

Novocastra™ Liquid Liquid Mouse Monoclonal Antibody Mismatch Repair Protein 6 (MSH6) Product Code: NCL-L-MSH6

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



EN FR IT DE ES PT SV EL DA

Instructions for Use

Please read before using this product.

Mode d'emploi

À lire avant d'utiliser ce produit.

Istruzioni per L'uso

Si prega di leggere, prima di usare il prodotto.

Gebrauchsanweisung

Bitte vor der Verwendung dieses Produkts lesen.

Instrucciones de Uso

Por favor, leer antes de utilizar este producto.

Instruções de Utilização

Leia estas instruções antes de utilizar este produto.

Instruktioner vid Användning

Var god läs innan ni använder produkten.

Οδηγίες χρήσης

Παρακαλούμε διαβάστε τις οδηγίες πριν χρησιμοποιήσετε το προϊόν αυτό.

Brugsanvisning

Læs venligst før produktet tages i brug.

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.

Novocastra™ Liquid Mouse Monoclonal Antibody Mismatch Repair Protein 6 (MSH6)

Product Code: NCL-L-MSH6

Intended Use

For in vitro diagnostic use.

NCL-L-MSH6 is intended for the qualitative identification by light microscopy of Mismatch Repair Protein 6 (MSH6) molecules in paraffin sections. The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Principle of Procedure

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

Clone

PU29

Immunogen

Prokaryotic recombinant protein corresponding to a 359 amino acid portion of the MSH6 human molecule.

Specificity

Human mismatch repair protein 6

Reagent Composition

NCL-L-MSH6 is a liquid tissue culture supernatant containing 15 mM sodium azide as a preservative.

Ig Class

IgG1

Total Protein Concentration

Total Protein

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

Antibody Concentration

Greater than or equal to 200 mg/L as determined by ELISA. Refer to vial label for batch specific Ig concentration.

Recommendations On Use

Immunohistochemistry (see **D. Methodology**) on paraffin sections. Suggested dilution: 1:100 for 30 minutes at 25 °C. Heat induced epitope retrieval using Epitope Retrieval Solution pH6.0 RE7113, RE7114 or RE7115. This is provided as a guide and users should determine their own optimal working dilutions. **Technical note:** The use of PBS-based diluents may result in increased background staining

Storage and Stability

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

Specimen Preparation

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

Warnings and Precautions

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

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

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

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

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

Quality Control

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

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

Positive Tissue Control

Used to indicate correctly prepared tissues and proper staining techniques.

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

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

Recommended positive control tissue is colon.

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 skeletal muscle.

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

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

Negative Reagent Control

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

Patient Tissue

Examine patient specimens stained with NCL-L-MSH6 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 PU29 detected the MSH6 protein expressed in the nuclei of cells in a variety of tissues (n=69). Staining was observed in colon, small bowel, appendix, adrenal, lung, stomach, esophagus, skin, ovary, cervix, prostate, thymus, salivary gland, thyroid, parathyroid, breast, pituitary, tonsil, bone marrow, gall bladder, placenta and spinal cord.

Tumor Tissues

Clone PU29 detected the MSH6 protein in 54/58 colon tumors. Clone PU29 also detected the MSH6 protein in lymphomas (9/11), sarcomas (7/7), ovarian tumors (7/7), lung tumors (6/7), breast tumors (4/5), stomach tumors (4/4), endometrial tumors (4/4), neuroendocrine tumors (2/4), BPH/prostate tumor (3/3), melanomas (3/3), adrenal tumors (3/3), germ cell tumors (3/3), bladder tumors (3/3), squamous cell carcinomas (2/3), liver tumors (1/3), pancreatic tumors (2/2), thyroid tumors (2/2), small bowel tumor (1/1), skin tumor (1/1), thymus tumor (1/1), neural tumor (0/1) and kidney tumors (0/4) (n=140).

NCL-L-MSH6 is recommended for use in detecting MSH6 protein expression in normal and neoplastic tissues, particularly to aid in the demonstration of the loss of MSH6 expression in hereditary non-polyposis colon cancer and sporadic cancers

General Limitations

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

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

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

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

Bibliography - General

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.
5. Warren J, Pohlhaus T, Changela A, et al. Structure of the human MutSα DNA lesion recognition complex. *Molecular Cell*. 2007; 26:579-592.
6. Marti T, Kunz C, Fleck O, et al. DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways. *Journal of Cellular Physiology*. 2002; 191:28-41.

Amendments to Previous Issue

Not applicable

Date of Issue

27 March 2013

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

A. Reagents Required but not Supplied

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

B. Equipment Required but not Supplied

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

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

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

D. Methodology

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

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

Epitope Retrieval

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

Visualization

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

E. Amendments to Previous Issue

Not applicable

F. Date of Issue

23 April 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

Novocastra™ Anticorps monoclonal liquide de souris

Mismatch Repair Protein 6 (MSH6)

Référence du Produit: NCL-L-MSH6

Utilisation Prévue

Diagnostic in vitro.

Le NCL-L-MSH6 est destiné à l'identification qualitative par microscopie optique de la molécule Mismatch Repair Protein 6 (MSH6) sur des coupes en paraffine. L'interprétation clinique de tout marquage, ou absence de marquage, doit être complétée par des études morphologiques utilisant des contrôles appropriés et doit être évaluée par un pathologiste qualifié à la lumière des antécédents cliniques du patient et d'autres analyses diagnostiques.

Principe de la Procédure

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

Clone

PU29

Immunogène

Protéine procaryote recombinante correspondant à une portion de 359 acides aminés de la molécule MSH6 humaine.

Spécificité

Protéine 6 de réparation des mésappariements

Composition du Réactif

Le NCL-L-MSH6 est un surnageant de culture tissulaire liquide contenant une solution d'azide de sodium 15 mM comme conservateur.

Classe d'Ig

IgG1

Concentration Totale en Protéines

Total Protein

1.0 - 8.0. g/L. La concentration totale en protéines, spécifique du lot, figure sur l'étiquette du flacon.

Concentration en Anticorps

Supérieure ou égale à 200 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 en paraffine. Dilution préconisée : 1:100 pendant 30 minutes à 25 °C. Restauration de l'épitope induite par la chaleur à l'aide de Epitope Retrieval Solution pH 6,0 RE7113, RE7114 ou RE7115. Ceci n'est donné qu'à titre indicatif et les utilisateurs doivent déterminer leurs propres dilutions de travail optimales. **Remarque technique** : L'emploi de diluants à base de PBS peut se traduire par un accroissement du bruit de fond du marquage

Conservation et Stabilité

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

Préparation des Spécimens

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

Mises en Garde et Précautions

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

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

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

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

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

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

Contrôle de Qualité

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

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

Tissu de Contrôle Positif

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

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

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

Le tissu de contrôle positif recommandé est colon.

