

Monoclonal Mouse Anti-Human

Epithelial Antigen

Clone Ber-EP4

Code No./ Code/ Code-Nr. M 0804

Edition/ Edition/ Ausgabe 20.12.02

ENGLISH

Intended use

For in vitro diagnostic use.

Monoclonal Mouse Anti-Human Epithelial Antigen, Clone Ber-EP4, is intended for use in immunocytochemistry. The antibody labels most epithelial cells and is useful as a discriminant in the differential diagnosis of adenocarcinoma versus malignant mesothelioma (1). The antibody may also aid in the detection of micrometastases in lymph nodes of patients with oesophageal carcinoma (2) and in differentiating between basal and squamous cell carcinomas of the skin (3). Differential identification is aided by the results from a panel of antibodies. Interpretation must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Introduction

Epithelial antigen is a cell surface glycoprotein of unknown function (4). This epithelium-specific antigen is broadly distributed in epithelial cells, and displays a highly conserved expression in carcinomas (4, 5). As exceptions to the general expression in normal epithelia, adult hepatocytes, in contrast to fetal hepatocytes, parietal cells in gastric glands, and apical cells in squamous epithelia are negative. Epithelial antigen is rarely present in mesotheliomas (1, 4). It has been reported that epithelial antigen plays an important role as tumour-cell marker in lymph nodes from patients with oesophageal carcinoma otherwise classified as node-negative (2). Epithelial antigen has also been suggested as a discriminator between basal cell and basosquamous carcinomas, and squamous cell carcinoma of the skin (3).

Reagent provided

Monoclonal mouse antibody provided in liquid form as cell culture supernatant dialysed against 0.05 mol/L Tris/HCl, pH 7.2, and containing 15 mmol/L NaN₃.

Clone: Ber-EP4 (4). Iso^type: IgG1, kappa.

Mouse IgG concentration: see label on vial.

Immunogen

MCF-7 cells (human breast carcinoma cell line) (4).

Specificity

Analysis of immunocomplexes between the antibody and lysate of ¹²⁵I surface-labelled MCF-7 cells in SDS-PAGE under reducing conditions shows that the antibody labels two polypeptides of 34 kDa and 39 kDa, respectively, corresponding to epithelial antigen. Under non-reducing conditions, the polypeptides appear as 39 kDa and 41 kDa, while deglycosylation reduces the size to 31 kDa, and 36 kDa.

In immunoprecipitation experiments, the Ber-EP4 antibody blocks the reaction of the HEA125 antibody with MCF-7 cell lysate and vice versa, showing that the two antibodies react with the same antigen. The two antibodies also produce identical staining results in cells and tissues (4).

Of 37 cell lines tested, the antibody homogeneously labels all (10/10) carcinoma cell lines, whereas all non-epithelial cell lines (26/27) are negative except for the erythromyeloid cell line K562 (4).

Precautions

- For professional users.
- This product contains sodium azide (NaN₃), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing.
- As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.

Storage

Store at 2-8 °C. Do not use after expiration date stamped on vial. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the user must verify the conditions. There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the antibody is suspected, contact our Technical Services.

Specimen preparation

Paraffin sections: The antibody can be used for labelling paraffin-embedded tissue sections fixed in formalin. Pre-treatment of tissues with heat-induced epitope retrieval is required. Optimal results are obtained with DakoCytomation Target Retrieval Solution, code No. S 1700. Less optimal results are obtained with 10 mmol/L citrate buffer, pH 6.0. However, DakoCytomation Target Retrieval Solution, High pH, code No. S 3308, or 10 mmol/L Tris buffer, 1 mmol/L EDTA, pH 9.0, and were found inefficient. Pre-treatment of tissues with proteinase K was found less optimal. The tissue sections should not dry out during the treatment or during the following immunocytochemical staining procedure.

Frozen sections and cell preparations: The antibody can be used for labelling acetone-fixed, frozen sections and cell preparations (4).

