

**FLEX**  
**Monoclonal Mouse**  
**Anti-Human**  
**CD246, ALK Protein**  
 Clone OT1A4  
**Ready-to-Use**  
 (Dako Omnis)

**Kód GA785**

<b>Použití</b>	<p>Pro diagnostiku in vitro.</p> <p>FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human CD246, ALK Protein, klon ALK1, Ready-to-Use (Dako Omnis) je určen pro použití při kvalitativním imunohistochemickém (IHC) testování společně s přístrojem Dako Omnis. Tato protilátka značí normální lidský protein ALK a chimerický protein EML4-ALK ve tkáňových řezech fixovaných ve formalínu a zalitých v parafínu (formalin-fixed, paraffin-embedded, FFPE). Výsledky pomáhají při klasifikaci ALK-pozitivních podskupin rakoviny plic. Diferenční klasifikaci napomáhají výsledky z panelu protilátek. Klinickou interpretaci zbarvení nebo jeho nepřítomnosti je třeba doplnit morfologickým vyšetřením s využitím patřičných kontrol a vyhodnotit s přihlédnutím k pacientově klinické anamnéze a k dalším diagnostickým testům provedeným kvalifikovaným patologem. Tato protilátka je určena k použití po primární diagnóze tumoru provedené konvenční histopatologií za použití neimunologických histochemických zbarvení.</p>
<b>Synonyma antigenu</b>	ALK receptor tyrozinkinázy, CD246, kináza anaplastického lymfomu.
<b>Souhrn a výklad</b>	<p>Protein kinázy anaplastického lymfomu (ALK) je receptor tyrozinkinázy (RTK), která je exprimována normálními buňkami neuronového typu. Jsou hlášeny genetické změny v <i>ALK</i> (fúze, amplifikace a mutace) u různých typů nádorů, včetně nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC). Byla identifikována celá řada fúzních partnerů pro <i>ALK</i> včetně <i>NPM</i>, <i>TFG</i>, <i>CARS</i>, <i>CLTC</i> a <i>KIF5B</i>. Fúzní gen <i>EML4-ALK</i> (echinodermální, s mikrotubuly související proteinová-4-kináza anaplastického lymfomu) je pro NSCLC novinkou a fúzní gen je hlášen ve 4–11 % případů NSCLC<sup>1-3</sup>. Protilátka detekuje chimerický protein ALK v podtypech NSCLC obsahujících fúzní gen <i>EML4-ALK</i>. Fúzní gen <i>EML4-ALK</i> je formován přeuspořádáním krátkého ramene chromozomu 2 a zahrnuje geny kódující ALK (2p23.2) a echinodermální, s mikrotubuly související protein (<i>EML4</i>) (2p21). Tato specifická translokace ALK byla identifikována v různých typech nádorů, včetně podmnožiny NSCLC<sup>4,5</sup>. <i>EML4-ALK</i> je onkogenní faktor v patogenezi NSCLC, zvláště u adenokarcinomu<sup>6</sup>. Protilátky k ALK se ukázaly jako nápomocné při klasifikaci NSCLC<sup>4,5</sup>.</p> <p>V naší příručce <i>General Instructions for Immunohistochemical Staining</i> (Obecné pokyny pro imunohistochemické barvení) společnosti Dako nebo v návodu k systému detekce pro IHC metody naleznete informace týkající se těchto témat: Princip metody, Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky, Skladování, Příprava vzorku, Postup barvení, Kontrola kvality, Řešení problémů, Interpretace zbarvení, Obecná omezení.</p>
<b>Dodávaná reagensie</b>	<p>Monoklonální myší protilátka připravená k použití se dodává v kapalné podobě v pufru s obsahem stabilizujícího proteinu a 0,015 mol/l azidu sodného.</p> <p><u>Klon</u>: OT1A4. <u>Izotyp</u>: IgG2b.</p>
<b>Imunogen</b>	Fragment lidského rekombinantního proteinu odpovídající aminokyselinám 1300–1620 lidského ALK (NP_004295) produkováný v <i>E.coli</i> .
<b>Specifická</b>	V testech Western blot extraktů buněčných linií H2228 a A549 značila protilátka velký pruh o molekulové hmotnosti asi 90 kDa odpovídající očekávané molekulové hmotnosti ALK <sup>6</sup> .
<b>Bezpečnostní opatření</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. K diagnostice in vitro</li> <li>2. Určeno pro profesionální uživatele.</li> <li>3. Pouze na předpis.</li> <li>4. Tento výrobek obsahuje azid sodný (NaN<sub>3</sub>), který je v čisté formě vysoce toxický. Koncentrace azidu sodného v produktu není sice klasifikována jako nebezpečná, nicméně sloučenina může reagovat s olovem a mědí v odpadním potrubí a vytvářet vysoce explozivní azidy těchto kovů. Při likvidaci splachujte dostatečným množstvím vody, aby nedocházelo k usazování azidů kovů v potrubí.</li> <li>5. Jako u každého výrobku biologického původu je při manipulaci nutno dodržovat řádná bezpečnostní opatření.</li> <li>6. Používejte osobní ochranné prostředky, aby nedošlo k zasažení očí nebo pokožky.</li> <li>7. Nespotřebované roztoky je nutno likvidovat jako chemický/biologický odpad v souladu s místními, oblastními, národními a mezinárodními předpisy.</li> <li>8. Bezpečnostní datové listy jsou dostupné na vyžádání na stránkách <a href="http://www.agilent.com">www.agilent.com</a>.</li> </ol>
<b>Uchovávání</b>	<p>Skladujte při teplotě 2–8 °C. Během skladování musí být víčko uzavřené. Nepoužívejte po datu expirace uvedeném na lahvičce. Aplikační stabilita je 375 hodin. Aplikační stabilitu sleduje software Dako Omnis. Pokud se reagensie skladují za jakýchkoli jiných než uvedených podmínek, musí uživatel tyto podmínky ověřit. Případná nestabilita výrobku se neprojevuje žádnými známkami. Proto je nutno provádět současně s testováním vzorků pacienta pozitivní a negativní kontroly. Pokud zpozorujete neočekávané zbarvení, které nelze vysvětlit změnami laboratorních postupů, a máte podezření, že se jedná o problém s protilátkou, obraťte se na patologickou podporu společnosti Agilent.</p>

