

**Novocastra™ Liquid
Mouse Monoclonal Antibody
Progesterone Receptor Clone 16**

Catalog No: NCL-L-PGR-312



Instructions for Use

Please read before using this product.

Check the integrity of the packaging before use.

Novocastra™ Liquid Mouse Monoclonal Antibody Progesterone Receptor Clone 16

Catalog No: NCL-L-PGR-312

Intended Use

For in vitro Diagnostic Use.

Progesterone Receptor (PGR) Clone 16 monoclonal antibody is intended to be used for the qualitative identification by light microscopy of human progesterone receptor in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue by immunohistochemical staining. PGR Clone 16 specifically binds to the PGR antigen located in the nucleus of PGR positive normal and neoplastic cells.

PGR Clone 16 is indicated as an aid in the management, prognosis and prediction of therapy outcome of breast cancer. 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.

Summary and Explanation

Progesterone Receptor (PGR) content of breast cancer tissue is an important parameter in the prediction of prognosis and response to endocrine therapy. The introduction of monoclonal antibodies to PGR has allowed the determination of receptor status of breast tumors to be carried out in routine histopathology laboratories. PGR Clone 16 is a mouse monoclonal antibody directed against the human progesterone receptor molecule. A prokaryotic recombinant protein, corresponding to the N-terminal region of the A form of human progesterone receptor, was used as the immunogen. Antibody characterization studies demonstrated that PGR Clone 16 reacts with both A and B forms of human progesterone receptor in Western blotting procedures, but only the A form is detected in immunohistochemical procedures.

Principle of Procedure

The product is used in an immunohistochemical (IHC) procedure, which allows the qualitative identification by light microscopy of antigens in sections of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue, via sequential steps with interposed washing steps. Prior to staining, endogenous peroxidase activity is blocked and sections are subjected to epitope retrieval. The section is subsequently incubated with the primary antibody. A biotin-conjugated secondary antibody formulation that recognizes mouse immunoglobulins is used to detect the primary antibody. A streptavidin- or ABC-peroxidase conjugate is then applied and binds to the biotin present on the secondary antibody. Sections are further incubated with the

substrate/chromogen, 3,3' - diaminobenzidine (DAB). Reaction with the peroxidase produces a visible brown precipitate at the antigen site. Sections are counterstained with hematoxylin and coverslipped. Results are interpreted using a light microscope.

Reagent Provided

NCL-L-PGR-312 is a liquid tissue culture supernatant containing 15 mM sodium azide as a preservative.

Immunogen

Prokaryotic recombinant protein corresponding to the N-terminal region of the A form of the human progesterone receptor.

Clone

16

Ig Class

IgG1

Total Protein Concentration Total Protein

Refer to vial label for batch specific total protein concentration.

Antibody Development

Greater than or equal to 324.0 mg/L as determined by ELISA. Refer to vial label for batch specific Ig concentration.

Method

PGR Clone 16 was raised against recombinant progesterone receptor protein that was expressed from cDNA derived from mRNA extracted from the cell line T47D. Balb/c mice were immunized with the resulting PGR protein fragment. Screening was conducted by ELISA, with ELISA positive supernatants tested on formalin-fixed, paraffin-embedded sections of breast carcinoma of known receptor status. Colonies demonstrating positive immunohistochemical staining were cloned by limiting dilution.

Reconstitution, Mixing, Dilution, Titration:

NCL-L-PGR-312 is a liquid tissue culture supernatant containing 15 mM sodium azide as a preservative.

Suggested dilution: 1:100–1:200 for 60 minutes at 25 °C. High temperature antigen retrieval using 0.01 M citrate retrieval solution (pH 6.0) is recommended. This is provided as a guide and users should determine their own optimal working dilutions. 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 (see Quality Control section).

Materials Required But Not Provided

Refer to the Detection System instructions for use for a list of Materials Required But Not Provided.

Storage

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 and Treatment Prior to Staining

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

Heat induced epitope retrieval using 0.01 M citrate retrieval solution (pH 6.0) is recommended.

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 precautions¹.
- 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.

Instructions for Use

Incubate tissue sections with primary antibody reagent for 60 minutes at 25 °C. Refer to the “Methodology” section of the Novocastra™ Detection System instructions for use for explanation of recommended staining procedure.

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).