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 muscle squelettique constitue le tissu de contrôle négatif recommandé.

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

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

Réactif de Contrôle Négatif

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

Tissu du Patient

Examiner les échantillons du patient marqués au NCL-L-MSH6 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 PU29 a détecté la protéine MSH6 exprimée dans les noyaux des cellules de divers tissus (n=69). Un marquage a été observé dans le colon, l'intestin grêle, l'appendice, les surrénales, le poulmon, l'estomac, l'oesophage, la peau, les ovaires, le col de l'utérus, l'utérus, la prostate, le thymus, les glandes salivaires, la thyroïde, la parathyroïde, le sein, l'hypophyse, les amygdales, la moelle osseuse, la vésicule biliaire, le placenta et la moelle épinière.

Tissus tumoraux

Le clone PU29 a détecté la protéine MSH6 dans des tumeurs du colon (54/58). Le clone PU29 a également détecté la protéine MSH6 dans des lymphomes (9/11), des sarcomes (7/7), des tumeurs ovariennes (7/7), des tumeurs du poulmon (6/7), des tumeurs mammaires (4/5), des tumeurs de l'estomac (4/4), des tumeurs endométriales (4/4), des tumeurs neuroendocrines(2/4), des tumeurs de la prostate/HBP (3/3), des mélanomes (3/3), des tumeurs des glandes surrénales (3/3), des tumeurs des cellules germinales (3/3), des tumeurs de la vessie (3/3), des carcinomes des cellules squameuses (2/3), des tumeurs du foie (1/3), des tumeurs pancréatiques (2/2), des tumeurs de la thyroïde (2/2), des tumeurs de l'estomac (2/2), des tumeurs pancréatiques (2/2), des tumeurs de la thyroïde (2/2), des tumeurs de l'intestin grêle (1/1), des tumeurs de la peau (1/1), des tumeurs du thymus (1/1), des tumeurs neurales (0/1) et des tumeurs du rein (0/4) (n=140).

L'utilisation du NCL-L-MSH6 est recommandée pour la détection de l'expression de la protéine MSH6 dans les tissus normaux et néoplasiques, en particulier dans le cadre de la démonstration de la perte d'expression de la MSH6 dans les cas de cancer du colon héréditaire sans polyposé et de cancer sporadique

Limites Générales

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

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

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

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

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

Bibliographie Générale

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Warren J, Pohlhaus T, Changela A, et al. Structure of the human MutSa DNA lesion recognition complex. Molecular Cell. 2007; 26:579-592.
6. Marti T, Kunz C, Fleck O, et al. DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways. Journal of Cellular Physiology. 2002; 191:28-41.

Amendements Apportés à la Version Précédente

Non applicable

Date de Publication

27 mars 2013

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

A. Réactifs nécessaires mais non fournis

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

B. Equipements nécessaires mais non fournis

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

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

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

D. Méthodologie

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

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

Restauration de l'épitope

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

Révélation

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

E. Amendements apportés à la version précédente

Non applicable.

F. Date de publication

23 avril 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

Novocastra™ Anticorpo monoclonale murino Liquido

Mismatch Repair Protein 6 (MSH6)

Codice Del Prodotto: NCL-L-MSH6

Uso Previsto

Per uso diagnostico in vitro.

NCL-L-MSH6 è destinato all'identificazione qualitativa in microscopia ottica della molecole Mismatch Repair Protein 6 (MSH6), in sezioni incluse in paraffina. L'interpretazione clinica di ogni colorazione o della sua assenza va integrata da studi morfologici che utilizzino i controlli appropriati e deve essere valutata da un patologo qualificato, nel contesto della storia clinica del paziente e delle altre metodiche diagnostiche adoperate.

Principio Della Procedura

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

Clone

PU29

Immunogeno

Proteina ricombinante procariotica, corrispondente a una porzione di 359 aminoacidi della molecola MSH6 umana.

Specificità

Proteina 6 umana del sistema di riparazione del DNA.

Composizione Del Reagente

NCL-L-MSH6 è un supernatante liquido di coltura tissutale, contenente 15 mM di sodio azide come conservante.

Classe Ig

IgG1

Concentrazione Proteica Totale

Total Protein

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

Concentrazione Anticorpale

Superiore o uguale a 200 mg/L, come determinato mediante test ELISA. Consultare l'etichetta del flacone per la concentrazione di Ig specifica del lotto.

Raccomandazioni Per L'uso

Immunostochimica (vedere **D. Metodologia**) sulle sezioni in paraffina. Diluizione raccomandata: 1:100 per 30 minuti a 25 °C. Smascheramento ad alta temperatura dell'epitopo mediante Epitope Retrieval Solution pH 6,0 RE7113, RE7114 o RE7115. Queste raccomandazioni costituiscono delle semplici linee guida; spetta al singolo utente stabilire la diluizione di lavoro ottimale.

Nota tecnica: L'uso di diluenti a base di PBS può provocare un aumento della colorazione di fondo

Conservazione E Stabilità

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

Preparazione Del Campione Biologico

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

Avvertenze E Precauzioni

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

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

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

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

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

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

Controllo Qualità

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

Controllo Positivo Del Tessuto

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

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

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

Il tessuto raccomandato per il controllo positivo è colon.

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

Controllo Negativo Del Tessuto

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

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

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

Controllo Negativo Del Reagente

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

Tessuto Del Paziente

Successivamente, esaminare i campioni biologici del paziente colorati con NCL-L-MSH6. 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 PU29 ha messo in evidenza la proteina MSH6 espressa nel nucleo delle cellule di una varietà di tessuti (n=69). Una colorazione è stata messa in evidenza in: colon, intestino tenue, appendice, ghiandola surrenale, polmone, stomaco, esofago, cute, ovaio, cervice, prostata, timo, ghiandola salivare, tiroide, paratiroide, ghiandola mammaria, pituitaria, tonsilla, midollo osseo, colecisti, placenta e midollo spinale.

