

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

English

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats				
Format	Catalog Number	Description	Dilution	Diluent
Concentrate	ACI 3252 A, B	0.1, 0.5 mL	1:100	Van Gogh Yellow
Predilute	API 3252 AA, G20, H	6.0, 20, 25 mL	Ready-to-use	N/A
ONCORE Pro	OPAI 3252 T60	60 tests	Ready-to-use	N/A
Q Series-- For Leica BOND-III	ALI 3252 G7	7.0 mL	Ready-to-use	N/A
UltraLine -- For BenchMark	AVI 3252 G, G25	6.0, 25 mL	Ready-to-use	N/A

Intended Use:

For *in vitro* Diagnostic Use

PRAME [EPR20330] is a rabbit monoclonal antibody that is intended for laboratory use after the initial diagnosis of tumor has been made by conventional histopathology using nonimmunologic histochemical stains, in the qualitative identification of PRAME protein by immunohistochemistry (IHC) in formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) human tissues. 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 as an aid in making any other clinical determinations.

Summary and Explanation:

PRAME is located on chromosome 22q11.22 and encodes a 509 amino acid protein. PRAME is an autosomal cancer-testis antigen (CTA) gene which has been shown to be expressed in melanoma, various nonmelanocytic malignant neoplasms, including non-small cell lung cancer, breast carcinoma, ovarian carcinoma, and several others cited. Normal healthy tissues are not known to express PRAME except for testis, ovary, adrenals, and a few others cited in the literature. ^(15,16)

Principle of Procedure:

This antibody product may be used as the primary antibody in immunohistochemistry testing of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. In general, immunohistochemical (IHC) staining techniques allow for the visualization of antigens via the sequential application of a specific antibody to the antigen (primary antibody), a secondary antibody to the primary antibody (optional link antibody/probe), an enzyme complex and a chromogenic substrate with interposed washing steps. The enzymatic activation of the chromogen results in a visible reaction product at the antigen site. The specimen may then be counterstained, and cover slipped. Results are interpreted using a light microscope and aid in the differential diagnosis of pathophysiological processes, which may or may not be associated with a particular antigen.

Materials and Methods:

Reagents Provided:

Host Source: Rabbit monoclonal

Species Reactivity: Human. Other species not tested.

Clone: EPR20330

Isotype: IgG

Protein Concentration: Specific IgG Concentration: Contact Biocare's Technical Support

Specificity: PRAME

Cellular Localization: Nucleus and cell membrane

Method: Affinity purified recombinant rabbit monoclonal.

Reconstitution, Mixing, Dilution, Titration:

Prediluted antibody reagent is optimally diluted for use with the above listed staining systems. Further dilution may result in loss of antigen staining. The user must validate any such change. 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).

Concentrated reagent requires dilution as indicated in table above.

Known Applications:

Immunohistochemistry (formalin-fixed paraffin-embedded tissues)

Supplied As: Buffered saline solution, pH 5.9-7.9 containing a protein carrier and less than 0.1% sodium azide preservative. See Safety Data Sheet for additional details.

Materials and Reagents Needed but Not Provided:

Microscope slides positively charged.
Positive and negative tissue controls
Desert Chamber (or similar Drying oven)
Xylene or xylene substitute
Ethanol or reagent alcohol
Decloaking Chamber (Pressure cooker)
Deionized or distilled water
Wash buffer
Pretreatment reagents
Peroxidase block
Protein block (optional)
Detection probe and polymer
Negative control reagents
Chromogens
Hematoxylin (counterstain)
Bluing reagent
Mounting medium
Coverglass
Light Microscope (40-400X magnification)

Configurations of the antibody product are available for use on the instruments indicated in the table above.

Storage and Stability:

Store at 2°C to 8°C. The product is stable to the expiration date printed on the vial label, when stored under these conditions. Do not use after expiration date. Storage under any condition other than those specified must be verified. Diluted reagents should be used promptly; store any remaining reagent at 2°C to 8°C. The stability of user diluted reagent has not been established by Biocare.