Troubleshooting

Refer to reference 3 for remedial action.

Contact your local distributor or the regional office of Leica Biosystems to report unusual staining.

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 degradation². The recommended positive control tissue for use with PGR Clone 16 is endometrium.

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. The recommended negative control tissue for use with PGR Clone 16 is tonsil.

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 nonspecifically⁴. 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. Normal mouse sera diluted to the same concentration as the primary antibody may be used as a negative control reagent.

Troubleshooting

Contact Leica Biosystems Technical Service (800) 248- 0123 Tech Support USA to report unusual staining results.

Assay Verification

Prior to initial use of an antibody or staining system in a diagnostic procedure, the user should verify the antibody's specificity by testing it on a series of in-house tissues with known immunohistochemical performance characteristics representing known positive and negative tissues. Refer to the quality control procedures previously outlined in this section of the product insert and to the quality control recommendations of the CAP Certification Program for Immunohistochemistry and/or the NCCLS IHC guideline. These quality control procedures should be repeated for each new antibody lot, or whenever there is a change in assay parameters. Tissues listed in the Performance Characteristics Section are suitable for assay verification.

Interpretation of Staining

Positive Tissue Control

The positive tissue control stained with PGR Clone 16 should be examined first to ascertain that all reagents are functioning properly. If the positive tissue controls fail to demonstrate positive staining, any results with the test specimens should be considered invalid.

Negative Tissue Control

The 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. The absence of specific staining in the negative tissue control confirms the lack of antibody crossreactivity to cells/cellular components. If specific staining (false positive staining) occurs in the negative external tissue control, results with the patient specimen should be considered invalid.

Nonspecific 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 nonspecifically⁴.

Patient Tissue

Examine patient specimens stained with PGR Clone 16 last. The staining pattern of PGR Clone 16 is nuclear. 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.

Scoring System

Slides should be scored using the Quick Score System in which the tumor is scored according to the proportion of cell nuclei stained and the intensity of the staining (Leake R et al. Immunohistochemical detection of steroid receptors in breast cancer: a working protocol. J Clin Pathol. 2000; 53(8):634–635).

Slide	Score	Definition
Intensity	3	Strong staining
	2	Moderate staining
	1	Weak staining
	0	Negative
Proportion	5	67–100%
	4	34–66%
	3	11–33%
	2	1–10%
	1	<1%
Quick Score = Intensity + Proportion		
A score of 3 or over is classed as receptor positive.		

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 tissue⁴.
- Excessive or incomplete counterstaining may compromise proper interpretation of results.
- The clinical interpretation of any positive or negative staining should be evaluated within the context of clinical presentation, morphology and other histopathological criteria. The clinical interpretation of any positive or negative staining should be complemented by morphological studies using proper positive and negative internal and external controls as well as other diagnostic tests. It is the responsibility of a qualified pathologist who is familiar with the proper use of IHC antibodies, reagents and methods to interpret the all of the steps used to prepare and interpret the final IHC preparation.

- The manufacturer provides these antibodies/reagents at optimal dilution for use following the provided instructions for IHC on prepared tissue sections. Any deviation from recommended test procedures may invalidate declared expected results; appropriate controls must be employed and documented. Users who deviate from recommended test procedures must accept responsibility for interpretation of patient results.
- This product is not intended for use in flow cytometry. Performance characteristics have not been determined for flow cytometry.
- Tissues from persons infected with hepatitis B virus and containing hepatitis B surface antigen (HBsAg) may exhibit nonspecific staining with horseradish peroxidase.
- Reagents may demonstrate unexpected reactions in previously untested tissues. The possibility of unexpected reactions even in tested tissue groups cannot be completely eliminated due to biological variability of antigen expression in neoplasms, or other pathological tissues.
- Normal/nonimmune sera from the same animal source as secondary antisera used in blocking steps may cause false-negative or false-positive results due to autoantibodies or natural antibodies.
- False-positive results may be seen due to non-immunological binding of proteins or substrate reaction products. They may also be caused by pseudoperoxidase activity (erythrocytes), endogenous peroxidase activity (cytochrome C), or endogenous biotin (e.g. liver, breast, brain, kidney) depending on the type of immunostain used.

