

# Novocastra™ Lyophilized Mouse Monoclonal Antibody Dystrophin (C-terminus)

**Product Code: NCL-DYS2**

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

## 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.

## Bruksanvisning

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.

## 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.

**www.LeicaBiosystems.com**



# Novocastra™ Lyophilized Mouse Monoclonal Antibody Dystrophin (C-terminus)

**Product Code: NCL-DYS2**

## Intended Use

*For in vitro diagnostic use.*

NCL-DYS2 is intended for the qualitative identification by light microscopy of Dystrophin (C-terminus) by immunohistochemistry. 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

Dy8/6C5

## Immunogen

Synthetic polypeptide consisting of the last 17 amino acids at the carboxy terminus of the human dystrophin sequence.

## Specificity

Reacts strongly with the carboxy terminus (between amino acids 3669 and 3685) of human dystrophin. Also crossreacts strongly with skeletal, cardiac and smooth muscle dystrophin from normal mouse, rat, rabbit, dog, chicken and hamster. No crossreactivity with mdx mouse tissue. Crossreacts very weakly with pig dystrophin.

## Reagent Composition

NCL-DYS2 is a lyophilized tissue culture supernatant containing sodium azide as a preservative. The user is required to reconstitute the contents of the vial with the correct volume of sterile distilled water as indicated on the vial label.

## Ig class

IgG1

## Total Protein Concentration Total Protein

Refer to vial label for lot specific total protein concentration.

## Antibody Concentration

Greater than or equal to 32.4 mg/L as determined by ELISA. Refer to vial label for batch specific Ig concentration.

## Recommendations On Use

Immunohistochemistry (see **D. Methodology**) on frozen sections. Suggested dilution: 1:20 for 60 minutes at 25 °C. This is provided as a guide and users should determine their own optimal working dilutions.

## Storage and Stability

Store unopened antibody at 2–8 °C. Under these conditions, there is no significant loss in product performance up to the expiry date indicated on the vial label. Do not use after expiration date indicated on the vial label. The reconstituted antibody is stable for at least two months when stored at 2–8 °C. For long term storage, it is recommended that aliquots of the reconstituted antibody are stored frozen at -20 °C (frost-free freezers are not recommended). Repeated freezing and thawing must be avoided. Prepare working dilutions on the day of use. Return to 2–8 °C immediately after use. Storage conditions other than those specified above must be verified by the user.

## Specimen Preparation

Freeze specimen tissue blocks in isopentane chilled in liquid nitrogen (see Warnings and Precautions). The specimens do not require further fixation but should be embedded in OCT™ compound (Sakura, Product No. Tissue-Tek 4583).

## Warnings and Precautions

### Novocastra Lyophilised Antibodies

Contains a mixture of: Sodium Azide (<10%), Benzylpenicillin Sodium (<10%), Streptomycin Sulphate (<10%).

Signal words: Danger.

H302: Harmful if swallowed.

H317: May cause an allergic skin reaction.

H334: May cause allergy or asthma symptoms or breathing difficulties if inhaled.

H411: Toxic to aquatic life with long lasting effects.

EUH032: Contact with acids liberates very toxic gas.

P261: Avoid breathing dust/fumes/gas/mist/vapours/spray.

P264: Wash hands thoroughly after handling.

P270: Do not eat, drink or smoke when using this product.

P272: Contaminated work clothing should not be allowed out of the workplace.

P273: Avoid release to the environment.

P280: Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.

P284: In case of inadequate ventilation wear respiratory protection.

P301+312: IF SWALLOWED: Call a POISON CENTER/doctor/ if you feel unwell.

P302+352: IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.

P304+340: IF INHALED: Remove person to fresh air and keep comfortable for breathing.

P330: Rinse mouth.

P333+313: If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.

P342+311: If experiencing respiratory symptoms: Call a POISON CENTER/doctor.

P362+364: Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

P391: Collect spillage.

P501: Dispose of contents/container to hazardous or special waste collection point.

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

This reagent contains sodium azide. A Material Safety Data Sheet is available upon request or available from [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com) Consult federal, state or local regulations for disposal of any potentially toxic components.

Specimens, before and after fixation, and all materials exposed to them, should be handled as if capable of transmitting infection and disposed of with proper precautions.<sup>1</sup> 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.

Liquid nitrogen due to its excessively cold temperature causes burns and protective clothing, including gloves and visor, should be used when handling. Use in a well ventilated area.

Isopentane is highly flammable and harmful by ingestion and inhalation. It is also irritating to skin and eyes, and is a narcotic in high concentration.

### Quality Control

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

Controls should be fresh autopsies/biopsy/surgical specimens frozen 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.<sup>2</sup>

Recommended positive control tissue is normal human striated muscle.

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 has not been evaluated.

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.<sup>3</sup> 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-DYS2 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 Dy8/6C5 detects an epitope at the carboxy terminus of human dystrophin close to the cytoplasmic face of the sarcolemma of normal human muscle.

### Abnormal Tissues

Clone Dy8/6C5 has been used in immunohistochemical and immunoblotting studies of more than 965 patients to identify a deficiency of the 427 kD protein, dystrophin.

### **NCL-DYS2 is recommended for the identification of human Dystrophin (C-terminus) by immunohistochemistry.**

## 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 artefacts, 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.<sup>4</sup> 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, PA. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadjji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Anderson LVB. Multiplex Western blot analysis of the muscular dystrophy proteins. Chapter 22, p369–386, in Muscular Dystrophy: Methods and Protocols (number 43 in the Methods in Molecular Medicine series), edited by Bushby KMD & Anderson LVB. 2001. Humana Press: Totowa, New Jersey.
6. Mahjneh I, Marconi G, Bushby K, et al. Dysferlinopathy (LGMD2B): a 23-year follow-up study of 10 patients homozygous for the same frameshifting dysferlin mutations. Neuromuscular Disorders. 2001; 11:20–26.
7. Pogue R, Anderson LVB, Pyle A, et al. Strategy for mutation analysis in the autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(1):80–87.
8. Pollitt C, Anderson LVB, Pogue R, et al. The phenotype of calpainopathy: diagnosis based on a multidisciplinary approach. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(3):287–296.
9. Anderson LVB, Harrison RM, Pogue R, et al. Secondary reduction in calpain 3 expression in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B and Miyoshi myopathy (primary dysferlinopathies). Neuromuscular Disorders. 2000; 10(8):553–559.
10. Auranen M, Rapola J, Pihko H, et al. Muscle membrane-skeleton protein changes and histopathological characterization of muscle-eye-brain disease. Neuromuscular Disorders. 2000; 10(1):16–23.
11. Bornemann A and Anderson LVB. Diagnostic protein expression in human muscle biopsies. Brain Pathology. 2000; 10:193–214.
12. Anderson LVB. Immunomarkers for molecular mass. Neuromuscular Disorders. 1999; 9(6-7):421–422.
13. Anderson LVB and Davison K. Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins. American Journal of Pathology. 1999; 154(4):1017–1022.
14. Anderson LVB, Davison K, Moss JA, et al. Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development. Human Molecular Genetics. 1999; 8(5):855–861.
15. Weiler T, Bashir R, Anderson LVB, et al. Identical mutation in patients with limb girdle muscle dystrophy type 2B or Miyoshi myopathy suggests a role for modifier gene(s). Human Molecular Genetics. 1999; 8(5):871–877.
16. Sewry CA, Taylor J, Anderson LVB, et al. Abnormalities in alpha-, beta- and gamma-sarcoglycan in patients with limb-girdle muscular dystrophy. Neuromuscular Disorders. 1996; 6(6):467–474.
17. Vainzof M, Passos-Bueno MR, Canovas M, et al. The sarcoglycan complex in the six autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. Human Molecular Genetics. 1996; 5(12):1963–1969.
18. Matthews PM, Benjamin D, Bakel IV, et al. Muscle X-inactivation patterns and dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy carriers. Neuromuscular Disorders. 1995; 5(3):209–220.
19. Heald A, Anderson LVB, Bushby KMD, et al. Becker muscular dystrophy with onset after 60 years. Neurology. 1994; 44:2388–2390.
20. Bushby KMD, Goodship JA, Nicholson LVB, et al. Variability in clinical, genetic and protein abnormalities in manifesting carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy. Neuromuscular Disorders. 1993; 3(1):57–64.

## Amendments to Previous Issue

Not Applicable

## Date of Issue

12 October 2016

# Immunohistochemistry methodology for using Novocastra™ antibodies on frozen muscle tissue.

## Reagents required but not supplied

1. Standard solvents used in immunohistochemistry.
2. 50 mM Tris-buffered saline (TBS) pH 7.6.
3. Antibody diluent - normal serum optimally diluted in TBS.
4. Normal serum from the species in which the secondary antibody is raised.
5. Secondary peroxidase-conjugated antibody - use as recommended by manufacturer.
6. 3,3' Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) - prepare and use as recommended by manufacturer.
7. Mounting medium - use as recommended by manufacturer.

## Equipment required but not supplied

1. Incubator set to 25 °C.
2. General immunohistochemistry laboratory equipment.
3. Electric fan for air drying slides.

## C. Antigen retrieval solutions (see Recommendations on Use)

Not applicable to frozen sections.

## 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 25 °C.

1. Cut and mount 4–10 µm sections on slides coated with a suitable tissue adhesive and air dry for at least one hour.
2. Incubate sections with optimally diluted primary antibody (see Recommendations on Use).
3. Wash in TBS buffer for 2 x 5 minutes with gentle rocking.
4. Incubate sections in appropriate peroxidase-conjugated secondary antibody.
5. Wash in TBS buffer for 2 x 5 minutes with gentle rocking.
6. Incubate the slides in DAB.
7. Rinse the slides in clean water.
8. Dehydrate, clear and mount sections.

## Amendments to Previous Issue

Not applicable.

## Date of Issue

4 February 2008 (CEprotocol/Frozen Muscle).

# Novocastra™ Anticorps Monoclonal Lyophilisé de Souris Dystrophin (C-terminus) Référence du Produit: NCL-DYS2

## Utilisation Prévue

*Diagnostic in vitro.*

Le NCL-DYS2 est destiné à l'identification qualitative par microscopie optique de la dystrophine (extrémité C terminale) par immunohistochimie. 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

Dy8/6C5

## Immunogène

Polypeptide synthétique constitué des 17 derniers acides aminés de l'extrémité carboxy-terminale de la séquence de la dystrophine humaine.

## Spécificité

Il réagit fortement avec l'extrémité carboxy-terminale (entre les acides aminés 3669 et 3685) de la dystrophine humaine. Il réagit fortement, de façon croisée, avec la dystrophine des muscles squelettiques, cardiaques et lisses de souris, de rat, de lapin, de chien, de poulet et de hamster normaux. Aucune réactivité croisée n'a été observée avec les tissus de souris mdx. Une faible réaction croisée a été observée avec la dystrophine de porc.

## Composition du Réactif

Le NCL-DYS2 est un surmageant de culture tissulaire lyophilisé contenant une solution d'azide de sodium 15 mM comme conservateur. L'utilisateur doit reconstituer le contenu du flacon avec un volume correct d'eau distillée stérile comme indiqué sur l'étiquette du flacon.

## Classe d'Ig

IgG1

## Concentration Totale en Protéines Total Protein

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

## Concentration en Anticorps

Supérieure ou égale à 32,4 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 **D. Méthodologie**) sur des coupes congelées. Dilution préconisée : 1:20 pendant 60 minutes à 25 °C. Ceci n'est donné qu'à titre indicatif et les utilisateurs doivent déterminer leurs propres dilutions de travail optimales.

## Conservation et Stabilité

Conserver l'anticorps non ouvert à 2–8 °C. Dans ces conditions il n'y a pas de perte de performance significative du produit jusqu'à la date de péremption qui figure sur l'étiquette du flacon. Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur l'étiquette du récipient. L'anticorps reconstitué est stable pendant au moins deux mois s'il a été conservé à 2–8 °C. Pour une conservation à long terme, il est recommandé de congeler les aliquotes d'anticorps à -20 °C (l'utilisation de congélateurs à dégivrage automatique n'est pas conseillée). Ne pas congeler et décongeler de façon répétée. Préparer les dilutions de travail le jour même de leur utilisation. Remettre immédiatement à 2–8 °C après utilisation. 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

Congeler les blocs tissulaires dans de l'isopentane refroidi dans de l'azote liquide (voir Mises en garde et précautions). Les spécimens nécessitent pas d'autre fixation mais doivent être inclus dans le composé OCT™ (Sakura, réf. produit Tissue-Tek 4583).

## Mises en Garde et Précautions

### **Novocastra Lyophilised Antibodies**

Il contient un mélange de:  
Azoture De Sodium (<10%),  
Benzylpenicillin Sodium (<10%),  
Streptomycin Sulphate (<10%).  
Mentions d'avertissement:  
Danger.

H302: Nocif en cas d'ingestion.  
H317: Peut provoquer une allergie cutanée.  
H334: Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation.  
H411: Toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.  
EUH032: Au contact d'un acide, dégage un gaz très toxique.

P261: Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols.  
P264: Se laver les mains soigneusement après manipulation.  
P270: Ne pas manger, boire ou fumer en manipulant ce produit.  
P272: Les vêtements de travail contaminés ne devraient pas sortir du lieu de travail.  
P273: Éviter le rejet dans l'environnement.  
P280: Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.  
P284: [Lorsque la ventilation du local est insuffisante] porter un équipement de protection respiratoire.  
P301+312: EN CAS D'INGESTION: Appeler un CENTRE ANTIPOISON/un médecin en cas de malaise.  
P302+352: EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: laver abondamment à l'eau et au savon.  
P304+340: EN CAS D'INHALATION: transporter la personne à l'extérieur et la maintenir dans une position où elle peut confortablement respirer.  
P330: Rincer la bouche.  
P333+313: En cas d'irritation ou d'éruption cutanée: consulter un médecin.  
P342+311: En cas de symptômes respiratoires: Appeler un CENTRE ANTIPOISON/un médecin.  
P362+364: Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation.  
P391: Recueillir le produit répandu.  
P501: Éliminer le contenu/réceptif dans un centre de collecte des déchets dangereux ou spéciaux.

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

Ce réactif contient de l'azide de sodium. Une Fiche de données de sécurité est disponible sur demande ou sur le site [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com)

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

Les spécimens, avant et après fixation, ainsi que toutes les matières ayant été en contact avec eux, doivent être manipulés comme s'ils étaient susceptibles de transmettre une infection et être éliminés en respectant les précautions appropriées.<sup>1</sup> 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.

Du fait de sa température extrêmement basse, l'azote liquide est susceptible de provoquer des brûlures et un vêtement de protection, comportant des gants et une visière, doit être utilisé lors de sa manipulation. Utiliser dans une zone bien ventilée.

L'isopentane est hautement inflammable et nocif en cas d'ingestion ou d'inhalation. Il est également irritant pour la peau et les yeux, et narcotique à haute concentration.

### **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, congelés 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.<sup>2</sup>

Le tissu de contrôle positif recommandé sont les muscles striés humains normaux.

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 tissu de contrôle négatif recommandé n'a pas été évalué.

Si non, 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.<sup>3</sup> Des résultats faussement positifs peuvent être observés en raison d'une liaison non immunologique à des protéines ou à des produits de réaction du substrat. Ils peuvent également être provoqués par des enzymes endogènes comme la pseudoperoxydase (érythrocytes), la peroxydase endogène (cytochrome C), ou la biotine endogène (foie, sein, cerveau, rein, par exemple) selon le type d'immunomarquage utilisé. Pour différencier l'activité des enzymes endogènes ou la liaison non spécifique d'enzymes de l'immunoréactivité spécifique, des tissus supplémentaires du patient peuvent être marqués exclusivement avec le substrat chromogène ou par des complexes enzymatiques (avidine-biotine, streptavidine, polymère marqué) et le substrat chromogène respectivement. Si un marquage spécifique se produit dans le tissu de contrôle négatif, les résultats des spécimens du patient doivent être considérés comme invalides.

### Réactif de Contrôle Négatif

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

### Tissu du Patient

Examiner les échantillons du patient marqués au NCL-DYS2 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 Dy8/6C5 détecte un épitope de l'extrémité carboxy-terminale de la dystrophine humaine proche du côté cytoplasmique du sarcolemme du muscle humain normal.

#### Tissus tumoraux

Le clone Dy8/6C5 a été utilisé lors d'études immunohistochimiques et d'immunobuvardage chez plus de 965 patients en vue d'identifier une déficience d'une protéine de 427 kD, la dystrophine.

**Le NCL-DYS2 est recommandé pour l'identification de la dystrophine humaine (extrémité C terminale) par immunohistochimie.**

### 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.<sup>4</sup>

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. Nadjji 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. Anderson LVB. Multiplex Western blot analysis of the muscular dystrophy proteins. Chapter 22, p369–386, in Muscular Dystrophy: Methods and Protocols (number 43 in the Methods in Molecular Medicine series), edited by Bushby KMD & Anderson LVB. 2001. Humana Press: Totowa, New Jersey.
6. Mahjneh I, Marconi G, Bushby K, et al. Dysferlinopathy (LGMD2B): a 23-year follow-up study of 10 patients homozygous for the same frameshifting dysferlin mutations. Neuromuscular Disorders. 2001; 11:20–26.
7. Pogue R, Anderson LVB, Pyle A, et al. Strategy for mutation analysis in the autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(1):80–87.
8. Pollitt C, Anderson LVB, Pogue R, et al. The phenotype of calpainopathy: diagnosis based on a multidisciplinary approach. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(3):287–296.
9. Anderson LVB, Harrison RM, Pogue R, et al. Secondary reduction in calpain 3 expression in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B and Miyoshi myopathy (primary dysferlinopathies). Neuromuscular Disorders. 2000; 10(8):553–559.

10. Auranen M, Rapola J, Pihko H, et al. Muscle membrane-skeleton protein changes and histopathological characterization of muscle-eye-brain disease. *Neuromuscular Disorders*. 2000; 10(1):16–23.
11. Bornemann A and Anderson LVB. Diagnostic protein expression in human muscle biopsies. *Brain Pathology*. 2000; 10:193–214.
12. Anderson LVB. Immunomarkers for molecular mass. *Neuromuscular Disorders*. 1999; 9(6-7):421–422.
13. Anderson LVB and Davison K. Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins. *American Journal of Pathology*. 1999; 154(4):1017–1022.
14. Anderson LVB, Davison K, Moss JA, et al. Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development. *Human Molecular Genetics*. 1999; 8(5):855–861.
15. Weiler T, Bashir R, Anderson LVB, et al. Identical mutation in patients with limb girdle muscle dystrophy type 2B or Miyoshi myopathy suggests a role for modifier gene(s). *Human Molecular Genetics*. 1999; 8(5):871–877.
16. Sewry CA, Taylor J, Anderson LVB, et al. Abnormalities in alpha-, beta- and gamma-sarcoglycan in patients with limb-girdle muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders*. 1996; 6(6):467–474.
17. Vainzof M, Passos-Bueno MR, Canovas M, et al. The sarcoglycan complex in the six autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Human Molecular Genetics*. 1996; 5(12):1963–1969.
18. Matthews PM, Benjamin D, Bakel IV, et al. Muscle X-inactivation patterns and dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy carriers. *Neuromuscular Disorders*. 1995; 5(3):209–220.
19. Heald A, Anderson LVB, Bushby KMD, et al. Becker muscular dystrophy with onset after 60 years. *Neurology*. 1994; 44:2388–2390.
20. Bushby KMD, Goodship JA, Nicholson LVB, et al. Variability in clinical, genetic and protein abnormalities in manifesting carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders*. 1993; 3(1):57–64.

### **Amendements Apportés à la Version Précédente**

Non applicable.

### **Date de Publication**

12 octobre 2016

# Méthodologie immunohistochimique pour l'utilisation des anticorps Novocastra™ sur des tissus musculaires congelés.

## Réactifs nécessaires mais non fournis

1. Solvants standard utilisés en immunohistochimie.
2. Tampon Tris (TBS) 50 mM, pH 7,6.
3. Diluant anticorps – sérum normal dilué de façon optimale dans du TBS.
4. Sérums normaux provenant de diverses espèces chez lesquelles l'anticorps secondaire est cultivé.
5. Anticorps secondaire conjugué à la peroxydase - utiliser selon les recommandations du fabricant.
6. Tétrachlorhydrate de 3,3'-diaminobenzidine (DAB) - utiliser selon les recommandations du fabricant.
7. Milieu de montage - utiliser selon les recommandations du fabricant.

## Équipements nécessaires mais non fournis

1. Incubateur réglé à 25 °C.
2. Équipements généraux de laboratoire d'immunohistochimie.
3. Ventilateur électrique pour sécher les lames à l'air.

## Solutions de restauration des antigènes (voir Recommandations d'utilisation)

Non applicables sur des coupes congelées.