Positive and negative controls should be run simultaneously with all 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 Biocare's Technical Support at 1-800-542-2002 or via the technical support information provided on biocare.net.

Specimen Preparation:

Tissues fixed in formalin are suitable for use prior to paraffin embedding. Osseous tissues should be decalcified prior to tissue processing to facilitate tissue cutting and prevent damage to microtome blades.^{1,2}

Properly fixed and embedded tissues expressing the specified antigen target should be stored in a cool place. The Clinical Laboratory Improvement Act (CLIA) of 1988 requires in 42 CFR §493.1259(b) that "The laboratory must retain stained slides at least ten years from the date of examination and retain specimen blocks at least two years from the date of examination."³



60 Berry Drive
Pacheco, CA 94553
USA

1/190



TP v3 (12/15/2021)

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080



Westervoortsedijk 60
8627 AT Arnhem
The Netherlands

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

English

BIOCARE
M E D I C A L

Treatment of Tissues Prior to Staining:

Perform Heat Induced Epitope Retrieval (HIER) per recommended protocol below. The routine use of HIER prior to IHC has been shown to minimize inconsistency and standardize staining. ^{4,5}

Warning and Precautions:

1. This antibody contains less than 0.1% sodium azide. Concentrations less than 0.1% are not reportable hazardous materials according to U.S. 29 CFR 1910.1200, OSHA Hazard communication and EC Directive 91/155/EC. Sodium azide (NaN₃) used as a preservative is toxic if ingested. Sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent azide build-up in plumbing. (Center for Disease Control, 1976, National Institute of Occupational Safety and Health, 1976)⁶
2. 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 precautions. Never pipette reagents by mouth and avoid contacting the skin and mucous membranes with reagents and specimens. If reagents or specimens come into contact with sensitive areas, wash with copious amounts of water.⁷
3. Microbial contamination of reagents may result in an increase in nonspecific staining.
4. Incubation times or temperatures other than those specified may give erroneous results. The user must validate any such change.
5. Do not use reagent after the expiration date printed on the vial.
6. Prediluted antibody reagent is optimally diluted for use. Further dilution may result in loss of antigen staining.
7. Dilution of concentrated antibody reagent must be validated before use. Any diluent used that is not specifically recommended also must be validated for compatibility and stability.
8. Dispose of all used reagents and any other contaminated disposable materials following procedures for infectious or potentially infectious waste. It is the responsibility of each laboratory to handle solid and liquid waste according to their nature and degree of hazardousness and to treat and dispose of it (or have them treated and disposed of) in accordance with any applicable regulations.
9. Follow local disposal regulations for your location along with recommendations in the Safety Data Sheet to determine the safe disposal of this product
10. The SDS is available upon request and is located at <http://biocare.net>.
11. To report suspected serious incidents related to this device, contact the local Biocare representative and the competent authority of the Member State or Country in which the user is established.

Instructions for Use:

Recommended Staining Protocols for PRAME [EPR20330]:

IntelliPATH FLX and manual use:

API3252 for IntelliPATH FLX and manual use, has been standardized with MACH 4 detection system. Use TBS for washing steps.	
Peroxide Block:	Block for 5 minutes with Peroxidized 1.
Pretreatment:	Perform heat retrieval using Borg Decloaker. Refer to the Borg Decloaker data sheet for specific instructions.
Protein Block (Optional):	Incubate for 5-10 minutes at RT with Background Punisher.
Primary Antibody:	Incubate for 30 minutes at RT.
Detection:	Probe: N/A
	Polymer: Incubate for 30 minutes at RT with a secondary-conjugated polymer.

Chromogen:	Incubate for 5 minutes at RT with Biocare's DAB – OR –Incubate for 5-7 minutes at RT with Warp Red.
Counterstain	Counterstain with hematoxylin. Rinse with deionized water. Apply Tacha's Bluing Solution for 1 minute. Rinse with deionized water.

