novolink Polymer Detection Systems, RE7280-K (1 250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) nebo RE7290-K (50 tests).
6. Fixační médium – použijte podle doporučení výrobce.

Potřebné vybavení, které není dodáno

1. Inkubátor nastavený na 25 °C.
2. Zahřívací zařízení k odmaskování epitopu: vodní lázeň, sterilizační přístroj, tlakový hrnec nebo jiné laboratorní vybavení s kontrolovanou teplotou.
3. Obecné vybavení imunohistochemické laboratoře.

Roztoky k odmaskování epitopu (viz Doporučení k použití pro jeden z následujících roztoků)

RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 koncentrát) 1 l	Citrátový pufr s obsahem surfaktantu
RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml	
RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (roztok připravený k použití) 1 l	
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 koncentrát) 1 l	EDTA pufr s obsahem surfaktantu
RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (roztok připravený k použití) 1 l	
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 koncentrát) 1 l	Tris/EDTA pufr s obsahem surfaktantu
RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (roztok připravený k použití) 1 l	

Metodika

Než uživatel přistoupí k této metodice, musí být proškoleni v imunohistochemických technikách.

Uživatelé musí stanovit optimální ředění pro protilátky. Pokud není uvedeno jinak, provádějí se všechny kroky při pokojové teplotě (25 °C).

Odmaskování epitopu

Postupujte podle pokynů k roztokům Epitope Retrieval Solutions, RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119 nebo RE7122.

Vizualizace

Postupujte podle návodu k použití k systému Novolink Polymer Detection System, RE7280-K (1 250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) nebo RE7290-K (50 tests).

Opravy předchozího vydání

Nevztahuje se

Datum vydání

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

Tekutá myšia monoklonálna protilátka Novocastra™

Cytokeratín 20

Kód produktu: NCL-L-CK20-561

Zamýšľané použitie

Na diagnostické použitie *in vitro*.

NCL-L-CK20-561 slúži na kvalitatívnu identifikáciu molekúl cytokeratínu 20 v parafinových rezoch pomocou svetelnej mikroskopie. 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.

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

PW31

Imunogén

Prokaryotický rekombinantný proteín zodpovedajúci zložke 70 aminokyselín oblasti N-konca proteínu intermediárnych filamentov cytokeratínu 20.

Špecificita

Proteín intermediárnych filamentov ľudského cytokeratínu 20.

Zloženie činidla

NCL-L-CK20-561 je tekutý supernatant na tkanivovú kultiváciu obsahujúci 15 mM azidu sodného ako konzervačnej látky.

Trieda Ig

IgG1

Celková koncentrácia proteínov

Total Protein

1,0 – 8,0 g/l. Celkovú koncentráciu proteínov špecifickú pre šaržu nájdete na štítku fľaštičky.

Koncentrácia protilátok

Vyššia alebo rovná 37 mg/l podľa ELISA. Koncentráciu Ig špecifickú pre šaržu nájdete na štítku fľaštičky.

Odporúčania na použitie

Imunohistochemia (pozri časť **D. Metóda**) parafinových rezov. Odporúčané riešenie: 1 : 100 po dobu 30 minút pri teplote 25 °C. Záchyt epitopov s tepelnou indukciou sa odporúča pomocou prípravku Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114 alebo RE7115. Táto hodnota je orientačná, používatelia si musia stanoviť svoje vlastné optimálne pracovné riešenia.

Ukladenie a stabilita

Skladujte pri teplote 2 – 8 °C. Nezmrazujte. Okamžite po použití vráťte do teploty 2 – 8 °C. Nepoužívajte po uplynutí dátumu expirácie uvedeného na štítku fľaštičky. Iné než vyššie uvedené podmienky skladovania si vyžadujú validáciu používateľom.

Príprava vzorky

Odporúčaný fixačný prípravok je 10 % neutrálny pufovaný formalín pre bločky tkaniva zaliate do parafínu.

Varovania a bezpečnostné opatrenia

Toto činidlo bolo pripravené zo supernatantu bunkovej kultúry. Keďže ide o biologický produkt, pri manipulácii je nutné vynaložiť zodpovedajúcu starostlivosť.

Molarita azidu sodného v tomto činidle je 15 mM. Materiálový bezpečnostný list (MSDS) k azidu sodnému je k dispozícii na požiadanie. 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 opatní.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/bioptické/chirurgické vzorky fixované čo najskôr formalínom a spracované zaliatím do parafínu rovnakým spôsobom ako vzorky pacienta.

Pozitívna kontrola tkanivom

Identifikuje správne pripravené tkanivá a správne techniky zafarbenia.

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

Tkanivo so slabým pozitívnym farbením je pre optimálnu kontrolu kvality a na detekciu slabšej degradácie činidla vhodnejšie než tkanivo so silným pozitívnym farbením.²

Odporúčané tkanivo na pozitívnu kontrolu je tenké črevo.

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

Negatívna kontrola tkanivom

Nutné vyšetriť po pozitívnej kontrole tkanivom s cieľom overiť špecifickosť 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.

Pripradné nešpecifické farbenie má obvykle difúznu vzhľad. V rezoch tkanív silne fixovaných formalínom 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 (erytrocyty), endogénnou peroxidázou (cytochróm C) alebo endogénnym biotínom (napr. pečeň, prsník, mozog, oblička) v závislosti od typu imunologickeho 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 špecifickeho farbenia v negatívnej kontrole tkanivom je nutné výsledky vzoriek pacienta považovať za neplatné.

