

FLEX
Monoclonal Mouse
Anti-Human
Cytokeratin
Klon AE1/AE3
Ready-to-Use
(Dako Omnis)

Kód GA053

Použití	<p>Pro diagnostiku in vitro.</p> <p>FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin, klon AE1/AE3 připravený k použití (Dako Omnis) je určen k použití v imunohistochemii (IHC) společně s přístrojem Dako Omnis. Tato protilátka je užitečná při klasifikaci tumorů epitelálního původu (1–3). Diferenční klasifikaci nádorů napomáhají výsledky z panelu protilátek. Klinickou interpretaci zbarvení nebo jeho nepřítomnosti je třeba doplnit morfoloickým 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>
Souhrn a výklad	<p>Cytokeratiny jsou rodina ve vodě rozpustných proteinů s molekulovou hmotností v rozmezí 40–70 kD, které tvoří buněčnou kostru epitelálních buněk. Bylo identifikováno nejméně 19 různých cytokeratinů a ty lze rozdělit do dvou podrodin. Podrodina A obsahuje relativně kyselé cytokeratiny (s pH do 5,5), zatímco cytokeratiny skupiny B mají relativně zásadité pH 6 nebo více.</p> <p>V 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>
Dodávaná reagensie	<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> AE1/AE3. <u>Izotyp:</u> IgG1, kappa.</p>
Imunogen	<p>Lidská epidermální zatvrdlina (1)</p>
Specifita	<p>AE1/AE3 je směs dvou monoklonálních protilátek, které byly získány imunizací myších keratinů s lidskými keratiny kalusu (2). Bylo prokázáno, že AE1/AE3 identifikuje většinu lidských cytokeratinů, a proto ji lze používat k pozitivní IHC identifikaci buněk pocházejících z jednoduchého a vrstevnatého epitelu (1,2,4). Protilátka AE1 reaguje s antigenními determinanty přítomnými ve většině cytokeratinů podrodiny A, včetně cytokeratinů s označením dle Molla (4) 10, 13, 14, 15 16 a 19 (molekulová hmotnost 56,5, 54', 50, 50', 48, resp. 40 kDa) avšak nikoli s čísly 12, 17 a 18 (55, 47 a 45 kDa) (4). Protilátka AE3 reaguje s antigenními determinanty společnými pro cytokeratiny podrodiny B, včetně čísel 1 a 2, 3, 4, 5, 6, 7 a 8 (molekulová hmotnost 65, 67, 64, 59, 58, 56, 54, resp. 52 kDa) (5).</p>
Bezpečnostní opatření	<ol style="list-style-type: none">1. Pro diagnostiku in vitro.2. Určeno pro profesionální uživatele.3. Tento výrobek obsahuje azid sodný (NaN₃), 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.4. Jako u každého výrobku biologického původu je nutno dodržovat řádná bezpečnostní opatření.5. Používejte odpovídající osobní ochranné prostředky, aby nedošlo k zasažení očí nebo pokožky.6. Nespotřebované roztoky je nutno likvidovat v souladu s místními a celostátními předpisy.
Uchovávání	<p>Skladujte při teplotě 2-8 °C. Během skladování musí být víčko uzavřené. Nepoužívejte po datu expirace uvedeném na lahvičce. Aplikační stabilita je 280 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 technickou podporu společnosti Dako.</p>

**Šablona protokolu
barvení***

Krok		Komentáře
Fixace/zalítí	Fixováno ve formalínu, zalito v parafínu	Odstranění parafínu v přístroji
Předběžné zpracování	EnVision FLEX, FLEX, High pH (kód GV804)	30 min HIER
Protilátka	Ready-to-use	12,5minutová inkubace
Negativní kontrola	FLEX Negative Control, Mouse (kód GA750)	12,5minutová inkubace
Vizualizace	EnVision FLEX (kód GV800)	Blok: 3 min; Polymer: 20 min; Chromogen: 5 min
Kontrastní barvivo	Hematoxylin (kód GC808)	3minutová inkubace
Kontrolní tkáň	Játra	Membránové a cytoplazmatické zbarvení
Sklička	FLEX IHC Microscope Slides (kód K8020)	Doporučeno kvůli lepší přilnavosti řezů tkání k podložním sklům.
Montáž	Je vyžadována bezvodá permanentní montáž	Po barvení je třeba řezy dehydratovat, vyčistit a montovat za použití permanentní montážní metody
Vybavení	Dako Omnis	Činidla se dodávají v ampulkách určených pro příslušný přístroj