Performance Characteristic

Normal Tissues

During antibody development, the specificity of PGR Clone 16 was evaluated on a range of normal tissues. Characteristic staining was observed in the nuclei of cells that express high levels of the protein, a proportion of endometrial, ovarian and myometrial cells, and normal breast ductal cells. Negative tissues included adrenal, bone marrow, brain (cerebellum), brain (cerebrum), colon, esophagus, heart, kidney, liver, lung, mesothelial cells, parathyroid, peripheral nerve, salivary/submandibular gland, skeletal muscle, skin, small intestine, spleen, spinal cord, stomach, testis, thymus, and thyroid. Weak staining was observed in ovary stromal cells and occasional islet cells of the pancreas.

Tumor Tissues

A total of 189 breast tissue specimens in two separate studies were used to compare staining results between PGR Clone 16 and DAKO PgR 636. Overall concordance was 98% (95% CI .95, 1.0). Percent positive agreement was 100% (95% CI .97, 1.0) and percent negative agreement was 96% (95% CI .89, .99).








Bibliography

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. Hungermann D, Roeser K, Buerger H, et al.. Relative paucity of gross genetic alterations in myoepitheliomas and myoepithelial carcinomas of salivary glands. Journal of Pathology 2002; 198: 487–494.

Amendments to Previous Issue

Not applicable.

Explanation of Symbols

	Manufacturer		Temperature limitations		Total Protein Concentration
	<i>In vitro</i> diagnostic device		Batch number		
	Consult instructions for use		Use by		

Date of Issue

17 June 2016

Anticorps monoclonal de souris liquide Novocastra™ Progesterone Receptor Clone 16

Numéro de référence : NCL-L-PGR-312

Utilisation prévue

Réservé à un usage de diagnostic in vitro.

L'anticorps monoclonal Progesterone Receptor (PGR) Clone 16 est destiné à être utilisé pour l'identification qualitative par microscopie optique du récepteur de la progestérone humain dans du tissu fixé au formol et enrobé de paraffine par marquage immunohistochimique. Le PGR Clone 16 se lie spécifiquement à l'antigène PGR situé dans le noyau des cellules normales et néoplasiques PGR positives.

Le PGR Clone 16 est indiqué comme une aide dans la prise en charge, le pronostic et la prédiction du résultat thérapeutique du cancer du sein. L'interprétation clinique de toute coloration ou de son absence doit être complétée par des études morphologiques utilisant des contrôles appropriés et doit être évaluée dans le contexte des antécédents cliniques du patient et des autres tests diagnostiques par un pathologiste qualifié.

Résumé et explication

La teneur en récepteurs de la progestérone (Progesterone Receptor, PGR) du tissu du cancer du sein est un paramètre important dans la prédiction du pronostic et la réponse au traitement endocrinien. L'introduction d'anticorps monoclonaux contre PGR a permis de déterminer le statut des récepteurs des tumeurs du sein dans les laboratoires d'histopathologie de routine.

Le PGR Clone 16 est un anticorps monoclonal de souris dirigé contre la molécule du récepteur de la progestérone humain. Une protéine recombinante procaryotique, correspondant à la région N terminale de la forme A du récepteur de la progestérone humain, a été utilisée en tant qu'immunogène. Des études de caractérisation des anticorps ont démontré que le PGR Clone 16 réagit avec les formes A et B du récepteur de la progestérone humain dans les procédures de Western blot, mais seule la forme A est détectée dans les procédures immunohistochimiques.

Principe de la procédure

Le produit est utilisé dans une procédure immunohistochimique (IHC) qui permet l'identification qualitative par microscopie optique des antigènes dans des coupes de tissus fixés au formol et enrobés de paraffine, par le biais d'étapes séquentielles avec des étapes de lavage interposées. Avant la coloration, l'activité de la peroxydase endogène est bloquée et les coupes sont soumises à la récupération des épitopes. La coupe est incubée par la suite avec l'anticorps primaire. Une formulation d'anticorps secondaire conjugué à la biotine qui reconnaît les immunoglobulines de souris est utilisée pour détecter l'anticorps primaire. Un conjugué de streptavidine-peroxydase ou ABC-peroxydase [ABC : complexe avidine-biotine] est appliqué ensuite et se lie à la biotine présente sur l'anticorps secondaire. Les coupes sont incubées

davantage avec le substrat/chromogène, 3,3' - diaminobenzidine (DAB). La réaction avec la peroxydase produit un précipité marron visible au niveau du site de l'antigène. Les coupes sont contre-colorées à l'hématoxyline et couvertes d'une lamelle couvre-objet. Les résultats sont interprétés avec un microscope optique.