Staining procedure

Dilution: Monoclonal Mouse Anti-Human Epithelial Antigen, code No. M 0804, may be used at a dilution range of 1:200-1:400 when applied on formalin-fixed, paraffin-embedded sections of human kidney and using 20 minutes heat-induced epitope retrieval in DakoCytomation Target Retrieval Solution, code No. S 1700, and 30 minutes incubation at room temperature with the primary antibody. Optimal conditions may vary depending on specimen and preparation method, and should be determined by each individual laboratory. The recommended negative control is DakoCytomation Mouse IgG1, code No. X 0931, diluted to the same mouse IgG concentration as the primary antibody. Unless the stability of the diluted antibody and negative control has been established in the actual staining procedure, it is recommended to dilute these reagents immediately before use, or dilute in DakoCytomation Antibody Diluent, code No. S 0809. Positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimen.

Visualization: DAKO LSAB™⁺/HRP kit, code No. K 0679, and DAKO EnVision™⁺/HRP kits, code Nos. K 4004 and K 4006, are recommended. For frozen sections and cell preparations, the DakoCytomation APAAP kit, code No. K 0670, is a good alternative if endogenous peroxidase staining is a concern. Follow the procedure enclosed with the selected visualization kit.

Product-specific limitations

In formalin-fixed, paraffin-embedded carcinomas arising from tissues with no or smaller amounts of epithelial antigen, such as hepatocellular and lung carcinomas, the antibody does not perform satisfactorily compared to labelling in frozen sections of the same tissues (4). Owing to the relative lability of the epitope in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections, negative results should be interpreted with caution (4).

Performance characteristics

Cells labelled by the antibody display membrane and cytoplasmic staining. The membrane staining is preferentially basolateral (4).

(104934-003)	M 0804/EFG/SUA/20.12.02 p. 1/4
DakoCytomation Denmark A/S · Produktionsvej 42 · DK-2600 Glostrup · Denmark · Tel. +45 44 85 95 00 · Fax +45 44 85 95 95 · CVR No. 33 21 13 17	

Normal tissues: All normal epithelial tissues are labelled by the antibody. Epithelial cells of different origin display varying levels of staining, but most epithelia are strongly positive. Only parietal cells in gastric glands, apical cell layers in squamous epithelia, and adult hepatocytes are negative (4). The antibody does not label non-epithelial tissues, including spleen, peripheral blood, bone marrow, brain, connective tissue, smooth and striated muscle, heart, endothelia, and myoepithelia. Additionally pleura and peritoneum-lining cells are negative, but cells covering the ovary display a slight staining (4).

Abnormal tissues: The antibody labelled 142 of 144 epithelial tumour specimens, irrespective of their differentiation, derived from breast, oesophagus, stomach, colon, rectum, pancreas, kidney, liver, lung, thyroid and salivary glands, vagina, ovary, cervix uteri and nasopharynx, reflecting the staining pattern in their non-malignant counterparts. Hepatocellular carcinomas displayed heterogeneous staining and included the two negative cases. In this study (4), 2 of 2 squamous cell carcinomas of the lung and cervix uteri, respectively, were positive in formalin-fixed, paraffin-embedded specimens, even though only the basal cell layers were labelled in normal tissues. In some carcinomas, such as gastric carcinomas, the antibody demonstrated a stronger labelling than in normal tissues, especially on the membrane. None of 88 non-epithelial tumours and 20 cases of leukaemia were labelled by the antibody (4).

In a study of 83 adenocarcinomas and 115 malignant mesotheliomas, 72/83 adenocarcinomas were labelled by the antibody whereas only 1/115 malignant mesotheliomas were labelled (1). In another study, 20/20 lung adenocarcinomas and 4/46 mesotheliomas were labelled. Of the 4 positive mesotheliomas, the 2 showed a strictly focal labelling (6). In lymph nodes classified as tumour free by conventional histopathological staging, the antibody labelled micrometastatic tumour cells in 89 of 126 patients with completely resected oesophageal carcinomas (2). In a study of 75 skin tumours, the antibody labelled 39/39 basal cell carcinomas, 0/23 squamous cell carcinomas, and showed some areas of staining in 13/13 basosquamous carcinomas (3).

FRANÇAIS

Intérêt

Pour diagnostic in vitro.