**Uživatel se musí vždy seznámit s podrobnými pokyny k barvicímu postupu a s pokyny týkajícími se zacházení s produktem, které jsou uvedené v příbalové informaci.*

Příprava vzorku

Parafinové řezy: Protílátku lze používat ke značení řezů tkání fixovaných ve formalínu a zalitých v parafínu. Vzorky tkání je nutno rozřezat na řezy o tloušťce 4 µm.

Předběžné zpracování: Je vyžadováno předběžné zpracování tkáňových řezů fixovaných ve formalínu a zalitých v parafínu tepelně indukovaným vyhledáváním epitopu (HIER). Doporučuje se předběžné zpracování tkání HIER pomocí naředěného roztoku EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Dako Omnis), kód GV804. Odstranění parafínu, rehydratace a vyhledání cíle se provádějí v přístroji Dako Omnis. Viz Základní uživatelská příručka Dako Omnis.

Přístroj Dako Omnis zajistí, aby tkáňové řezy během předběžného zpracování a následného imunohistochemického barvení nevyschly. Z důvodu vyšší přilnavosti řezů tkání k podložním sklům se doporučuje používat podložní skla FLEX IHC Microscope Slides, kód K8020.

Postup barvení

Program: V softwaru přístroje Dako Omnis jsou předem naprogramovány kroky barvení a inkubační doby. Podrobné pokyny ke vkládání podložních skel a plnění činidel naleznete v Základní uživatelské příručce Dako Omnis. Pokud není v systému Dako Omnis připraven protokol, kontaktujte technickou podporu společnosti Dako. Všechny kroky inkubace se provádějí při teplotě 32 °C v přístroji Dako Omnis.

Vizualizace: Doporučený vizualizační systém je EnVision FLEX, High pH, (Dako Omnis), kód GV800. Vizualizace se provádí v přístroji Dako Omnis.

Kontrastní barvení: Doporučené kontrastní barvivo je Hematoxylin (Dako Omnis), kód GC808. Kontrastní barvení se provádí v přístroji Dako Omnis.

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

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

Interpretace zbarvení

Obraz buněčného barvení je membránový a/nebo cytoplazmatický.

Charakteristiky účinnosti

Normální tkáň: Při testování 30 různých normálních tkání bylo prokázáno pozitivní zbarvení v cytoplazmě skvamózního a cylindrického epitelu děložního hrdla, tračníku, jícnu, kůže, tenkého střeva, žaludku a tonzily. Dále se zbarvení projevilo u dalších tkání včetně glandulární tkáň (prsí, příštítná žláza, prostata, potní a štítná žláza), u astrocytů, bílé hmoty malého mozku, gliových filament velkého mozku, distálního tubulu a Bowmanova váčku ledviny, žlučového, plicních buněk, průdušek, mezotelu, interlobulárních vývodů slinivky břišní, buněk adenohipofýzy, interlobulárních vývodů a sekrečních buněk slinné žlázy, retikulárních buněk a Hassallových tělísek brzlíku a endometria a hladkého svalstva dělohy (6). U nadledviny, kostní dřeně, srdce, osrdečníku, periferních nervů, kosterního svalu, sleziny a varlat nebylo zjištěno žádné zbarvení.

Anti-AE1/AE3 reaguje s keratinizovaným (56,5/65-67) a korneálním (55/64) epidermem, vrstevnatými skvamózními epitelu vnitřních orgánů (51/59), vrstevnatými epitelu (50/58), hyperproliferativními keratinocyty (48/56) a jednoduchými epitelu (45/52 a 46/54). Keratin 40 kDa se nachází ve většině epitelů kromě epidermu dospělých (3,4).