Réactif fourni

Le NCL-L-PGR-312 est un supernageant de culture tissulaire liquide contenant un conservateur constitué de 15 mM d'azoture de sodium.

Immunogène

Protéine recombinante procaryotique correspondant à la région N terminale de la forme A du récepteur de la progestérone humain.

Clone

16

Classe Ig

IgG1

Concentration totale en protéines Total Protein

Consultez l'étiquette du flacon pour connaître la concentration totale en protéines spécifique au lot.

Développement d'anticorps

Concentration supérieure ou égale à 324,0 mg/l tel que déterminé par ELISA. Consultez l'étiquette du flacon pour connaître la concentration en Ig spécifique au lot.

Méthode

Le PGR Clone 16 a été élevé contre une protéine recombinante réceptrice de la progestérone exprimée à partir de l'ADNc dérivé de l'ARNm extrait de la lignée de cellules T47D. Les souris Balb/c ont été immunisées avec le fragment de protéine PGR résultant. Le dépistage a été réalisé par la méthode ELISA ; les supernageants qui se sont avérés positifs avec ELISA ont été testés sur des coupes de carcinome mammaire ayant un statut de récepteur connu, fixées au formol et enrobées de paraffine. Les colonies présentant un marquage immunohistochimique positif ont été clonées en limitant la dilution.

Reconstitution, mélange, dilution, titration

Le NCL-L-PGR-312 est un supernageant de culture tissulaire liquide contenant un conservateur constitué de 15 mM d'azoture de sodium.

Dilution suggérée : 1:100–1:200 pendant 60 minutes à 25 °C. La récupération des antigènes à température élevée en utilisant une solution de récupération à base de citrate 0,01 M (pH 6,0) est recommandée. Ces informations sont fournies à titre d'indication et les utilisateurs doivent déterminer leurs propres dilutions de travail optimales. Les différences dans le traitement des tissus et les procédures techniques mises en œuvre dans le laboratoire de l'utilisateur

peuvent entraîner une variabilité importante des résultats, nécessitant des contrôles internes réguliers des performances (consultez la section Contrôle qualité).

Matériels nécessaires mais non fournis

Consultez le mode d'emploi du système de détection pour une liste des matériels nécessaires mais non fournis.

Conservation

Conservez entre 2 °C et 8 °C. Ne pas congeler. Remettez la solution entre 2 °C et 8 °C immédiatement après utilisation. N'utilisez pas au-delà de la date de péremption indiquée sur l'étiquette du flacon. L'utilisateur doit vérifier les conditions de conservation différentes de celles précisées ci-dessus.

Préparation et traitement des échantillons avant la coloration

Le fixatif recommandé est du formol tampon neutre à 10 % pour les coupes de tissu enrobées de paraffine.

La récupération des épitopes induite par la chaleur en utilisant une solution de récupération à base de citrate 0,01 M (pH 6,0) est recommandée.

Avertissements et précautions

- Ce réactif a été préparé à partir du surnageant de culture cellulaire. Comme il s'agit d'un produit biologique, il convient de prendre des précautions raisonnables lors de sa manipulation.
- La molarité de l'azoture de sodium contenu dans ce réactif est de 15 mM. Une fiche de données de sécurité (FDS) est disponible à la demande pour l'azoture de sodium.
- Consultez les réglementations nationales, régionales ou locales relatives à l'élimination des composants potentiellement toxiques.
- Les échantillons, avant et après fixation, et tous les matériels exposés aux échantillons, doivent être manipulés comme s'ils pouvaient transmettre une infection et doivent être éliminés en utilisant les précautions appropriées¹.
- Ne pipetez jamais les réactifs à la bouche et évitez le contact de la peau et des membranes muqueuses avec les réactifs et les échantillons.
- Si des réactifs ou des échantillons viennent en contact avec des zones sensibles, lavez abondamment à l'eau. Consultez un médecin.
- Minimisez la contamination microbienne des réactifs ; sinon une augmentation de la coloration non spécifique peut survenir.
- Les durées ou températures d'incubation, autres que celles précisées, peuvent donner des résultats erronés. Tout changement de ce type doit être validé par l'utilisateur.