ONCORE Pro Automated Slide Staining System:

OPAI3252 is intended for use with the ONCORE Pro. Refer to the User Manual for specific instructions for use. Protocol parameters in the Protocol Editor should be programmed as follows:		
Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	PRAME Rb	PRAME Rb AP
Protocol Template (Description):	Special Template (ONCORE Pro-Tect Detection Required)	Rb AP Template 1
Dewaxing (DS Buffer Option):	DS2-50	DS Buffer
Antigen Retrieval (AR Option):	AR1, high pH; 103°C	AR1, high pH; 103°C
Block Option:	Buffer	Buffer
Reagent Name, Time, Temp.:	PRAME Rb, 45 min., 25°C	PRAME Rb, 30 min., 25°C

Ventana BenchMark ULTRA:

AVI3252 is intended for use with the BenchMark ULTRA. Refer to the User Manual for specific instructions for use. Recommended protocol parameters are as follows:	
Template/Detection:	OptiView DAB IHC
Pretreatment Protocol:	CC1 64 minutes
Peroxidase:	Pre-Primary Peroxidase Inhibitor
Primary Antibody:	32 minutes, 36°C

Q Series – For Leica BOND-III:

ALI3252 is intended for use with the Leica BOND-III. Refer to the User Manual for specific instructions for use. Recommended protocol parameters are as follows:		
Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	IHC Protocol F	IHC Protocol J
Detection:	Bond Polymer Refine	Bond Polymer Refine Red
HIER:	20 min with ER2	20 min with ER2
Peroxide Block:	5 min	
Marker (Primary Antibody):	15 min	15 min
Post Primary:	8 min	
Polymer:	8 min	
Post Primary AP:		20 min
Polymer AP:		30 min
Mixed Chromogen Refine:	10 min	10 min + 5 min
Hematoxylin:	5 min	5 min

Quality Control:

Refer to CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011⁸

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

English

BIOCARE
M E D I C A L

Positive Tissue Control: Melanoma, normal testis

External positive control materials should be fresh specimens fixed, processed, and embedded as soon as possible in the same manner as the patient sample(s). Positive tissue controls are indicative of correctly prepared tissues and proper staining techniques. One positive external tissue control for each set of test conditions should be included in each staining run.

The tissues used for the external positive control materials should be selected from patient specimens with well-characterized low levels of the positive target activity that gives weak positive staining. The low level of positivity for external positive controls is designed to ensure detection of subtle changes in the primary antibody sensitivity from instability or problems with the IHC methodology. Commercially available tissue control slides or specimens processed differently from the patient sample(s) validate reagent performance only and do not verify tissue preparation.

Known positive tissue controls should only be utilized for monitoring the correct performance of processed tissues and test reagents, rather than as an aid in formulating a specific diagnosis of patient samples. If the positive tissue controls fail to demonstrate positive staining, results with the test specimens should be considered invalid.

Negative Tissue Control:

Use a negative tissue control (known to be PRAME negative) fixed, processed, and embedded in a manner identical to the patient sample(s) with each staining run to verify the specificity of the IHC primary antibody for demonstration of the target antigen, and to provide an indication of specific background staining (false positive staining). Also, the variety of different cell types present in most tissue sections can be used by the laboratorian as internal negative control sites to verify the IHC's performance specifications. The types and sources of specimens that may be used for negative tissue controls are listed in the Performance Characteristics section.

If specific staining (false positive staining) occurs in the negative tissue control, results with the patient specimens should be considered invalid.

Nonspecific Negative Reagent Control:

Use a nonspecific negative reagent control in place of the primary antibody with a section of each patient specimen to evaluate nonspecific staining and allow better interpretation of specific staining at the antigen site. Ideally, a negative reagent control contains a PRAME IgG antibody produced from tissue culture supernatant in the same way as the primary antibody but exhibits no specific reactivity with human tissues in the same matrix/solution as the Biocare antibody. Dilute a negative control antibody to the same immunoglobulin or protein concentration as the diluted primary antibody using the identical diluent. If fetal calf serum is retained in the neat antibody after processing, fetal calf serum at a protein concentration equivalent to the diluted primary antibody in the same diluent is also suitable for use. (Refer to reagent provided). Diluent alone may be used as a less desirable alternative to the previously described negative reagent controls. The incubation period for the negative reagent control should correspond to that of the primary antibody.