Tessuti tumorali

Il clone PU29 ha messo in evidenza la proteina MSH6 in 54/58 tumori del colon. Il clone PU29 ha messo in evidenza la proteina MSH6 anche in: linfomi (9/11), sarcomi (7/7), tumori ovarici (7/7), tumori polmonari (6/7), tumori mammari (4/5), tumori gastrici (4/4), tumori endometriali (4/4), tumori neuroendocrini (2/4), BPH/tumori della prostata (3/3), melanomi (3/3), tumori surrenalici (3/3), tumori a cellule germinali (3/3), tumori della vescica (3/3), carcinomi a cellule squamose (2/3), tumori epatici (1/3), tumori pancreatici (2/2), tumori tiroidei (2/2), tumori dell'intestino tenue (1/1), tumori cutanei (1/1), tumori del timo (1/1), tumori neurali (0/1) tumori renali (0/4) (n=140).

Si raccomanda l'uso di NCL-L-MSH6 nella messa in evidenza dell'espressione della proteina MSH6 in tessuti normali e neoplastici, in particolare per favorire l'identificazione di perdita di espressività di MSH6 nel cancro del colon da non poliposi ereditaria e nel cancro sporadico.

Limitazioni Generali

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

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

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

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

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

Riferimenti Bibliografici Di Base

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Warren J, Pohlhaus T, Changela A, et al. Structure of the human MutSa DNA lesion recognition complex. Molecular Cell. 2007; 26:579-592.
6. Marti T, Kunz C, Fleck O, et al. DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways. Journal of Cellular Physiology. 2002; 191:28-41.

Modifiche Alla Pubblicazione Precedente

Non applicabile.

Data Di Pubblicazione

27 marzo 2013

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

A. Reagenti necessari ma non forniti

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

B. Attrezzature necessarie ma non fornite

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

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

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

D. Metodologia

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

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

Smascheramento dell'epitopo

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

Visualizzazione

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

E. Modifiche alla pubblicazione precedente

Non applicabile.

F. Data di pubblicazione

23 aprile 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

Novocastra™ Flüssiger monoklonaler Maus-Antikörper Mismatch Repair Protein 6 (MSH6) Produkt-Nr.: NCL-L-MSH6

Verwendungszweck

Für *in-vitro*-Diagnostik.

NCL-L-MSH6 ist für den qualitativen Nachweis der Mismatch Repair Protein 6 (MSH6)-Moleküle in Paraffinschnitten mittels Lichtmikroskopie gedacht. Die klinische Bewertung einer vorliegenden bzw. fehlenden Färbung sollte durch morphologische Studien mit entsprechenden Kontrollen ergänzt und im Kontext der Krankengeschichte des Patienten und anderer diagnostischer Tests von einem qualifizierten Pathologen vorgenommen werden.

Verfahrensgrundlage

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

Klon

PU29

Immunogen

Prokaryotisches rekombinantes Protein, das einem Anteil aus 359 Aminosäuren des humanen MSH6-Moleküls entspricht

Spezifität

Humanes Protein 6 zur Mismatch-Reparatur

Reagenzzusammensetzung

NCL-L-MSH6 ist ein flüssiger Gewebekulturüberstand, der 15 mmol/l Natriumazid als Konservierungsmittel enthält.

Ig-Klasse

IgG1

Gesamtproteinkonzentration Total Protein

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

Antikörperkonzentration

Größer als oder gleich 200 mg/L laut ELISA-Bestimmung. Hinsichtlich der chargenspezifischen Ig-Konzentration siehe Angaben auf dem Produktetikett.

Gebrauchsempfehlungen

Immunhistochemie (siehe **D. Vorgehensweise**) auf Paraffinschnitten. Empfohlene Verdünnung: 1:100 über einen Zeitraum von 30 Minuten bei 25 °C. Hitzeinduzierte Antigendemaskierung mit Epitope Retrieval Solutions pH 6,0 RE7113, RE7114 oder RE7115. Dies ist nur eine Empfehlung, und die Benutzer sollten ihre eigenen optimalen Arbeitsverdünnungen bestimmen. **Technischer Hinweis:** Die Verwendung von Verdünnungsmitteln auf PBS-Basis könnte zu einer verstärkten Hintergrundfärbung führen

Lagerung und Stabilität

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

Probenvorbereitung

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

Warnhinweise und Sicherheitsmaßnahmen

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

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

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

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

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

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

Qualitätskontrolle

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

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

Positive Gewebekontrolle

Zeigt korrekt vorbereitete Gewebe und korrekte Färbetechniken an.

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

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

Für die positive Gewebekontrolle wird Kolon empfohlen.

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

Negative Gewebekontrolle

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

Für die negative Gewebekontrolle wird Skelettmuskel empfohlen.

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

Liegt eine unspezifische Färbung vor, hat diese gewöhnlich ein diffuses Erscheinungsbild. Eine sporadische Färbung des Bindegewebes kann ebenfalls in Schnitten von übermäßig formalinfixierten Geweben beobachtet werden. Zur Bewertung der Färberegebnisse intakte Zellen verwenden. Nekrotische oder degenerierte Zellen werden oft unspezifisch gefärbt.³ Falsch-positive Ergebnisse können aufgrund einer nichtimmunologischen Bindung von Proteinen oder Substratreaktionsprodukten beobachtet werden. In Abhängigkeit von der Art der verwendeten Immunfärbung können solche Ergebnisse auch durch endogene Enzyme wie Pseudoperoxidase (Erythrozyten), endogene Peroxidase (Zytochrom C) oder endogenes Biotin (beispielsweise Leber, Mamma, Gehirn, Niere) hervorgerufen werden. Um eine endogene Enzymaktivität bzw. eine unspezifische Enzymbindung von einer spezifischen Immunreaktivität zu unterscheiden, können zusätzliche Patientengewebe ausschließlich mit Substratchromogen bzw. mit Enzymkomplexen (Avidin-Biotin, Streptavidin, markiertes Polymer) plus Substratchromogen gefärbt werden. Falls im negativen Kontrollgewebe eine spezifische Färbung auftritt, sollten die Ergebnisse mit den Patientenproben als ungültig betrachtet werden.

Negative Reagenzkontrolle

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

Patientengewebe

Die mit NCL-L-MSH6 gefärbten Patientenproben müssen zuletzt untersucht werden. Eine positive Färbintensität 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 PU29 wies das MSH6-Protein, das im Nukleus von Zellen exprimiert wird, in einer Reihe unterschiedlicher Gewebe (n=69) nach. Eine Färbung wurde in Kolon, Dünndarm, Appendix, Nebennieren, Lunge, Magen, Ösophagus, Haut, Ovar, Zervix, Prostata, Thymus, Speicheldrüse, Thyroidea, Parathyroidea, Mamma, Hypophyse, Tonsillen, Knochenmark, Gallenblase, Plazenta und Rückenmark beobachtet.