## 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 25 °C.

1. Découper et monter des coupes de 4 à 10 µm sur des lames revêtues d'un adhésif adapté au tissu et laisser sécher à l'air pendant une heure.
2. Incuber les coupes avec l'anticorps primaire dilué de façon optimale (**voir Recommandations d'utilisation**).
3. Laver dans du tampon TBS pendant 2 fois pendant 5 minutes sous agitation légère.
4. Incuber les coupes dans l'anticorps secondaire conjugué à la peroxydase approprié.
5. Laver dans du tampon TBS pendant 2 fois pendant 5 minutes sous agitation légère.
6. Incuber les lames dans le DAB.
7. Rincer les lames à l'eau propre.
8. Déshydrater, assécher et monter les coupes.

## Amendements apportés à la version précédente

Non applicable.

## Date de publication

5 février 2004 (CEprotocol/Frozen Muscle).

# Novocastra™ Anticorpo Monoclonale Murino Liofilizzato

## Dystrophin (C-terminus)

### Codice Del Prodotto: NCL-DYS2

#### Uso Previsto

*Per uso diagnostico in vitro.*

NCL-DYS2 è destinato all'identificazione qualitativa in microscopia ottica della distrofina (regione C-terminale) mediante immunistochimica. 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 immunistochimica (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

Dy8/6C5

#### Immunogeno

Polipeptide sintetico formato dagli ultimi 17 aminoacidi dell'estremità carbossilica della sequenza della distrofina umana.

#### Specificità

Reagisce intensamente con l'estremità carbossilica (aminoacidi 3669–3685) della distrofina umana. Il clone crossreagisce inoltre con la distrofina del tessuto muscolare scheletrico, cardiaco e liscio di topo, di ratto, di coniglio, di cane, di pollo e di criceto normali. Non si osserva alcuna reattività crociata con il tessuto di topo mdx. Il clone crossreagisce molto debolmente con la distrofina di maiale.

#### Composizione Del Reagente

NCL-DYS2 è un supernatante liofilizzato di coltura tissutale, contenente 15 mM di sodio azide come conservante. L'utente deve ricostituire il contenuto del flacone con il volume appropriato di acqua distillata sterile, come indicato sull'etichetta del flacone stesso.

#### Classe Ig

IgG1

#### Concentrazione Proteica Totale

Total Protein

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

#### Concentrazione Anticorpale

Superiore o uguale a 32,4 mg/l, come determinato mediante test ELISA. Consultare l'etichetta del flacone per la concentrazione di Ig specifica del lotto.

#### Raccomandazioni Per L'uso

Immunistochimica (vedere **D. Metodologia**) sulle sezioni congelate. Diluizione raccomandata: 1:20 per 60 minuti a 25 °C. Queste raccomandazioni costituiscono delle semplici linee guida; spetta al singolo utente stabilire la diluizione di lavoro ottimale.

#### Conservazione E Stabilità

Conservare l'anticorpo, nella confezione ancora integra, a 2–8 °C. In queste condizioni, il prodotto non subisce perdite significative di prestazione fino alla data di scadenza, indicata sull'etichetta del flacone. Non usare dopo la data di scadenza, indicata sull'etichetta del flacone. L'anticorpo ricostituito rimane stabile per almeno due mesi, se conservato a 2–8 °C. Per la conservazione a lungo termine, si raccomanda di congelare aliquote dell'anticorpo a -20 °C (non si raccomanda l'uso di congelatori frost-free, cioè senza brina). Evitare di congelare e scongelare ripetutamente. Preparare le diluizioni di lavoro il giorno stesso dell'utilizzazione. Immediatamente dopo l'uso, raffreddare di nuovo a 2–8 °C. Condizioni di conservazione diverse da quelle sopra specificate vanno verificate dall'utente.

#### Preparazione Del Campione Biologico

Congelare i blocchetti di tessuto campione in isopentano raffreddato dall'azoto liquido (vedere "Avvertenze e precauzioni"). I campioni biologici non richiedono l'ulteriore fissazione, ma vanno inclusi in OCT™ compound (Sakura, codice del prodotto Tissue-Tek 4583).

## Avvertenze E Precauzioni

### **Novocastra Lyophilised Antibodies**

Contiene una miscela di: Azoturo Di Sodio (<10%), Benzilpenicillin Sodium (<10%), Streptomycin Sulphate (<10%).

Avvertenze: Pericolo.

H302: Nocivo se ingerito.  
H317: Può provocare una reazione allergica cutanea.  
H334: Può provocare sintomi allergici o asmatici o difficoltà respiratorie se inalato.  
H411: Tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.  
EUH032: A contatto con acidi libera gas molto tossici.

P261: Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/ gli aerosol.  
P264: Lavare accuratamente mani dopo l'uso.  
P270: Non mangiare, né bere, né fumare durante l'uso.  
P272: Gli indumenti da lavoro contaminati non devono essere portati fuori dal luogo di lavoro.  
P273: Non disperdere nell'ambiente.  
P280: Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/ il viso.  
P284: [Quando la ventilazione del locale è insufficiente] indossare un apparecchio di protezione respiratoria.  
P301+312: IN CASO DI INGESTIONE: contattare un CENTRO ANTIVELENI/un medico in caso di malessere.  
P302+352: IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua e sapone.  
P304+340: IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione.  
P330: Sciacquare la bocca.  
P333+313: In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.  
P342+311: In caso di sintomi respiratori: contattare un CENTRO ANTIVELENI/un medico.  
P362+364: Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.  
P391: Raccogliere il materiale fuoriuscito.  
P501: Smaltire il prodotto/recipiente in un punto di raccolta rifiuti pericolosi o speciali.

Questo reagente è stato preparato dal supernatante di coltura cellulare. Trattandosi di un prodotto biologico, va maneggiato con cautela. Questo reagente contiene sodio azide. Una scheda di sicurezza del prodotto (MSDS) è disponibile su richiesta o dal sito [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com)

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

Prima e dopo la fissazione, i campioni biologici e tutti i materiali ad essi esposti vanno trattati come potenzialmente infettanti e smaltiti con le appropriate precauzioni.<sup>1</sup> 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.

A causa della sua temperatura estremamente bassa, l'azoto liquido può provocare ustioni da freddo; si raccomanda l'uso di indumenti protettivi (es. guanti, visiera). Operare in ambiente ben ventilato.

L'isopentano è facilmente infiammabile e nocivo per ingestione e per inalazione. Inoltre, è irritante per la pelle e per gli occhi e, ad alte concentrazioni, è un narcotico.

### **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 sui campioni biologici autoptici/bioptici/chirurgici devono essere congelati il più rapidamente possibile, 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.<sup>2</sup>

Il tessuto raccomandato per il controllo positivo è il muscolo umano striato normale.

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 non è stato valutato.

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 aspecifica.<sup>3</sup> 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-DYS2. 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 Dy8/6C5 mette in evidenza un epitopo all'estremità carbossilica della distrofina umana, vicino al lato citoplasmatico del sarcolemma del muscolo umano normale.

#### Tessuti tumorali

Il clone Dy8/6C5 è stato impiegato in studi di immunostochimica e di immunoblotting condotti su oltre 965 pazienti, per mettere in evidenza il deficit della proteina da 427 kD, distrofina.

#### L'uso di NCL-DYS2 è consigliato per l'identificazione della distrofina umana (regione C-terminale) mediante immunostochimica.

### **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.<sup>4</sup>

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

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

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

### **Riferimenti Bibliografici Di Base**

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadj 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. Anderson LVB. Multiplex Western blot analysis of the muscular dystrophy proteins. Chapter 22, p369–386, in Muscular Dystrophy: Methods and Protocols (number 43 in the Methods in Molecular Medicine series), edited by Bushby KMD & Anderson LVB. 2001. Humana Press: Totowa, New Jersey.
6. Mahjneh I, Marconi G, Bushby K, et al. Dysferlinopathy (LGMD2B): a 23-year follow-up study of 10 patients homozygous for the same frameshifting dysferlin mutations. Neuromuscular Disorders. 2001; 11:20–26.
7. Pogue R, Anderson LVB, Pyle A, et al. Strategy for mutation analysis in the autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(1):80–87.
8. Pollitt C, Anderson LVB, Pogue R, et al. The phenotype of calpainopathy: diagnosis based on a multidisciplinary approach. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(3):287–296.
9. Anderson LVB, Harrison RM, Pogue R, et al. Secondary reduction in calpain 3 expression in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B and Miyoshi myopathy (primary dysferlinopathies). Neuromuscular Disorders. 2000; 10(8):553–559.

10. Auranen M, Rapola J, Pihko H, et al. Muscle membrane-skeleton protein changes and histopathological characterization of muscle-eye-brain disease. *Neuromuscular Disorders*. 2000; 10(1):16–23.
11. Bornemann A and Anderson LVB. Diagnostic protein expression in human muscle biopsies. *Brain Pathology*. 2000; 10:193–214.
12. Anderson LVB. Immunomarkers for molecular mass. *Neuromuscular Disorders*. 1999; 9(6-7):421–422.
13. Anderson LVB and Davison K. Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins. *American Journal of Pathology*. 1999; 154(4):1017–1022.
14. Anderson LVB, Davison K, Moss JA, et al. Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development. *Human Molecular Genetics*. 1999; 8(5):855–861.
15. Weiler T, Bashir R, Anderson LVB, et al. Identical mutation in patients with limb girdle muscle dystrophy type 2B or Miyoshi myopathy suggests a role for modifier gene(s). *Human Molecular Genetics*. 1999; 8(5):871–877.
16. Sewry CA, Taylor J, Anderson LVB, et al. Abnormalities in alpha-, beta- and gamma-sarcoglycan in patients with limb-girdle muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders*. 1996; 6(6):467–474.
17. Vainzof M, Passos-Bueno MR, Canovas M, et al. The sarcoglycan complex in the six autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Human Molecular Genetics*. 1996; 5(12):1963–1969.
18. Matthews PM, Benjamin D, Bakel IV, et al. Muscle X-inactivation patterns and dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy carriers. *Neuromuscular Disorders*. 1995; 5(3):209–220.
19. Heald A, Anderson LVB, Bushby KMD, et al. Becker muscular dystrophy with onset after 60 years. *Neurology*. 1994; 44:2388–2390.
20. Bushby KMD, Goodship JA, Nicholson LVB, et al. Variability in clinical, genetic and protein abnormalities in manifesting carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders*. 1993; 3(1):57–64.

### **Modifiche Alla Pubblicazione Precedente**

Non applicabile.

### **Data Di Pubblicazione**

12 ottobre 2016

# Metodologia immunoistochimica per l'uso di anticorpi Novocastra™ su tessuto muscolare congelato.

## Reagenti necessari ma non forniti

1. Solventi standard utilizzati in immunoistochimica.
2. Tampone Tris salino (TBS) 50 mM a pH 7,6.
3. Diluente anticorpale - siero normale diluito in maniera ottimale in TBS.
4. Sieri normali delle specie da cui si è ottenuto l'anticorpo secondario.
5. Anticorpo secondario coniugato con perossidasi - usare secondo le raccomandazioni del produttore.
6. 3,3' diaminobenzidina tetraidrocloruro (DAB) - preparare ed usare secondo le raccomandazioni del produttore.
7. Mezzo di montaggio - usare secondo le raccomandazioni del produttore.

## Attrezzature necessarie ma non fornite

1. Set incubatore a 25 °C.
2. Attrezzature di base del laboratorio di immunoistochimica.
3. Ventilatore elettrico per asciugare i vetrini.

## Soluzioni per smascheramento antigenico (vedere Raccomandazioni per l'uso)

Non si applica alle sezioni congelate.

## Metodologia

Prima di intraprendere questa metodologia, l'utente deve acquisire esperienza con le tecniche immunoistochimiche. Gli utenti devono determinare le diluizioni ottimali degli anticorpi. Se non indicato diversamente, tutte le fasi vanno condotte alla temperatura di 25 °C.

1. Tagliare e montare sezioni dallo spessore di 4–10 µm su vetrini ricoperti con un adatto adesivo tissutale e lasciar asciugare all'aria per circa un'ora.
2. Incubare le sezioni con anticorpo primario diluito in maniera ottimale (vedere Raccomandazioni per l'uso).
3. Lavare 2 volte in tampone TBS per 5 minuti, scotendo delicatamente.
4. Incubare le sezioni con un appropriato anticorpo secondario coniugato con perossidasi.
5. Lavare 2 volte in tampone TBS per 5 minuti, scotendo delicatamente.
6. Incubare i vetrini in DAB.
7. Sciacquare i vetrini in acqua pulita.
8. Disidratare, pulire e montare le sezioni.

## Modifiche alla pubblicazione precedente

Non applicabile.

## F. Data di pubblicazione

5 Febbraio 2004 (CEprotocol/Frozen Muscle).



# Novocastra™ Lyophilisierter Monoklonaler Maus-Antikörper Dystrophin (C-terminus) Produkt-Nr.: NCL-DYS2

## Verwendungszweck

Für *in-vitro*-Diagnostik.

NCL-DYS2 ist für den qualitativen Nachweis von Dystrophin (C-Terminus) mittels Lichtmikroskopie und Immunhistochemie vorgesehen. 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

Dy8/6C5

## Immunogen

Synthetisches Polypeptid, das aus den letzten 17 Aminosäuren am Carboxy-Terminus der humanen Dystrophin-Sequenz besteht.

## Spezifität

Zeigt eine starke Reaktion mit dem Carboxy-Terminus (zwischen den Aminosäuren 3669 und 3685) des humanen Dystrophins. Reagiert außerdem stark mit Skelett-, Herz- und Glattmuskel-Dystrophin aus normalen Geweben von Maus, Ratte, Kaninchen, Hund, Huhn und Hamster. Eine Kreuzreaktivität mit mdx-Mausgewebe wurde nicht beobachtet. Es besteht eine sehr schwache Kreuzreaktivität mit Schweine-Dystrophin.

## Reagenzzusammensetzung

NCL-DYS2 ist ein lyophilisierter Gewebekulturrüberstand, der 15 mmol/l Natriumazid als Konservierungsmittel enthält. Der Benutzer muss den Inhalt des Fläschchens mit dem korrekten Volumen sterilen, destillierten Wassers entsprechend den Angaben auf dem Produktetikett rekonstituieren.

## Ig-Klasse

IgG1

## Gesamtproteinkonzentration Total Protein

Siehe Angaben auf dem Produktetikett bezüglich der chargenspezifischen Gesamtproteinkonzentration.

## Antikörperkonzentration

Größer als oder gleich 32,4 mg/l laut ELISA-Bestimmung. Hinsichtlich der chargenspezifischen Ig-Konzentration siehe Angaben auf dem Produktetikett.

## Gebrauchsempfehlungen

Immunhistochemie (siehe **D. Vorgehensweise**) auf gefrorenen Schnitten. Empfohlene Verdünnung: 1:20 über einen Zeitraum von 60 Minuten bei 25 °C. Dies ist nur eine Empfehlung, und die Benutzer sollten ihre eigenen optimalen Arbeitsverdünnungen bestimmen.

## Lagerung und Stabilität

Ungeöffneten Antikörper bei 2–8 °C lagern. Unter diesen Bedingungen kommt es bis zum Ablauf des auf dem Produktetikett angegebenen Verfallsdatums zu keiner bedeutenden Verschlechterung der Produktleistung. Nach Ablauf des Verfallsdatums (auf dem Behälteretikett) darf das Produkt nicht mehr verwendet werden. Der rekonstituierte Antikörper bleibt bei einer Lagertemperatur von 2–8 °C mindestens zwei Monate lang stabil. Für eine langfristige Lagerung wird empfohlen, Aliquoten des rekonstituierten Antikörpers bei -20 °C einzufrieren (frostfreie Gefrierschränke werden nicht empfohlen). Wiederholtes Einfrieren und Auftauen muss vermieden werden. Die Arbeitsverdünnungen müssen am Tag ihrer Verwendung angesetzt werden. Nach Gebrauch sofort wieder bei 2–8 °C lagern. Lagerbedingungen, die von den oben genannten Bedingungen abweichen, müssen vom Benutzer verifiziert werden.

## Probenvorbereitung

Die Blöcke mit den Gewebeproben müssen in Isopentan, das in flüssigem Stickstoff gekühlt wurde, eingefroren werden (siehe Warnhinweise und Sicherheitsmaßnahmen). Die Proben erfordern keine weitere Fixierung, sollten jedoch in OCT™-Compound (Sakura, Produkt-Nr. Tissue-Tek 4583) eingebettet werden.

## Warnhinweise und Sicherheitsmaßnahmen

### **Novocastra Lyophilised Antibodies**

Eine Mischung aus: Natriumazid (<10%), Benzylpenicillin Natrium (<10%), Streptomycin Sulphate (<10%).

Signalwörter: Gefahr.

H302: Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.  
H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen.  
H334: Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.  
H411: Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.  
EUH032: Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.

P261: Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden.  
P264: Nach Gebrauch Hände gründlich waschen.  
P270: Bei Gebrauch nicht essen, trinken oder rauchen.  
P272: Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen.  
P273: Freisetzung in die Umwelt vermeiden.  
P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.  
P284: [Bei unzureichender Belüftung] Atemschutz tragen.  
P301+312: BEI VERSCHLUCKEN: Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt/anrufen.  
P302+352: BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen.  
P304+340: BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen.  
P330: Mund ausspülen.  
P333+313: Bei Hautreizung oder-ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.  
P342+311: Bei Symptomen der Atemwege: GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt anrufen.  
P362+364: Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.  
P391: Verschüttete Mengen aufnehmen.  
P501: Inhalt/Behälter zu einer Problemabfallsorgung zuführen.

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

Dieses Reagenz enthält Natriumazid. Ein Material Sicherheits-Datenblatt ist auf Anfrage von [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com) erhältlich.

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

Vor und nach der Fixierung sind die Proben sowie alle Materialien, die mit ihnen in Kontakt gekommen sind, als potentiell infektiös zu behandeln und daher mit entsprechender Vorsicht zu entsorgen.<sup>1</sup> 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.

Flüssiger Stickstoff verursacht aufgrund seiner extrem niedrigen Temperatur Verbrennungen. Daher müssen bei seiner Anwendung Schutzkleidung sowie Handschuhe und Schutzbrille getragen werden. Nur in einem gut belüfteten Bereich anwenden.

Isopentan ist sehr leicht entzündlich und bei Verschlucken und Einatmen gesundheitsschädlich. Es reizt außerdem Haut und Augen und wirkt bei hoher Konzentration wie ein Narkotikum.

### **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) eingefroren werden sollten.

### **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.<sup>2</sup>

Für die positive Gewebekontrolle wird normales, humanes gestreiftes Muskelgewebe 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 wurde kein Gewebetyp untersucht.

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.<sup>3</sup> 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-DYS2 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 Dy8/6C5 weist ein Epitop am Carboxy-Terminus des humanen Dystrophins nahe der Zytoplasmaseite des Sarkolemm von normalem humanem Muskelgewebe nach.

### Tumorgewebe

Klon Dy8/6C5 wurde in immunhistochemischen und Immunblottingstudien von mehr als 965 Patienten zum Nachweis eines Mangels des 427-kDa-Proteins Dystrophin verwendet.

**NCL-DYS2 wird für den Nachweis von humanem Dystrophin (C-Terminus) mittels Immunhistochemie empfohlen.**

## Allgemeine Beschränkungen

Die Immunhistochemie ist ein mehrstufiger diagnostischer Prozess, der eine spezialisierte Ausbildung auf den folgenden Gebieten erfordert: Auswahl der entsprechenden Reagenzien; Gewebeauswahl, -fixierung und -verarbeitung; Vorbereitung des IHC-Objektträgers sowie Bewertung der Färbeergebnisse.

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.<sup>4</sup>

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

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

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

## Literatur - Allgemein

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadjji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Anderson LVB. Multiplex Western blot analysis of the muscular dystrophy proteins. Chapter 22, p369–386, in Muscular Dystrophy: Methods and Protocols (number 43 in the Methods in Molecular Medicine series), edited by Bushby KMD & Anderson LVB. 2001. Humana Press: Totowa, New Jersey.
6. Mahjneh I, Marconi G, Bushby K, et al. Dysferlinopathy (LGMD2B): a 23-year follow-up study of 10 patients homozygous for the same frameshifting dysferlin mutations. Neuromuscular Disorders. 2001; 11:20–26.
7. Pogue R, Anderson LVB, Pyle A, et al. Strategy for mutation analysis in the autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(1):80–87.
8. Pollitt C, Anderson LVB, Pogue R, et al. The phenotype of calpainopathy: diagnosis based on a multidisciplinary approach. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(3):287–296.
9. Anderson LVB, Harrison RM, Pogue R, et al. Secondary reduction in calpain 3 expression in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B and Miyoshi myopathy (primary dysferlinopathies). Neuromuscular Disorders. 2000; 10(8):553–559.
10. Auranen M, Rapola J, Pihko H, et al. Muscle membrane-skeleton protein changes and histopathological characterization of muscle-eye-brain disease. Neuromuscular Disorders. 2000; 10(1):16–23.
11. Bornemann A and Anderson LVB. Diagnostic protein expression in human muscle biopsies. Brain Pathology. 2000; 10:193–214.