**Šablona protokolu  
barvení\***

Krok	Reagencie	Protokol
Odparafinování	Clearify (kód GC810)	Výchozí
Předběžné zpracování	EnVision FLEX, FLEX, High pH (kód GV804)	30minutové tepelně indukované vyhledávání epitopu
Primární protilátka	Ready-to-Use (kód GA785)	25minutová inkubace
Reagencie pro negativní kontrolu	FLEX Negative Control, Mouse (kód GA750)	25minutová inkubace
Vizualizace	EnVision FLEX (kód GV800) + EnVision FLEX+ Mouse LINKER (kód GV821)	Blok: 3 min; Link: 10 min; Polymer: 20 min; Chromogen: 5 min
Barvení pozadí	Hematoxylin (kód GC808)	3minutová inkubace
Montáž	Je vyžadována bezvodá permanentní montáž	Po vyjmutí nutno dehydratovat, vyčistit a namontovat
Kontrola kvality	Tkáň	Barvicí vzor
Kontrolní tkáň	Tlusté střevo/apendix	Cytoplazmatické zbarvení

\*Uživatel se musí vždy seznámit s používanými činidly, která jsou uvedena v příbalové informaci, a vyhledat si podrobnosti v uživatelských příručkách Dako Omnis.

**Příprava vzorku**

**Parafinové řezy:** Protilátku lze používat k značení řezů tkání fixovaných ve formalínu a zalitých v parafínu. Vzorky tkání je nutno rozřezat na řezy o tloušťce 4 µm. Z důvodu vyšší přilnavosti řezů tkání k podložním sklům se doporučuje používat podložní skla FLEX IHC Microscope Slides, kód K8020. Chcete-li zachovat antigenicitu, měly by se tkáňové řezy umístěné na sklíčka obarvit do 8 týdnů od provedení řezů, pokud jsou uchovávány v temnu při teplotě 2–8 °C (preferováno) nebo 4 týdny v temnu při pokojové teplotě do 25 °C. Teplota při skladování nebo manipulaci by nikdy neměla překročit 25 °C, a to v žádném okamžiku po umístění na sklíčka, aby se zajistila integrita a antigenicita tkáně.

**Postup barvení**

Odstranění parafínu, vyhledání cíle, imunohistochemické barvení a kontrastní barvení se provádějí v přístroji Dako Omnis. V softwaru přístroje Dako Omnis jsou předem naprogramovány kroky barvení a inkubační doby. Pokud není v systému Dako Omnis připraven protokol, lze jej stáhnout ze stránky *Dako Omnis Protocol Update* (Aktualizace protokolu Dako Omnis) na webu [www.agilent.com](http://www.agilent.com). Podrobné pokyny ke vkládání podložních skel a plnění činidel naleznete v Základní uživatelské příručce Dako Omnis.

Přístroj Dako Omnis zajistí, aby tkáňové řezy během předběžného zpracování a následného imunohistochemického barvení nevyschly.

**Předpůsobení:** Odstranění parafínu z tkáňových řezů FFPE se provádí pomocí roztoku Clearify, kód GC810. Doporučuje se vyhledávání cíle s tepelně indukovaným vyhledáváním epitopu (HIER) pomocí naředěného roztoku EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Dako Omnis), kód GV804.

**Vizualizace:** Doporučený vizualizační systém je EnVision FLEX, High pH (Dako Omnis), kód GV800 ve spojení se systémem EnVision FLEX+ Mouse (LINKER) (Dako Omnis), kód GV821.

**Kontrastní barvení:** Doporučené kontrastní barvivo je Hematoxylin (Dako Omnis), kód GC808.

**Montáž:** Po provedení barvení v přístroji Dako Omnis se řezy musí dehydratovat, vyčistit a namontovat pomocí permanentní montážní metody.