Tumorgewebe

Klon PU29 wies das MSH6-Protein in 54/58 Kolontumoren nach. Klon PU29 wies das MSH6-Protein ebenfalls bei Lymphomen (9/11), Sarkomen (7/7), Ovarialtumoren (7/7), Lungentumoren (6/7), Mammatumoren (4/5), Magentumoren (4/4), Endometriumtumoren (4/4), neuroendokrinen Tumoren (2/4), BPH/Prostatatumoren (3/3), Melanomen (3/3), Nebennierentumoren (3/3), Keimzelltumoren (3/3), Harnblasentumoren (3/3), Plattenzellkarzinomen (2/3), Lebertumoren (1/3), Pankreastumoren (2/2), Schilddrüsentumoren (2/2), Dünndarmtumor (1/1), Hauttumor (1/1), Thymustumor (1/1), neuralem Tumor (0/1) und Nierentumor (0/4) (n=140) nach.

NCL-L-MSH6 wird zum Nachweis der MSH6-Proteinexpression in normalen und neoplastischen Geweben empfohlen, insbesondere zur Unterstützung der Demonstration des Verlusts der MSH6-Expression bei erblichem Nicht-Polyposis-Kolonkarzinom und sporadischem Krebs

Allgemeine Beschränkungen

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

Die Gewebefärbung hängt von der Handhabung und Verarbeitung des Gewebes vor dem Färben ab. Unsachgemäßes Fixieren, Einfrieren, Auftauen, Waschen, Trocknen, Erwärmen, Schneiden oder eine Kontamination mit anderen Geweben oder Flüssigkeiten kann zu Artefakten, Antikörper-Trapping oder falsch-negativen Ergebnissen führen. Abweichende Ergebnisse können aufgrund von Unterschieden bei der Fixierung und Einbettung oder intrinsischen Unregelmäßigkeiten im Gewebe selbst entstehen.⁴

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

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

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

Literatur - Allgemein

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, 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. Warren J, Pohlhaus T, Changela A, et al. Structure of the human MutSα DNA lesion recognition complex. Molecular Cell. 2007; 26:579-592.
6. Marti T, Kunz C, Fleck O, et al. DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways. Journal of Cellular Physiology. 2002; 191:28-41.

Änderungen zur vorhergehenden Ausgabe

Keine.

Ausgabedatum

27 März 2013

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

A. Erforderliche, jedoch nicht mitgelieferte Reagenzien

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

B. Erforderliche, jedoch nicht mitgelieferte Ausrüstung

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

C. Epitopdemaskierungslösungen (siehe Gebrauchsempfehlungen für eines der folgenden Produkte)

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

D. Vorgehensweise

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

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

Epitopdemaskierungsverfahren

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

Visualisierung

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

E. Änderungen zur vorherigen Ausgabe

Keine.

F. Ausgabedatum

23 April 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

Novocastra™ Anticuerpos monoclonal murino líquidos

Mismatch Repair Protein 6 (MSH6)

Código De Producto: NCL-L-MSH6

Indicaciones De Uso

Para uso diagnóstico in vitro.

NCL-L-MSH6 está indicado para la identificación cualitativa en secciones de parafina, mediante microscopía óptica, de moléculas de Mismatch Repair Protein 6 (MSH6). La interpretación clínica de cualquier tinción o de su ausencia debe complementarse con estudios morfológicos, con el uso de los controles adecuados, y un anatomopatólogo cualificado debe evaluarla en el contexto del historial clínico del paciente y de otras pruebas diagnósticas.

Principio Del Procedimiento

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

Clon

PU29

Inmunógeno

Proteína recombinante procarrióica correspondiente a una parte de 359 aminoácidos de la molécula humana MSH6

Especificidad

Proteína 6 humana de reparación de emparejamientos incorrectos del ADN

Composición Del Reactivo

NCL-L-MSH6 es un sobrenadante de cultivo tisular líquido que contiene azida sódica 15 mM como conservante.

Clase de Ig

IgG1

Concentración Total De Proteína Total Protein

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

Concentración De Anticuerpo

Igual o superior a 200 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 de parafina. Dilución sugerida: 1:100 durante 30 minutos a 25°C. Recuperación de epitopos inducida por calor con Epitope Retrieval Solution pH 6,0 RE7113, RE7114 o RE7115. Ésta es tan solo una pauta y cada usuario debe determinar sus propias diluciones de trabajo óptimas. *Nota técnica:* La utilización de diluyentes a base de PBS puede provocar una mayor tinción de fondo

Almacenamiento Y Estabilidad

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

Preparación De Las Muestras

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

Advertencias Y Precauciones

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

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

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

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

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

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

Control De Calidad

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

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

Control Tisular Positivo

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

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

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

El tejido de control positivo recomendado es colon.

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

Control Tisular Negativo

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

El tejido de control negativo recomendado es músculo esquelético.

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

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

Control De Reactivo Negativo

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

Tejido Del Paciente

Examine las muestras del paciente o pacientes teñidas con NCL-L-MSH6 al final. La intensidad de la tinción positiva debe valorarse en el contexto de cualquier tinción de fondo no específica del control de reactivo negativo. Como con cualquier prueba inmunohistoquímica, un resultado negativo significa que no se ha detectado antígeno, y no que el antígeno esté ausente en las células o tejido probados. Si es necesario, use un panel de anticuerpos para identificar falsas reacciones negativas.

Resultados esperados

Tejidos normales

El clon PU29 detectó la expresión de la proteína MSH6 en el núcleo de las células de diversos tejidos (n=69). La tinción se observó en colon, intestino delgado, apéndice, tejido suprarrenal, pulmones, estómago, esófago, piel, ovario, cérvix, próstata, timo, glándula salivar, tiroides, glándula paratiroidea, mama, glándula pituitaria, amígdalas, médula ósea, vejiga urinaria, placenta y médula espinal.

Tejidos tumorales

El clon PU29 detectó la proteína MSH6 en 54 de 58 tumores de colon. El clon PU29 también detectó la proteína MSH6 en linfomas (9 de 11), sarcomas (7 de 7), tumores ováricos (7 de 7), pulmonares (6 de 7), de mama (4 de 5), de estómago (4 de 4), endometriales (4 de 4), neuroendocrinos (2 de 4), tumores de próstata/HPB (3 de 3), melanomas (3 de 3), tumores suprarrenales (3 de 3), tumores de células reproductoras (3 de 3), tumores de vejiga (3 de 3), carcinomas de células escamosas (2 de 3), tumores hepáticos (1 de 3), tumores pancreáticos (2 de 2), tumores tiroideos (2 de 2), tumores de intestino delgado (1 de 1), tumores de piel (1 de 1), tumores del timo (1 de 1), neural (0 de 1) y tumores del riñón (0 de 4) (n=140).