12. Anderson LVB. Immunomarkers for molecular mass. *Neuromuscular Disorders*. 1999; 9(6-7):421–422.
13. Anderson LVB and Davison K. Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins. *American Journal of Pathology*. 1999; 154(4):1017–1022.
14. Anderson LVB, Davison K, Moss JA, et al. Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development. *Human Molecular Genetics*. 1999; 8(5):855–861.
15. Weiler T, Bashir R, Anderson LVB, et al. Identical mutation in patients with limb girdle muscle dystrophy type 2B or Miyoshi myopathy suggests a role for modifier gene(s). *Human Molecular Genetics*. 1999; 8(5):871–877.
16. Sewry CA, Taylor J, Anderson LVB, et al. Abnormalities in alpha-, beta- and gamma-sarcoglycan in patients with limb-girdle muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders*. 1996; 6(6):467–474.
17. Vainzof M, Passos-Bueno MR, Canovas M, et al. The sarcoglycan complex in the six autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Human Molecular Genetics*. 1996; 5(12):1963–1969.
18. Matthews PM, Benjamin D, Bakel IV, et al. Muscle X-inactivation patterns and dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy carriers. *Neuromuscular Disorders*. 1995; 5(3):209–220.
19. Heald A, Anderson LVB, Bushby KMD, et al. Becker muscular dystrophy with onset after 60 years. *Neurology*. 1994; 44:2388–2390.
20. Bushby KMD, Goodship JA, Nicholson LVB, et al. Variability in clinical, genetic and protein abnormalities in manifesting carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders*. 1993; 3(1):57–64.

### **Änderungen zur vorhergehenden Ausgabe**

Keine.

### **Ausgabedatum**

12 Oktober 2016

# Immunhistochemisches Vorgehen beim Einsatz von Novocastra™-Antikörpern für gefrorenes Muskelgewebe.

## A. Zusätzlich benötigte, aber nicht mitgelieferte Reagenzien

1. In der Immunhistochemie übliche Standardlösungsmittel.
2. 50 mmol/l Tris-gepufferte physiologische Kochsalzlösung (Tris-Buffered Saline, TBS) pH-Wert 7,6.
3. Antikörper-Verdünnungsmittel – optimal in TBS verdünntes Normalserum.
4. Normalseren der Spezies, in denen der sekundäre Antikörper gezüchtet wird.
5. Sekundärer, peroxidase-konjugierter Antikörper – gemäß den Empfehlungen des Herstellers zu verwenden.
6. 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) - gemäß den Empfehlungen des Herstellers anzusetzen und zu verwenden.
7. Eindeckmedium - gemäß den Empfehlungen des Herstellers zu verwenden.

## Zusätzlich benötigte, aber nicht mitgelieferte Ausrüstung

1. Inkubator, auf 25 °C eingestellt.
2. Übliche immunhistochemische Laborausstattung.
3. Elektroventilator zum Lufttrocknen von Objektträgern.

## Antigen-Retrieval-Lösungen (siehe Gebrauchsempfehlungen)

Nicht für gefrorene Schnitte zutreffend.

## Vorgehensweise

Vor Anwendung dieser Methodik müssen die Benutzer in immunhistochemischen Techniken unterrichtet werden.

Die Benutzer müssen die optimale Verdünnung für die Antikörper bestimmen. Sofern nicht anderweitig vorgegeben, werden alle Schritte bei Raumtemperatur (25 °C) durchgeführt.

1. Schnitte von 4–10 µm schneiden und auf Objektträgern aufbringen, die mit einem geeigneten Gewebefixationsmaterial beschichtet sind, und mindestens eine Stunde lang an der Luft trocknen lassen.
2. Die Schnitte mit optimal verdünntem primären Antikörper inkubieren (siehe Gebrauchsempfehlungen)
3. Die Schnitte in TBS-Puffer 2 x 5 Minuten lang mit sanfter Kippbewegung spülen.
4. Die Schnitte mit einem entsprechenden peroxidase-konjugierten, sekundären Antikörper inkubieren.
5. Die Schnitte in TBS-Puffer 2 x 5 Minuten lang mit sanfter Kippbewegung spülen.
6. Die Objektträger in DAB inkubieren.
7. Die Objektträger mit sauberem Wasser abspülen.
8. Die Schnitte dehydrieren, säubern und aufbringen.

## E. Änderungen zur vorhergehenden Ausgabe

Keine.

## F. Ausgabedatum

5. Februar 2004 (CEprotocol/Frozen Muscle).

# Novocastra™ Anticuerpos Monoclonal Liofilizado de Ratón Dystrophin (C-terminus) Código De Producto: NCL-DYS2

## Indicaciones De Uso

*Para uso diagnóstico in vitro.*

NCL-DYS2 está indicado para la identificación cualitativa por microscopía óptica de distrofina (terminal C) mediante inmunohistoquímica. 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 cubreobjetos. 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

Dy8/6C5

## Inmunógeno

Polipéptido sintético que consta de los últimos 17 aminoácidos del extremo carboxiterminal de la secuencia de la distrofina humana.

## Especificidad

Reacciona intensamente con el extremo carboxiterminal (entre los aminoácidos 3669 y 3685) de la distrofina humana. Además, reacciona intensamente de forma cruzada con la distrofina de músculo esquelético, cardíaco y liso de ratón, rata, conejo, perro, pollo y hámster. No presenta reactividad cruzada con el tejido de ratón mdx. Reacciona de forma cruzada muy débilmente con la distrofina de cerdo.

## Composición Del Reactivo

NCL-DYS2 es un sobrenadante de cultivo tisular liofilizado que contiene azida sódica 15 mM como conservante. El usuario debe reconstituir el contenido del vial con el volumen correcto de agua destilada estéril que se indica en la etiqueta del vial.

## Clase de Ig

IgG1

## Concentración Total De Proteína Total Protein

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

## Concentración De Anticuerpo

Igual o superior a 32,4 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 **D. Metodología**) con secciones congeladas. Dilución sugerida: 1:20 durante 60 minutos a 25 °C. Ésta es tan solo una pauta y cada usuario debe determinar sus propias diluciones de trabajo óptimas.

## Almacenamiento Y Estabilidad

Almacene el anticuerpo sin abrir a una temperatura de 2–8 °C. Bajo estas condiciones, no hay pérdida significativa de la eficacia del producto hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial. No lo utilice después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial. El anticuerpo reconstituido es estable durante al menos dos meses si se almacena a una temperatura de 2–8 °C. Para el almacenamiento de larga duración, se recomienda almacenar alícuotas del anticuerpo reconstituido congeladas a -20 °C (no se recomiendan los congeladores libres de escarcha ("frost free")). Debe evitar congelar y descongelar repetidamente el producto. Prepare las diluciones de trabajo el día en que las vaya a utilizar. Devuélvalo a 2–8 °C inmediatamente después de su uso. Cualesquiera condiciones de almacenamiento que no sean las arriba especificadas deben ser verificadas por el usuario.

## Preparación De Las Muestras

Congele los bloques de tejido en isopentano enfriado en nitrógeno líquido (consulte Advertencias y precauciones). Las muestras no requieren mayor fijación, pero deben incluirse en el compuesto OCT™ (Sakura, N° de producto Tissue-Tek 4583).

## Advertencias Y Precauciones

### Novocastra Lyophilised Antibodies

Contiene una mezcla de:  
Aziduro De Sodio (<10%),  
Benzylpenicillin Sodium (<10%),  
Streptomycin Sulphate (<10%).  
Palabras de advertencia: Peligro

H302: Nocivo en caso de ingestión.  
H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel.  
H334: Puede provocar síntomas de alergia o asma o dificultades respiratorias en caso de inhalación.  
H411: Tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.  
EUH032: En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos.

P261: Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol.  
P264: Lavarse manos concienzudamente tras la manipulación.  
P270: No comer, beber ni fumar durante su utilización.  
P272: Las prendas de trabajo contaminadas no podrán sacarse del lugar de trabajo.  
P273: Evitar su liberación al medio ambiente.  
P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.  
P284: [En caso de ventilación insuficiente,] llevar equipo de protección respiratoria.  
P301+312: EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar a un CENTRO DE TOXICOLOGIA/médico/si la persona se encuentra mal.  
P302+352: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.  
P304+340: EN CASO DE INHALACIÓN: Transportar a la persona al aire libre y mantenerla en una posición que le facilite la respiración.  
P330: Enjuagarse la boca.  
P333+313: En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.  
P342+311: En caso de síntomas respiratorios: Llamar a un CENTRO DE TOXICOLOGIA/médico.  
P362+364: Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.  
P391: Recoger el vertido.  
P501: Eliminar el contenido/el recipiente en un punto de recogida pública de residuos especiales o peligrosos.

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

Este reactivo contiene azida sódica. Está disponible una Hoja de información sobre la seguridad del material, previa petición, o en [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com)

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

Las muestras, antes y después de ser fijadas, así como todos los materiales expuestos a ellas, deben manipularse como susceptibles de transmitir una infección, y se deben desechar tomando las precauciones adecuadas.<sup>1</sup> 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.

El nitrógeno líquido, a causa de su temperatura extremadamente baja, causa quemaduras, por lo que debe ponerse ropa protectora, incluidos guantes y visor, para manipularlo. Úsese en un área bien ventilada.

El isopentano es altamente inflamable, y dañino por ingestión e inhalación. Además, irrita los ojos y la piel, y es narcótico a altas concentraciones.

### 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, congeladas 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.<sup>2</sup>

El tejido de control positivo recomendado es músculo estriado normal humano.

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.

No se ha evaluado el tejido de control negativo recomendado.

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.<sup>3</sup> También pueden observarse falsos positivos causados por la unión no inmunológica a proteínas o a productos de reacción del sustrato. Estos falsos positivos pueden estar causados también por enzimas endógenas tales como la pseudoperoxidasa (eritrocitos), la peroxidasa endógena (citocromo C), o la biotina endógena (por ejemplo, de hígado, mama, cerebro, riñón), en función del tipo de inmunotinción utilizada. Para diferenciar la actividad de las enzimas endógenas o los enlaces no específicos de las enzimas de la inmunoreactividad específica, pueden teñirse otros tejidos del paciente exclusivamente con cromógeno sustrato o con complejos enzimáticos (avidina-biotina, estreptavidina, polímeros marcados) y cromógeno sustrato respectivamente. Si se produce una tinción específica del control tisular negativo, los resultados de las muestras de los pacientes deben considerarse no válidos.

## Control De Reactivo Negativo

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

## Tejido Del Paciente

Examine las muestras del paciente o pacientes teñidas con NCL-DYS2 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 está 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 Dy8/6C5 detecta un epítipo presente en el extremo carboxiterminal de la distrofina humana, cerca del lado citoplásmico del sarcolema de músculo normal humano.

### Tejidos tumorales

El clon Dy8/6C5 se ha utilizado en estudios inmunohistoquímicos y de inmunoblotting de más de 965 pacientes a fin de identificar una deficiencia de la proteína distrofina (427 kD).

### NCL-DYS2 está recomendado para la identificación de distrofina humana (terminal C) mediante inmunohistoquímica.

## 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.<sup>4</sup>

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

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

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

## Bibliografía - General

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F, Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadjji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Anderson LVB. Multiplex Western blot analysis of the muscular dystrophy proteins. Chapter 22, p369–386, in Muscular Dystrophy: Methods and Protocols (number 43 in the Methods in Molecular Medicine series), edited by Bushby KMD & Anderson LVB. 2001. Humana Press: Totowa, New Jersey.
6. Mahjneh I, Marconi G, Bushby K, et al. Dysferlinopathy (LGMD2B): a 23-year follow-up study of 10 patients homozygous for the same frameshifting dysferlin mutations. Neuromuscular Disorders. 2001; 11:20–26.
7. Pogue R, Anderson LVB, Pyle A, et al. Strategy for mutation analysis in the autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(1):80–87.
8. Pollitt C, Anderson LVB, Pogue R, et al. The phenotype of calpainopathy: diagnosis based on a multidisciplinary approach. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(3):287–296.
9. Anderson LVB, Harrison RM, Pogue R, et al. Secondary reduction in calpain 3 expression in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B and Miyoshi myopathy (primary dysferlinopathies). Neuromuscular Disorders. 2000; 10(8):553–559.
10. Auranen M, Rapola J, Pihko H, et al. Muscle membrane-skeleton protein changes and histopathological characterization of muscle-eye-brain disease. Neuromuscular Disorders. 2000; 10(1):16–23.



11. Bornemann A and Anderson LVB. Diagnostic protein expression in human muscle biopsies. *Brain Pathology*. 2000; 10:193–214.
12. Anderson LVB. Immunomarkers for molecular mass. *Neuromuscular Disorders*. 1999; 9(6-7):421–422.
13. Anderson LVB and Davison K. Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins. *American Journal of Pathology*. 1999; 154(4):1017–1022.
14. Anderson LVB, Davison K, Moss JA, et al. Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development. *Human Molecular Genetics*. 1999; 8(5):855–861.
15. Weiler T, Bashir R, Anderson LVB, et al. Identical mutation in patients with limb girdle muscle dystrophy type 2B or Miyoshi myopathy suggests a role for modifier gene(s). *Human Molecular Genetics*. 1999; 8(5):871–877.
16. Sewry CA, Taylor J, Anderson LVB, et al. Abnormalities in alpha-, beta- and gamma-sarcoglycan in patients with limb-girdle muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders*. 1996; 6(6):467–474.
17. Vainzof M, Passos-Bueno MR, Canovas M, et al. The sarcoglycan complex in the six autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Human Molecular Genetics*. 1996; 5(12):1963–1969.
18. Matthews PM, Benjamin D, Bakel IV, et al. Muscle X-inactivation patterns and dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy carriers. *Neuromuscular Disorders*. 1995; 5(3):209–220.
19. Heald A, Anderson LVB, Bushby KMD, et al. Becker muscular dystrophy with onset after 60 years. *Neurology*. 1994; 44:2388–2390.
20. Bushby KMD, Goodship JA, Nicholson LVB, et al. Variability in clinical, genetic and protein abnormalities in manifesting carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders*. 1993; 3(1):57–64.

### **Correcciones A La Publicación Anterior**

No aplicable.

### **Fecha De Publicación**

12 de octubre de 2016

# Metodología inmunohistoquímica para el uso de anticuerpos Novocastra™ con tejido muscular congelado.

## Reactivos necesarios que no se suministran

1. Solventes estándar utilizados en inmunohistoquímica.
2. Solución salina tamponada con Tris 50 mM (TBS), pH 7,6.
3. Diluyente de anticuerpos - suero normal diluido óptimamente en TBS.
4. Sueros normales de la especie en la que se ha producido el anticuerpo secundario.
5. Anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa - utilizado de la forma recomendada por el fabricante.
6. Tetraclorhidrato de 3,3' diaminobenzidina (DAB) - preparado y utilizado de la forma recomendada por el fabricante.
7. Medio de montaje - utilizado de la forma recomendada por el fabricante.

## Equipo necesario que no se suministra

1. Incubador ajustado a 25 °C.
2. Equipo de laboratorio utilizado generalmente para inmunohistoquímica.
3. Ventilador eléctrico para secar los portaobjetos al aire.

## Soluciones de recuperación de antígenos (consulte las Recomendaciones de uso)

No aplicables a secciones congeladas.

## Metodología

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

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

1. Corte y monte secciones de 4-10 µm en portaobjetos revestidos de un adhesivo de tejidos adecuado y seque al aire durante al menos una hora.
2. Incube las secciones con el anticuerpo primario óptimamente diluido (**consulte las Recomendaciones de uso**).
3. Lave en tampón TBS durante 2 x 5 minutos con sacudimiento suave.
4. Incube las secciones en el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa apropiado.
5. Lave en tampón TBS durante 2 x 5 minutos con sacudimiento suave.
6. Incube los portaobjetos en DAB.
7. Lave los portaobjetos en agua limpia.
8. Deshidrate, aclare y monte las secciones.

## Correcciones a la publicación anterior

No aplicable.

## Fecha de publicación

5 de febrero de 2004 (CEprotocol/Frozen Muscle)

# Novocastra™ Anticorpo Monoclonal Lofilizado de Ratinho

## Dystrophin (C-terminus)

### Código Do Produto: NCL-DYS2

#### Utilização prevista

*Para utilização em diagnósticos in vitro.*

NCL-DYS2 destina-se à identificação qualitativa, por microscopia óptica, da distrofina (terminal C) através de imuno-histoquímica. A interpretação clínica de qualquer coloração ou da sua ausência deve ser complementada por estudos morfológicos empregando os devidos controlos e deve ser avaliada por um patologista qualificado, dentro do contexto do historial clínico do doente e de outros testes de diagnóstico.

#### Princípio Do Procedimento

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

#### Clone

Dy8/6C5

#### Imunogénio

Polipéptido sintético constando dos últimos 17 aminoácidos do carboxi-terminal da sequência da distrofina humana.

#### Especificidade

Reage fortemente com o domínio do carboxi-terminal (entre os aminoácidos 3669 e 3685) da distrofina humana. O clone tem ainda uma forte reacção cruzada com a distrofina esquelética, cardíaca e do músculo liso do ratinho, rato, coelho, cão, galinha e hamster normais. Não se dá nenhuma reacção cruzada com o tecido mdx do ratinho. Tem uma reacção cruzada muito fraca com a distrofina do suíno.

#### Composição Do Reagente

NCL-DYS2 é um sobrenadante liofilizado de uma cultura de tecido contendo 15 mM de azida de sódio como produto conservante.

O utilizador deve reconstituir o conteúdo da ampola com o volume correcto de água destilada esterilizada, conforme indicado no rótulo da ampola.

#### Classe De Ig

IgG1

#### Concentração Total De Proteína Total Protein

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

#### Concentração De Anticorpo

Maior que ou igual a 32,4 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 **D. Metodologia**) em secções congeladas. Diluição sugerida: 1:20 durante 60 minutos a 25 °C. Esta recomendação é apenas uma directriz e o utilizador deve determinar qual a diluição ideal para o trabalho específico.

#### Armazenamento E Estabilidade

Armazenar o anticorpo em embalagem não aberta a 2–8 °C. Nessas condições, não se regista uma redução significativa no desempenho do produto até ao prazo de validade indicado no rótulo da ampola. Não utilizar após o prazo de validade indicado no rótulo do recipiente. O anticorpo reconstituído permanece estável durante pelo menos dois meses, desde que seja armazenado a uma temperatura entre 2–8 °C. Em caso de armazenamento a longo prazo, recomenda-se que as alíquotas do anticorpo reconstituído sejam armazenadas congeladas a -20 °C (não se recomenda a utilização de congeladores do tipo auto-descongelador). Deve evitar-se congelar e descongelar repetidamente o produto. Preparar as diluições de trabalho no próprio dia do seu emprego. Retornar à temperatura de 2–8 °C imediatamente após a utilização. As condições de armazenamento que diferirem das que se encontram especificadas acima devem ser verificadas pelo utilizador.

#### Preparação Das Amostras

Congelar blocos de tecido da amostra em isopentano arrefecido em nitrogénio líquido (ver os Avisos e precauções). As amostras não requerem mais nenhuma fixação, mas devem ser envolvidas no composto OCT™ (Sakura, Produto n.º Tissue-Tek 4583).

## Avisos E Precauções

### Novocastra Lyophilised Antibodies

Contém uma mistura de:  
Azoteto De Sodio (<10%),  
Benzylpenicillin Sodium (<10%),  
Streptomycin Sulphate (<10%).  
Palavras-sinal: Perigo.

H302: Nocivo por ingestão.  
H317: Pode provocar uma reação alérgica cutânea.  
H334: Quando inalado, pode provocar sintomas de alergia ou de asma ou dificuldades respiratórias.  
H411: Tóxico para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.  
EUH032: Em contacto com ácidos liberta gases muito tóxicos.

P261: Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.  
P264: Lavar mãos cuidadosamente após manuseamento.  
P270: Não comer, beber ou fumar durante a utilização deste produto.  
P272: A roupa de trabalho contaminada não pode sair do local de trabalho.  
P273: Evitar a libertação para o ambiente.  
P280: Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial.  
P284: [Em caso de ventilação inadequada] usar protecção respiratória.  
P301+312: EM CASO DE INGESTÃO: caso sinta indisposição, contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico.  
P302+352: SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar com sabonete e água abundantes.  
P304+340: EM CASO DE INALAÇÃO: retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la numa posição que não dificulte a respiração.  
P330: Enxaguar a boca.  
P333+313: Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico.  
P342+311: Em caso de sintomas respiratórios: contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico.  
P362+364: Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a voltar a usar.  
P391: Recolher o produto derramado.  
P501: Eliminar o conteúdo/recipiente em um local autorizado para a recolha de resíduos perigosos ou especiais.

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

Este reagente contém azida sódica. Encontra-se disponível uma Ficha de Dados de Segurança do Material, mediante pedido ou através do site [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com)

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

As amostras, antes e depois da sua fixação, bem como todos os materiais expostos às mesmas, devem ser manipulados como se tivessem a capacidade de transmitir infecções e devem ser descartados com as devidas precauções.<sup>1</sup> 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.

O nitrogénio líquido causa queimaduras devido à sua temperatura excessivamente fria, e as pessoas que o manusearem devem utilizar vestuário de protecção, incluindo luvas e um visor. Utilizar o material numa área bem ventilada.