When panels of several antibodies are used on serial sections, the negatively staining areas of one slide may serve as a negative/nonspecific binding background control for other antibodies. To differentiate endogenous enzyme activity or nonspecific binding of enzymes from specific immunoreactivity, additional patient tissues may be stained exclusively with substrate-chromogen or enzyme complexes (PAP, avidin-biotin, streptavidin) and substrate-chromogen, respectively.

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 Program⁹ for Immunohistochemistry and/or the NCCLS IHC guideline¹⁰). 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.

Troubleshooting:

Follow the antibody specific protocol recommendations according to the data sheet provided. If atypical results occur, contact Biocare's Technical Support at 1-800-542-2002.

Interpretation of Staining:

Positive Tissue Control:

The positive tissue control stained with indicated antibody should be examined first to ascertain that all reagents are functioning properly. The appropriate staining of target cells (as indicated above) is indicative of positive reactivity. If the positive tissue controls fail to demonstrate positive staining, any results with the test specimens should be considered invalid.

The color of the reaction product may vary depending on substrate chromogens used. Refer to substrate package inserts for expected color reactions. Further, metachromasia may be observed in variations of the method of staining.¹¹

When a counterstain is used, depending on the incubation length and potency of the counterstain used, counterstaining will result in a coloration of the cell nuclei. Excessive or incomplete counterstaining may compromise proper interpretation of results. Refer to protocol(s) for recommended counterstain.

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 cross reactivity 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 nonspecifically.

Patient Tissue:

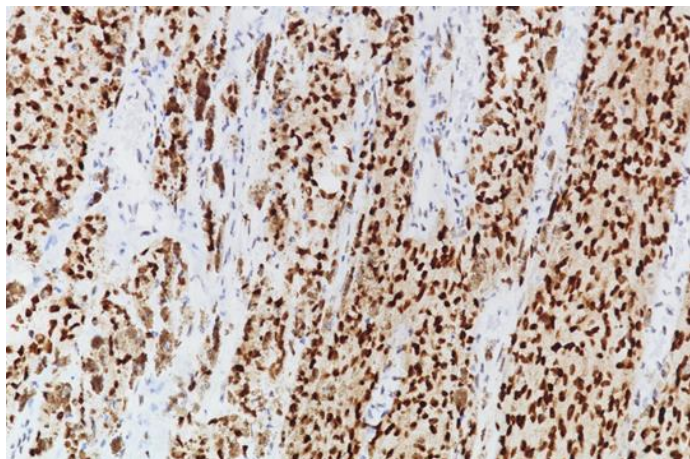
Examine patient specimens stained with indicated antibody last. Positive staining intensity should be assessed within the context of any nonspecific background staining of the negative reagent control. As with any immunohistochemical test, a negative result means that the antigen was not detected, not that the antigen was absent in the cells/tissue assayed. If necessary, use a panel of antibodies to identify false-negative reactions.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

English

BIOCARE
M E D I C A L



Melanoma stained with PRAME [EPR20330] antibody.

Refer to Summary and Explanation, Limitations, and Performance Characteristics for specific information regarding indicated antibody immunoreactivity.

Limitations:

General Limitations:

1. For *in vitro* diagnostic Use
2. This product is for professional use only: 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.
3. 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 tissue.¹²
4. Excessive or incomplete counterstaining may compromise proper interpretation of results.
5. 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 all the steps used to prepare and interpret the final IHC preparation.
6. The optimum antibody dilution and protocols for a specific application can vary. These include, but are not limited to fixation, heat-retrieval method, incubation times, tissue section thickness and detection kit used. Due to the superior sensitivity of these unique reagents, the recommended incubation times and titers listed are not applicable to other detection systems, as results may vary. The data sheet recommendations and protocols are based on exclusive use of Biocare products. Ultimately, it is the responsibility of the investigator to determine optimal conditions.
7. This product is not intended for use in flow cytometry. Performance characteristics have not been determined for flow cytometry.
8. Tissues from persons infected with hepatitis B virus and containing hepatitis B surface antigen (HBsAg) may exhibit nonspecific staining with horseradish peroxidase.¹³
9. 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.¹⁴ Contact Biocare's Technical Support at 1-800-542-2002, or via the technical support information provided on biocare.net, with documented unexpected reaction(s).

