

FLEX
Monoclonal Mouse
Anti-Human
Melanosome
Klon HMB45
Ready-to-Use
(Dako Omnis)

Kód GA052

Použití

Pro diagnostiku in vitro.

FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Melanosome, klon HMB45, připravená k použití (Dako Omnis), je určena pro použití v imunohistochemii (IHC) společně s přístrojem Dako Omnis. Tato protilátka je užitečná při identifikaci melanocytů s tvorbou nezralých melanosomů v normální kůži a névu. Výsledky pomáhají při klasifikaci melanomů a melanocytárních lézí (1, 3, 5, 6). 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.

Souhrn a výklad

Přítomnost antigenu indikuje aktivní tvorbu melanosomu a tedy melanocytickou diferenciací (5). Je rovněž exprimován v normálních fetálních melanocytech (2,3), nikoli však v normálních klidových melanocytech, bez ohledu na stupeň pigmentace (1,3,6). Při aktivaci mohou melanocyty reexprimovat antigen definovaný protilátkou HMB45 (jelikož je exprimován ve fetálních melanocytech). Tyto melanocyty jsou aktivovány různými podněty. HMB45-pozitivní buňky byly například detekovány ve tkáni překrývající nebo sousedící se zrnitou tkání, hemangiomy, stromatem nádorů bohatým na cévy a karcinomem z bazálních buněk (5-8). Vlasové folikuly jsou občas zbarveny v souvislosti se stimulovanými melanocyty (1). Pozitivní barvení HMB45 nebylo pozorováno u melanocytů v pihách nebo překrývajících fibroblastických novotvarech, jako jsou keloidy, dermatofibromy a staré fibrotické hemangiomy (8). Zdá se, že nemelanocytické normální tkáně s protilátkou HMB45 nereagují.

V příručce *General Instructions for Immunohistochemical Staining (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.

Dodávaná reagentie

Monoklonální myší protilátka připravená k použití se dodává v kapalné podobě v pufru s obsahem stabilizujícího proteinu a 0,015 mol/l NaN₃.

Klon: HMB45. Izotyp: IgG1, kappa.

Imunogen

Výtažek z metastáz pigmentovaného melanomu z lymfatických uzlin.

Specifita

Bylo prokázáno, že anti-melanom, HMB45 reaguje s 10 kD segmentem sialyzovaného glykokonjugátu citlivého na neuraminidázu, který se nachází v prekurzorech melanosomů a v ranných stádiích melanosomů (nezralých melanosomech) (2-4)

Bezpečnostní opatření

1. K diagnostice 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 správné postupy zacházení.
5. Používejte odpovídající osobní ochranné prostředky, aby nedošlo k zasažení očí nebo pokožky.
6. Nespoteřované roztoky je nutno likvidovat v souladu s místními a celostátními předpisy.

Uchovávání

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 reagentie 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.

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	25minutová inkubace
Negativní kontrola	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
Kontrastní barvivo	Hematoxylin (kód GC808)	3minutová inkubace
Kontrolní tkáň	Melanom	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: Protilátku 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 odmaskováním (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 skl a plnění činidel naleznete v Základní uživatelské příručce Dako Omnis. Pokud není v systému Dako Omnis připraven protokol, kontaktujte technickou podporu výrobce 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 v kombinaci s EnVision FLEX+ Mouse LINKER (Dako Omnis), kód GV821. 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: Tkáně 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 buňky melanomu 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

Buněčný barvicí vzor je cytoplazmatický.

Charakteristiky účinnosti










Normální tkáň: Mezi normální tkáně, které s protilátkou anti-melanom, HMB45 vykazují pozitivní zbarvení, patří melanocyty (fetální a subset, melanocyty obsahující nezralé melanozomy), retinální pigmentové epitely (prenatální a infantilní). Mezi negativní tkáně patří nadledvina, mozek, prs, žlučník, zažívací trakt, ledvina, játra, plíce, lymfoidní tkáň, mezenchymální buňky, slinivka břišní, periferní nervová tkáň, retinální pigmentové epitely (dospělého člověka), slinná žláza, kůže (melanocyty, normální klidové, melonofágy, Langerhansovy buňky, keratinocyty, vlasové folikuly, kožní nervy, potní žlázy, mazové žlázy) a varlata.