O isopentano é altamente inflamável e nocivo por ingestão e inalação. É ainda um irritante dérmico e ocular e, quando muito concentrado, é narcótico.

### 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, congeladas 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.<sup>2</sup>

O tecido de controlo positivo recomendado é o músculo estriado humano normal.

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 não foi ainda avaliado.

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.<sup>3</sup> 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-DYS2 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 Dy8/6C5 detecta um epítipo no domínio do carboxi-terminal da distrofina humana, perto da face citoplasmática do sarcolema do músculo humano normal.

#### Tecidos tumorais

O clone Dy8/6C5 foi utilizado em estudos de imunohistoquímica e immunoblotting de mais de 965 doentes para identificar uma deficiência da proteína de 427 kD, a distrofina.

#### **NCL-DYS2 está recomendado para a identificação da distrofina (terminal C) humana através de imuno-histoquímica.**

### **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.<sup>4</sup>

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, Rike F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadjji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Anderson LVB. Multiplex Western blot analysis of the muscular dystrophy proteins. Chapter 22, p369-386, in Muscular Dystrophy: Methods and Protocols (number 43 in the Methods in Molecular Medicine series), edited by Bushby KMD & Anderson LVB. 2001. Humana Press: Totowa, New Jersey.
6. Mahjneh I, Marconi G, Bushby K, et al. Dysferlinopathy (LGMD2B): a 23-year follow-up study of 10 patients homozygous for the same frameshifting dysferlin mutations. Neuromuscular Disorders. 2001; 11:20-26.
7. Pogue R, Anderson LVB, Pyle A, et al. Strategy for mutation analysis in the autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(1):80-87.
8. Pollitt C, Anderson LVB, Pogue R, et al. The phenotype of calpainopathy: diagnosis based on a multidisciplinary approach. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(3):287-296.

9. Anderson LVB, Harrison RM, Pogue R, et al. Secondary reduction in calpain 3 expression in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B and Miyoshi myopathy (primary dysferlinopathies). *Neuromuscular Disorders*. 2000; 10(8):553–559.
10. Auranen M, Rapola J, Pihko H, et al. Muscle membrane-skeleton protein changes and histopathological characterization of muscle-eye-brain disease. *Neuromuscular Disorders*. 2000; 10(1):16–23.
11. Bornemann A and Anderson LVB. Diagnostic protein expression in human muscle biopsies. *Brain Pathology*. 2000; 10:193–214.
12. Anderson LVB. Immunomarkers for molecular mass. *Neuromuscular Disorders*. 1999; 9(6-7):421–422.
13. Anderson LVB and Davison K. Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins. *American Journal of Pathology*. 1999; 154(4):1017–1022.
14. Anderson LVB, Davison K, Moss JA, et al. Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development. *Human Molecular Genetics*. 1999; 8(5):855–861.
15. Weiler T, Bashir R, Anderson LVB, et al. Identical mutation in patients with limb girdle muscle dystrophy type 2B or Miyoshi myopathy suggests a role for modifier gene(s). *Human Molecular Genetics*. 1999; 8(5):871–877.
16. Sewry CA, Taylor J, Anderson LVB, et al. Abnormalities in alpha-, beta- and gamma-sarcoglycan in patients with limb-girdle muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders*. 1996; 6(6):467–474.
17. Vainzof M, Passos-Bueno MR, Canovas M, et al. The sarcoglycan complex in the six autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Human Molecular Genetics*. 1996; 5(12):1963–1969.
18. Matthews PM, Benjamin D, Bakel IV, et al. Muscle X-inactivation patterns and dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy carriers. *Neuromuscular Disorders*. 1995; 5(3):209–220.
19. Heald A, Anderson LVB, Bushby KMD, et al. Becker muscular dystrophy with onset after 60 years. *Neurology*. 1994; 44:2388–2390.
20. Bushby KMD, Goodship JA, Nicholson LVB, et al. Variability in clinical, genetic and protein abnormalities in manifesting carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders*. 1993; 3(1):57–64.

### **Emendas Da Edição Anterior**

Não é aplicável.

### **Data De Emissão**

12 de Outubro de 2016

# Metodologia de imunocitoquímica para utilização de anticorpos Novocastra™ em tecido de músculo congelado.

## Reagentes necessários mas não fornecidos

1. Solventes comuns utilizados em imunohistoquímica.
2. 50 mM solução salina tampão Tris (TBS) pH 7,6.
3. Diluente do anticorpo – soro normal diluído em TBS.
4. Soros normais da espécie em que o anticorpo secundário tenha sido desenvolvido.
5. Anticorpo secundário conjugado com peroxidase – preparar conforme recomendado pelo fabricante.
6. 3,3' Tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB) – preparar e utilizar conforme recomendado pelo fabricante.
7. Meio de montagem – usar conforme recomendado pelo fabricante.

## Equipamento necessário mas não fornecido

1. Incubador regulado para 25 °C.
2. Equipamento geral de laboratório de imunohistoquímica.
3. Ventilador eléctrico para secagem das lâminas ao ar.

## Soluções de recuperação de antígeno (ver as Recomendações sobre a utilização)

Não se aplica às secções congeladas.

## Metodologia

Antes de intentar esta metodologia, o utilizador deve ter recebido a devida formação em técnicas de imunohistoquímica. O utilizador deve determinar quais as fórmulas de diluição ideais para os anticorpos. A não ser indicação em contrário, todas as etapas devem ser efectuadas a 25 °C.

1. Cortar e montar secções de 4–10 µm em lâminas revestidas de um tecido adesivo apropriado e secar ao ar durante pelo menos uma hora.
2. Incubar as secções com anticorpo primário optimamente diluído (ver Recomendações sobre a utilização).
3. Lavar em tampão TBX durante 2 x 5 minutos, agitando levemente.
4. Incubar as secções num anticorpo secundário apropriado, conjugado com peroxidase.
5. Lavar em tampão TBX durante 2 x 5 minutos, agitando levemente.
6. Incubar as lâminas em DAB.
7. Enxaguar as lâminas em água limpa.
8. Desidratar, soltar e montar as secções.

## E. Emendas da edição anterior

Não é aplicável.

## F. Data de emissão

5 de Fevereiro de 2004 (CEprotocol/Frozen Muscle).

# Novocastra™ Frystorkad Monoklonal Musantikropp

## Dystrophin (C-terminus)

### Produktkod: NCL-DYS2

#### **Avsedd Användning**

*För in vitro diagnostisk användning.*

NCL-DYS2 är avsedd för kvalitativ identifiering med ljusmikroskopi av dystrofin (C-terminus) genom immunhistokemi. Den kliniska tolkningen av all färgning eller dess frånvaro bör kompletteras med morfologiska undersökningar som använder korrekta kontroller och utvärderas av kvalificerad patologi 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**

Dy8/6C5

#### **Immunogen**

Syntetisk polypeptid bestående av de sista 17 aminosyrorna vid carboxy terminus av den humana dystrofinsekvensen.

#### **Specificitet**

Reagerar starkt med carboxy terminus (mellan aminosyrorna 3669 och 3685) av humant dystrofin. Korsreagerar också starkt med skelett-, hjärt- och glattmuskeldystrofin från normal mus, råtta, kanin, hund, höna och hamster. Ingen korsreaktivitet med mdx musvävnad. Korsreagerar väldigt svagt med gridystrofin.

#### **Reagensinnehåll**

NCL-DYS2 är en frystorkad supernatant från vävnadsodling som innehåller 15 mM natriumazid som konserveringsmedel. Användaren måste späda flaskans innehåll med den korrekta volymen steril destillerat vatten enligt anvisningarna på flaskans etikett.

#### **Ig-klass**

IgG1

#### **Total Proteinkoncentration** Total Protein

Se flaskans etikett för total specifik proteinkoncentration för satsen.

#### **Antikropps-koncentration**

Större än eller lika med 32,4 mg/l fastställt genom ELISA. Se flaskans etikett för specifik Ig-koncentration för satsen.

#### **Rekommendationer Vid Användning**

Immunhistokemi (se **D. Metodologi**) på frysta snitt. Föreslagen spädning: 1:20 i 60 minuter vid 25 °C. Detta är endast en riktlinje och användare bör själva fastställa den optimala bruksspädningen.

#### **Förvaring Och Stabilitet**

Förvara öppnad antikropp vid 2–8 °C. Vid dessa förhållanden sker ingen betydelsefull nedgång i produktens utförande fram till utgångsdatumet på flaskans etikett. Använd ej efter det utgångsdatum som anges på flaskans etikett. Den spädda antikroppen håller sig stabil i minst två månader om den förvaras vid 2–8 °C. Vid långvarig förvaring rekommenderas det att allkvoter av den spädda antikroppen förvaras frysta vid -20 °C (frostfria frys rekommenderas ej). Upprepad nedfrysning och upptinande bör undvikas. Förbered brukslösningar samma dag som de skall användas. Återgå till 2–8 °C direkt efter användning. Förvaringsförhållanden som skiljer sig från de ovannämnda måste kontrolleras av användaren.

#### **Preparation Av Prov**

Frys vävnadsprovblocken i isopentan nedkylt i flytande kväve (se Varningar och Försiktighetsåtgärder). Proven kräver ingen ytterligare fixering men bör bäddas in i OCT™-förening (Sakura, produktkod Tissue-Tek 4583).



## Varningar Och Försiktighetsåtgärder

### Novocastra Lyophilised Antibodies

Innehåller en blandning av: Natriumazid (<10%), Benzylpenicillin Sodium (<10%), Streptomycin Sulphate (<10%). Signalord: Fara.

H302: Skadligt vid förtäring.  
H317: Kan orsaka allergisk hudreaktion.  
H334: Kan orsaka allergi- eller astmasymtom eller andningssvårigheter vid inandning.  
H411: Giftigt för vattenlevande organismer med långtidseffekter.  
EUH032: Utvecklar mycket giftig gas vid kontakt med syra.

P261: Undvik att inandas damm/rök/gaser/dimma/ångor/sprej.  
P264: Tvätta händerna grundligt efter användning.  
P270: Åt inte, drick inte och rök inte när du använder produkten.  
P272: Nedstänkta arbetskläder får inte avlägsnas från arbetsplatsen.  
P273: Undvik utsläpp till miljön.  
P280: Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd.  
P284: [Vid otillräcklig ventilation], använd andningsskydd.  
P301+312: VID FÖRTÄRING: Vid obehag, kontakta GIFTINFORMATIONSCENTRALEN/läkare.  
P302+352: VID HUDKONTAKT: Tvätta med mycket tvål och vatten.  
P304+340: VID INANDNING: Flytta personen till frisk luft och se till att andningen underlättas.  
P330: Skölj munnen.  
P333+313: Vid hudirritation eller utslag: Sök läkarhjälp.  
P342+311: Vid besvär i luftvägarna: Kontakta GIFTINFORMATIONSCENTRALEN/läkare.  
P362+364: Ta av nedstänkta kläder och tvätta dem innan de används igen.  
P391: Samla upp spill.  
P501: Innehållet/Behållaren lämnas till samlingsställe för farligt avfall.

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

Delta reagens innehåller natriumazid. Materialsäkerhetsdatablad finns att få på begäran eller från [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com)

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

Före och efter fixering bör prover och alla material som har varit utsatta för dem hanteras som om det finns risk för att de kan överföra infektioner och kasseras med iakttagande av försiktighet.<sup>1</sup> 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.

Flytande kväve ger brännskador p.g.a. sin ytterst låga temperatur och skyddskläder, inklusive handskar och ögonskydd, skall användas vid hantering. Använd i ett väl ventilerat område.

Isopentan är högst brandfarligt och skadligt vid intagning via mun samt inhalation. Det irriterar också hud och ögon och har narkotisk effekt vid höga koncentrationer.

### 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 har frysts på samma sätt som patientprover (s).

### 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.<sup>2</sup>

Normal human tvärstrimmig muskel 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.

Rekommenderad negativ kontrollvävnad har inte utvärderats.

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.<sup>3</sup> 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-DYS2 sist. Positiv färgningsintensitet bör utvärderas inom ramen för all ospecifik bakgrunds-färgning av den negativa reagenskontrollen. Som vid alla immunhistokemiska tester betyder ett negativt resultat att antigenet inte upptäcktes och inte att det inte förekom i de analyserade cellerna/vävnaderna. Använd vid behov en antikroppspanel för att identifiera falskt negativa reaktioner.

## Förväntade Resultat

### Normal vävnad

Klon Dy8/6C5 upptäcker en epitop vid carboxy terminus av humant dystrofin nära den cytoplasmiska ytan på sarkolemma från normal human muskel.

### Tumörvävnader

Klon Dy8/6C5 har använts i immunhistokemiska och immunblottningsstudier av över 965 patienter för att identifiera brist på 427 kD-proteinet, dystrofin.

### NCL-DYS2 rekommenderas för identifiering av human dystrofin (C-terminus) genom immunhistokemi.

## 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.<sup>4</sup>

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

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

Antikroppar från Leica Biosystems Newcastle Ltd är till för användning så som anges på antingen frysta eller paraffininfärdade 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. Nadj 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. Anderson LVB. Multiplex Western blot analysis of the muscular dystrophy proteins. Chapter 22, p369–386, in Muscular Dystrophy: Methods and Protocols (number 43 in the Methods in Molecular Medicine series), edited by Bushby KMD & Anderson LVB. 2001. Humana Press: Totowa, New Jersey.
6. Mahjneh I, Marconi G, Bushby K, et al. Dysferlinopathy (LGMD2B): a 23-year follow-up study of 10 patients homozygous for the same frameshifting dysferlin mutations. Neuromuscular Disorders. 2001; 11:20–26.
7. Pogue R, Anderson LVB, Pyle A, et al. Strategy for mutation analysis in the autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(1):80–87.
8. Pollitt C, Anderson LVB, Pogue R, et al. The phenotype of calpainopathy: diagnosis based on a multidisciplinary approach. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(3):287–296.
9. Anderson LVB, Harrison RM, Pogue R, et al. Secondary reduction in calpain 3 expression in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B and Miyoshi myopathy (primary dysferlinopathies). Neuromuscular Disorders. 2000; 10(8):553–559.
10. Auranen M, Rapola J, Pihko H, et al. Muscle membrane-skeleton protein changes and histopathological characterization of muscle-eye-brain disease. Neuromuscular Disorders. 2000; 10(1):16–23.
11. Bornemann A and Anderson LVB. Diagnostic protein expression in human muscle biopsies. Brain Pathology. 2000; 10:193–214.
12. Anderson LVB. Immunomarkers for molecular mass. Neuromuscular Disorders. 1999; 9(6-7):421–422.
13. Anderson LVB and Davison K. Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins. American Journal of Pathology. 1999; 154(4):1017–1022.
14. Anderson LVB, Davison K, Moss JA, et al. Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development. Human Molecular Genetics. 1999; 8(5):855–861.
15. Weiler T, Bashir R, Anderson LVB, et al. Identical mutation in patients with limb girdle muscle dystrophy type 2B or Miyoshi myopathy suggests a role for modifier gene(s). Human Molecular Genetics. 1999; 8(5):871–877.
16. Sewry CA, Taylor J, Anderson LVB, et al. Abnormalities in alpha-, beta- and gamma-sarcoglycan in patients with limb-girdle muscular dystrophy. Neuromuscular Disorders. 1996; 6(6):467–474.
17. Vainzof M, Passos-Bueno MR, Canovas M, et al. The sarcoglycan complex in the six autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. Human Molecular Genetics. 1996; 5(12):1963–1969.

18. Matthews PM, Benjamin D, Bakel IV, et al. Muscle X-inactivation patterns and dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy carriers. *Neuromuscular Disorders*. 1995; 5(3):209–220.
19. Heald A, Anderson LVB, Bushby KMD, et al. Becker muscular dystrophy with onset after 60 years. *Neurology*. 1994; 44:2388–2390.
20. Bushby KMD, Goodship JA, Nicholson LVB, et al. Variability in clinical, genetic and protein abnormalities in manifesting carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders*. 1993; 3(1):57–64.

### **Rättelser Av Tidigare Utgivning**

Gäller ej.

### **Utgivningsdatum**

12 oktober 2016

# Immunhistokemisk metodologi för användning av Novocastra™ antikroppar på fryst muskelvävnad.

## Reagens som krävs men ej tillhandahålls

1. Standardlösningar som används inom immunhistokemi.
2. 50 mM Trisbuffrad saltlösning (TBS) pH 7,6.
3. Antikroppsutspädningsmedel – normalt serum optimalt spätt i TBS .
4. Normala sera från de arter i vilka den sekundära antikroppen odlas.
5. Sekundär peroxidaskonjugerad antikropp – använd enligt tillverkarens rekommendationer.
6. 3,3' Diaminobenzidin tetrahydroklorid (DAB) – bered och använd enligt tillverkarens rekommendationer.
7. Monteringsmedel – bered enligt tillverkarens rekommendationer.

## Utrustning som krävs men ej tillhandahålls

1. Inkubator inställd på 25 °C.
2. Allmän immunhistokemisk laboratorieutrustning.
3. Elektrisk fläkt för lufttorkning av objektglas.

## Antigenåtervinningslösningar (se Rekommendationer vid användning)

Gäller ej frysta snitt.

## Metodologi

Innan denna metodologi tillämpas måste användare utbildas i immunhistokemiska tekniker. Användare bör fastställa optimal spädning för antikroppar. Alla steg utförs om inget annat anges vid rumstemperatur på 25 °C .

1. Skär och montera 4–10 µm snitt på objektglas täckta med ett lämpligt vävnadsklister och lufttorka i minst en timme.
2. Inkubera snitten med optimalt spädd primär antikropp (se Rekommendationer vid användning).
3. Tvätta snitten i TBS-buffert i 2 x 5 minuter och gunga försiktigt.
4. Inkubera snitten i lämplig peroxidaskonjugerad sekundär antikropp.
5. Tvätta snitten i TBS-buffert i 2 x 5 minuter och gunga försiktigt.
6. Inkubera objektglaset i DAB.
7. Skölj objektglaset i rent vatten.
8. Dehydratisera, klargör och montera snitten.

## Rättelser av tidigare utgivning

Gäller ej.

## Utgivningsdatum

5 februari 2004 (CEprotocol/Frozen Muscle).

# Novocastra™ Λυοφιλοποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού Dystrophin (C-terminus) Κωδικός είδους: NCL-DYS2

## Χρήση Για Την Οποία Προορίζεται

*Για in vitro διαγνωστική χρήση.*

Το NCL-DYS2 προορίζεται για την ποιοτική ταυτοποίηση με μικροσκοπία φωτός της δυστροφίνης (καρβοξυτελικό άκρο) με ανοσοϊστοχημεία. 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

Dy8/6C5

## Ανοσογόνο

Συνθετικό πολυπεπτιδίο που αποτελείται από τα τελευταία 17 αμινοξέα στο καρβοξυ-τελικό άκρο της αλληλουχίας της ανθρώπινης δυστροφίνης.

## Ειδικότητα

Αντιδρά ισχυρά με το καρβοξυ-τελικό άκρο (μεταξύ των αμινοξέων 3669 και 3685) της ανθρώπινης δυστροφίνης. Παρουσιάζει επίσης ασχρή διασταυρούμενη αντίδραση με δυστροφίνη από σκελετικούς, καρδιακούς και λειούς μύες από φυσιολογικό ποντικό, αρουραίο, κουνέλι, σκύλο, όρνιθα και χάμστερ. Δεν παρουσιάζεται διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με ιστό ποντικού mdx. Παρουσιάζει πολύ ασθενή διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με δυστροφίνη χοίρου.

## Σύνθεση Αντιδραστήριου

Το NCL-DYS2 είναι ένα λυοφιλοποιημένο υπερκείμενο ιστοκαλλιέργειας που περιέχει 15 mM αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό. Ο χρήστης χρειάζεται να ανασυσπείσει το περιεχόμενο του φιαλιδίου με τον σωστό όγκο αποστειρωμένου απεσταμμένου νερού, όπως υποδεικνύεται στην ετικέτα του φιαλιδίου.

## Τάξη Ig

IgG1

## Ολική Συγκέντρωση Πρωτεΐνης

Total Protein

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

## Συγκέντρωση Αντισώματος

Μεγαλύτερη ή ίση με 32,4 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 ενότητα “**Δ. Μεθοδολογία**”) σε τομές κατεψυγμένες. Προτεινόμενη αραιώση: 1:20 επί 60 λεπτά στους 25 °C. Αυτό παρέχεται ως οδηγός και οι χρήστες θα πρέπει να προσδιορίζουν τις δικές τους βέλτεστες αραιώσεις εργασίας.