NCL-L-MSH6 se recomienda para detectar la expresión de la proteína MSH6 en tejidos normales y neoplásicos, sobre todo para facilitar la demostración de la pérdida de la expresión de MSH6 en cáncer de colon sin poliposis y de cáncer esporádico.

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 IHC, y la interpretación de los resultados de la tinción.

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

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

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

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

Bibliografía - General

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.
5. Warren J, Pohlhaus T, Changela A, et al. Structure of the human MutSα DNA lesion recognition complex. *Molecular Cell*. 2007; 26:579-592.
6. Marti T, Kunz C, Fleck O, et al. DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways. *Journal of Cellular Physiology*. 2002; 191:28-41.

Correcciones A La Publicación Anterior

No aplicable

Fecha De Publicación

27 de marzo de 2013

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

A. Reactivos necesarios que no se suministran

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

B. Equipo necesario que no se suministra

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

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

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

D. Metodología

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

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

Recuperación de epítomos

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

Visualización

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

E. Correcciones con respecto a la publicación anterior

No aplicable.

F. Fecha de publicación

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

Novocastra™ Anticorpo monoclonal líquido de ratinho

Mismatch Repair Protein 6 (MSH6)

Código Do Produto: NCL-L-MSH6

Utilização prevista

Para utilização em diagnósticos *in vitro*.

NCL-L-MSH6 foi concebido para efectuar a identificação qualitativa da moléculas de Mismatch Repair Protein 6 (MSH6) por microscopia óptica, em secções parafinizadas. A interpretação clínica de qualquer coloração ou da sua ausência deve ser complementada por estudos morfológicos empregando os devidos controlos e deve ser avaliada por um patologista qualificado, dentro do contexto do historial clínico do doente e de outros testes de diagnóstico.

Princípio Do Procedimento

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

Clone

PU29

Imunogénio

Proteína recombinante procarriótica correspondendo a uma porção de 359 aminoácidos da molécula MSH6 humana.

Especificidade

Proteína 6 de reparação de mismatch humana.

Composição Do Reagente

NCL-L-MSH6 é o sobrenadante líquido da cultura de um tecido contendo 15 mM de azida de sódio como produto conservante.

Classe De Ig

IgG1

Concentração Total De Proteína Total Protein

1.0 - 8.0 g/L. Consultar a etiqueta da ampola para determinar a concentração total de proteína do lote específico.

Concentração De Anticorpo

Maior que ou igual a 200 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 de parafina. Diluição sugerida: 1:100 durante 30 minutos a 25 °C. Recuperação de epítomos induzida por calor utilizando Epitope Retrieval Solution pH6,0 RE7113, RE7114 ou RE7115. Esta recomendação é apenas uma directriz e o utilizador deve determinar qual a diluição ideal para o trabalho específico. Observação técnica: O emprego de diluentes à base de PBS pode resultar num aumento da coloração de fundo.

Armazenamento E Estabilidade

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

Preparação Das Amostras

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

Avisos E Precauções

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

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

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

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

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

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

Controlo Da Qualidade

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

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

Controlo De Tecido Positivo

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

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

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

O tecido de controlo positivo recomendado é a cólon.

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

Controlo De Tecido Negativo

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

O controlo de tecido negativo recomendado é o músculo esquelético.

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

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

Controlo De Reagente Negativo

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

Tecido Do Doente

Examinar as amostras do doente coloridas com NCL-L-MSH6 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 PU29 detectou a proteína MSH6 expressa nos núcleos das células de uma série de tecidos (n=69). Observou-se a coloração no cólon, intestino delgado, apêndice, glândula supra-renal, pulmão, estômago, esófago, pele, ovário, colo uterino, próstata, timo, glândula salivar, tiróide, paratiróide, mama, pituitária, amígdala, medula óssea, vesícula biliar, placenta e espinal medula.

Tecidos tumorais

O clone PU29 detectou a proteína MSH6 em 54/58 tumores do cólon. O clone PU29 detectou ainda a proteína MSH6 em linfomas (9/11), sarcomas (7/7), tumores ovarianos (7/7), tumores do pulmão (6/7), tumores da mama (4/5), tumores estomacais (4/4), tumores endometriais (4/4), tumores neuroendócrinos (2/4), tumores BPH/da próstata (3/3), melanomas (3/3), tumores supra-renais (3/3), tumores das células germinais (3/3), tumores da bexiga (3/3), carcinomas das células escamosas (2/3), tumores hepáticos (1/3), tumores pancreáticos (2/2), tumores da tiróide (2/2), tumor do intestino delgado (1/1), tumor da pele (1/1), tumor do timo (1/1), tumor neural (0/1) e tumores renais (0/4) (n=140).

NCL-L-MSH6 é recomendado para utilização na detecção da expressão da proteína MSH6 em tecidos normais e neoplásicos, em especial para ajudar a demonstrar a perda da expressão da MSH6 em cancro de não polipose do cólon, hereditários e cancro esporádicos.

Limitações Gerais

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

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

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

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

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

Bibliografia - Geral

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Warren J, Pohlhaus T, Changela A, et al. Structure of the human MutSa DNA lesion recognition complex. Molecular Cell. 2007; 26:579-592.
6. Marti T, Kunz C, Fleck O, et al. DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways. Journal of Cellular Physiology. 2002; 191:28-41.

Emendas Da Edição Anterior

Não é aplicável

Data De Emissão

27 de Março de 2013

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

A. Reagentes necessários mas não fornecidos

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

B. Equipamento necessário mas não fornecido

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

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

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

D. Metodologia

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

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

Recuperação de epítomos

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

Visualização

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

E. Emendas da edição anterior

Não é aplicável.

F. Data de emissão

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

Novocastra™ Flytande monoklonal musantikropp

Mismatch Repair Protein 6 (MSH6)

Produktkod: NCL-L-MSH6

Avsedd Användning

För in vitro diagnostisk användning.

NCL-L-MSH6 är avsedd för kvalitativ identifiering med ljusmikroskopi av Mismatch Repair Protein 6 (MSH6)-molekyler i paraffinsnitt. Den kliniska tolkningen av all färgning eller dess frånvaro bör kompletteras med morfologiska undersökningar som använder korrekta kontroller och utvärderas av kvalificerad patolog inom ramen för patientens kliniska anamnes och andra diagnostiska tester.

Metodens Princip

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

Klon

PU29

Immunogen

Prokaryotiskt rekombinant protein som motsvarar en portion av MSH6 human molekyl med 359 aminosyror.