10. 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.
11. False-positive results may be seen due to non-immunological binding of proteins or substrate reaction products. They may also be caused by pseudo peroxidase activity (erythrocytes), endogenous peroxidase activity (cytochrome C), or endogenous biotin (e.g., liver, breast, brain, kidney) depending on the type of immunostain used.¹²

Product Specific Limitations:

No additional product specific limitations.

Performance Characteristics:

Reproducibility:

Reproducibility of antibody performance was verified by testing select normal and tumor tissue on various days and various instruments with multiple operators. Staining of the select tissues was consistent and performed as expected.

Immunoreactivity:

The following positive and negative immunoreactivities have been demonstrated in Tables 1 and 2 below.

The list provided below is not exhaustive but characterizes the types of immunoreactivities observed with the indicated antibody.

There is no known non-specific antibody reactivity observed in this product.

Summary of Expected Results:

The prevalence of PRAME in normal and disease state tissues was evaluated using Tissue Microarrays (TMAs).

The normal tissues tested stained as expected, with high levels of staining observed in testis and no staining in other tissues.

Staining of PRAME was observed at a high level in melanoma as expected, and at varying levels in other cancer tissues such as ovary, lung, prostate, and breast.

Analytical Performance:

Staining tests for sensitivity and specificity were conducted and the results are listed below.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

English

BIOCARE
M E D I C A L

Sensitivity and Specificity:

Table 1: Sensitivity and specificity of the antibody was determined by testing FFPE normal tissues.

Tissue	Positive Cases	Total Cases
Cerebrum	0	6
Cerebellum	0	3
Adrenal	0	3
Ovary	0	3
Pancreas	0	3
Trachea	0	3
Pituitary	0	3
Testis*	3	3
Thyroid	0	3
Breast	0	3
Spleen	0	3
Tonsil	0	3
Thymus	0	3
Bone Marrow**	0	1
Lung	0	3
Heart	0	3
Esophagus	0	3
Stomach	0	3
Small Intestine	0	3
Colon	0	3
Liver	0	3
Salivary Gland	0	3
Kidney	0	3
Prostate	0	3
Uterus	0	3
Cervix	0	3
Skeletal Muscle	0	3
Skin	0	3
Peripheral Nerve	0	3
Lining Cells	0	3
Head, neck, and salivary gland	0	6
Lymph node	0	3

* 3-4 strength nuclear staining

** Two samples missing

Table 2: Sensitivity and specificity of the antibody was determined by testing a variety of FFPE neoplastic tissues.

Pathology	Positive Cases	Total Cases
Melanoma	29	39
Ovary Cancer	9	44
Breast Cancer	10	26
Colon Cancer	4	43
Lung Cancer	21	50
Prostate Cancer	18	41
Adrenocortical carcinoma	0	1
Bladder Cancer	0	2
Meningioma	0	2
Astrocytoma	0	1
Squamous Cell carcinoma (esophagus)	0	2
Adenocarcinoma (stomach)	0	2
Adenocarcinoma (small intestine)	0	1
Adenocarcinoma (colon & rectum)	0	6
Kidney Cancer	0	2
Liver Cancer	0	4
Lymphoma	0	3
Squamous Cell carcinoma (head & neck, oral cavity, tongue)	0	1
Nasopharyngeal carcinoma	1	1
Adenocarcinoma (pancreas)	0	1
Adenocarcinoma (prostate)	0	2
Adenoid cystic carcinoma (head and neck, salivary gland)	0	1
Squamous Cell carcinoma (skin)	0	1
Seminoma	0	2
Thyroid Cancer	0	2
Cervical Cancer	0	2
Endometrium Cancer	1	2

PRAME expression in various neoplasms may exhibit variable percent tumor positivity. Refer to Table 3 for positive staining tumor cell percentages (categorized by quartiles) observed in various neoplasms found in Table 2.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

English

BIOCARE
M E D I C A L

Table 3: Percent positive tumor cell staining in various FFPE neoplasms.