Mode d'emploi

Incubez les coupes de tissu avec le réactif anticorps primaire pendant 60 minutes à 25 °C. Consultez la section « Méthodologie » du mode d'emploi du système de détection Novocastra™ pour une explication de la procédure de coloration recommandée.

Contrôle qualité

Des différences dans le traitement du tissu et les procédures techniques employées par le laboratoire de l'utilisateur peuvent entraîner une variabilité importante des résultats, nécessitant d'effectuer régulièrement des contrôles internes, en plus des procédures qui suivent.

Les contrôles doivent être des échantillons frais obtenus par autopsie, biopsie ou chirurgie, fixés au formol, traités et enrobés de paraffine dès que possible, en procédant de la même manière que pour les échantillons du patient.

Dépannage

Consultez la référence 3 pour les mesures correctives.

Contactez le distributeur local ou le bureau régional de Leica Biosystems pour signaler une coloration inhabituelle.

Tissu de contrôle positif

Utilisé pour indiquer que les tissus sont correctement préparés et les techniques de coloration sont appropriées. Incluez un tissu de contrôle positif pour chaque ensemble de conditions d'essai dans chaque série de coloration. Les tissus à faible coloration positive sont plus adaptés que ceux à forte coloration positive pour un contrôle qualité optimal et permettent de détecter des niveaux mineurs de dégradation des réactifs². L'endomètre constitue le tissu de contrôle positif recommandé pour une utilisation avec le PGR Clone 16.

Si le tissu de contrôle positif ne donne pas de coloration positive, les résultats des échantillons de l'essai doivent être considérés comme non valides.

Tissu de contrôle négatif

Examinez le tissu de contrôle négatif après le tissu de contrôle positif pour vérifier la spécificité du marquage de l'antigène cible par l'anticorps primaire. L'amygdale constitue le tissu de contrôle négatif recommandé pour une utilisation avec le PGR Clone 16.

Sinon, la variété des types de cellules différents présents dans la plupart des coupes de tissus conduit souvent à des sites de contrôle négatif, mais l'utilisateur doit les vérifier.

Une coloration non spécifique, le cas échéant, présente habituellement une apparence diffuse. Une coloration sporadique de tissu conjonctif peut également être observée dans des coupes de tissus fixés trop fortement au formol. Utilisez des cellules intactes pour l'interprétation des résultats de la coloration.

Les cellules nécrotiques ou dégénérées présentent souvent des colorations non spécifiques⁴. Des résultats faussement positifs peuvent être observés en raison d'une liaison non immunologique de protéines ou de produits de réaction du substrat. Ils peuvent également être dus à des enzymes endogènes comme la pseudo-péroxydase (érythrocytes), la peroxydase endogène (cytochrome C) ou la biotine endogène (p. ex., foie, seins, cerveau, reins) suivant le type d'immunomarquage utilisé. Pour différencier l'activité enzymatique endogène ou la liaison non spécifique d'enzymes par rapport à l'immunoréactivité spécifique, des tissus supplémentaires du patient peuvent être colorés exclusivement avec un substrat chromogène ou des complexes d'enzymes (avidine-biotine, streptavidine, polymère marqué) et un substrat-chromogène, respectivement.

Si une coloration spécifique apparaît dans le tissu de contrôle négatif, les résultats sur les échantillons du patient doivent être considérés comme non valides.

Réactif de contrôle négatif

Utilisez un réactif de contrôle négatif non spécifique à la place de l'anticorps primaire avec une coupe de chaque échantillon du patient pour évaluer la coloration non spécifique et permettre une meilleure interprétation de la coloration spécifique au niveau de site de l'antigène. Des sérums de souris normaux dilués à la même concentration que l'anticorps primaire peuvent être utilisés en tant que réactif de contrôle négatif.

Dépannage

Contactez le service technique de Leica Biosystems : (800) 248- 0123, Assistance technique aux États-Unis, pour signaler des résultats de coloration inhabituels.