## Φύλαξη Και Σταθερότητα

Φυλάσσετε το μη ανοιγμένο αντίσωμα στους 2–8 °C. Υπό τις συνθήκες αυτές, δεν υπάρχει σημαντική απώλεια στην απόδοση του προϊόντος έως την ημερομηνία λήξης που υποδεικνύεται στην ετικέτα του φιαλιδίου. Μη χρησιμοποιείτε μετά την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα του φιαλιδίου. Το ανασυσταθέν αντίσωμα είναι σταθερό επί δύο μήνες τουλάχιστον, εφόσον φυλάσσεται στους 2–8 °C. Για μακροχρόνια φύλαξη, συνιστάται να κλάσματα του ανασυσταθέντος αντισώματος να φυλάσσονται κατεψυγμένα στους -20 °C (δε συνιστάται η χρήση καταψυκτών χωρίς πάγο). Θα πρέπει να αποφεύγονται οι επαναληπμένοι κύκλοι κατάψυξης και απόψυξης. Παρασκευάζετε αραιώσεις εργασίας την ημέρα της χρήσης. Επαναφέρετε στους 2–8 °C αμέσως μετά τη χρήση. Τυχόν συνθήκες φύλαξης διαφορετικές από εκείνες που καθορίζονται παραπάνω πρέπει να επαληθεύονται από το χρήστη.

## Παρασκευή Δείγματος

Καταψύξτε τεμάχια ιστών δειγμάτων σε ισοπεντάνιο που έχει ψυχθεί σε υγρό άζωτο (δείτε την ενότητα “Προετοιμασίες και προφυλάξεις”). Τα δείγματα δε χρειάζονται περαιτέρω μονιμοποίηση, αλλά πρέπει να εγκλείονται στην ένωση OCT™ (Sakura, κωδικός είδους Tissue-Tek 4583).

## Προειδοποιήσεις Και Προφυλάξεις

### Novocastra Lyophilised Antibodies

Περιέχει ένα μείγμα από: Sodium Azide (<10%), Benzylpenicillin Sodium (<10%), Streptomycin Sulphate (<10%).  
Προειδοποιητές λέξεις:  
Κύνδυνος.

H302: Επιβλαβές σε περίπτωση κατάποσης.  
H317: Μπορεί να προκαλέσει αλλεργική δερματική αντίδραση.  
H334: Μπορεί να προκαλέσει αλλεργία ή συμπτώματα άσθματος ή δύσπνοια σε περίπτωση εισπνοής.  
H411: Τοξικό για τους υδρόβιους οργανισμούς, με μακροχρόνιες επιπτώσεις.  
EUH032: Σε επαφή με οξέα ελευθερώνονται πολύ τοξικά αέρια.

P261: Αποφύγετε να αναπνέετε σκόνη/αναθυμιάσεις/αέρια/σταγονίδια/ατμούς/εκνεφώματα.  
P264: Πλύνετε χέρια σχολαστικά μετά το χειρισμό.  
P270: Μην τρώτε, πίνετε ή καπνίζετε, όταν χρησιμοποιείτε αυτό το προϊόν.  
P272: Τα μολυσμένα ενδύματα εργασίας δεν πρέπει να βγαίνουν από το χώρο εργασίας.  
P273: Να αποφεύγεται η ελευθέρωση στο περιβάλλον.  
P280: Να φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/πρόσωπο.  
P284: Ψε σε περίπτωση ανεπαρκούς αερισμού χρησιμοποιήστε μέσα ατομικής προστασίας της αναπνοής.  
P301+312: ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΚΑΤΑΠΟΣΗΣ: Καλέστε το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ/γιατρό/ εάν αισθανθείτε αδιαθεσία.  
P302+352: ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΟ ΔΕΡΜΑ: Πλύνετε με άφθονο νερό και σαπούνι.  
P304+340: ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΙΣΠΝΟΗΣ: Μεταφέρατε τον παθόντα στον καθαρό αέρα και αφήστε τον να ξεκουραστεί σε στάση που διευκολύνει την αναπνοή.  
P330: Ξεπλύνετε το στόμα.  
P333+313: Εάν παρατηρηθεί ερεθισμός του δέρματος ή εμφανιστεί εξάνθημα: Συμβουλευθείτε/Επισκεφθείτε γιατρό.  
P342+311: Εάν παρουσιάζονται αναπνευστικά συμπτώματα: Καλέστε το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ/γιατρό.  
P362+364: Βγάλτε τα μολυσμένα ρούχα και πλύντε τα πριν τα ξαναχρησιμοποιήσετε.  
P391: Μαζέψτε τη χυμένη ποσότητα.  
P501: Διάθεση του περιεχομένου/περιέκτη σε χώρο συλλογής επικινδύνων ή ειδικών αποβλήτων.

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

Αυτό το αντιδραστήριο περιέχει αζίδιο του νατρίου. Δελτίο δεδομένων ασφαλείας υλικού διατίθεται κατόπιν αιτήματος ή από τη διεύθυνση [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com)

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

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

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

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

Το υγρό άζωτο λόγω της υπερβολικά ψυχρής θερμοκρασίας του προκαλεί εγκαύματα και κατά το χειρισμό του πρέπει να φοράτε προστατευτικό ρουχισμό, συμπεριλαμβανομένων γαντιών και προσώπιδας. Χρησιμοποιείτε σε καλά αεριζόμενο χώρο.

Το ισοπεντικό είναι ιδιαίτερα εύφλεκτο και επιβλαβές με κατάποση και εισπνοή. Είναι επίσης ερεθιστικό στο δέρμα και τα μάτια, καθώς και ναρκωτικό σε υψηλή συγκέντρωση.

### 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 νεκροψίας/βιοψίας/χειρουργικά δείγματα, τα οποία καταψύχονται το συντομότερο δυνατό με τον ίδιο τρόπο όπως 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.<sup>2</sup>

Συνιστώμενος ιστός θετικού μάρτυρα είναι ο φυσιολογικός ανθρώπινος γραμμώδης μυς.

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 πρωτοπαγές αντισώμα.

Συνιστώμενος ιστός αρνητικού μάρτυρα δεν έχει αξιολογηθεί.

Εναλλακτικά, η ποικιλία διαφόρων κυτταρικών τύπων που υπάρχουν στις περισσότερες τομές ιστών παρέχει συχνά θετικές 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 συνδετικού ιστού σε τομές από ιστούς που έχουν μονιμοποιηθεί με υπερβολική ποσότητα φορμολίνης. Χρησιμοποιείτε άδεια κύτταρα για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της χρώσης. Νεκρωτικά ή εκφυλισμένα κύτταρα παρουσιάζουν συχνά μη ειδική χρώση.<sup>3</sup> 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 ψευδουπεροξειδάση (ερυθροκύτταρα), η ενδογενής υπεροξειδάση (κυτόχρωμα C) ή η ενδογενής βιοτίνη (π.χ. ήπαρ, μαστός, εγκέφαλος, νεφρός) ανάλογα με τον τύπο ανασοχρώσης που χρησιμοποιείται. Για τη διαφοροποίηση της ενδογενούς ενζυμικής δραστηριότητας ή της μη ειδικής δέσμευσης των ενζύμων από ειδική ανασοαντιδραστικότητα, είναι δυνατό να χρωματιστούν αποκλειστικά επιπλέον ιστίο ασθενών με χρωμογόνο υποστρώματος ή ενζυμικά σύμπλοκα (αβιδίνη-βιοτίνη, στρεπταβιδίνη, σημιασμένο 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 Αντιδραστήριου

Χρησιμοποιείτε έναν μη ειδικό αρνητικό μάρτυρα αντιδραστήριου αντί του πρωτογαούς 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-DYS2. Η ένταση της θετικής χρώσης θα πρέπει να εκτιμάται στα πλαίσια τυχών μη ειδικής χρώσης υποβάθρου του αρνητικού μάρτυρα αντιδραστήριου. Όπως συμβαίνει με οποιαδήποτε ανασοιστοχημική εξέταση, ένα αρνητικό αποτέλεσμα σημαίνει ότι το αντιγόνο δεν ανιχνεύθηκε, όχι ότι το αντιγόνο δεν υπήρχε στα κύτταρα/στον ιστό που εξετάστηκε. Εάν είναι απαραίτητο, χρησιμοποιήστε μια σειρά αντισωμάτων για την αναγνώριση ψευδώς αρνητικών αντιδράσεων.

## Αναμενόμενα Αποτελέσματα

### Φυσιολογικοί Ιστοί

Ο κλώνος Dy8/6C5 ανιχνεύει έναν επίτοπο στο καρβοξύ-τελικό άκρο της ανθρώπινης δυστροφίνης πληθυσμό της κυτταροπλασματικής πλευράς του σαρκαίτηματός του φυσιολογικού ανθρώπινου μύος.

### Καρκινικοί Ιστοί

Ο κλώνος Dy8/6C5 έχει χρησιμοποιηθεί σε μελέτες ανασοιστοχημείας και ανασοσύτωσης σε περισσότερους 965 ασθενείς για την ταυτοποίηση μιας ανεπάρκειας της πρωτεΐνης δυστροφίνης 427 kD.

**Το NCL-DYS2 συνιστάται για την ταυτοποίηση της ανθρώπινης δυστροφίνης (καρβοξυτελικό άκρο) με ανασοιστοχημεία.**

## Γενικοί Περιορισμοί

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

Η χρώση του ιστού εξαρτάται από το χειρισμό και την επεξεργασία του ιστού πριν από τη χρώση. Τυχόν εσφαλμένη μονιμοποίηση, κατάψυξη, αποψύξη, πλύση, στέγνωμα, θέρμανση, τομή ή μόλυση 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.<sup>4</sup>

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

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

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

## Βιβλιογραφία - Γενική

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, 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. Anderson LVB. Multiplex Western blot analysis of the muscular dystrophy proteins. Chapter 22, p369-386, in Muscular Dystrophy: Methods and Protocols (number 43 in the Methods in Molecular Medicine series), edited by Bushby KMD & Anderson LVB. 2001. Humana Press: Totowa, New Jersey.
6. Mahjneh I, Marconi G, Bushby K, et al. Dysferlinopathy (LGMD2B): a 23-year follow-up study of 10 patients homozygous for the same frameshifting dysferlin mutations. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(20)-26.
7. Pogue R, Anderson LVB, Pyle A, et al. Strategy for mutation analysis in the autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(1):80-87.
8. Pollitt C, Anderson LVB, Pogue R, et al. The phenotype of calpainopathy: diagnosis based on a multidisciplinary approach. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(3):287-296.
9. Anderson LVB, Harrison RM, Pogue R, et al. Secondary reduction in calpain 3 expression in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B and Miyoshi myopathy (primary dysferlinopathies). Neuromuscular Disorders. 2000; 10(8):553-559.
10. Auranen M, Rapola J, Pihko H, et al. Muscle membrane-skeleton protein changes and histopathological characterization of muscle-eye-brain disease. Neuromuscular Disorders. 2000; 10(1):16-23.
11. Bornemann A and Anderson LVB. Diagnostic protein expression in human muscle biopsies. Brain Pathology. 2000; 10:193-214.
12. Anderson LVB. Immunomarkers for molecular mass. Neuromuscular Disorders. 1999; 9(6-7):421-422.
13. Anderson LVB and Davison K. Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins. American Journal of Pathology. 1999; 154(4):1017-1022.
14. Anderson LVB, Davison K, Moss JA, et al. Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development. Human Molecular Genetics. 1999; 8(5):855-861.
15. Weiler T, Bashir R, Anderson LVB, et al. Identical mutation in patients with limb girdle muscle dystrophy type 2B or Miyoshi myopathy suggests a role for modifier gene(s). Human Molecular Genetics. 1999; 8(5):871-877.

16. Sewry CA, Taylor J, Anderson LVB, et al. Abnormalities in alpha-, beta- and gamma-sarcoglycan in patients with limb-girdle muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders*. 1996; 6(6):467–474.
17. Vainzof M, Passos-Bueno MR, Canovas M, et al. The sarcoglycan complex in the six autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Human Molecular Genetics*. 1996; 5(12):1963–1969.
18. Matthews PM, Benjamin D, Bakel IV, et al. Muscle X-inactivation patterns and dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy carriers. *Neuromuscular Disorders*. 1995; 5(3):209–220.
19. Heald A, Anderson LVB, Bushby KMD, et al. Becker muscular dystrophy with onset after 60 years. *Neurology*. 1994; 44:2388–2390.
20. Bushby KMD, Goodship JA, Nicholson LVB, et al. Variability in clinical, genetic and protein abnormalities in manifesting carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders*. 1993; 3(1):57–64.

### **Τροποποιήσεις Στην Προηγούμενη Έκδοση**

Δεν έχει εφαρμογή.

### **Ημερομηνία Έκδοσης**

12 Οκτωβρίου 2016



# Μεθοδολογία ανοσοϊστοχημείας για χρήση αντισωμάτων Novocastra™ σε κατεψυγμένο μυϊκό ιστό.

## Αντιδραστήρια που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

1. Πρότυποι διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην ανοσοϊστοχημεία.
2. 50 mM αλατούχου ρυθμιστικού διαλύματος Tris (TBS) pH7,6.
3. Αραιωτικό αντισώματος - φυσιολογικός ορός βέλτιστα αραιωμένος σε TBS.
4. Φυσιολογικοί οροί από το είδος στο οποίο αναπτύσσεται το δευτεροταγές αντίσωμα.
5. Δευτεροταγές αντίσωμα συζευγμένο με υπεροξειδάση - χρησιμοποιείτε όπως συνιστάται από τον κατασκευαστή.
6. Τετραϋδροχλωρική 3,3' διαμινοβενζιδίνη (DAB) - παρασκευάζετε και χρησιμοποιείτε σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.
7. Μέσο στερέωσης – χρησιμοποιείτε σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.

## Εξοπλισμός που απαιτείται αλλά δεν παρέχεται

1. Θάλαμος επώασης ρυθμισμένος στους 25 °C.
2. Γενικός εργαστηριακός εξοπλισμός ανοσοϊστοχημείας.
3. Ηλεκτρικός ανεμιστήρας για στέγνωμα των αντικειμενοφόρων πλακών με αέρα.

## Διαλύματα ανάκτησης αντιγόνου (δείτε την ενότητα “Συστάσεις για τη χρήση”)

Δεν ισχύει για κατεψυγμένες τομές.

## Μεθοδολογία

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

Οι χρήστες θα πρέπει να προσδιορίσουν τις βέλτιστες αραιώσεις για αντισώματα. Εκτός εάν υποδεικνύεται διαφορετικά, όλα τα βήματα εκτελούνται στους 25 °C.

1. Κόψτε και στερεώστε τομές 4–10 μm σε αντικειμενοφόρους πλάκες επικαλυμμένες με κατάλληλο συγκολλητικό ιστών και στεγνώστε με αέρα επί μία ώρα τουλάχιστον.
2. Επώαστε τις τομές με βέλτιστα αραιωμένο πρωτοταγές αντίσωμα (δείτε την ενότητα “Συστάσεις για τη χρήση”).
3. Πλύνετε σε ρυθμιστικό διάλυμα TBS επί 2 x 5 λεπτά με απαλή ανακίνηση.
4. Επώαστε τις τομές σε κατάλληλο δευτεροταγές αντίσωμα συζευγμένο με υπεροξειδάση.
5. Πλύνετε σε ρυθμιστικό διάλυμα TBS επί 2 x 5 λεπτά με απαλή ανακίνηση.
6. Επώαστε τις αντικειμενοφόρους πλάκες σε DAB.
7. Εκπλύντε τις αντικειμενοφόρους πλάκες σε καθαρό νερό.
8. Αφυδατώστε, καθαρίστε και στερεώστε τις τομές.

## Τροποποιήσεις στην προηγούμενη έκδοση

Δεν έχει εφαρμογή.

## Ημερομηνία έκδοσης

5 Φεβρουαρίου 2004 (CEprotocol/Frozen Muscle).

# Novocastra™ Lyophiliseret Monoklonalt Museantistof

## Dystrophin (C-terminus)

### Produktkode: NCL-DYS2

#### Tilsigtet Anvendelse

*Til in vitro diagnostisk anvendelse.*

NCL-DYS2 er beregnet til kvalitativ identifikation ved hjælp af lysmikroskopi af dystrofin (C-terminus) med immunhistokemi. 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

Dy8/6C5

#### Immunogen

Syntetisk polypeptid indeholdende de sidste 17 aminosyrer i carboxyterminalen af den humane dystrophinsekvens.

#### Specifitet

Reagerer kraftigt med carboxyterminalen (mellem aminosyre 3669 og 3685) af humant dystrophin. Krydsreagerer også med muskeldystrophin fra skelet-, hjerte- og glat muskel fra normal mus, rotte, kanin, hund, kylling og hamster. Ingen krydsreaktivitet med mdx-musevæv. Krydsreagerer svagt med svinedystrophin.

#### Reagenssammensætning

NCL-DYS2 er en lyophiliseret vævskultursupernatant indeholdende 15 mM natriumazid som konserveringsmiddel. Brugeren skal rekonstituere indholdet i hætteflasken med det korrekte volumen sterile destillerede vand som angivet på hætteflaskens etikette.

#### Ig-klasse

IgG1

#### Totalproteinkoncentration Total Protein

Se etiketten på hætteflasken for lotspecifik totalproteinkoncentration.

#### Antistofkoncentration

Større end eller lig med 32,4 mg/l som bestemt ved ELISA. Se etiketten på hætteflasken for lotspecifik Ig-koncentration.

#### Anbefalinger Vedrørende Anvendelse

Immunhistokemi (se **D. Metodologi**) på frosne vævssnitt. Foreslået fortynding: 1:20 ved 60 minutter ved 25 °C. Disse retningslinier er vejledende, og brugeren bør selv bestemme egne optimale brugsopløsninger.

#### Opbevaring Og Holdbarhed

Opbevar det uåbnede antistof ved 2–8 °C. Under disse betingelser er der ingen betydende tab af produktets ydeevne indtil udløbsdatoen angivet på hætteflaskens etikette. Må ikke anvendes efter udløbsdatoen angivet på hætteflaskens etikette. Det rekonstituerede antistof er stabilt i mindst to måneder når opbevaret ved 2–8 °C. Ved langtidsopbevaring anbefales det at udportionere det rekonstituerede antistof og opbevare portionerne nedfrosset ved -20 °C (frostfri fryser anbefales ikke). Gentagen optøning og frysning skal undgås. Fremstil brugsopløsninger på dagen for anvendelsen. Sættes tilbage til 2–8 °C umiddelbart efter brug. Andre opbevaringsbetingelser end de ovenfor angivne skal verificeres af brugeren.

#### Prøveklargøring

Frys prøver af vævsblokke i isopentan lynkølet i flydende nitrogen (se Advarsler og forholdsregler). Prøverne kræver ikke yderligere fiksering, men bør indstøbes i OCT™ (Sakura, produkt nr. Tissue-Tek 4583).

## Advarsler Og Forholdsregler

### Novocastra Lyophilised Antibodies

Indeholder en blanding af: Natriumazid (<10%), Benzylpenicillin Sodium (<10%), Streptomycin Sulphate (<10%).  
Signalord: Fare.

H302: Farlig ved indtagelse.  
H317: Kan forårsage allergisk hudreaktion.  
H334: Kan forårsage allergi- eller astmasymptomer eller åndedrætsbesvær ved indånding.  
H411: Giftig for vandlevende organismer, med langvarige virkninger.  
EUH032: Udvikler meget giftig gas ved kontakt med syre.

P261: Undgå indånding af pulver/røg/gas/tåge/damp/spray.  
P264: Vask hænder grundigt efter brug.  
P270: Der må ikke spises, drikkes eller ryges under brugen af dette produkt.  
P272: Tilsudmet arbejdstøj bør ikke fjernes fra arbejdspladsen.  
P273: Undgå udledning til miljøet.  
P280: Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjenskyttelse/ansigtsbeskyttelse.  
P284: [I tilfælde af utilstrækkelig ventilation], anvend åndedrætsværn.  
P301+312: I TILFÆLDE AF INDTAGELSE: I tilfælde af ubehag, ring til en GIFTINFORMATION/læge.  
P302+352: VED KONTAKT MED HUDEN: Vask med rigeligt sæbe og vand.  
P304+340: VED INDÅNDING: Flyt personen til et sted med frisk luft og sørg for, at vejtrækningen lettes.  
P330: Skyl munden.  
P333+313: Ved hudirritation eller udslæt: Søg lægehjælp.  
P342+311: Ved luftvejssymptomer: Ring til en GIFTINFORMATION/læge.  
P362+364: Alt tilsudmet tøj tages af og vaskes inden genanvendelse.  
P391: Udslip opsamles.  
P501: Indholdet/Beholderen bortskaffes i et indsamlingssted for farligt affald og problemaffald.

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

Denne reagens indeholder natriumazid. Et datablad for materialesikkerhed kan fås efter anmodning eller er tilgængeligt på [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com)

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

Prøver skal før og efter fiksering, lige som alle materialer eksponeret mod prøverne, håndteres som potentielt smittefarligt og bortskaffes under iagttagelse af passende forholdsregler<sup>1</sup>. Pipetter aldrig reagenser med munden og undgå, at reagenser og prøver kommer i kontakt med huden eller slemhinder. 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.

Flydende nitrogen forårsager på grund af dets meget kolde temperatur forbrændinger, og der bør bæres beskyttelsesdragt inklusive handsker og visir under arbejde med dette. Arbejd i et ventileret område.