Monoclonal Mouse Anti-Human Epithelial Antigen, Clone Ber-EP4, est destiné à un usage en immunocytochimie. L'anticorps marque la plupart des cellules épithéliales et c'est un outil de discrimination utile pour le diagnostic différentiel d'adénocarcinomes par rapport aux mésothéliomes malins (1). L'anticorps peut également faciliter la détection de micrométastases dans les ganglions lymphatiques de patients atteints de cancer de l'œsophage (2) et faciliter la différenciation entre les carcinomes à cellules basales de la peau et ceux à cellules squameuses (3). L'identification différentielle est facilitée par les résultats d'un panel d'anticorps. L'interprétation des résultats doit être faite par un professionnel qualifié dans le contexte de l'histoire clinique du patient et des autres examens diagnostics.

Introduction

L'antigène épithélial est une glycoprotéine de la surface cellulaire dont la fonction est inconnue (4). L'antigène spécifique à l'épithélium est largement distribué dans les cellules épithéliales et il montre une expression hautement conservée dans les carcinomes (4, 5). A l'exception de l'expression générale dans les épithéliums normaux, les hépatocytes adultes, contrairement aux hépatocytes fœtaux, les cellules pariétales des glandes gastriques et les cellules apicales des épithéliums squameux sont négatifs. L'antigène épithélial est rarement présent dans les mésothéliomes (1, 4). Il a été décrit que l'antigène épithélial joue un rôle important de marqueur tumoral dans les ganglions lymphatiques des patients atteints de cancers de l'œsophage autrement classés comme ganglion-négatifs (2). Il a également été suggéré que l'antigène épithélial pouvait être un discriminant entre les carcinomes cutanés à cellules basales et baso-squameuses et ceux à cellules squameuses (3).

Réactif fourni

Anticorps monoclonal de souris à l'état liquide sous forme de surnageant de culture cellulaire, obtenu par dialyse contre une solution Tris/HCl à 0,05 mol/L, pH 7,2, et contenant 15 mmol/L de NaN₃.

Clone: Ber-EP4 (4). Iso^type: IgG1, kappa.

Concentration en IgG de souris: Voir l'étiquette sur le flacon.

Immunogène

Cellules MCF-7 (lignée cellulaire de cancer du sein humain) (4).

Spécificité

L'analyse SDS-PAGE des immunocomplexes formés entre l'anticorps et le lysat des cellules MCF-7 marqués en surface au ¹²⁵I dans des conditions réductrices montre que l'anticorps marque deux polypeptides de 34 kDa et 39 kDa correspondant à l'antigène épithélial. En conditions non réductrices, les polypeptides se présentent sous forme de molécules de 39 kDa et 41 kDa, alors que la glycosylation réduit leur taille à 31 kDa et 36 kDa.

Dans les tests d'immunoprécipitation, l'anticorps Ber-EP4 bloque la réaction de l'anticorps HEA125 avec le lysat de cellules MCF-7 et vice-versa, ce qui montre que les deux anticorps réagissent avec le même antigène. Les deux anticorps produisent également une coloration identique dans les cellules et les tissus (4).

Sur 37 lignées cellulaires testées, l'anticorps a marqué de manière homogène toutes les lignées cellulaires de carcinomes (10/10), alors que les lignées cellulaires non épithéliales (26/27) ont été négatives à l'exception de la lignée érythromyéloïde K562 (4).

Précautions d'emploi

- Pour utilisateurs professionnels.
- Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN₃), un produit chimique hautement toxique à l'état pur. Bien qu'il ne soit pas classé comme dangereux aux concentrations présentes dans le produit, l'azide de sodium est susceptible de réagir avec les parties en plomb et en cuivre des tuyauteries pour former des dépôts hautement explosifs d'azides métalliques. Lors de l'élimination du produit, rincer avec de grandes quantités d'eau pour éviter toute accumulation d'azides métalliques dans la tuyauterie.
- Comme pour tout produit d'origine biologique, des procédures de manipulation appropriées doivent être utilisées.

Conservation

Conserver entre 2 °C et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur le flacon. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles préconisées, les conditions doivent être vérifiées par l'utilisateur. Aucun signe visible n'indique l'instabilité du produit. Par conséquent, des contrôles positifs et négatifs doivent être traités simultanément avec les échantillons du patient. En cas de résultats imprévus qui ne peuvent pas être expliqués par des changements de procédures de laboratoire et si un problème avec le produit est suspecté, contacter nos Services Techniques.