Buňky žlučového v játrech vykazují středně silnou až silnou reakci barvení, zatímco hepatocyty vykazují slabou až středně silnou, převážně membránovou reakci barvení.










Abnormální tkáně: Co se týče patologických tkání, Listrom a Dalton (7) testovali klony AE1/AE3 u více než 60 špatně rozlišených epiteliálních novotvarů, lymfomů, melanomů a sarkomů. Kromě zbarvení pouze 2/6 případů malobuněčného karcinomu a 3/5 karcinomu urotelu bylo při studii zjištěno, že u všech 34 epiteliálních novotvarů se projevilo zbarvení. V případě reakce zbarvila protilátka AE1/AE3 karcinomy z přechodných buněk pouze slabě a zbarvení nádorových buněk bylo difúzně cytoplazmatické nebo perinukleární. Montag a kol. (8) zjistili, že protilátka AE1/AE3 je citlivou reagentií pro klasifikaci difúzního maligního mezoteliomu sarkomatoidního (vřetenobuněčitého) typu (pozitivní v 30/30 případech), zatímco jiné typy vřetenobuněčitých novotvarů byly nereaktivní (0/49). Při srovnání s anti-EMA ve studii 87 novotvarů, včetně 48 adenokarcinomů různých typů, Pinkus a kol. (6) zjistili, že protilátka AE1/AE3 barví v 33 % případů spolehlivěji než anti-EMA.

Ačkoliv 3 z 3 případů chondroidního chordomu a 1 z 8 případů reagovaly s anti-AE1/AE3, žádné zbarvení nebylo pozorováno u 25 neepiteliálních novotvarů včetně 4 případů, v každém z nich šlo o melanom a glioblastom (7).

Literatura

1. Tseng SCG, Jarvinen MJ, Nelson WG, Huang JW, Woodcock-Mitchell J, Sun TTI. Correlation of specific keratins with different types of epithelial differentiation: Monoclonal antibody studies. *Cell* 1982; 30:361
2. Woodcock-Mitchell J, Eichner R, Nelson WG, Sun TT. Immunolocalization of keratin polypeptides in human epidermis using monoclonal antibodies. *J Cell Biol* 1982; 95:580
3. Moll R, Franke WW, Schiller DI. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 1982; 31:11
4. Sun T-T, Eichner R, Schermer A, Cooper D, Nelson WG, Weiss RA. Classification, expression and possible mechanisms of evolution of mammalian epithelial keratins: A unifying model. In: Levine A, Topp W, Vande Woude G, Watson JD (eds.). *Cancer cells 1 the transformed phenotype*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory 1984
5. Eichner R, Bonitz P, Sun T-T. Classification of epidermal keratins according to their immunoreactivity, isoelectric point and mode of expression. *J Cell Biol* 1984; 98:1388
6. Pinkus GS, Etheridge CL, O'Connor EM. Are keratin proteins a better tumor marker than epithelial membrane antigen? *Amer J Clin Pathol* 1986; 85:269
7. Listrom MB and Dalton LW. Comparison of keratin monoclonal antibodies MAK-6, AE1:AE3 and CAM-5.2. *Amer J Clin Pathol* 1987; 88:297
8. Montag AG, Pinkus GS, Corson JM. Keratin protein immunoreactivity of sarcomatoid and mixed types of diffuse malignant mesothelioma: An immunoperoxidase study of 30 cases. *Hum Pathol* 1988; 19:336
9. Nelson WG, Battifora H, Santana H and Sun T-T. Specific keratins as molecular markers for neoplasms with a stratified epithelial origin. *Canc Res* 1984; 44:1600

Vysvětlivky k symbolům

 Katalogové číslo	 Teplotní rozmezí od do	 In vitro diagnostický zdravotnický prostředek
 Výrobce	 Číslo šarže	 Obsah postačující pro <n> testů
 Použitelné do	 Viz návod k použití	 Autorizovaný zástupce v Evropské unii



Agilent Technologies, Inc.
5301 Stevens Creek Blvd.
Santa Clara, CA 95051
United States

Tel. +44 161 492 7050
www.agilent.com

TX02438/01

Revize 2020.06