Abnormální tkáň: Anti-melanom, HMB45 barví 245/256 (95,7 %) melanomů (kromě desmoplastických (1,3,5,6,9-14) a 245/291 (84,2 %) melanomů (včetně desmoplastických) (1,3,5,6,9, 13,14). Melanocytická atypická hyperplazie (2/2) (1), melanocytický infantilní neuroektoderm (1/1) (6), angiomyolipom ledvin (27/29) (11,12) a různé névy (218/228) (1,5,6,10) se barví protilátkou anti-melanom, HMB45. U melanomu vykazují neoplastické buňky středně silnou až silnou reakci barvení.

Literatura

- Gown AM, Vogel AM, Hoak D, Gough F, McNutt MA. Monoclonal antibodies specific for melanocytic tumors distinguish subpopulations of melanocytes. Am J Pathol 1986; 123(2):195-203.
- Kapur RP, Bigler SA, Skelly M, Gown AM. Anti-melanoma monoclonal antibody HMB45 identifies an oncofetal glycoconjugate associated with immature melanosomes. J Histochem Cytochem 1992; 40(2):207
- Esclamado RM, Gown AM, Vogel AM. Unique proteins defined by monoclonal antibodies specific for human melanoma. Amer J Surg 1986; 152:376
- Taatjes DJ, Arendash-Durand B, von Turkovich M, Trainer TD. HMB-45 antibody demonstrates melanosome specificity by immunoelectron microscopy. Arch Pathol Lab Med 1993; 117:264
- Skelton HG, Smith KJ, Barrett TL, Lupton GP, Graham JH. HMB-45 staining in benign and malignant melanocytic lesions. Amer J Dermatopathol 1991; 13:543
- Colombari R, Bonetti F, Zamboni G, Scarpa A, Marino F, Tomezzoli A, Capelli P, Menestrina F, Chilosi M, Fiore-Donati L. Distribution of melanoma specific antibody (HMB-45) in benign and malignant melanocytic tumors. Virch Arch A Pathol Anat 1988; 413:17
- Smoller BR, Hsu A, Krueger J. HMB-45 monoclonal antibody recognizes an inducible and reversible melanocyte cytoplasmic protein. J Cutan Pathol 1991; 18:315
- Smoller BR, McNutt NS, Hsu A. HMB-45 recognizes stimulated melanocytes. J Cutan Pathol 1989;16:49
- Wick MR, Swanson PE, Rocamora A. Recognition of malignant melanoma by monoclonal antibody HMB-45. An immunohistochemical study of 200 paraffin-embedded cutaneous tumors. J Cutan Pathol 1988; 15:201
- Ashfaq R, Weinberg AG, Albores-Saavedra J. Renal angiomyolipomas and HMB-45 reactivity. Canc 1993; 71:3091
- Pea M, Bonetti F, Zamboni G, Martignoni G, Riva M, Colombari R, Mombello A, Bonzanini M, Scarpa A, Ghimenton C, Donati LF. Melanocyte-marker-HMB-45 is regularly expressed in angiomyolipoma of the kidney. Pathol 1991; 23:185
- Bonetti F, Chiodera PL, Pea M, Martignoni G, Bosi F, Zamboni G, Mariuzzi GM. Transbronchial biopsy in lymphangiomyomatosis of the lung. HMB45 for diagnosis. Amer J Surg Pathol 1993; 17(11):1092
- Ordonez NG, Xiaolong JI, Hickey RC. Comparison of HMB-45 monoclonal antibody and S-100 protein in the immunohistochemical diagnosis of melanoma. Amer J Clin Pathol 1988; 90(4):385
- Bacchi CE, Goldfogel GA, Greer BE, Gown AM. Paget's disease and melanoma of the vulva. Gyn Oncol 1992; 46:216

Vysvětlivky k symbolům

 REF	Katalogové číslo		Teplotní rozmezí od do	 IVD	In vitro diagnostický zdravotnický prostředek
	Výrobce	 LOT	Číslo šarže		Obsah postačující pro <n> testů
	Použitelné do		Viz návod k použití	 EC REP	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