Isopentan er meget brandfarligt og skadeligt ved indtagelse eller indånding. Det irriterer ligeledes øjne og hud og er et narkotikum i høj koncentration.

### 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 nedfrosset 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.<sup>2</sup>

Anbefalet positivt kontrolvæv er normal human stribet muskel.

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 ikke blevet evalueret.

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 diffust udseende. Sporadisk farvning af bindevæv kan ligeledes observeres i vævssnit af væv, der er fikseret for kraftigt i formalin. Anvend intakte celler til fortolkning af farvningsresultaterne. Nekrotiske eller degenererede celler farves ofte mere uspecifikt.<sup>3</sup> Der kan eventuelt ses falske positive resultater, der skyldes non-immunologisk binding af proteiner eller substratreaktionsprodukter. Dette kan ligeledes skyldes endogene enzymer, såsom pseudoperoxidase (erythrocytter), endogen peroxidase (cytochrom C) eller endogent biotin (f.eks. lever, bryst, hjerne, nyre) afhængigt af den anvendte type immunfarve. For at differentiere mellem endogen enzymaktivitet eller uspecifik enzymbinding og specifik immunreaktivitet kan yderligere patientvæv

eventuelt farves udelukkende med henholdsvis substratkromogen eller enzymkomplekser (avidin-biotin, streptavidin, mærket polymer) og substratkromogen. Hvis der optræder specifik farvning i den negative vævskontrol, skal resultaterne af patientprøverne kasseres.

## Negativ Reagenskontrol

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

## Patientvæv

Eksaminer patientprøver farvet med NCL-DYS2 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 Dy8/6C5 påviser en epitop i carboxyterminalen af humant dystrophin tæt på den cytoplasmatiske side i sarcolemma fra normal human muskel.

### Tumorvæv

Klon Dy8/6C5 er blevet anvendt i immunhistokemiske studier og i immunoblottingstudier af mere end 965 patienter med henblik på identifikation af mangel på det 427 kD store protein dystrophin.

### NCL-DYS2 anbefales til identifikation af humant dystrofin (C-terminus) med immunhistokemi.

## Generelle Begrænsninger

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

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

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

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

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

## Bibliografi - Generelt

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Anderson LVB. Multiplex Western blot analysis of the muscular dystrophy proteins. Chapter 22, p369–386, in Muscular Dystrophy: Methods and Protocols (number 43 in the Methods in Molecular Medicine series), edited by Bushby KMD & Anderson LVB. 2001. Humana Press: Totowa, New Jersey.
6. Mahjneh I, Marconi G, Bushby K, et al. Dysferlinopathy (LGMD2B): a 23-year follow-up study of 10 patients homozygous for the same frameshifting dysferlin mutations. Neuromuscular Disorders. 2001; 11:20–26.
7. Pogue R, Anderson LVB, Pyle A, et al. Strategy for mutation analysis in the autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(1):80–87.
8. Pollitt C, Anderson LVB, Pogue R, et al. The phenotype of calpainopathy: diagnosis based on a multidisciplinary approach. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(3):287–296.
9. Anderson LVB, Harrison RM, Pogue R, et al. Secondary reduction in calpain 3 expression in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B and Miyoshi myopathy (primary dysferlinopathies). Neuromuscular Disorders. 2000; 10(8):553–559.
10. Auranen M, Rapola J, Pihko H, et al. Muscle membrane-skeleton protein changes and histopathological characterization of muscle-eye-brain disease. Neuromuscular Disorders. 2000; 10(1):16–23.
11. Bornemann A and Anderson LVB. Diagnostic protein expression in human muscle biopsies. Brain Pathology. 2000; 10:193–214.
12. Anderson LVB. Immunomarkers for molecular mass. Neuromuscular Disorders. 1999; 9(6-7):421–422.
13. Anderson LVB and Davison K. Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins. American Journal of Pathology. 1999; 154(4):1017–1022.
14. Anderson LVB, Davison K, Moss JA, et al. Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development. Human Molecular Genetics. 1999; 8(5):855–861.
15. Weiler T, Bashir R, Anderson LVB, et al. Identical mutation in patients with limb girdle muscle dystrophy type 2B or Miyoshi myopathy suggests a role for modifier gene(s). Human Molecular Genetics. 1999; 8(5):871–877.
16. Sewry CA, Taylor J, Anderson LVB, et al. Abnormalities in alpha-, beta- and gamma-sarcoglycan in patients with limb-girdle muscular dystrophy. Neuromuscular Disorders. 1996; 6(6):467–474.

17. Vainzof M, Passos-Bueno MR, Canovas M, et al. The sarcoglycan complex in the six autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Human Molecular Genetics*. 1996; 5(12):1963–1969.
18. Matthews PM, Benjamin D, Bakel IV, et al. Muscle X-inactivation patterns and dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy carriers. *Neuromuscular Disorders*. 1995; 5(3):209–220.
19. Heald A, Anderson LVB, Bushby KMD, et al. Becker muscular dystrophy with onset after 60 years. *Neurology*. 1994; 44:2388–2390.
20. Bushby KMD, Goodship JA, Nicholson LVB, et al. Variability in clinical, genetic and protein abnormalities in manifesting carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders*. 1993; 3(1):57–64.

### **Rettelser Til Tidligere Udgave**

Ingen rettelser.

### **Udgivelsesdato**

12 oktober 2016

# Immunhistokemisk fremgangsmåde til anvendelse af Novocastra™ antistoffer på frossent muskelvæv.

## Nødvendige reagenser, der ikke medfølger

1. Standardopløsningsmidler anvendt i immunhistokemi.
2. 50 mM Tris-bufferjusteret saltvandsopløsning (TBS) pH7,6.
3. Antistofdiluent - normalt serum optimalt fortyndet i TBS.
4. Normale sera fra de arter, i hvilke det sekundære antistof opformeres.
5. Sekundært peroxidasekonjugeret antistof - anvendes ifølge producentens anbefalinger.
6. 3,3' diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) - fremstilles ifølge producentens anbefalinger.
7. Monteringsmedium - fremstilles ifølge producentens anbefalinger.

## Nødvendige reagenser, der ikke medfølger

1. Inkubator indstillet til 25 °C.
2. Almindeligt laboratorieudstyr til immunhistokemi.
3. Elektrisk ventilator til tørring af objektglas.

## Antigengendfindingsopløsninger (se Anbefalinger vedrørende anvendelse)

Ikke anvendelig til frosne vævssnit.

## Metodologi

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

Brugeren bør bestemme de optimale fortyndinger for antistoffer. Med mindre andet er anført, skal alle trin udføres ved 25 °C.

1. Snit og monter 4–10 µm tykke vævssnit på objektglas coatet med et passende vævsadhæsiiv og lufttør i mindst en time.
2. Inkuber vævssnittene i optimalt fortyndet primært antistof (se Anbefalinger vedrørende anvendelse).
3. Vask i TBS i 2 x 5 minutter, mens de vugges forsigtigt.
4. Inkuber vævssnittene med et passende peroxidasekonjugeret sekundært antistof.
5. Vask i TBS i 2 x 5 minutter, mens de vugges forsigtigt.
6. Inkuber vævssnittene i DAB.
7. Skyl vævssnittene i rent vand.
8. Tør, klar og monter vævssnittene.

## Rettelser til tidligere udgave

Ingen rettelser.

## Udgivelsesdato

5. februar 2004 (CEprotocol/Frozen Muscle).

# Novocastra™ Gelyofiliseerd Muis Monoklonaal Antilichaam

## Dystrophin (C-terminus)

### Productcode: NCL-DYS2

#### Beoogd Gebruik

Voor gebruik bij *in-vitro*-diagnostiek.

NCL-DYS2 is bedoeld voor de kwalitatieve identificatie, met behulp van lichtmicroscopie, van dystrofine (C-terminus) door middel van immunohistochemie. De klinische interpretatie van iedere kleuring of de afwezigheid ervan moet worden aangevuld met morfologisch onderzoek en goede controles. De interpretatie moet worden geëvalueerd door een vakkundige patholoog binnen de context van de klinische geschiedenis van de patiënt en eventueel ander diagnostisch onderzoek.

#### Beginsel van de Procedure

Immunohistochemische (IHC) kleuringstechnieken maken de visualisatie van antigenen mogelijk via de sequentiële toepassing van een specifiek antilichaam naar het antigen (primaire antilichaam), het secundaire antilichaam naar het primaire antilichaam en een enzymcomplex met een chromogeen substraat met ingevoegde wasstappen. De enzymatische activering van de chromogeenresultaten in een zichtbaar reactieproduct op de antigene plaats. De monsters kunnen dan tegengekleurd en afgedekt zijn. De resultaten worden geïnterpreteerd met een lichtmicroscopie en hulpmiddelen in de differentiële diagnose van pathofysiologische processen, die wel of niet met een specifiek antigen geassocieerd kunnen worden.

#### Kloon

Dy8/6C5

#### Immunogeen

Synthetische polypeptide die bestaat uit de laatste 17 aminozuren aan de carboxyterminus van de humane dystrofinesequentie.

#### Specificiteit

Vertoont een sterke reactie met de carboxyterminus (tussen aminozuur 3669 en 3685) van humaan dystrofine. Vertoont ook een sterke kruisreactie met dystrofine uit skelet-, hart- en gladdespierweefsel van normale muizen, ratten, konijnen, honden, kippen en hamsters. Geen kruisreactiviteit met weefsel van mdx-muizen. Vertoont een zeer zwakke kruisreactie met dystrofine van varkens.

#### Reagentiasamenstelling

NCL-DYS2 is een gelyofiliseerde bovendienweefselweek die natriumazide bevat als conserveringsmiddel. De gebruiker moet de inhoud van de flacon reconstitueren met het correcte volume van steriel gedistilleerd water, zoals aangegeven op het etiket van de flacon.

#### Ig-klasse

IgG1

#### Totale Proteïneconcentratie Total Protein

Raadpleeg het etiket op de flacon voor de specifieke totale proteïneconcentratie.

#### Antilichaamconcentratie

Groter of gelijk aan 32,4 mg/L zoals bepaald door ELISA. Raadpleeg het etiket op de flacon voor de specifieke Ig-concentratie.

#### Aanbevelingen over het Gebruik

Immunohistochemie (zie **D. Methodologie**) op ingevroren coupes. Voorgestelde verdunning: 1:20 gedurende 60 minuten bij 25 °C. Dit is een richtsnoer en gebruikers moeten zelf de voor hen optimale werkverdunning bepalen.

#### Opslag en Stabiliteit

Sla een niet geopend antilichaam op bij een temperatuur van 2–8 °C. Onder deze condities is er geen significant verlies van de productprestatie tot de expiratedatum die op het etiket van de flacon staat. Gebruik het product niet meer na de expiratedatum die op de flacon staat. Het gereconstitueerde antilichaam is minstens twee maanden stabiel wanneer het wordt opgeslagen bij een temperatuur van 2–8 °C. Als het product langer moet worden opgeslagen, is het raadzaam dat gedeeltes van het gereconstitueerde antilichaam opgeslagen worden bij een temperatuur van -20 °C (vorstvrije vriezers worden niet aanbevolen). Herhaaldelijke bevroeringen en ontdooingen moeten voorkomen worden. Bereid het werken met verdunningen voor op de dag dat u ze gebruikt. Laat het systeem direct na gebruik terugkeren naar een temperatuur van 2–8 °C. Opslagcondities andere dan degene die hierboven gespecificeerd zijn, dienen door de gebruiker geverifieerd te.

#### Vorbereiding van Monsters

Freeze specimen weefsel blokken in isopentaan gekoeld in vloeibare stikstof (zie waarschuwingen en voorzorgen). De monsters hoeven niet verder te fixeren, maar moet worden ingebed in OCT™ verbinding (Sakura, Product No. Tissue-Tek 4583).

## Waarschuwingen en Voorzorgsmaatregelen

### **Novocastra Lyophilised Antibodies**

Bevat een mengsel van: Natriumazide (<10%), Benzylpenicillin Sodium (<10%), Streptomycin Sulphate (<10%).  
Signaalwoorden: Gevaar.

H302: Schadelijk bij inslikken.  
H317: Kan een allergische huidreactie veroorzaken.  
H334: Kan bij inademing allergie- of astmasymptomen of ademhalingsmoeilijkheden veroorzaken.  
H411: Giftig voor in het water levende organismen, met langdurige gevolgen.  
EUH032: Vormt zeer giftig gas in contact met zuren.

P261: Inademing van stof/rook/gas/nevel/damp/spuitnevel vermijden.  
P264: Na het werken met dit product handen grondig wassen.  
P270: Niet eten, drinken of roken tijdens het gebruik van dit product.  
P272: Verontreinigde werkkleding mag de werkruimte niet verlaten.  
P273: Voorkom lozing in het milieu.  
P280: Beschermende handschoenen/beschermende kleding/oogbescherming/geaatsbescherming dragen.  
P284: [Bij ontoereikende ventilatie] adembescherming dragen.  
P301+312: NA INSLIKKEN: bij onwel voelen een ANTIGIFCENTRUM/arts/ raadplegen.  
P302+352: BIJ CONTACT MET DE HUID: met veel water en zeep wassen.  
P304+340: NA INADEMING: de persoon in de frisse lucht brengen en ervoor zorgen dat deze gemakkelijk kan ademen.  
P330: De mond spoelen.  
P333+313: Bij huidirritatie of uitslag: een arts raadplegen.  
P342+311: Bij ademhalings symptomen: Een ANTIGIFCENTRUM/arts/ raadplegen.  
P362+364: Verontreinigde kleding uittrekken en wassen alvorens deze opnieuw te gebruiken.  
P391: Gelekte/gemorste stof opruimen.  
P501: Zich ontdoen van inhoud/Verpakking afvoeren naar inzamelpunt voor gevaarlijk of bijzonder afval.

Deze reagens is voorbereid van het supernatant van de celweek. Aangezien het biologisch product is, dient u bij het gebruik ervan voorzichtig te werk te gaan.

Deze reagens bevat natriumazide. Een materiaalveiligheidsblad is op verzoek verkrijgbaar bij [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com)

Raadpleeg de richtlijnen van de lokale of nationale overheid voor het afdanken van potentieel giftige componenten.

Monsters moeten voor en na fixatie worden behandeld als potentiële overdragers van infecties en volgens de juiste voorzorgsmaatregelen worden afgedankt. Dit geldt tevens voor alle materialen die aan de monsters zijn blootgesteld.<sup>1</sup>

Reagentia mogen nooit met de mond worden gepipetteerd. Daarnaast moet contact tussen de huid en het slijmvlies met reagentia en monsters worden vermeden.

Als reagentia of monsters in contact komen met gevoelige gebieden, moet u deze gebieden wassen met een ruime hoeveelheid water. Neem contact op met een arts.

Minimaliseer de kans van microbacteriële contaminatie van reagentia. Als u dit niet doet, kan er een toename van niet-specifieke kleuring optreden.

Incubatietijden of temperaturen die afwijken van degenen die gespecificeerd zijn, kunnen tot onjuiste resultaten leiden. Iedere dergelijke verandering moet door de gebruiker gevalideerd worden.

### **Kwaliteitscontrole**

Verschillen in het verwerken van weefsel en technische procedures in het laboratorium van de gebruiker kunnen zorgen voor een aanzienlijke variabiliteit van de resultaten. Dit vereist een regulier gebruik van bedrijfsgeïmplementeerde controles naast de volgende procedures.

De controles moeten verse autopsie-, biopsie-, of chirurgische monsters omvatten, en zo snel mogelijk formaline gefixeerd en in paraffinewax ingebed worden, op dezelfde manier als de patiëntmonster(s).

### **Positieve Weefselcontrole**

Wordt gebruikt om correct voorbereide weefsels en goede kleuringstechnieken aan te duiden.

Er dient een positieve weefselcontrole opgenomen te worden voor iedere set testcondities in iedere kleuringrun.

Voor een optimale kwaliteitscontrole en voor het detecteren van geringe niveaus van reagensdegradatie, is weefsel met zwakke positieve kleuring beter geschikt dan weefsel met sterke positieve kleuring.<sup>2</sup>

Aanbevolen positief controleweefsel is normaal humaan dwarsgestreept spierweefsel.

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

### **Negatieve Weefselcontrole**

Dient onderzocht te worden na de positieve weefselcontrole om de specificiteit te verifiëren van de labeling van het doelantigen door het primaire antilichaam.

Aanbevolen negatief controleweefsel is niet geëvalueerd.

Daarnaast leveren de verscheidenheid aan celtypen, die in de meeste weefselcoupes aanwezig zijn, regelmatig negatieve controlelocaties op, maar dit dient door de gebruiker geïmplementeerd te worden. Niet-specifieke kleuring, indien aanwezig, heeft meestal een diffuus uiterlijk.

Daarnaast kan in coupes sporadische kleuring van bindweefsel worden geobserveerd. Dit treedt op als gevolg van overdadig fixeren van weefsel met formaline. Maak voor de interpretatie van kleuringresultaten gebruik van intacte cellen. Necrotische of gedegenereerde cellen kunnen vaak een niet-specifieke kleuring vertonen.<sup>3</sup>

Er kan sprake zijn van fout-positieven als gevolg van niet-immunologische binding van eiwitten of substraatreactieproducten. Zij kunnen ook veroorzaakt worden door endogene enzymen zoals pseudoperoxidase (erythrocyten), endogene peroxidase (cytochrom C), of endogene biotine (bijv. lever, borst, hersenen, nieren), afhankelijk van het type immunokleuring dat gebruikt wordt.



Om endogene enzymen of niet-specifieke binding van enzymen van specifieke immunoreactiviteit te differentiëren, kan het zijn dat extra patiëntweefsels exclusief gekleurd wordt met substraat chromogeen of enzymcomplexen (avidine-biotine, streptavidine, gelabeld polymeer) en respectievelijk substraat-chromogeen. Indien specifieke kleuring binnen het interne negatieve controleweefsel optreedt, moeten de resultaten die met de patiëntmonsters zijn verkregen als ongeldig worden beschouwd.

## Negatieve Reagenscontrole

Gebruik een niet-specifieke negatieve reagenscontrole in plaats van het primaire antilichaam met een coupe van ieder patiëntmonster, om een niet-specifieke kleuring te evalueren en een betere interpretatie te krijgen van de specifieke kleuring op de antigene plaats.

## Patiëntweefsel

Onderzoek de gekleurde patiëntmonsters met NCL-DYS2. De positieve kleuringsintensiteit moet worden geëvalueerd binnen de context van iedere niet-specifieke achtergrondkleuring van de negatieve reagenscontrole. Net zoals bij elke immunohistochemische test betekent een negatief resultaat dat het antigeen niet is gedetecteerd. Het betekent dus niet dat het antigeen afwezig was in de geanalyseerde cellen/het geanalyseerde weefsel. Gebruik een panel van antilichamen om de verkeerd-negatieve reacties te identificeren.

## Verwachte Resultaten

### Normale Weefsels

Kloon Dy8/6C5 detecteert een epitoom op de carboxyterminus van humaan dystrofine nabij de cytoplasmakant van het sarcolemma van normaal humaan spierweefsel.

### Abnormale Weefsels

Kloon Dy8/6C5 is gebruikt bij immunohistochemische en immunoblotting-studies bij meer dan 965 patiënten ter vaststelling van een tekort aan het 427 kD-eiwit, dystrofine.

### **NCL-DYS2 wordt aanbevolen voor de identificatie van humaan dystrofine (C-terminus) door middel van immunohistochemie.**

## Algemene Beperkingen

Immunohistochemie is een diagnoseproces van meerdere stappen dat uit een gespecialiseerde training bestaat in het selecteren van de desbetreffende reagentia; weefselselectie, fixatie en verwerking; voorbereiding van de IHC-objectglasjes; en de interpretatie van de kleuringsresultaten. Weefselkleuring is afhankelijk van het gebruik en de verwerking van het weefsel vóór het aanbrengen van de kleuring. Een juiste manier van fixeren, invriezen, ontdooien, wassen, drogen, verwarmen en opdelen of contaminatie met andere weefsels of vloeistoffen kunnen leiden tot artefacten, het vastzitten van antilichamen of fout-negatieve. Inconsistente resultaten kunnen het gevolg zijn van variaties in de methoden die voor het fixeren en inbedden worden gebruikt of van inherente onregelmatigheden binnen het weefsel.<sup>4</sup>

Overmatige of onvolledige tegenkleuring kan een correcte interpretatie van de resultaten in te weg zitten.

De klinische interpretatie van iedere kleuring of de afwezigheid ervan moet worden aangevuld met morfologisch onderzoek en goede controles. De interpretatie moet worden geëvalueerd door een vakkundige patholoog binnen de context van de klinische geschiedenis van de patiënt en eventueel ander diagnostisch onderzoek.

Antilichamen van Leica Biosystems Newcastle Ltd zijn bedoeld voor gebruik, zoals aangegeven, op bevoren of paraffine ingebedde coupes met specifieke fixatie-eisen. Er kan een onverwachte antigenexpressie optreden, met name in neoplasma's. De klinische interpretatie van ieder gekleurde weefselcoupe moet morfologische analyses bevatten en de evaluatie van de juiste controles.