Préparation de l'échantillon

Coupes en paraffine: L'anticorps peut être utilisé pour le marquage des coupes de tissus incluses en paraffine, fixées au formol. Le prétraitement des tissus par restauration de l'épitope induite par la chaleur est nécessaire. Des résultats optimaux sont obtenus avec DakoCytomation Target Retrieval Solution, code S 1700. Des résultats moins optimaux sont obtenus avec un tampon citrate à 10 mmol/L, pH 6,0. Mais DakoCytomation Target Retrieval Solution, pH élevé, code S 3308, ou tampon Tris 10 mmol/L, EDTA 1 mmol/L , pH 9.0 se sont révélés inefficaces. Le prétraitement des tissus par la Protéinase K diminue l'efficacité du dosage. Les coupes de tissus ne doivent pas sécher pendant le traitement ou la procédure de marquage immunocytochimique qui suit.

Coupes congelées et préparations cellulaires: L'anticorps peut être utilisé pour le marquage des coupes congelées et préparations cellulaires fixées à l'acétone (4).

Procédure d'immunomarquage

Dilution: Monoclonal Mouse Anti-Human Epithelial Antigen, code M 0804 peut être dilué entre 1:200 et 1:400 pour utilisation sur des coupes de rein humain incluses en paraffine, fixées au formol, avec une restauration de l'épitope par la chaleur pendant 20 minutes dans DakoCytomation Target Retrieval Solution, code S 1700 et 30 minutes d'incubation à température ambiante avec l'anticorps primaire. Les conditions optimales peuvent varier selon l'échantillon et la méthode de préparation, et elles doivent être déterminées par chaque laboratoire. Le contrôle négatif recommandé est DakoCytomation Mouse IgG1, code X 0931, ajusté à la même concentration en IgG de souris que l'anticorps primaire. A moins que la stabilité de l'anticorps dilué et du contrôle négatif n'ait été établie pour la procédure d'immunomarquage en cours, il est recommandé de diluer les réactifs juste avant l'utilisation ou de diluer dans DakoCytomation Antibody Diluent, code S 0809. Des contrôles positifs et négatifs doivent être traités simultanément avec les échantillons du patient.

(104934-003)	M 0804/EFG/SUA/20.12.02 p. 2/4
DakoCytomation Denmark A/S · Produktionsvej 42 · DK-2600 Glostrup · Denmark · Tel. +45 44 85 95 00 · Fax +45 44 85 95 95 · CVR No. 33 21 13 17	

Révélation: La trousse DAKO LSAB™+/HRP, code K 0679, et les trousses DAKO EnVision™+/HRP, codes K 4004 et K 4006 sont recommandées. Pour les coupes congelées et préparations cellulaires, la trousse DakoCytomation APAAP, code K 0670, constitue une bonne alternative si le marquage par la peroxydase endogène est à craindre. Suivre la procédure figurant dans la trousse de révélation choisie.

Limites du produit

Dans les coupes de carcinomes incluses en paraffine, fixées au formol, provenant de tissus dans lesquels l'antigène épithélial est absent, ou présent en faible quantité, tels que les carcinomes hépatocellulaires ou les carcinomes du poumon, l'anticorps ne réagit pas de manière satisfaisante comparativement à des coupes congelées des mêmes tissus (4). En raison de la labilité relative de l'épitope dans les coupes de tissus incluses en paraffine, fixées au formol, les résultats négatifs doivent être interprétés avec prudence (4).

Performances

Les cellules marquées par l'anticorps montrent une coloration de la membrane et du cytoplasme. La coloration de la membrane est généralement basolatérale (4).

Tissus normaux: Tous les tissus épithéliaux normaux sont marqués par l'anticorps. Les cellules épithéliales d’origines différentes montrent des niveaux variables de coloration, mais la plupart des épithéliums sont fortement positifs. Seules les cellules pariétales des glandes gastriques, les couches cellulaires apicales des épithéliums squameux et les hépatocytes adultes sont négatifs (4). L'anticorps ne marque pas les tissus non épithéliaux, notamment la rate, le sang périphérique, la moelle osseuse, le cerveau, le tissu conjonctif, les muscles lisses et striés, le cœur, l'endothélium et le myoépithélium. Les cellules des muqueuses pleurale et péritonéale sont également négatives, mais les cellules de la surface de l'ovaire montrent une légère coloration (4).