Tissues	Percent Tumor Cells Staining # Cases Exhibiting Staining Percentage of Total # Cases (%)				
	<1%	1-25%	26-50%	51-75%	> 75%
Ovary Cancer	35/44 (79.5%)	2/44 (4.5%)	3/44 (6.8%)	3/44 (6.8%)	1/44 (2.3%)
Breast Cancer	16/26 (61.5%)	7/26 (26.9%)	1/26 (3.8%)	2/26 (7.7%)	0 (0%)
Colon Cancer	39/43 (88.4%)	4/43 (11.6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Lung Cancer	29/50 (58.0%)	7/50 (14.0%)	4/50 (8.0%)	7/50 (14.0%)	3/50 (6.0%)
Prostate Cancer	23/41 (56.1%)	9/41 (22.0%)	3/41 (7.3%)	2/41 (4.9%)	4/41 (9.8%)
Nasopharyngeal carcinoma	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1/1 (100%)
Endometrium Cancer	1/2 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	1/2 (50%)	0 (0%)
Melanoma	10/39 (25.6%)	6/39 (15.4%)	5/39 (12.8%)	6/39 (15.4%)	12/39 (30.8%)

*Percent tumor cell staining presented for all staining intensities.
Staining on tissues showing varying levels of PRAME protein expression.*

The results of the analytical performance testing demonstrated that the PRAME [EPR20330] antibody can correctly detect the PRAME protein when using the defined IHC protocol. The abnormal tissue test results support the conclusion that PRAME [EPR20330] is sensitive to the PRAME protein when using the recommended IHC protocols. The PRAME [EPR20330] antibody is able to detect low to high levels of the PRAME protein. The normal tissue testing showed no unexpected detection of PRAME over 32 tissue types. There was no unexpected cross reactivity. The results support the claim PRAME [EPR20330] antibody is highly specific (analytical specificity) to the PRAME protein.

Clinical Performance:

Staining tests for diagnostic sensitivity and specificity were conducted and the results are listed below. Positive and negative immunoreactivity has been recorded in Table 4.

Three melanoma TMA slides were stained at Biocare and sent to an external pathologist to be read and graded. Melanoma tissues showed a diversity of staining scores ranging from 0 (negative) to strong (4). Most melanocytic nevi showed no PRAME reactivity, but a few had strong reactivity.

Table 4: Percent positive tumor cell staining in various FFPE melanocytic neoplasms and skin.

Tissues	Percent Tumor Cells Staining # Cases Exhibiting Staining Percentage of Total # Cases (%)				
	<1%	1-25%	26-50%	51-75%	> 75%
Melanoma	28/133 (21.1%)	50/133 (37.6%)	10/133 (7.5%)	8/133 (6.0%)	37/133 (27.8%)
Metastatic melanoma	7/38 (18.4%)	10/38 (26.3%)	3/38 (7.9%)	2/38 (5.3%)	16/38 (42.1%)
Melanocytic nevi	12/14 (85.7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2/12 (14.3%)
Skin	10/10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

*Percent tumor cell staining presented for all staining intensities.
Staining on tissues showing varying levels of PRAME protein expression.*

The primary endpoint of the test was to evaluate the diagnostic sensitivity of the PRAME [EPR20330] antibody in the IHC procedure, defined as the positive melanoma detection rate of the confirmed positive samples. [TP/(TP+FN)]

A secondary endpoint was to evaluate the diagnostic specificity - the negative detection rate for confirmed melanoma negative samples. [TN/(TN+FP)]

There were 35 false negative melanoma cases that had received the gold standard pathological evaluation as melanoma but were negative for PRAME. 136 cases were true positives in that they were diagnosed with melanoma and showed signal for PRAME. Two false positives were detected in the 14 melanocytic nevi samples that were diagnosed as benign which showed signal for PRAME.

From the data, the estimated diagnostic sensitivity = $136/(136+35) = 79.5\%$
From the data, the estimated diagnostic specificity = $22/(22+2) = 91.7\%$

Based on our calculations, we arrive at an estimated diagnostic sensitivity of 79.5% and an estimated diagnostic specificity of 91.7% for melanoma detection.