## Algemene Literatuurlijst

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. Anderson LVB. Multiplex Western blot analysis of the muscular dystrophy proteins. Chapter 22, p369–386, in Muscular Dystrophy: Methods and Protocols (number 43 in the Methods in Molecular Medicine series), edited by Bushby KMD & Anderson LVB. 2001. Humana Press: Totowa, New Jersey.
6. Mahjneh I, Marconi G, Bushby K, et al. Dysferlinopathy (LGMD2B): a 23-year follow-up study of 10 patients homozygous for the same frameshifting dysferlin mutations. Neuromuscular Disorders. 2001; 11:20–26.
7. Pogue R, Anderson LVB, Pyle A, et al. Strategy for mutation analysis in the autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(1):80–87.
8. Pollitt C, Anderson LVB, Pogue R, et al. The phenotype of calpainopathy: diagnosis based on a multidisciplinary approach. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(3):287–296.
9. Anderson LVB, Harrison RM, Pogue R, et al. Secondary reduction in calpain 3 expression in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B and Miyoshi myopathy (primary dysferlinopathies). Neuromuscular Disorders. 2000; 10(8):553–559.
10. Auranen M, Rapola J, Pihko H, et al. Muscle membrane-skeleton protein changes and histopathological characterization of muscle-eye-brain disease. Neuromuscular Disorders. 2000; 10(1):16–23.
11. Bornemann A and Anderson LVB. Diagnostic protein expression in human muscle biopsies. Brain Pathology. 2000; 10:193–214.
12. Anderson LVB. Immunomarkers for molecular mass. Neuromuscular Disorders. 1999; 9(6-7):421–422.
13. Anderson LVB and Davison K. Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins. American Journal of Pathology. 1999; 154(4):1017–1022.
14. Anderson LVB, Davison K, Moss JA, et al. Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development. Human Molecular Genetics. 1999; 8(5):855–861.

15. Weiler T, Bashir R, Anderson LVB, et al. Identical mutation in patients with limb girdle muscle dystrophy type 2B or Miyoshi myopathy suggests a role for modifier gene(s). *Human Molecular Genetics*. 1999; 8(5):871–877.
16. Sewry CA, Taylor J, Anderson LVB, et al. Abnormalities in alpha-, beta- and gamma-sarcoglycan in patients with limb-girdle muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders*. 1996; 6(6):467–474.
17. Vainzof M, Passos-Bueno MR, Canovas M, et al. The sarcoglycan complex in the six autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Human Molecular Genetics*. 1996; 5(12):1963–1969.
18. Matthews PM, Benjamin D, Bakel IV, et al. Muscle X-inactivation patterns and dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy carriers. *Neuromuscular Disorders*. 1995; 5(3):209–220.
19. Heald A, Anderson LVB, Bushby KMD, et al. Becker muscular dystrophy with onset after 60 years. *Neurology*. 1994; 44:2388–2390.
20. Bushby KMD, Goodship JA, Nicholson LVB, et al. Variability in clinical, genetic and protein abnormalities in manifesting carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders*. 1993; 3(1):57–64.

### **Aanpassingen ten opzichte van Vorige Editie**

Niet toepasbaar.

### **Publicatiedatum**

12 oktober 2016

# Immunohistochemische methodologie voor het gebruik van Novocastra™ antilichamen bij ingevroren spierweefsel.

## Benodigde, maar niet inbegrepen reagentia

1. Standaard oplossingen gebruikt in de immunohistochemie.
2. 50 mM Tris-gebufferde zoutoplossing (TBS), pH 7,6.
3. Antilichaamverduunningsmiddel - normaal serum optimaal verdund in TBS.
4. Normaal serum van de soort waarbij het secundaire antilichaam wordt noggewekt.
5. Secundair peroxidase-geconjugeerd antilichaam - gebruiken volgens de aanbevelingen van de fabrikant.
6. 3,3' diaminobenzidinetetrahydrochloride (DAB) - bereiden en gebruiken volgens de aanbevelingen van de fabrikant.
7. Inbedmiddel - gebruiken volgens de aanbevelingen van de fabrikant

## Benodigde, maar niet inbegrepen apparatuur

1. Incubator ingesteld op 25 °C.
2. Algemene uitrusting van immunohistochemisch laboratorium.
3. Elektrische ventilator voor het met aan lucht drogen van objectglaasjes.

## C. Antigenhersteloplossingen (zie Aanbevelingen voor het gebruik)

Niet van toepassing op ingevroren coupes.

## Methodologie

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

Gebruikers moeten de optimale verdunding voor antilichamen bepalen. Tenzij anders vermeld worden alle stappen uitgevoerd bij 25 °C.

1. Snij coupes van 4-10 µm, breng ze aan op objectglaasjes waarop een geschikt weefselhechtmiddel is aangebracht en droog ze ten minste een uur lang aan de lucht.
2. Incubeer de coupes met optimaal verdund primair antilichaam (zie Aanbevelingen voor het gebruik).
3. Was gedurende 2 x 5 minuten in TBS-buffer onder zachtjes wiebelen.
4. Incubeer de coupes in het juiste peroxidase-geconjugeerde secundaire antilichaam.
5. Was gedurende 2 x 5 minuten in TBS-buffer onder zachtjes wiebelen.
6. Incubeer de objectglaasjes in DAB.
7. Spoel de objectglaasjes af met schoon water.
8. Dehydrateer en klaar de coupes en breng ze aan op de objectglaasjes.

## Aanpassingen ten opzichte van de vorige uitgave

Niet toepasbaar.

## Datum uitgave

4 februari 2008 (CE-protocol/ingevroren spierweefsel).

# Novocastra™ Lyofilisert Monoklonalt Antistoff Fra Mus Dystrophin (C-terminus)

## Produktkode: NCL-DYS2

### Tiltenkt Bruk

*Til in vitro-diagnostisk bruk.*

NCL-DYS2 er tiltenkt for kvalitativ identifisering med lysmikroskopi av dystrofin (C-terminal) gjennom immunhistokjemi. Den kliniske tolkningen av farge eller manglende farge skal suppleres med morfologiske undersøkelser og bruk av egnede kontroller, og bør evalueres av en kvalifisert patolog i lys av pasientens kliniske historie og eventuelle andre diagnostiske tester.

### Prosedyreprinsipp

Immunhistokjemiske (IHC) fargingsteknikker gjør det mulig å se antigener via en sekvensiell tilsetning av et bestemt antistoff mot antigenet (primært antistoff), et sekundært antistoff mot det primære antistoffet og et enzymkompleks med et kromogent substrat med innskutte vasketrinn. Den enzymatiske aktiveringen av kromogenet gir et synlig reaksjonsprodukt på antigenstedet. Prøven kan deretter kontrastfarges og dekkes med et dekkglass. Resultatene fortolkes ved hjelp av et lysmikroskop og medvirker til differensialdiagnose av patofysiologiske prosesser som muligens kan være assosiert med et bestemt antigen.

### Klon

Dy8/6C5

### Immunogen

Syntetisk polypeptid som består av de siste 17 aminosyrene ved karboksyterminalen i sekvensen for humant dystrofin.

### Spesifisitet

Reagerer sterkt med karboksyterminalen (mellom aminosyrer 3669 og 3685) av humant dystrofin. Kryssreagerer også sterkt med dystrofin i skjelett-, hjerte- og glattmuskel fra normal mus, rotte, kanin, hund, høne og hamster. Ingen kryssreaktivitet med mdx-musevev. Kryssreagerer veldig svakt med dystrofin fra gris.

### Reagenssammensetning

NCL-DYS2 er en lyofilisert vevskultursupernatant som inneholder natriumiazid som konserveringsmiddel. Brukeren skal rekonstituere innholdet i hetteglasset med riktig mengde sterilt, destillert vann slik det er angitt på produktmerkingen.

### Ig-klasse

IgG1

### Totalproteinkonsentrasjon

Total Protein

Se etiketten på hetteglasset for lotspesifikk totalproteinkonsentrasjon.

### Antistoffkonsentrasjon

Større enn eller tilsvarende 32,4 mg/ml i henhold til ELISA. Se etiketten på hetteglasset for lotspesifikk Ig-konsentrasjon.

### Anbefalinger for Bruk

Immunhistokjemi (se **D. Metode**) på frose snitt. Foreslått fortyning: 1:20 i 60 minutter ved 25 °C. Dette er kun veiledende, og brukerne bør fastslå egne optimale fortyninger for sitt arbeid.

### Oppbevaring og Stabilitet

Uåpnet antistoff skal oppbevares ved 2–8 °C. Da vil produktytelsen holde seg frem til utløpsdatoen angitt på produktmerkingen. Må ikke brukes etter utløpsdatoen angitt på produktetiketten. Det rekonstituerte antistoffet er stabilt i minst to måneder dersom det oppbevares ved 2–8 °C. For langtidsoppbevaring er det anbefalt at deler av det rekonstituerte antistoffet oppbevares i fryst tilstand ved –20 °C (frostfrie fryser anbefales ikke). Gjentatte fryse- og tinesykluser må unngås. Preparer aktive fortyninger til den dagen de skal brukes. Returneres til 2–8 °C umiddelbart etter bruk. Andre oppbevaringsbetingelser må valideres av brukeren.

### Klargjøring av Prøver

Fryse prøve vevsblokker i isopentan kjølt i flytende nitrogen (se Advarsler og forsiktighetsregler). Prøvene krever ikke ytterligere fiksering, men bør være forankret i OCT™ forbindelse (Sakura, Product No. Tissue-Tek 4583).

## Advarsler og Forholdsregler

### **Novocastra Lyophilised Antibodies**

Inneholder en blanding av: Sodium Azide (<10%), Benzylpenicillin Sodium (<10%), Streptomycin Sulphate (<10%).  
Signalord: Fare.

H302: Farlig ved svelging.  
H317: Kan utløse en allergisk hudreaksjon.  
H334: Kan gi allergi eller astmasymptomer eller pustevansker ved innånding.  
H411: Giftig, med langtidsvirkning, for liv i vann.  
EUH032: Ved kontakt med syrer utvikles meget giftig gass.

P261: Unngå innånding av støv/røyk/gass/tåke/damp/aerosoler.  
P264: Vask hender grundig etter bruk.  
P270: Ikke spis, drikk eller røyk ved bruk av produktet.  
P272: Tilsølte arbeidsklær må ikke fjernes fra arbeidsplassen.  
P273: Unngå utslipp til miljøet.  
P280: Benytt vernehansker/verneklær/vernebriller/ansiktsskjerm.  
P284: Bruk åndedrettsvern.  
P301+312: VED SVELGING: Kontakt et GIFTINFORMASJONSSENTER eller lege ved ubehag.  
P302+352: VED HUDKONTAKT: Vask med mye såpe og vann.  
P304+340: VED INNÅNDING: Flytt personen til frisk luft og sørg for at vedkommende hviler i en stilling som letter åndedrettet.  
P330: Skyll munnen.  
P333+313: Ved hudirritasjon eller utslett: Søk legehjelp.  
P342+311: Ved symptomer i luftveiene: Kontakt et GIFTINFORMASJONSSENTER eller lege.  
P362 + p364: Ta av tilsølte klær og vask dem før ny bruk.  
P391: Samle opp spill.  
P501: Innhold/Beholder leveres til godkjent avfallsbehandlingsanlegg.

Denne reagensen er laget av supernatanten fra en cellekultur. Dette er et biologisk produkt som må behandles deretter.

Denne reagensen inneholder natriumazid. Dataark om materialsikkerhet (MSDS) er tilgjengelig på forespørsel eller kan lastes ned fra [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com)

Følg nasjonale og lokale forskrifter for avhending av komponenter som kan være giftige.

Prøver (før og etter fiksering) og alt materiale som eksponeres for dem, skal behandles som potensielt smittefarlig og kasseres i samsvar med gjeldende forholdsregler.<sup>1</sup> Hold aldri pipetter med reagens i munnen, og unngå at hud og slimhinner kommer i kontakt med reagenser og prøver.

Hvis reagenser eller prøver kommer i kontakt med følsomme områder, skal de skylles med rikelig vann. Kontakt lege.

Reduser mikrobiell kontaminering av reagensene til et minimum, ellers kan det forekomme økt uspesifisert farging.

Inkubasjonstider eller temperaturer som er annerledes enn det som er angitt, kan gi unøyaktige resultater. Slike endringer må valideres av brukeren.

### **Kvalitetskontroll**

Forskjeller i behandlingen av vev og forskjeller i tekniske prosedyrer i brukerens laboratorium kan gi signifikant varierte resultater, og det kan være nødvendig å foreta kontroller på stedet i tillegg til prosedyrene angitt nedenfor.

Kontrollene skal være nye autopsi-/biopsi-/kirurgiske prøver, formalinfikserte, behandlede og parafinlagrede så snart som mulig, på samme måte som pasientprøver.

### **Positiv Vevskontroll**

Brukes for å påvise korrekt vevspreparering og fargeteknikker.

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

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

Anbefalt positivt kontrollvev er normal, human tverrstripet muskulatur.

Hvis den positive vevskontrollen ikke viser positiv farging, skal resultatene til testprøvene anses som ugyldige.

### **Negativ Vevskontroll**

Skal undersøkes etter den positive vevskontrollen for å sikre at det primære antistoffet merker målantigenet spesifikt.

Anbefalt negativt kontrollvev har ikke blitt evaluert.

Alternativt har de mange ulike celletypene som finnes i de fleste vevssnittene ofte negative kontrollsteder, men dette må verifiseres av brukeren. Uspesifikk farging, hvis dette er aktuelt, har ofte et diffus utseende.

Sporadisk farging av bindevev kan på samme måte observeres i snitt fra vev som er fiksert for kraftig i formalin. Bruk intakte celler for å tolke fargeresultatene. Nekrotiske eller degenererte celler kan ofte farges uspesifikt.<sup>3</sup> Falske positive resultater kan skyldes ikke-immunologisk binding av proteiner eller substratreaksjonsprodukter. Dette kan også skyldes endogene enzymer som pseudoperoksidase (erytrocytter), endogen peroksidase (cytokrom C) eller endogent biotin (f.eks. lever, bryst, hjerne, nyre), avhengig av anvendt type immunfarge. For å differensiere endogen enzymaktivitet eller uspesifikk enzymbinding og spesifikk immunreaktivitet kan ytterligere pasientvev eventuelt farges kun med henholdsvis substratkromogen eller enzymkomplekser (avidin-biotin, streptavidin, merket polymer) og substratkromogen. Hvis det skjer spesifikk farging i den negative vevskontrollen, må resultatene for pasientprøvene anses som ugyldige.

### **Negativ Reagenskontroll**

Bruk en uspesifikk negativ reagenskontroll i stedet for det primære antistoffet på et snitt av hver pasientprøve for å vurdere uspesifikk farging og for å muliggjøre bedre fortolkning av spesifikk farging på antigenstedet.

### **Pasientvev**

Undersøk pasientprøver farget med NCL-DYS2 sist. Intensiteten av positiv farging bør vurderes i sammenheng med eventuell uspesifikk bakgrunnsfarging av den negative reagenskontrollen. Som med alle immunhistokjemiske tester, betyr et negativt resultat at antigenet ikke ble påvist, ikke at antigenet var fraværende i de analyserte cellene/vevet. Om nødvendig kan man bruke et panel av antistoffer for å identifisere falske negative reaksjoner.

## Forventede Resultater

### Normalt Vev

Klon Dy8/6C5 påviser en epitop ved karboksyterminalen i humant dystrofin, nær cytoplasmalflaten til sarkolemma i normal human muskulatur.

### Abnormalt Vev

Klon Dy8/6C5 har blitt brukt i immunhistokjemiske studier og immunblotningsstudier av mer enn 965 pasienter for å identifisere en mangel på det 427 kD proteinet dystrofin.

### NCL-DYS2 er anbefalt for identifisering av humant dystrofin (C-terminal) gjennom immunhistokjemi.

## Generelle Begrensninger

Immunhistokjemi er en diagnostisk prosess i flere trinn som omfatter spesialutdanning i valg av egnede reagenser, vevsleksjon, -fiksering og -behandling samt preparering av IHC-objektglass og tolking av fargeresultater. Vevsfarging avhenger av håndteringen og behandlingen av vevet før fargingen. Feil fiksering, frysing, tining, vasking, tørking, oppvarming, snitting eller kontaminering med annet vev eller væsker kan gi artefakter, innfangning av antistoffer eller falske negative resultater. Inkonsekvente resultater kan skyldes variasjoner ved fiksering eller innstøpningsmetoder eller iboende uregelmessigheter i vevet.<sup>4</sup>

Overdreven eller ufullstendig motfarging kan også gjøre det vanskelig å tolke resultatene riktig.

Den kliniske tolkningen av farge eller manglende farge skal suppleres med morfologiske undersøkelser og bruk av egnede kontroller, og bør evalueres av en kvalifisert patolog i lys av pasientens kliniske historie og eventuelle andre diagnostiske tester.

Antistoffer fra Leica Biosystems Newcastle Ltd skal brukes, som angitt, på enten frosne eller parafinlagrede snitt med spesifikk krav til fiksering. Uventet antigenekspresjon kan forekomme, spesielt i neoplasma. Den kliniske tolkningen av fargede vevsnett må omfatte morfologiske analyser 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. Nadjji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Anderson LVB. Multiplex Western blot analysis of the muscular dystrophy proteins. Chapter 22, p369–386, in Muscular Dystrophy: Methods and Protocols (number 43 in the Methods in Molecular Medicine series), edited by Bushby KMD & Anderson LVB. 2001. Humana Press: Totowa, New Jersey.
6. Mahjneh I, Marconi G, Bushby K, et al. Dysferlinopathy (LGMD2B): a 23-year follow-up study of 10 patients homozygous for the same frameshifting dysferlin mutations. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(20)–26.
7. Pogue R, Anderson LVB, Pyle A, et al. Strategy for mutation analysis in the autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(1):80–87.
8. Pollitt C, Anderson LVB, Pogue R, et al. The phenotype of calpainopathy: diagnosis based on a multidisciplinary approach. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(3):287–296.
9. Anderson LVB, Harrison RM, Pogue R, et al. Secondary reduction in calpain 3 expression in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B and Miyoshi myopathy (primary dysferlinopathies). Neuromuscular Disorders. 2000; 10(8):553–559.
10. Auranen M, Rapola J, Pihko H, et al. Muscle membrane-skeleton protein changes and histopathological characterization of muscle-eye-brain disease. Neuromuscular Disorders. 2000; 10(1):16–23.
11. Bornemann A and Anderson LVB. Diagnostic protein expression in human muscle biopsies. Brain Pathology. 2000; 10:193–214.
12. Anderson LVB. Immunomarkers for molecular mass. Neuromuscular Disorders. 1999; 9(6-7):421–422.
13. Anderson LVB and Davison K. Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins. American Journal of Pathology. 1999; 154(4):1017–1022.
14. Anderson LVB, Davison K, Moss JA, et al. Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development. Human Molecular Genetics. 1999; 8(5):855–861.
15. Weiler T, Bashir R, Anderson LVB, et al. Identical mutation in patients with limb girdle muscle dystrophy type 2B or Miyoshi myopathy suggests a role for modifier gene(s). Human Molecular Genetics. 1999; 8(5):871–877.
16. Sewry CA, Taylor J, Anderson LVB, et al. Abnormalities in alpha-, beta- and gamma-sarcoglycan in patients with limb-girdle muscular dystrophy. Neuromuscular Disorders. 1996; 6(6):467–474.
17. Vainzof M, Passos-Bueno MR, Canovas M, et al. The sarcoglycan complex in the six autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. Human Molecular Genetics. 1996; 5(12):1963–1969.
18. Matthews PM, Benjamin D, Bakel IV, et al. Muscle X-inactivation patterns and dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy carriers. Neuromuscular Disorders. 1995; 5(3):209–220.
19. Heald A, Anderson LVB, Bushby KMD, et al. Becker muscular dystrophy with onset after 60 years. Neurology. 1994; 44:2388–2390.
20. Bushby KMD, Goodship JA, Nicholson LVB, et al. Variability in clinical, genetic and protein abnormalities in manifesting carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy. Neuromuscular Disorders. 1993; 3(1):57–64.

## Endringer i forhold til Forrige Utgave

Ikke relevant.

## Utgivelsesdato

12 oktober 2016

# Immunhistokjemisk metode for bruk av Novocastra™-antistoffer på frosset muskelvev.

## Nødvendige reagenser som ikke følger med

1. Standard løsemidler som brukes innen immunhistokjemi.
2. 50 mM tris-bufret saltvann (TBS) pH 7,6.
3. Antistofffortynner – normalt serum optimalt fortynnet i TBS.
4. Normalt serum fra artene hvor det sekundære antistoffet er hevet.
5. Sekundært peroksidase-konjugert antistoff – bruk som anbefalt av produsenten.
6. 3,3'-diaminbenzidin-tetrahydroklorid (DAB) – klargjør og bruk som anbefalt av produsenten.
7. Monteringsmedium – bruk som anbefalt av produsenten.