Tissus anormaux: L'anticorps a marque 142 échantillons sur 144 de tumeurs épithéliales, quelle que soit leur différenciation, provenant du sein, de l'œsophage, de l'estomac, du colon, du rectum, du pancréas, du rein, du foie, du poumon, de la thyroïde et des glandes salivaires, du vagin, de l'ovaire, du col de l'utérus et du rhinopharynx, en reflétant le profil de coloration dans leurs homologues non malins. Les hépatomes ont montré une coloration hétérogène et ont inclus deux cas négatifs. Dans cette étude (4), 2 cas sur 2 de carcinomes épidermoïdes du poumon et du col de l'utérus respectivement ont été positifs dans des échantillons inclus en paraffine, fixés au formol, même si seule les couches de cellules basales ont été marquées dans les tissus normaux. Dans certains cancers, tels que les cancers de l'estomac, l'anticorps a montré un marquage plus fort que dans les tissus normaux, notamment sur la membrane. Aucune des 88 tumeurs non épithéliales et aucun des 20 cas de leucémie n'ont été marqués par l'anticorps (4).

Dans une étude portant sur 83 adénocarcinomes et 115 mésothéliomes malins, 72 adénocarcinomes sur 83 ont été marqués par l'anticorps alors qu'un seul mésothéliome malin sur 115 a été marqué (1). Dans une autre étude, 20 adénocarcinomes du poumon sur 20 et 4 mésothéliomes sur 46 ont été marqués. Sur les 4 mésothéliomes positifs, deux ont présenté un marquage strictement focal (6). Dans les ganglions lymphatiques classés comme non tumoraux par analyse histopathologique conventionnelle, l'anticorps a marqué des cellules tumorales micrométastatiques chez 89 patients sur 126 ayant subi une résection totale du carcinome gastrique (2). Dans une étude de 75 tumeurs cutanées, l'anticorps a marqué 39/39 carcinomes baso-cellulaires, 0/23 épithéliomas épidermoïdes spino-cellulaires et il a montré des zones de coloration dans 13/13 carcinomes baso-squameux (3).

DEUTSCH

Zweckbestimmung

Zur Verwendung für In-vitro-Untersuchungen.

Monoclonal Mouse Anti-Human Epithelial Antigen, Clone Ber-EP4, ist für die immunzytochemische Anwendung bestimmt. Der Antikörper markiert die meisten Epithelzellen und dient als Unterscheidungskriterium bei der Differenzialdiagnose zwischen Adenokarzinom und malignem Mesotheliom (1). Der Antikörper ist vermutlich ebenfalls hilfreich beim Nachweis von Mikrometastasen in Lymphknoten von Patienten mit Ösophaguskarzinom (2) und bei der Differenzierung von Basalzell- und Plattenepithelkarzinomen der Haut (3). Die Differenzialdiagnose wird durch die mit einem Antikörper-Panel erhaltenen Resultate unterstützt. Die Interpretation muss unter Berücksichtigung der klinischen Anamnese des Patienten und im Kontext weiterer diagnostischer Verfahren durch einen erfahrenen Pathologen erfolgen.

Einleitung

Das epitheliale Antigen ist ein Zelloberflächenglykoprotein unbekannter Funktion (4). Dieses Epithel-spezifische Antigen ist in Epithelzellen weit verbreitet und zeigt eine in hohem Maße konservierte Expression in Karzinomen (4, 5). Zur generellen Expression in normalen Epithelien gibt es folgende Ausnahmen: Hepatozyten Erwachsener im Gegensatz zu fötalen Hepatozyten, parietale Zellen in gastrischen Drüsen und apikale Zellen im Plattenepithel testen alle negativ. Epitheliales Antigen kommt nur selten in Mesotheliomen vor (1, 4). Epitheliales Antigen spielt nachweislich eine wichtige Rolle als Tumorzellmarker in Lymphknoten von Patienten mit Ösophaguskarzinomen, die ansonsten als nodal-negativ klassifiziert werden (2). Es wurde ebenfalls vorgeschlagen, epitheliales Antigen bei der Differenzierung von Basalzell- und basosquamösen Karzinomen sowie von Plattenepithelkarzinomen der Haut einzusetzen (3).