Vérification d'analyse

Avant d'utiliser pour la première fois un anticorps ou un système de coloration dans une procédure diagnostique, l'utilisateur doit vérifier la spécificité de l'anticorps en le testant en interne sur une série de tissus ayant des caractéristiques de performances immunohistochimiques connues et qui représentent des tissus positifs et négatifs connus. Consultez les procédures de contrôle qualité décrites précédemment dans cette section de la notice et les recommandations de contrôle qualité du programme de certification pour l'immunohistochimie (CAP, Certification Program for Immunohistochemistry) et/ou les lignes directrices proposées par le NCCLS pour l'immunohistochimie (IHC). Ces procédures de contrôle qualité doivent être répétées pour chaque nouveau lot d'anticorps ou chaque fois qu'une modification est apportée aux paramètres d'analyse. Les tissus indiqués dans la section Caractéristiques de performances sont adaptés à la vérification d'analyse.

Interprétation de la coloration

Tissu de contrôle positif

Examinez d'abord le tissu de contrôle positif marqué avec le PGR Clone 16 pour vous assurer que tous les réactifs fonctionnent correctement. Si le tissu de contrôle positif ne donne pas de coloration positive, les résultats des échantillons de l'essai doivent être considérés comme non valides.

Tissu de contrôle négatif

Examinez le tissu de contrôle négatif après le tissu de contrôle positif pour vérifier la spécificité du marquage de l'antigène cible par l'anticorps primaire. L'absence de coloration spécifique dans le tissu de contrôle négatif confirme le manque de réactivité croisée de l'anticorps sur les cellules/éléments cellulaires. Si une coloration spécifique (coloration faussement positive) apparaît dans le tissu de contrôle négatif externe, les résultats sur les échantillons du patient doivent être considérés comme non valides.

Une coloration non spécifique, le cas échéant, présente habituellement une apparence diffuse. Une coloration sporadique de tissu conjonctif peut également être observée dans des coupes de tissus fixés trop fortement au formol. Utilisez des cellules intactes pour l'interprétation des résultats de la coloration. Les cellules nécrotiques ou dégénérées présentent souvent des colorations non spécifiques⁴.

Tissu du patient

Examinez les échantillons de patient marqués avec le PGR Clone 16 en dernier. Le PGR Clone 16 produit un schéma de marquage nucléaire. L'intensité du marquage positif doit être évaluée dans le contexte de tout marquage de fond non spécifique du réactif de contrôle négatif. Comme pour tout essai immunohistochimique, un résultat négatif signifie que l'antigène n'a pas été détecté et non que l'antigène était absent dans les cellules/tissus testés. Si nécessaire, utilisez un panel d'anticorps pour identifier des réactions faussement négatives.

Système de cotation

Les lames doivent être cotées en utilisant le système de cote rapide (Quick Score System) dans lequel la tumeur est cotée en fonction de la proportion de noyaux de cellules marqués et l'intensité du marquage (Leake R et al. Immunohistochemical detection of steroid receptors in breast cancer: a working protocol. J Clin Pathol. 2000; 53(8):634–635).

Lame	Cote	Définition
Intensité	3	Marquage fort
	2	Marquage modéré
	1	Marquage faible
	0	Négatif
Proportion	5	67–100 %
	4	34–66 %
	3	11–33 %
	2	1–10 %
	1	<1 %
Cote rapide = Intensité + Proportion		
Une cote de 3 ou plus est classée comme récepteur positif.		

Limites générales :

- L'immunohistochimie est un processus diagnostique en plusieurs étapes qui nécessite une formation spécialisée à la sélection des réactifs appropriés ; au choix, à la fixation et au traitement des tissus ; à la préparation de la lame IHC ; et à l'interprétation des résultats du marquage.
- La coloration des tissus dépend de la manipulation et du traitement du tissu avant sa coloration. Le non-respect des procédures lors des opérations de fixation, congélation, décongélation, lavage, séchage, chauffage ou coupe, ou la contamination par d'autres tissus ou liquides risque d'entraîner des artefacts, un piégeage des anticorps ou des résultats faussement négatifs. Des résultats incohérents peuvent être dus à des variations dans les méthodes de fixation et d'enrobage, ou à des anomalies inhérentes au tissu⁴.
- Une contre-coloration excessive ou incomplète peut compromettre l'interprétation correcte des résultats.
- L'interprétation clinique de toute coloration positive ou négative doit être évaluée dans le contexte de la présentation clinique, de la morphologie et d'autres critères histopathologiques. L'interprétation clinique de toute coloration positive ou négative doit être complétée par des études morphologiques en utilisant des contrôles internes et externes positifs et négatifs adéquats ainsi que d'autres tests diagnostiques. Il incombe à un pathologiste qualifié qui connaît l'utilisation correcte des anticorps, réactifs et méthodes IHC d'interpréter toutes les étapes utilisées pour préparer et interpréter la préparation IHC finale.
- Le fabricant fournit ces anticorps/réactifs à une dilution optimale pour l'emploi en suivant les instructions fournies pour l'IHC sur des coupes de tissu préparées. Tout écart des procédures de test recommandées peut invalider les résultats attendus annoncés ; des contrôles adéquats doivent être