Specifitet

Humant felmatchande reparationsprotein 6

Reagensinnehåll

NCL-L-MSH6 är en flytande supernatant från vävnadsodling som innehåller 15 mM natriumazid som konserveringsmedel.

Ig-klass

IgG1

Total Proteinkoncentration Total Protein

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

Antikropps-koncentration

Större än eller lika med 200 mg/L fastställt genom ELISA. Se flaskans etikett för specifik Ig-koncentration för satsen.

Rekommendationer Vid Användning

Immunhistokemi (se **D. Metodologi**) på paraffinsnitt. Föreslagen spädning: 1:100 i 30 minuter vid 25 °C. Värmeinducerad epitopåtervinning med Epitope Retrieval Solution pH6,0 RE7113, RE7114 eller RE7115. Detta är endast en riktlinje och användare bör själva fastställa den optimala bruksspädningen. **Teknisk anmärkning:** Användning av PBS-baserade spädningsmedel kan orsaka ökad bakgrundsfärgning

Förvaring Och Stabilitet

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

Preparation Av Prov

Rekommenderat fixeringsmedel för paraffinbäddade vävnadssnitt är 10% neutralbuffrat formalin.

Varningar Och Försiktighetsåtgärder

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

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

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

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

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

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

Kvalitetskontroll

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

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

Positiv Vävnadskontroll

Används för att ange korrekt förberedda vävnader och rätt färgningstekniker.

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

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

Kolon rekommenderas som positiv kontrollvävnad.

Om den positiva vävnadskontrollen inte uppvisar positiv färgning bör resultatet 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.

Skelettmuskulatur rekommenderades som negativ kontrollvävnad.

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

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

Negativ Reagenskontroll

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

Patientvävnad

Undersök patientprover färgade med NCL-L-MSH6 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 PU29 detekterade MSH6-proteinet uttryckt i kärnan av celler i ett antal olika vävnader (n=69). Färgning observerades i kolon, tunntarm, blindtarm, binjüre, lunga, mage, matstrupe, hud, äggstock, livmoderhals, prostata, tymus, salivkörtel, sköldkörtel, bisköldkörtel, bröst, hypofys, tonsill, benmärg, gallblåsa, placenta och ryggmärg.

Tumörvävnader

Klon PU29 detekterade MSH6-proteinet i 54/58 kolontumörer. Klon PU29 detekterade även MSH6-proteinet i lymfom (9/11), sarkom (7/7), äggstockstumörer (7/7), lungtumörer (6/7), brösttumörer (4/5), magtumörer (4/4), endometriala tumörer (4/4), neuroendokrina tumörer (2/4), BPH/prostatatumör (3/3), melanom (3/3), binjuretumörer (3/3), könszelltumörer (3/3), urinblåsetumörer (3/3), skvamösa cellcarcinom (2/3), levertumörer (1/3), bukspottkörteltumörer (2/2), sköldkörteltumörer (2/2), tunntarmstumör (1/1), hudtumör (1/1), tymustumör (1/1), neural tumör (0/1) och njurtumörer (0/4) (n=140).

NCL-L-MSH6 rekommenderas för användning vid detektion av MSH6-proteinuttryck i normala och neoplastiska vävnader, särskilt för att underlätta demonstration av förlust av MSH6-uttryck i ärftlig icke-polypos koloncancer och sporadisk cancer.

Allmänna Begränsningar

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

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

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

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

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

Bibliografi - Allmän

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Warren J, Pohlhaus T, Changela A, et al. Structure of the human MutSα DNA lesion recognition complex. Molecular Cell. 2007; 26:579-592.
6. Marti T, Kunz C, Fleck O, et al. DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways. Journal of Cellular Physiology. 2002; 191:28-41.

Rättelser Av Tidigare Utgivning

Gäller inte

Utgivningsdatum

27 mars 2013

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

A. Reagens som krävs men inte tillhandahålls

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

B. Utrustning som krävs men inte tillhandahålls

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

C. Epitopåtervinningslösningar (se Rekommendationer för användning för en av följande)

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

D. Metodologi

Innan metoden tillämpas måste användarna vara utbildade i immunhistokemiska tekniker.

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

Epitopåtervinning

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

Visualisering

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

E. Rättelser av tidigare utgivning

Inte tillämpligt.

F. Utgivningsdatum

23 April 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink)

Novocastra™ Υγρό Μονοκλωνικό Αντίσωμα Ποντικού

Mismatch Repair Protein 6 (MSH6)

Κωδικός είδους: NCL-L-MSH6

Χρήση Για Την Οποία Προορίζεται

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση.

Το NCL-L-MSH6 προορίζεται για την ποιοτική ταυτοποίηση με μικροσκοπία φωτός της ανθρώπινης Μόρια Mismatch Repair Protein 6 (MSH6) σε τομές παραφίνης. Η κλινική ερμηνεία οποιασδήποτε χρώσης ή της απουσίας της θα πρέπει να συμπληρώνεται με μορφολογικές μελέτες που χρησιμοποιούν αμεινωμένους 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 ανοσοστοχημικής (IHC) χρώσης επιτρέπουν την οπτικοποίηση των αντιγόνων μέσω της διαδοχικής εφαρμογής ενός ειδικού αντισώματος στο αντιγόνο (πρωτογενές αντίσωμα), ενός δευτεροταγούς αντισώματος στο πρωτογενές αντίσωμα και ενός ενζυμικού συμπλόκου με χρωμογόνο υπόστρωμα με παρεμβαλλόμενα βήματα πλύσης. Η ενζυμική ενεργοποίηση του χρωμογόνου έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός ορατού προϊόντος αντίδρασης στη θέση του αντιγόνου. Το δείγμα μπορεί κατόπιν να υποβληθεί σε αντιχρώση και να καλυφθεί με καλυπτήρια. Τα αποτελέσματα ερμηνεύονται με χρήση μικροσκοπίου φωτός και βοηθούν στη διαφορική διάγνωση παθοφυσιολογικών εξεργασιών, οι οποίες ενδέχεται ή όχι να σχετίζονται με ένα συγκεκριμένο αντιγόνο.

Κλώνος

PU29

Ανοσογόνο

Προκαρμωτική ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη που αντιστοιχεί σε ένα τμήμα 359 αμινοξέων του ανθρώπινου μορίου MSH6.

Ειδικότητα

Ανθρώπινη πρωτεΐνη 6 επιδιόρθωσης αταίριαστων ζευγών βάσεων

Σύνθεση Αντιδραστήριου

Το NCL-L-MSH6 είναι ένα υγρό υπερκείμενο ιστοκαλλιέργειας που περιέχει 15 mM αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό.