Geliefertes Reagenz

Der monoklonale Mausantikörper wird in flüssiger Form als Zellkulturüberstand geliefert, wurde gegen 0,05 mol/L Tris/HCl, pH-Wert 7,2, dialysiert und enthält 15 mmol/L NaN₃.

Klon: Ber-EP4 (4). **Isotyp:** IgG1, Kappa.

Maus-IgG-Konzentration: Siehe Produktetikett.

Immunogen

MCF-7-Zellen (humane Mammakarzinom-Zelllinie) (4).

Spezifität

Die SDS-PAGE-Analyse der Immunkomplexe zwischen dem Antikörper und dem Lysat von ¹²⁵I-oberflächenmarkierten MCF-7-Zellen unter reduzierenden Bedingungen zeigt, dass der Antikörper zwei Polypeptide von jeweils 34 kDa bzw. 39 kDa entsprechend dem epithelialen Antigen markiert. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen erscheinen die Polypeptide als 39 kDa bzw. 41 kDa-Peptide, durch Deglykosylierung werden sie jedoch auf eine Größe von 31 kDa bzw. 36 kDa reduziert.

In Immunpräzipitationsexperimenten blockiert der Ber-EP4-Antikörper die Reaktion des HEA-125-Antikörpers mit MCF-7-Zellysat und umgekehrt, wodurch nachgewiesen wird, dass beide Antikörper mit dem gleichen Antigen reagieren. Die beiden Antiköper produzieren ebenfalls identische Färbungsergebnisse in Zellen und Geweben (4).

Von 37 getesteten Zelllinien findet in allen (10/10) Karzinomzelllinien eine homogene Färbung durch den Antikörper statt, während alle nicht-epithelialen Zelllinien (26/27) mit Ausnahme der erythromyeloiden Zelllinie K562 negativ erschienen.

Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

1. Für geschultes Fachpersonal.

2. Dieses Produkt enthält Natrium-Azid (NaN₃), eine in reiner Form hochtoxische chemische Verbindung. Bei den in diesem Produkt verwendeten Konzentrationen kann Natrium-Azid, obwohl nicht als gefährlich klassifiziert, mit in Abflussrohren enthaltenem Blei oder Kupfer reagieren und zur Bildung von hochexplosiven Metall-Azid-Anreicherungen in den Abflussrohren führen. Nach der Entsorgung muss mit reichlich Wasser nachgespült werden, um Metall-Azid-Anreicherung in den Abflussrohren zu vermeiden.

3. Wie bei allen aus biologischen Materialien gewonnenen Produkten müssen die ordnungsgemäßen Handabungsverfahren eingehalten werden.

Lagerung

Bei 2 – 8 °C lagern. Nicht nach dem auf dem Fläschchen angegebenen Verfallsdatum verwenden. Sollten die Reagenzien unter anderen Bedingungen als den beschriebenen aufbewahrt worden sein, so müssen diese vom Anwender verifiziert werden. Es gibt keine offensichtlichen Anhaltspunkte für die mögliche Instabilität dieses Produktes. Es sollten daher die Positiv- und Negativkontrollen gleichzeitig mit den Patientenproben mitgeführt werden. Wenn unerwartete Verfärbung beobachtet wird, welche durch Änderungen in den Labormethoden nicht erklärt werden kann, und falls Verdacht auf ein Problem mit dem Antikörper besteht, ist bitte Kontakt mit unserem technischen Kundendienst aufzunehmen.