employés et documentés. Les utilisateurs qui s'écartent des procédures de test recommandées doivent accepter la responsabilité de l'interprétation des résultats de patient.

- Ce produit n'est pas destiné à être utilisé dans le cadre de la cytométrie de flux. Les caractéristiques de performances n'ont pas été déterminées pour la cytométrie de flux.
- Les tissus de personnes infectées par le virus de l'hépatite B et contenant un antigène de surface de l'hépatite B (HBsAg) peuvent présenter un marquage non spécifique à la peroxydase de raifort.
- Les réactifs peuvent avoir des réactions inattendues dans des tissus précédemment non testés. L'éventualité de réactions inattendues, même dans des groupes de tissus testés, ne peut pas être complètement écartée en raison de la variabilité biologique de l'expression antigénique dans les néoplasmes ou d'autres tissus pathologiques.
- Des sérums normaux ou non immuns de la même source animale que l'anti-sérum secondaire utilisé dans les opérations de blocage peuvent causer des résultats faussement négatifs ou faussement positifs dus aux auto-anticorps ou aux anticorps naturels.
- Des résultats faussement positifs peuvent être observés en raison d'une liaison non immunologique de protéines ou de produits de réaction du substrat. Elles peuvent également être dues à une activité pseudo-péroxydase (érythrocytes), une activité peroxydase endogène (cytochrome C) ou à la biotine endogène (p. ex., foie, seins, cerveau, reins) suivant le type d'immunomarquage utilisé.

Caractéristiques de performances

Tissus normaux

Au cours du développement d'anticorps, la spécificité du PGR Clone 16 a été évaluée sur une plage de tissus normaux. Un marquage caractéristique a été observé dans les noyaux des cellules qui expriment des taux élevés de la protéine, une proportion de cellules endométriales, ovariennes et myométriales, et des cellules canalaire normales du sein. Parmi les tissus négatifs, on peut signaler la glande surrénale, la moelle osseuse, le cerveau (cervelet), le cerveau (cerebrum), le côlon, l'œsophage, le cœur, le rein, le foie, le poumon, les cellules mésothéliales, la glande parathyroïde, le nerf périphérique, la glande salivaire/submandibulaire, le muscle squelettique, la peau, l'intestin grêle, la rate, la moelle épinière, l'estomac, le testicule, le thymus et la thyroïde. Un faible marquage a été observé dans les cellules stromales de l'ovaire et des cellules des îlots pancréatiques occasionnelles.

Tissus tumoraux

Un total de 189 échantillons de tissus mammaires dans le cadre de deux études distinctes a été utilisé pour comparer les résultats du marquage entre le

PGR Clone 16 et le DAKO PgR 636. La concordance globale était de 98 % (IC à 95 % 0,95, 1,0). Le pourcentage de concordance positive était de 100 % (IC à 95 % 0,97, 1,0) et le pourcentage de concordance négative était de 96 % (IC à 95 % 0,89, 0,99).








Bibliographie

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. Hungermann D, Roeser K, Buerger H, et al.. Relative paucity of gross genetic alterations in myoepitheliomas and myoepithelial carcinomas of salivary glands. Journal of Pathology 2002; 198: 487–494.

Modifications apportées à la publication précédente

Sans objet.

Légende des symboles

	Fabricant		Limitation en température		Concentration totale en protéines
	Dispositif de diagnostic <i>in vitro</i>		Numéro de lot		
	Lire les instructions d'utilisation		Date de péremption		

Date de publication

17 juin 2016

Leica Biosystems Newcastle Ltd
Balliol Business Park
Benton Lane
Newcastle Upon Tyne NE12 8EW
United Kingdom
✆ +44 191 215 4242
Toll free: 0800 298 2344



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

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

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