Τάξη Ig

IgG1

Ολική Συγκέντρωση Πρωτεΐνης

Total Protein

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

Συγκέντρωση Αντισώματος

Μεγαλύτερη ή ίση με 200 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

Ανοσοστοχημεία (δείτε την ενότητα "**Δ. Μεθοδολογία**") σε τομές παραφίνης. Προτεινόμενη αραίωση: 1:100 επί 30 λεπτά στους 25 °C. Θεσμικά επαγόμενη ανάκτηση επιτόπου με χρήση των Eritore Retrieval Solution pH6.0 RE7113, RE7114 ή RE7115. Αυτό παρέχεται ως οδηγός και οι χρήστες θα πρέπει να προσδιορίζουν τις δικές τους βέλτιστες αραιώσεις εργασίας. Τεχνική σημείωση: Η χρήση αραιωτικών με βάση το PBS μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη χρώση του υποβάθρου.

Φύλαξη Και Σταθερότητα

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

Παρασκευή Δείγματος

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

Προειδοποιήσεις Και Προφυλάξεις

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

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

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

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

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

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

Ποιοτικός Έλεγχος

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

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

Θετικός Μάρτυρας Ιστού

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

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

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

Συνιστώμενος ιστός θετικού μάρτυρα είναι η κόλον.

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

Αρνητικός Μάρτυρας Ιστού

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

Συνιστώμενος ιστός αρνητικού μάρτυρα είναι η Σκελετικός μυς.

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

Μη ειδική χρώση, εάν υπάρχει, έχει συνήθως διάχυτη εμφάνιση. Ενδέχεται επίσης να παρατηρηθεί σποραδική χρώση του συνδεδετικού ιστού σε τομές από ιστούς που έχουν μονιμοποιηθεί με υπερβολική ποσότητα φορμόλης. Χρησιμοποιείτε άθικτα κύτταρα για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της χρώσης. Νεκρωτικά ή εκφυλισμένα κύτταρα παρουσιάζουν συχνά μη ειδική χρώση.³ Ενδέχεται να παρατηρηθούν ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω μη ανοσολογικής δέσμησης των πρωτεϊνών ή των προσόντων 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 ανοσοχρώσης που χρησιμοποιείται. Για τη διαφοροποίηση της ενδογενούς ενζυμικής δραστηριότητας ή της μη ειδικής δέσμησης των ενζύμων από ειδική ανοσοαντιδραστικότητα, είναι δυνατό να χρωματιστούν αποκλειστικά επιπλέον ιστού ασθενούς με χρωμογόνο υποστρώματος ή ενζυμικά σύμπλοκα (αβιδίνη-βιοτίνη, στρεπταβιδίνη, σημασμένο πολυμερές) και υπόστρωμα-χρωμογόνο, αντίστοιχα. Εάν παρουσιαστεί ειδική χρώση στον αρνητικό μάρτυρα ιστού, τα αποτελέσματα με τα δείγματα ασθενούς θα πρέπει να θεωρούνται άκυρα.

Αρνητικός Μάρτυρας Αντιδραστηρίου

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

Ιστός Ασθενούς

Εξετάστε τελευταία τα δείγματα ασθενούς που έχουν χρωματιστεί με το NCL-L-MSH6. Η ένταση της θετικής χρώσης θα πρέπει να είναι εκτιμάται στα πλαίσια ιστών μη ειδικής χρώσης υποβάθρου του αρνητικού μάρτυρα αντιδραστηρίου. Όπως συμβαίνει με οποιαδήποτε ανοσοϊστοχημική εξέταση, ένα αρνητικό αποτέλεσμα σημαίνει ότι το αντιγόνο δεν ανιχνεύτηκε, όχι ότι το αντιγόνο δεν υπήρχε στα κύτταρα/στον ιστό που εξετάστηκε. Εάν είναι απαραίτητο, χρησιμοποιήστε μια σειρά αντισωμάτων για την αναγνώριση ψευδώς αρνητικών αντιδράσεων.

Αναμενόμενα αποτελέσματα

Φυσιολογικοί ιστοί

Ο κλώνος PU29 ανίχνευσε την πρωτεΐνη MSH6 που εκφράζεται στους πυρήνες των κυττάρων σε ποικιλία ιστών (n=69). Χρώση παρατηρήθηκε στο κόλον, το λεπτό έντερο, τη σκληροειδή απόφυση, τα επινεφρίδια, τον πνεύμονα, το στομάχο, τον οισοφάγο, το δέρμα, τις ωοθήκες, τον τράχηλο, τον προστάτη, το θύμο αδένα, τους σιελογόνους αδένες, το θυροειδή, τους παραθυρεοειδείς, τους μαστούς, την υπόφυση, τις αμυγδαλές, τον μελό των οστών, τον πλακούντα και το νωτιαίο μελό.

Καρκινικοί ιστοί

Ο κλώνος PU29 ανίχνευσε την πρωτεΐνη MSH6 σε 54/58 όγκους του κόλου. Ο κλώνος PU29 ανίχνευσε επίσης την πρωτεΐνη MSH6 σε λεμφώματα (9/11), σαρκώματα (7/7), όγκους των ωοθηκών (7/7), όγκους των πνευμόνων (6/7), όγκους των μαστών (4/5), όγκους του στομάχου (4/4), όγκους του ενδομητρίου (4/4), νευροενδοκρινικούς όγκους (2/4), όγκους του προστάτη/καλοήθους προστατικής υπερπλασίας (3/3), μελανώματα (3/3), όγκους των επινεφριδίων, όγκους των βλαστικών κυττάρων (3/3), όγκους της ουροδόχου κύστεως (3/3), ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα (2/3), όγκους του ήπατος (1/3), όγκους του παγκρέατος (2/2), όγκους του θυροειδούς (2/2), όγκο του λεπτού εντέρου (1/1), όγκο του δέρματος (1/1), όγκο του θύμου αδένα (1/1), όγκους των νεύρων (0/1) και όγκους των νεφρών (0/4) (n=140).

Το NCL-L-MSH6 συνιστάται για χρήση στην ανίχνευση της έκφρασης της πρωτεΐνης MSH6 σε φυσιολογικούς και νεοπλασματικούς ιστούς, ιδιαίτερα για βοήθεια στην ανανώριση της απώλειας της έκφρασης της MSH6 σε περιπτώσεις κληρονομικού μη πολυποειδούς καρκίνου του κόλου και σποραδικών καρκίνων.