From this we conclude that the PRAME [EPR20330] antibody, as tested by Biocare on melanoma and melanocytic nevi samples, is sensitive to melanoma and highly specific to melanoma.

Troubleshooting: (Provide explanation for each of the points below)

1. No staining of any slides – Check to determine appropriate positive control tissue, antibody, and detection products have been used.
2. Weak staining of all slides – Check to determine appropriate positive control tissue, antibody, and detection products have been used.
3. Excessive background of all slides – There may be high levels of endogenous biotin (if using biotin-based detection products), endogenous HRP activity converting chromogen to colored end product (use peroxidase block), or excess non-specific protein interaction (use a protein block, such as serum- or casein-based blocking solution).
4. Tissue sections wash off slides during incubation – Check slides to ensure they are positively charged.
5. Specific staining too dark – Check protocol to determine if proper antibody titer was applied to slide, as well as proper incubation times for all reagents. Additionally, ensure the protocol has enough washing steps to remove excess reagents after incubation steps are completed.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

English

BIOCARE
M E D I C A L

References:

1. Kiernan JA. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. *Theory and Practice of Histotechnology*. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. *J Histotechnol*. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. *Biotech Histochem*. 1996 Jan;71(5):263-70.
6. Center for Disease Control Manual. Guide: Safety Management, NO. CDC-22, Atlanta, GA. April 30, 1976 "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts."
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition* CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
8. CLSI *Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2)* CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011
9. College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. [Http://www.cap.org](http://www.cap.org) (800) 323-4040.
10. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. *Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)*. Wayne, PA. 1997;1-46.
11. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. *Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques. Histochemistry* 1987; 86:471-478.
12. Nadji M, Morales AR. *Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Lab Med*1983;14:767.
13. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. *Nonimmunologic binding of horseradishperoxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. Am J Clin Path* 1980;73:626.
14. Herman GE and Elfont EA. *The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech & Histochem* 1991;66:194.
15. Zhang W, *et al*. PRAME expression and promoter hypermethylation in epithelial ovarian cancer. *Oncotarget*, 2016 Jul; 7(29):45352-69.
16. Lezcano C, *et al*. PRAME expression in melanocytic tumors. *Am J Surg Pathol*. 2018 Nov; 42(11):1456-65.

Ultraline antibodies are developed solely by Biocare Medical LLC and do not imply approval or endorsement of Biocare antibodies by Ventana Medical Systems, Inc or Roche. Biocare, Ventana and Roche are not affiliated, associated, or related in any way. Ventana®, BenchMark®, ultraView and OptiView are trademarks of Roche.

Q Series antibodies are developed solely by Biocare Medical LLC and do not imply approval or endorsement of Biocare antibodies by Leica Biosystems. Biocare and Leica Biosystems are not affiliated, associated, or related in any way. Leica, Leica Biosystems, BOND-MAX, and BOND-III are trademarks of Leica Biosystems.

The summary of safety and performance can be found here: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Bulgarian

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats				
Format	Catalog Number	Description	Dilution	Diluent
Concentrate	ACI 3252 A, B	0.1, 0.5 mL	1:100	Van Gogh Yellow
Predilute	API 3252 AA, G20, H	6.0, 20, 25 mL	Ready-to-use	N/A
ONCORE Pro	OPAI 3252 T60	60 tests	Ready-to-use	N/A
Q Series-- For Leica BOND-III	ALI 3252 G7	7.0 mL	Ready-to-use	N/A
UltraLine -- For BenchMark	AVI 3252 G, G25	6.0, 25 mL	Ready-to-use	N/A

Предназначение:

За *in vitro* диагностична употреба

PRAME [EPR20330] е заешко моноклонално антитяло, което е предназначено за лабораторна употреба, след като първоначалната диагноза на тумора е била направена чрез конвенционална хистопатология с използване на неимунологични хистохимични оцветявания, при качествена идентификация на PRAME протеин чрез имунохистохимия (ИHC) във формалин фиксиран парафин- вградени (FFPE) човешки тъкани. Клиничната интерпретация на всяко оцветяване или неговото отсъствие трябва да бъде допълнена от морфологични изследвания с използване на подходящи контроли и трябва да бъде оценена в контекста на клиничната история на пациента и други диагностични тестове от квалифициран патолог като помощ при вземането на всякакви други клинични определения.