**Kontrola kvality**

Positivní a negativní kontroly a také činidlo pro negativní kontrolu je nutno provádět vždy současně použitím stejného protokolu jako vzorky pacienta. Tkáň pro pozitivní kontrolu musí obsahovat tlusté střevo/apendix a buňky/struktury musí zobrazovat vzor reakce, jak je stanoveno pro tuto tkáň v části „Charakteristiky účinnosti“. Doporučené činidlo pro negativní kontrolu je FLEX Negative Control, Mouse, (Dako Omnis), kód GA750.

**Interpretace barvení**

Buněčný barvicí vzor je cytoplazmatický.

## Charakteristiky účinnosti

Normální tkáně: V tlustém střevě/apendixu vykazují gangliové buňky myenterického plexu střední, výraznou reakci s cytoplazmatickým zbarvením, zatímco axony vykazují slabou až střední reakci s cytoplazmatickým zbarvením.

Typ tkáně (počet testovaných)	Označené prvky tkáně	Typ tkáně (počet testovaných)	Označené prvky tkáně
Brzlík (3)	0/3	Nerv periferní (3)	0/3
Děloha (3)	0/3	Pankreas (3)	0/3
Děložní hrdlo (3)	0/3	Plíce (3)	0/3
Hypofýza (3)	3/3 adenohypofýza (silné zbarvení, membrána a cytoplazma, 18–80 %) 2/3 neurohypofýza (různé od velmi slabého/téměř žádného zbarvení po slabé až středně silné zbarvení, 100 %)	Prostata (3)	0/3
Játra (3)	0/3	Prs (3)	0/3
Jícen (3)	2/3 gangliové buňky (slabé až středně silné zbarvení, cytoplazma, 100 %)	Příštitná tělíska (3)	0/3
Kosterní sval (3)	0/3	Slezina (3)	0/3
Kostní dřeň (3)	0/3	Slinná žláza (3)	0/3
Kůže (3)	0/3	Srdce (3)	0/3
Ledvina (3)	0/3	Štitná žláza (3)	0/3
Malý mozek (3)	0/3	Tenké střevo (3)	0/3
Mandle (3)	0/3	Tlusté střevo (3)	3/3 gangliové buňky a nervová vlákna (slabé až středně silné zbarvení, membrána* a cytoplazma, 50–60 %)
Mezotel (3)	0/3	Vaječník (3)	0/3
Mozek (3)	0/3	Varlata (3)	3/3 Leydigovy buňky (velmi slabé / téměř žádné zbarvení, cytoplazma, 40–90 %)
Nadledvina (3)	0/3	Žaludek (3)	0/3









\* Primárně cytoplazmatické zbarvení s fokálním zbarvením spojeným s membránou

Abnormální tkáně: Tato protilátka zbarvila 20/20 nádorů s jinak uspořádaným ALK (100% citlivost) a správně charakterizovala 196/198 negativních případů (specifita 99,1 %)⁷. Celkem 298 vzorků s 1A4 (-) prokázalo 100% shodu se standardními výsledky FISH. Všechny 58 případů FISH (+) bylo identifikováno protilátkou 1A4⁸.

## Literatura

- Qi M, Li Y, Liu J et al. Morphologic features of carcinomas with recurrent gene fusions. *Advances in anatomic pathology*. 2012;19(6):417-24.
- Kim H, Xu X, Yoo SB et al. Discordance between anaplastic lymphoma kinase status in primary non-small-cell lung cancers and their corresponding metastases. *Histopathology*. 2012.
- Wang Z, Zhang X, Bai H et al. EML4-ALK Rearrangement and Its Clinical Significance in Chinese Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncology*. 2012;83(5):248-56.
- Soda M, Choi YL, Enomoto M et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. 2007;448(7153):561-6.
- Thunnissen E, Bubendorf L, Dietel M et al. EML4-ALK testing in non-small cell carcinomas of the lung: a review with recommendations. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2012;461(3):245-57.
- Product datasheet for ALK Mouse Monoclonal Antibody [Clone ID: OT11A4]. <https://cdn.origene.com/datasheet/ta801287.pdf>. Last accessed on 2021.02.09
- Gruber K, Kohlhäufel M, Friedel G et al. A Novel, Highly Sensitive ALK Antibody 1A4 Facilitates Effective Screening for ALK Rearrangements in Lung Adenocarcinomas by Standard Immunohistochemistry. *J Thorac Oncol*. 2015;10: 713–716
- Wang Q, Zhao L, Wei S et al. Antibody 1A4 with routine immunohistochemistry demonstrates high sensitivity for ALK rearrangement screening of Chinese lung adenocarcinoma patients: A single-center large-scale study. *Lung Cancer*. 2016;95:39-43.

## Vysvětlivky k symbolům

 REF	Katalogové číslo	 2°C – 8°C	Teplotní rozmezí od do		Použitelné do
 IVD	In vitro diagnostický zdravotnický prostředek	 LOT	Číslo šarže		Výrobce
 i	Viz návod k použití	 EC REP	Autorizovaný zástupce v Evropské unii		



Agilent Technologies Singapore (International) Pte Ltd.  
No. 1 Yishun Avenue 7  
Singapore, 768923  
Tel. +44 161 492 7050  
[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

Revize 2021.02