## Nødvendig utstyr som ikke følger med

1. Inkubator stilt til 25 °C.
2. Generelt immunhistokjemisk laboratorieutstyr.
3. Elektrisk vifte for lufttøking av objektglass.

## C. Antigen-demaskeringsløsninger (se Anbefalinger for bruk)

Gjelder ikke for frosne snitt.

### Metode

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 25 °C.

1. Kutt og monter 4–10 µm snitt på objektglass belagt med et egnet vevlim, og lufttørk i minst én time.
2. Inkuber snittene med optimalt fortynnet primært antistoff (se Anbefalinger for bruk).
3. Vask i TBS-buffer i 2 x 5 minutter med forsiktig vugging.
4. Inkuber snittene i egnet peroksidase-konjugert sekundært antistoff.
5. Vask i TBS-buffer i 2 x 5 minutter med forsiktig vugging.
6. Inkuber objektglassene i DAB.
7. Skyll objektglassene i rent vann.
8. Dehydrer, klarer og monter snitt.

### Endringer på tidligere utgave

Ikke relevant.

### Utstedelsesdato

4. februar 2008 (CE-protokoll / frosset muskelvev).

# Novocastra™ Liyofilize Monoklonal Antistoff Fra Mus Dystrophin (C-terminus) Ürün Kodu: NCL-DYS2

## Kullanım Amacı

*In vitro* diagnostik kullanımı için.

NCL-DYS2, Distrofin'in (C ucu) immünohistokimya yoluyla ışık mikroskopisi ile nitel belirlenmesi için amaçlanmıştır. Herhangi bir boyamanın mevcut olması veya olmaması ile ilgili klinik yorumlama, uygun kontroller kullanılarak morfolojik çalışmalarla tamamlanmalıdır ve hastanın klinik geçmişi ve diğer diagnostik testler kapsamında kalifiye bir patolojist tarafından değerlendirilmelidir.

## Prosedür Prensipleri

İmmünohistokimyasal (IHC) boyama teknikleri, spesifik bir antikorun antijene (primer antikor), ikincil bir antikorun primer antikora ve bir enzim kompleksinin kromojenik bir substrat ile arada yıkama adımları olacak şekilde sekansiyel olarak uygulanmasıyla antijenlerin görselleştirilmesini sağlar. Kromojenin enzimatik aktivasyonu, antijen bölgede görünür bir reaksiyon ürettiği ile sonuçlanır. Numune bu durumda karşıt boyanabilir ve lamellenebilir. Sonuçlar, bir ışık mikroskopu kullanılarak yorumlanır ve özel bir antijenle birleştirilebilen veya birleştirilemeyen patofizyolojik işlemlerin ayrıntılı tanısına yardımcı olur.

## Clone

Dy8/6C5

## İmmünojen

İnsan distrofin sekansının karboksil ucundaki son 17 amino asitten oluşan sentetik polipeptid.

## Spesifite

İnsan distrofinin karboksil ucuyla (3669 ve 3685 amino asitleri arasında) kuvvetli reaksiyona girer. Ayrıca normal fare, sıçan, tavşan, köpek, tavuk ve hamster iskelet, kardiyak ve düz kas distrofiniyle kuvvetli çapraz reaksiyona girer. mdx fare dokusuyla çapraz reaksiyonu yoktur. Domuz distrofiniyle çok zayıf çapraz reaksiyona girer.

## Reagent Kompozisyonu

NCL-DYS2, prezervatif olarak sodyum azit içeren supernatant bir liyofilize doku kültürüdür. Kullanıcı, viyal etiketinde belirtildiği gibi viyal içeriğini doğru steril distile su hacmi ile yeniden oluşturmalıdır.

## Ig Sınıfı

IgG1

Total Protein

## Toplam Protein Konsantrasyonu

Lota özel toplam protein konsantrasyonu için viyal etiketine başvurun.

## Antikor Konsantrasyonu

ELISA tarafından belirlendiği gibi 32,4 mg/L'ye eşit veya bu değerden yüksek. Lota özel Ig konsantrasyonu için viyal etiketine başvurun.

## Kullanım Tavsiyeleri

Donmuş kesitlerde immünohistokimya (bkz. **D. Yöntem**). Önerilen dilüsyon: 25 °C'de 60 dakika için 1:20. Bu, bir kılavuz olarak sağlanmıştır ve kullanıcılar kendi optimal çalışma dilüsyonlarını kendileri belirlemelidirler.

## Saklama ve Dayanıklılık

Açılmamış antikor 2–8 °C'de saklayın. Bu koşullar altında viyal etiketinin üzerinde belirtilen son kullanım tarihine kadar ürün performansında önemli bir kayıp olmaz. Viyal etiketinin üzerinde belirtilen son kullanım tarihinden sonra kullanmayın. Yeniden oluşturulan antikor, 2–8 °C'de saklandığında en az iki ay boyunca sabit kalır. Uzun süreli saklama için yeniden oluşturulan antikorun alikotlarının dondurulmuş olarak -20 °C'de saklanması önerilir (buzsuz dondurucular önerilmez). Dondurma ve eritme işlemlerinin tekrarlanmasından kaçınılmalıdır. Çalışma dilüsyonlarını, kullanım gününde hazırlayın. Kullanımdan hemen sonra 2–8 °C'ye dönün. Yukarıda belirtilenlerin dışındaki saklama koşullarının, kullanıcı tarafından kontrol edilmesi gerekir.

## Numune Hazırlığı

Sıvı azot içinde soğutulmuş izopentan içinde örnek doku blokları (bkz Uyarılar ve Önlemler) dondurun. numuneler ayrıca tespiti gerektiren yok ama OCT™ bileşik (Sakura, Ürün No. Doku-Tek 4583) gömülü olmalıdır.



## Uyarılar ve Önlemler

### Novocastra

#### Lyophilised Antibodies

Oluşan bir karışımı içerir: Sodyum Azide (<10%), Benzylpenicillin Sodyum (<10%), Streptomycin Sulphate (<10%).  
Isaret kelimesi: Tehlike.

H302: Yutulması halinde sağlığa zararlıdır.  
H317: Alerjik cilt reaksiyonlarına neden olabilir.  
H334: Solunum halinde alerji, astim belirtileri veya solunum sıkayetlerine neden olabilir.  
H411: Uzun vadeli olarak, sudaki organizmalar için toksik.  
EUH032: Asit ile temas halinde çok toksik gaz geliştirir.

P261: Toz/duman/gaz/sis/buhar/aerosol solunumundan kaçınınız.  
P264: Kullandıktan sonra ellerinizi iyice yıkayınız.  
P270: Kullanım sırasında yemek yemeyiniz, içecek içmeyiniz veya sigara içmeyiniz.  
P272: Kirli iş kıyafetlerini işyeri dışında kullanmayınız.  
P273: Çevreye kontrolsüz verilmesinden kaçınınız.  
P280: koruyucu eldiven/koruyucu elbise/göz koruyucu/yüz siperi kullanınız.  
P284: Solunum koruma aleti kullanınız.  
P301+312: YUTMA DURUMUNDA: Kendinizi iyi hissetmiyorsanız bir ZEHİR MERKEZİ / doktora başvurunuz.  
P302+352: CİLT İLE TEMAS HALİNDE: Bol miktarda su ve sabunla yıkayınız.  
P304+340: SOLUNUM HALİNDE: Temiz havaya çıkarınız ve nefes alıp vermeyi kolaylaştırın bir pozisyon sağlayınız.  
P330: Ağız çalkalayınız.  
P333+313: Cilt tahrisinde veya döküntüsünde: Tıbbi tavsiye / bakım alın.  
P342+311: Solunum yolu belirtilerinde: ZEHİR DANISMA MERKEZİNİ arayınız veya bir doktora başvurunuz.  
P362 + p364: Kirlenmiş giysileri çıkarın ve tekrar kullanmadan önce yıkayın.  
P391: Yığıntı kitleyi kaldırınız.  
P501: İçerik/Kap tehlikeli veya özel atık toplama yerlerinde sağlayınız.

Bu reagent, hücre kültürünün supernatantından hazırlanmıştır confirm. Bu bir biyolojik ürün olduğundan işlem yaparken özel dikkat gerektirir.

Bu reagent, sodyum azit içerir. Talep üzerine veya [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com)'dan bir Material Safety Data Sheet (Malzeme Güvenlik Veri Sayfası) elde edilebilir.

Potansiyel tüm toksik bileşenlerin imhası için federal, ulusal veya lokal düzenlemelere başvurun. Fikse etme işleminden önce ve sonra numuneler ve bunlara maruz kalan tüm materyaller, enfeksiyon yayabilecek gibi ele alınmalı ve doğru önlemler alınarak atığa çıkartılmalıdır.<sup>1</sup>

Reagent'lar asla ağızla pipetlenmemeli ve cildin ve muköz membranların reagent ve numunelerle temasından kaçınılmalıdır.

Reagent veya numunelerin hassas alanlarla temas etmesi durumunda bu alanları bol su ile yıkayın. Doktora başvurun.

Reagent'ların mikrobiyal kontaminasyonunu minimize edin, aksi durumda nonspesifik boyamada bir artış ortaya çıkabilir.

Belirtilenlerin dışında inkübasyon süreleri veya sıcaklıkları, hatalı sonuçlara neden olabilir. Tüm değişiklikler, kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır.

### Kalite Kontrol

Kullanıcının laboratuvarındaki doku işleme ve teknik prosedürlerdeki değişiklikler, sonuçlarda önemli farklılıklara neden olabilir ve aşağıdaki prosedürlere ek olarak dahili kontrollerin düzenli şekilde yapılmasını gerektirir.

Kontroller, mümkün olan en kısa sürede ve hasta örneği (örnekleri) ile aynı şekilde formalinle fikse edilmiş, işlenmiş ve parafin mumuna gömülmüş taze toplu/biyopsi/cerrahi numune olmalıdır.

### Pozitif Doku Kontrolü

Doğru hazırlanmış dokuları ve düzgün boyama tekniklerini belirtmek için kullanılır.

Bir pozitif doku kontrolü, her boyama çalıştırmasında test koşullarının her seti için dahil edilmelidir.

Optimal kalite kontrol için ve reagent degradasyonunun minör düzeylerini tespit etmek için zayıf pozitif boyamaya sahip bir doku, güçlü pozitif boyamaya sahip bir dokudan daha uygundur.<sup>2</sup>

Önerilen pozitif kontrol dokusu normal insan çizgili kasıdır.

Pozitif doku kontrolü, pozitif boyamayı göstermezse test numuneleri ile elde edilen sonuçlar geçersiz olarak ele alınmalıdır.

### Negatif Doku Kontrolü

Pozitif doku kontrolünden sonra hedef antijenin etiketleme spesifitesini primer antikorla kontrol etmek için gerçekleştirilmelidir.

Önerilen negatif kontrol dokusu değerlendirilmemiştir.

Pek çok doku seksiyonunda bulunan farklı hücre tiplerinin çeşitliliği, genelde negatif kontrol bölgeleri sağlar ancak bu, kullanıcı tarafından kontrol edilmelidir. Nonspesifik boyama, mevcutsa genelde difüz bir görünüme sahiptir.

Bağ dokusu sporadik boyama, aşırı formalinle fikse edilmiş dokulardan seksiyonlarda da gözlemlenebilir. Boyama sonuçlarının yorumlanması için intakt hücreler kullanın. Nekrotik veya dejenerer hücreler, genelde belirsiz şekilde boyanabilir.<sup>3</sup>

Yanlış pozitif sonuçlar, substrat reaksiyon ürünleri veya proteinler veya proteinlerin immünojenik olmayan protein bağlanması nedeniyle görülebilir.

Bunlar, kullanılan immüno boyamanın tipine bağlı olarak psödoperoksidaz (eritrositler), endojen peroksidaz (sitokrom C) veya endojen biotin (örn. karaciğer, meme, beyin, böbrek) gibi endojen enzimler nedeniyle de ortaya çıkabilir.

Endojen enzim aktivitesini veya enzimlerin nonspesifik bağlanmasını, spesifik immünoreaktiveden ayırt etmek için ilave hasta dokuları, sadece sırasıyla substrat kromojen veya enzim kompleksleriyle (avidin biotin, streptavidin, etiketli polimer) ve substrat kromojen ile boyanabilir. Spesifik boyamanın, negatif doku kontrolünde ortaya çıkması durumunda hasta numuneleri ile elde edilen sonuçlar geçersiz olarak ele alınmalıdır.

### Negatif Reagent Kontrolü

Antijen bölgede nonspesifik boyamanın değerlendirilmesi ve spesifik boyamanın daha iyi yorumlanmasını sağlamak amacıyla her hasta numunesinin bir seksiyonu ile primer antikorun yerine bir nonspesifik negatif reagent kontrolü kullanın.

## Hasta Dokusu

NCL-DYS2 ile boyanan son hasta numunelerini inceleyin. Pozitif boyama intensitesi, negatif reagent kontrolünün herhangi bir nonspesifik arka plan boyamasının kapsamında değerlendirilmelidir. Herhangi bir immünohistokimyasal test ile negatif bir sonuç, antijenin tespit edilmediği anlamına gelir; antijenin test edilen hücrelerde/dokuda mevcut olmadığı anlamına gelmez. Gerekliyse yanlış negatif reaksiyonları belirlemek için bir antikor paneli kullanın.

## Öngörülen Sonuçlar

### Normal Dokular

Klon Dy8/6C5, normal insan kasının sarkolemmasının sitoplazmik yüzüne yakın olan insan distrofininin karboksii ucundaki bir epitopu tespit eder.

### Anormal Dokular

Klon Dy8/6C5, 427 kD protein, distrofinin eksikliğini belirlemek amacıyla 965'ten fazla hastanın immünohistokimyasal ve immünoiblottama çalışmalarında kullanılmıştır.

### **NCL-DYS2, insan Distrofininin (C ucu) immünohistokimya yoluyla belirlenmesi için önerilir.**

## Genel Sınırlamalar

İmmünohistokimya uygun reagent'ların seçilmesinde; dokunun seçilmesi, fikse edilmesi ve işlenmesinde; IHC laminin hazırlanmasında ve boyama sonuçlarının yorumlanmasında uzmanlık eğitimi gerektiren çok adımlı bir diagnostik işlemdir. Doku boyama, boyamadan önce dokunun ele alınması ve işlenmesine bağlıdır. Diğer dokularla veya akışkanlarla hatalı fikse etme, dondurma, eritme, yıkama, kurutma, ısıtma, seksiyonlama veya kontaminasyon artefakt, antikor trapping veya yanlış negatif sonuçlar ortaya oluşturabilir. Doku içerisinde fikse etme ve gömme yöntemleri veya inherent aksaklıklar nedeniyle tutarsız sonuçlar ortaya çıkabilir.<sup>4</sup>

Aşırı veya inkomplet karşıt boya, sonuçların doğru yorumlanmasına engel olabilir.

Herhangi bir boyamanın mevcut olması veya olmaması ile ilgili klinik yorumlama, uygun kontroller kullanılarak morfolojik çalışmalarla tamamlanmalıdır ve hastanın klinik geçmişi ve diğer diagnostik testler kapsamında kalifiye bir patolojist tarafından değerlendirilmelidir. Leica Biosystems Newcastle Ltd antikorları, belirtildiği gibi spesifik fikse etme işlemleri gerektiren dondurulmuş veya parafine gömülmüş seksiyonlarda kullanılmak içindir. Özellikle neoplazmalarda beklenmedik antijen ekspresyonu ortaya çıkabilir. Boyanan doku seksiyonunun klinik yorumu, morfolojik analiz ve uygun kontrollerin değerlendirmesini 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. Nadjf 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. Anderson LVB. Multiplex Western blot analysis of the muscular dystrophy proteins. Chapter 22, p369–386, in Muscular Dystrophy: Methods and Protocols (number 43 in the Methods in Molecular Medicine series), edited by Bushby KMD & Anderson LVB. 2001. Humana Press: Totowa, New Jersey.
6. Mahjneh I, Marconi G, Bushby K, et al. Dysferlinopathy (LGMD2B): a 23-year follow-up study of 10 patients homozygous for the same frameshifting dysferlin mutations. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(1):20–26.
7. Pogue R, Anderson LVB, Pyle A, et al. Strategy for mutation analysis in the autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(1):80–87.
8. Pollitt C, Anderson LVB, Pogue R, et al. The phenotype of calpainopathy: diagnosis based on a multidisciplinary approach. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(3):287–296.
9. Anderson LVB, Harrison RM, Pogue R, et al. Secondary reduction in calpain 3 expression in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B and Miyoshi myopathy (primary dysferlinopathies). Neuromuscular Disorders. 2000; 10(8):553–559.
10. Auranen M, Rapola J, Pihko H, et al. Muscle membrane-skeleton protein changes and histopathological characterization of muscle-eye-brain disease. Neuromuscular Disorders. 2000; 10(1):16–23.
11. Bornemann A and Anderson LVB. Diagnostic protein expression in human muscle biopsies. Brain Pathology. 2000; 10:193–214.
12. Anderson LVB. Immunomarkers for molecular mass. Neuromuscular Disorders. 1999; 9(6-7):421–422.
13. Anderson LVB and Davison K. Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins. American Journal of Pathology. 1999; 154(4):1017–1022.
14. Anderson LVB, Davison K, Moss JA, et al. Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development. Human Molecular Genetics. 1999; 8(5):855–861.
15. Weiler T, Bashir R, Anderson LVB, et al. Identical mutation in patients with limb girdle muscle dystrophy type 2B or Miyoshi myopathy suggests a role for modifier gene(s). Human Molecular Genetics. 1999; 8(5):871–877.
16. Sewry CA, Taylor J, Anderson LVB, et al. Abnormalities in alpha-, beta- and gamma-sarcoglycan in patients with limb-girdle muscular dystrophy. Neuromuscular Disorders. 1996; 6(6):467–474.
17. Vainzof M, Passos-Bueno MR, Canovas M, et al. The sarcoglycan complex in the six autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. Human Molecular Genetics. 1996; 5(12):1963–1969.
18. Matthews PM, Benjamin D, Bakel IV, et al. Muscle X-inactivation patterns and dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy carriers. Neuromuscular Disorders. 1995; 5(3):209–220.
19. Heald A, Anderson LVB, Bushby KMD, et al. Becker muscular dystrophy with onset after 60 years. Neurology. 1994; 44:2388–2390.
20. Bushby KMD, Goodship JA, Nicholson LVB, et al. Variability in clinical, genetic and protein abnormalities in manifesting carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy. Neuromuscular Disorders. 1993; 3(1):57–64.

## Önceki Baskıya göre Değişiklikler

Uygulanamaz.

### Yayın Tarihi

12 Ekim 2016

## Donmuş kas dokusunda Novocastra™ antikorları kullanmak için immünohistokimya yöntemi.

### Gereken ama sağlanmayan reaktifler

1. İmmünohistokimyada kullanılan standart çözücüler.
2. 50 mM Tris tamponlu salin (TBS) pH 7,6.
3. Antikor seyreltici - TBS'de optimal olarak seyreltilmiş normal serum.
4. Sekonder antikorun yetiştirilmiş olduğu türlerden normal serum.
5. Sekonder peroksidaz konjuge antikor - üreticinin önerdiği şekilde kullanın.
6. 3,3' Diaminobenzidin tetrahidroklorid (DAB) - üreticinin önerdiği şekilde hazırlayın ve kullanın.
7. Monte etme solüsyonu - üreticinin önerdiği şekilde kullanın.

### Gereken ama sağlanmayan ekipman

1. 25 °C'ye ayarlı inkübatör.
2. Genel immünohistokimya laboratuvar ekipmanı.
3. Slaytları havayla kurutmak için elektrikli fan.

### C. Antijen geri kazanma solüsyonları (bkz. Kullanım Önerileri)

Donmuş kesitler için geçerli değildir.

### Yöntem

Bu yönetime başlamadan önce kullanıcılar immünohistokimya teknikleri konusunda eğitilmiş olmalıdır.

Antikorlar için optimal dilüsyonları kullanıcıların kendileri belirlemelidir. Aksi belirtilmedikçe tüm adımlar 25 °C'de yapılır.

1. 4–10 µm kesitler halinde kesin ve uygun doku yapışkanıyla kaplı lamalara monte edin ve en az bir saat boyunca havayla kurutun.
2. Kesitleri, optimum şekilde seyreltilmiş primer antikorla inkübe edin (bkz. Kullanım Önerileri).
3. TBS tamponda hafif sallamayla 2 x 5 dakika yıkayın.
4. Kesitleri, uygun peroksidaz konjuge sekonder antikorda inkübe edin.
5. TBS tamponda hafif sallamayla 2 x 5 dakika yıkayın.
6. Slaytları DAB'da inkübe edin.
7. Slaytları temiz suda durulayın.
8. Kesitleri dehidrate edin, saydamlaştırın ve monte edin.

### Önceki Sayıdan Değişiklikler

Geçerli değildir.

### Yayın Tarihi

4 Şubat 2008 (CE protokolü/Donmuş Kas).









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