Negatívna kontrola činidlom

Na vyhodnotenie nešpecifickeho zafarbenia použite nešpecifickú negatívnu kontrolu činidlom miesto primárnej protilátky s rezom jednotlivých vzoriek pacienta, čo umožní lepšiu interpretáciu špecifickeho farbenia na mieste antigénu.

Tkanivo pacienta

Pacientske vzorky zafarbené prípravkom NCL-L-CK20-561 preskúmajte ako posledné. Intenzitu pozitívneho farbenia je nutné vyhodnotiť v kontexte prípadného nešpecifickeho zafarbenia negatívnej kontroly činidlom na pozadí. Podobne ako pri všetkých imunohistochemických testov znamená negatívny výsledok, že antigén nebol detegovaný. Nepotvrďuje jeho absenciu v testovaných bunkách/tkanivách. V prípade potreby identifikujte falošne negatívne reakcie pomocou panelu protilátok.

Očakávané výsledky

Normálne tkanivá

Klon PW31 deteguje cytokeratín 20 v cytoplazme normálneho epitelu žalúdka, tenkého a hrubého čreva, urotelu a Merkelových buniek kože (n = 100).

Abnormálne tkanivá

Klon PW31 zafarbil karcinómy hrubého čreva (60/65) a močového mechúra (1/2) a nádor z Merkelových buniek. Fokálne imunofarbenie bolo pozorované pri skvamocelulárnych karcinómoch pľúc (3/7). Nezafarbil celý rad ďalších nádorov (n = 99) vrátane karcinómov prsníka, renálneho karcinómu zo svetlých buniek, adenokarcinómov prostaty, adenokarcinómu pankreasu, karcinómu endometria, karcinómov štítnej žľazy, malobunkových karcinómov a adenokarcinómov pľúc, melanómov a sarkómov.

NCL-L-CK20-561 sa odporúča ako súčasť panelu protilátok pri charakterizácii nádorov pochádzajúcich z urotelu, črevného epitelu a Merkelových buniek.

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

Nadmerné alebo neúplné kontrastné farbenie môže narušiť správnu interpretáciu 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.

Protilátky 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. Nadj M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavi 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. Campbell F and Herrington CS. Application of cytokeratin 7 and 20 immunohistochemistry to diagnostic pathology. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:113-122.
6. Leech SN, Kolar AJO, Barrett PD, et al. Merkel cell carcinoma can be distinguished from metastatic small cell carcinoma using antibodies to cytokeratin 20 and thyroid transcription factor 1. Journal of Clinical Pathology. 2001; 54:727-729.

Úpravy predchádzajúceho vydania

Neuplatňuje sa.

Dátum vydania

07 november 2018

Imunohistochemická metóda spracovania protilátok Novocastra™ na tkanive zaliatom v parafíne pomocou techniky záchytu epitopov s tepelnou indukciou.

Požadované, ale nedodávané činidlá

1. Štandardné rozpúšťadlá používané v imunohistochemii
2. 50mM tris-pufrovaný fyziologický roztok (TBS), pH 7,6
3. Roztok na záchyt epitopov (pozri časť C. Roztoky na záchyt epitopov)
4. Zriedovadlo protilátok, Novocastra IHC Diluent, RE7133
5. Vizualizačný systém, Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 testov), RE7150-K (500 testov), RE7140-K (250 testov) alebo RE7290-K (50 testov).
6. Upevňovacie médium – používajte podľa odporúčania výrobcu.

Požadované, ale nedodávané vybavenie

1. Inkubátor nastavený na teplotu 25 °C.
2. Ohrievač na záchyt epitopov: vodný kúpeľ, napařovač, tlakový hrniec alebo iné laboratórne vybavenie s reguláciou teploty
3. Všeobecné vybavenie imunohistochemického laboratória

Roztoky na záchyt epitopov (pozri časť Odporúčania na použitie pre niektoré z nasledujúcich produktov)

RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 L	Pufor na báze citranu obsahujúci surfaktant
RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 mL	
RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 L	
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 L	Pufor na báze EDTA obsahujúci surfaktant
RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 L	
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 L	Pufor na báze tris/EDTA obsahujúci surfaktant
RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 L	

Metóda

Používatelia musia byť vyškolení v oblasti imunohistochemických techník skôr, než pristúpia k tejto metóde.

Používateľ musí stanoviť optimálne riedenie protilátok. Ak nie je uvedené inak, všetky kroky sa vykonávajú pri izbovej teplote (25 °C).

Záchyt epitopov

Postupujte podľa návodu na použitie v časti Roztoky na záchyt epitopov, RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119 alebo RE7122.

Vizualizácia

Postupujte podľa návodu na použitie v systémoch Novolink Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 testov), RE7150-K (500 testov), RE7140-K (250 testov) alebo RE7290-K (50 testov).

Úpravy predchádzajúceho vydania

Neuplatňuje sa

Dátum vydania

23. apríla 2008 (CE protokol/HTAUT+Novolink).

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

Leica Biosystems Canada
71 Four Valley Drive
Concord, Ontario L4K 4V8
Canada
J +1 800 248 0123

Leica Biosystems Inc
1700 Leider Lane
Buffalo Grove IL 60089
USA
J +1 800 248 0123

Leica Biosystems Melbourne
Pty Ltd
495 Blackburn Road
Mt Waverley VIC 3149
Australia
J +61 2 8870 3500