Probenvorbereitung

Paraffinschnitte: Der Antikörper kann für die Färbung von paraffineingebetteten, formalinfixierten Gewebeschnitten genutzt werden. Eine Vorbehandlung der Gewebe mit hitzeinduzierter Epitopdemaskierung ist erforderlich. Optimale Ergebnisse werden mit DakoCytomation Target Retrieval Solution, Code-Nr. S 1700, erzielt. Weniger optimale Ergebnisse erhält man mit 10 mmol/L Citratpuffer, pH 6,0.DakoCytomation Target Retrieval Solution, pH 9,9, Code-Nr. S 3308, bzw. 10 mmol/L Tris-Puffer, 1 mmol/L EDTA, pH 9,0, erwiesen sich dagegen als ineffizient. Die Vorbehandlung der Gewebe mit Proteinase K hat sich als weniger optimal erwiesen. Während der Gewebevorbehandlung oder während der sich anschließenden immunzytochemischen Färbeprozedur dürfen die Gewebeschnitte nicht austrocknen.

Gefrierschnitte und zytologische Präparate: Der Antikörper kann für die Markierung von azetonfixierten Gefrierschnitten und Zellpräparaten verwendet werden (4).

Färbeprozedur

Verdünnung: Monoclonal Mouse Anti-Human Epithelial Antigen, Code-Nr. M 0804, kann bei einem Verdünnungsbereich von 1:200-1:400 eingesetzt werden, wenn es für formalinfixierte, paraffineingebettete Schnitte der menschlichen Niere genutzt wird und wenn 20 Minuten lang die hitzeinduzierte Epitopdemaskierung mit DakoCytomation Target Retrieval Solution, Code-Nr. S 1700, durchgeführt wird, gefolgt von 30minütiger Inkubation mit dem primären Antikörper bei Raumtemperatur. Die optimalen Bedingungen schwanken je nach Probe und Methode der Probenvorbereitung und sollten von jedem einzelnen Labor bestimmt werden. Als Negativkontrolle wird DakoCytomation Mouse IgG1, Code-Nr. X 0931 empfohlen, das auf dieselbe Maus-IgG-Konzentration wie der primäre Antikörper verdünnt worden ist. Solange mit dem eigentlichen Testsystem die Stabilität des verdünnten Antikörpers und der Negativkontrolle nicht sichergestellt ist, wird empfohlen, diese Reagenzien unmittelbar vor Gebrauch zu verdünnen oder die Verdünnung mit DakoCytomation Antibody Diluent, Code-Nr. S 0809, vorzunehmen. Positive und negative Kontrollen sollten gleichzeitig mit den Patientenproben analysiert werden.

Visualisierung: Folgende Kits werden empfohlen: DAKO LSAB™+/HRP-Kit, Code-Nr. K 0679, und DAKO EnVision™+/HRP-Kits, Code-Nr. K 4004 und K 4006. Falls bei Gefrierschnitten und Zellpräparaten Probleme mit endogener Peroxidasefärbung auftreten, bietet der DakoCytomation APAAP Kit, Code-Nr. K 0670, eine gute Alternative. Dem Verfahren folgen, das in den Anleitungen des für die Visualisierung ausgewählten Kits beschrieben wird.

Produktspezifische Beschränkungen

In formalinfixierten, paraffineingebetteten Karzinomen, die aus Geweben mit keinem oder kleineren Mengen an epithelialem Antigen, wie hepatozelluläre und Lungenkarzinome, entstehen, zeigt der Antikörper im Vergleich zur Färbung in Gefrierschnitten desselben Gewebes keine zufrieden stellende Leistung (4). Aufgrund der relativen Labilität des Epitops in formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten sind negative Ergebnisse mit Vorsicht zu interpretieren (4).

Leistungseigenschaften

Durch den Antikörper markierte Zellen zeigen sowohl Membran- wie auch zytoplasmatische Färbung. Die Membranfärbung ist vorzugsweise basolateral (4).

Normalgewebe: Alle normalen Epithelgewebe werden durch den Antikörper markiert. Bei Epithelzellen unterschiedlicher Herkunft variiert der Grad der Färbung, die meisten Epithelien sind jedoch stark positiv. Allein die parietalen Zellen in gastrischen Drüsen, apikale Schichten in Plattenepithelien sowie die Hepatocyten Erwachsener testen negativ. (4). Nicht-epitheliale Gewebe, einschließlich Milz, peripheres Blut, Knochenmark, Gehirn, Bindegewebe, glatter und quergestreifter Muskel, Herz, Endothele und Myoepithele, werden durch den Antikörper nicht markiert. Ebenso testen Pleura sowie das Peritoneum auskleidende Zellen negativ, wohingegen das Ovar bedeckende Zellen eine leichte Färbung aufweisen (4).