Γενικοί Περιορισμοί

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

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

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

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

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

Βιβλιογραφία - Γενική

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, 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. Warren J, Pohlhaus T, Changela A, et al. Structure of the human MutSa DNA lesion recognition complex. *Molecular Cell*. 2007; 26:579-592.
6. Marti T, Kunz C, Fleck O, et al. DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways. *Journal of Cellular Physiology*. 2002; 191:28-41.

Τροποποιήσεις Στην Προηγούμενη Έκδοση

Δεν έχει εφαρμογή.

Ημερομηνία Έκδοσης

27 Μαρτίου 2013

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

A. Αντιδραστήρια που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

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

B. Εξοπλισμός που απαιτείται αλλά δεν παρέχεται

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

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

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

Δ. Μεθοδολογία

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

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

Ανάκτηση επιτόπου

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

Απεικόνιση

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

E. Τροποποιήσεις στην προηγούμενη έκδοση

Δεν έχει εφαρμογή.

Στ. Ημερομηνία έκδοσης

23 Απρίλιος 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

Novocastra™ Væskeformigt monoklonalt museantistof

Mismatch Repair Protein 6 (MSH6)

Produktkode: NCL-L-MSH6

Tilsigtet Anvendelse

Til in vitro diagnostisk anvendelse.

NCL-L-MSH6 er beregnet til kvalitativ identifikation af Mismatch Repair Protein 6 (MSH6)-molekyler i paraffinsnit ved lysmikroskopi.

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

Procedureprincip

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

Klon

PU29

Immunogen

Prokaryot rekombinant protein svarende til en 359 aminosyredele af MSH6 humant molekyle

Specifitet

Humant mispansnings-reparationsprotein 6

Reagenssammensætning

NCL-L-MSH6 er en flydende vævskultursupernatant indeholdende 15 mM natriumazid som konserveringsmiddel. Confirm

Ig-klasse

IgG1

Totalproteinkoncentration

Total Protein

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

Antistofkoncentration

Større end eller lig med 200 mg/L som bestemt ved ELISA. Se etiketten på hætteflasken for lotspecifik Ig-koncentration.

Anbefalinger Vedrørende Anvendelse

Immunhistokemi (se **D. Metodologi**) på paraffinsnit. Foreslået fortynding: 1:100 ved 30 minutter ved 25 °C. Varmeinduceret epitopgenfindning ved brug af Epitope Retrieval Solution pH6,0 RE7113, RE7114 eller RE7115. Disse retningslinier er vejledende, og brugeren bør selv bestemme egne optimale brugsopløsninger. Teknisk bemærkning: Anvendelse af PBS-baserede tilsætningsstoffer kan medføre øget baggrundsfarvning.

Opbevaring Og Holdbarhed

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

Prøveklargøring

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

Advarsler Og Forholdsregler

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

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

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

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

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

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

Kvalitetskontrol

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

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

Positiv Vævskontrol

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

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

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

Anbefalet positivt kontrolvæv er colon.

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 skeletmuskulatur.

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.³ Der kan eventuelt ses falske positive resultater, der skyldes non-immunologisk binding af proteiner eller substratreaktionsprodukter. Dette kan ligeledes skyldes endogene enzymer, såsom pseudoperoxidase (erythrocytter), endogen peroxidase (cytochrom C) eller endogent biotin (f.eks. lever, bryst, hjerne, nyre) afhængigt af den anvendte type immunfarve. For at differentiere mellem endogen enzymaktivitet eller uspecifik enzymbinding og specifik immunreaktivitet kan yderligere patientvæv eventuelt farves udelukkende med henholdsvis substratkromogen eller enzymkomplekser (avidin-biotin, streptavidin, mærket polymer) og substratkromogen. Hvis der optræder specifik farvning i den negative vævskontrol, skal resultaterne af patientprøverne kasseres.

Negativ Reagenskontrol

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

Patientvæv

Eksaminer patientprøver farvet med NCL-L-MSH6 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 PU29 detekterede MSH6-protein udtrykt i cellerkerne i en række vævstyper (n=69). Farvning blev observeret i colon, tyndtarm, blindtarm, binyre, lunge, mave, spiserør, hud, ovarie, livmoderhals, prostata, thymus, spytkirtel, skjoldbrusk, biskjoldbrusk, bryst, slimhinde, mandel, knoglemarv, galdeblære, placenta og rygmarv.

Tumorstoffer

Klon PU29 detekterede MSH6 protein i 54/58 colon-tumorer. Klon PU29 detekterede også MSH6 protein i lymfomer (9/11), sarkomer (7/7), ovarietumorer (7/7), lungetumorer (6/7), brysttumorer (4/5), mavetumorer (4/4), endometrialtumorer (4/4), neuroendokrine tumorer (2/4), BPH/prostatatumor (3/3), melanomer (3/3), binyretumorer (3/3), kimcelletumorer (3/3), blæretumorer (3/3), pladecellecarcinomer (2/3), levertumorer (1/3), bugspytkirteltumorer (2/2), skjoldbrusktumorer (2/2), tyndtarmstumorer (1/1), hudtumorer (1/1), thymuskirteltumorer (1/1), neurale tumorer (0/1) og nyretumorer (0/4) (n=140).

NCL-L-MSH6 anbefales til brug ved detektering af MSH6 protein udtrykt i normalt og neoplastisk væv, specielt som en hjælp ved demonstration af tabet af MSH6-udtryk i nedarvet non-polypos colon-cancer og sporadisk cancer.

Generelle Begrænsninger

Immunhistokemi er en diagnostisk proces bestående af mange trin, der omfatter specialiseret uddannelse i valg af passende reagenser, vævsseleksion, -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, frydning, 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 irregularteter indeholdt i vævet.⁴

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

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

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

Bibliografi - Generelt

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, 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. Warren J, Pohlhaus T, Changela A, et al. Structure of the human MutSα DNA lesion recognition complex. Molecular Cell. 2007; 26:579-592.
6. Marti T, Kunz C, Fleck O, et al. DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways. Journal of Cellular Physiology. 2002; 191:28-41.

Rettelser Til Tidligere Udgave

Ingen rettelser.

Udgivelsesdato

27 marts 2013

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

A. Nødvendige reagenser, der ikke medfølger

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

B. Nødvendigt udstyr, der ikke medfølger

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

C. Antigengendfindingsopløsninger (se Anbefalinger vedrørende anvendelse for en af følgende)

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

D. Fremgangsmåde

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

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

Epitopgenfindning

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

Visualisering

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

E. Rettelser til tidligere udgave

Ingen rettelser.

F. Udgivelsesdato

23 April 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

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