Anomales Gewebe: Der Antikörper markierte 142 von 144 epithelialen Tumorproben, ungeachtet ihrer Differenzierung, und zwar aus Brust, Ösophagus, Magen, Kolon, Rektum, Pankreas, Niere, Leber, Lunge, Schilddrüse und Speicheldrüsen, Vagina, Ovarien, Zervix Uteri und Nasopharynx, wobei die Färbemuster in ihren nicht-malignen Gegenstücken reflektiert wurden. Die hepatozellulären Karzinome wiesen eine heterogene Färbung auf und enthielten auch die zwei negativen Fälle. In dieser Studie (4) waren 2 von 2 Plattenepithelkarzinomen, und zwar je eins der Lunge und des Zervix Uteri, in formalinfixierten, paraffineingebetteten Proben positiv, obwohl in normalen Geweben nur die Basalzellschichten markiert wurden. In einigen Karzinomen, wie z. B. gastrischen Karzinomen, zeigte der Antikörper eine stärkere Färbung als in normalen Geweben, insbesondere auf der Membran. Von 88 nicht-epithelialen Tumoren und 20 Leukämiefällen fand in keinem Fall eine Färbung durch den Antikörper statt (4).

In einer Studie von 83 Adenokarzinomen und 115 malignen Mesotheliomen wurden 72/83 Adenokarzinomen durch den Antikörper markiert, während nur 1/115 malignen Mesotheliomen markiert wurde (1). In einer anderen Studie wurden 20/20 Lungenadenokarzinomen und 4/46 Mesotheliomen markiert. Von den 4 Mesotheliomen zeigten 2 eine strikt fokale Färbung (6). In Lymphknoten, die durch konventionelles histopathologisches Staging als tumorfrei klassifiziert wurden, markierte der Antikörper bei 89 von 126 Patienten mit vollkommen resektierten Ösophaguskarzinomen mikrometastatische Tumorzellen (2). In einer Studie von 75 Hauttumoren markierte der Antikörper 39/39 Basalzellkarzinome, 0/23 squamösen Zellkarzinomen und färbte bei 13/13 basosquamösen Karzinomen einige Bereiche (3).

References/ Références/ Literatur

- Sheibani K, Shin SS, Kezirian J, Weiss LM. Ber-EP4 antibody as a discriminant in the differential diagnosis of malignant mesothelioma versus adenocarcinoma. Am J Surg Pathol 1991;15:779-84.
- Hosch S, Kraus J, Scheunemann P, Izbicki JR, Schneider C, Schumacher U, et al. Malignant potential and cytogenetic characteristics of occult disseminated tumor cells in esophageal cancer. Cancer Res 2000;60:6836-40.
- Beer TW, Shepherd P, Theaker JM. Ber EP4 and epithelial membrane antigen aid distinction of basal cell, squamous cell and basosquamous carcinomas of the skin. Histopathology 2000;37:218-23.
- Latza U, Niedobitek G, Schwarting R, Nekarda H, Stein H. Ber-EP4: new monoclonal antibody which distinguishes epithelia from mesothelia. J Clin Pathol 1990;43:213-9.
- Momburg F, Moldenhauer G, Hämmerling GJ, Möller P. Immunohistochemical study of the expression of a *M*, 34,000 human epithelium-specific surface glycoprotein in normal and malignant tissues. Cancer Res 1987;47:2883-91.
- Carella R, Deleonardi G, D’Errico A, Salerno A, Egarter-Vigl E, Seebacher C, et al. Immunohistochemical panels for differentiating epithelial malignant mesothelioma from lung adenocarcinoma. Am J Surg Pathol 2001;25:43-50.

Explanation of symbols/ Légende des symboles/ Erläuterung der Symbole

REF	Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer	 2 °C – 8 °C	Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich	 Manufacturer Fabricant Hersteller
IVD	In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-Vitro-Diagnostikum	LOT	Batch code Code du Lot Chargenbezeichnung	
	Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten		Use by Utiliser jusque Verwendbar bis	