Резюме и обяснение:

PRAME се намира на хромозома 22q11.22 и кодира протеин от 509 аминокиселини. PRAME е ген на автосомен рак-тестисен антиген (СТА), за който е доказано, че се експресира в меланома, различни немеланоцитни злокачествени неоплазми, включително недробноклетъчен рак на белия дроб, карцином на гърдата, карцином на яйчниците и няколко други цитирани. Не е известно, че нормалните здрави тъкани експресират PRAME, с изключение на тестисите, яйчниците, надбъбречните жлези и няколко други, цитирани в литературата. ^(15,16)

Принцип на процедурата:

Това антитяло може да се използва като първично антитяло при имунохистохимично изследване на фиксирани във формалин, вградени в парафин тъканни срезове. Като цяло имунохистохимичните (ИHC) техниките на оцветяване позволяват визуализация на антигени чрез последователно прилагане на а специфично антитяло към антигена (първично антитяло), вторично антитяло към първичното антитяло (по избор свързващо антитяло/сонда), ензимен комплекс и хромогенен субстрат с вмъкнати стъпки на промиване. Ензимното активиране на хромогена води до видим реакционен продукт на мястото на антигена. След това образецът може да бъде насрещно оцветен и покрит с капак. Резултатите се интерпретират с помощта на светлина микроскоп и помощ при диференциалната диагноза на патофизиологични процеси, които могат или може да не са свързани с определен антиген.

Материали и методи:

Осигурени реагенти:

Източник на гостоприемник: моноклонален заек

Реактивност на видовете: човешки. Други видове не са тествани.

Клон: EPR20330

Изотип: IgG

Концентрация на протеин: Специфична концентрация на IgG:

Свържете се с техническата поддръжка на Biocare

Специфичност: PRAME

Клетъчна локализация: Ядро и клетъчна мембрана

Метод: Афинитетно пречистен рекомбинантен моноклонал заек.

Разтваряне, смесване, разреждане, титруване:

Предварително разределеният реагент за антитела е оптимално разреден за използване с изброените по-горе системи за оцветяване. Понататъшното разреждане може да доведе до загуба на антигенно оцветяване. Потребителят трябва да потвърди всяка такава промяна. Разликите в обработката на тъканите и техническите процедури в лабораторията на потребителя могат да доведат до значителна променливост в резултатите, което налага редовно извършване на вътрешни контроли (вижте раздела за контрол на качеството). Концентрираният реагент изисква разреждане, както е посочено в таблицата по-горе.

Известни приложения:

Имунохистохимия (фиксирана във формалин тъкани, вградени в парафин)

Доставя се като: Буферирани физиологичен разтвор, pH 5,9-7,9, съдържащ протеинов носител и по-малко от 0,1% консервант натриев азид. Вижте Информационния лист за безопасност за допълнителни подробности.

Необходими, но неосигурени материали и реагенти:

Микроскопски предметни стъкла са положително заредени.

Положителни и отрицателни тъканни контроли

Пустинна камера (или подобна сушилна)

Ксилен или заместител на ксилен

Етанол или реактив алкохол

Камера за разкриване (тенджер под налягане)

Дейонизирана или дестилирана вода

Измивач буфер

Реагенти за предварителна обработка

Пероксидазен блок

Протеинов блок (по избор)

Сонда за откриване и полимер

Реагенти за отрицателна контрола

Хромогени

Хематоксилин (контраоцветяване)

Реагент за посиняване

Монтажна среда

Покривно стъкло

Светлинен микроскоп (40-400 пъти увеличение)

Конфигурациите на продукта с антитела са налични за използване на инструментите, посочени в таблицата по-горе.

Съхранение и стабилност:

Съхранявайте при 2°C до 8°C. Продуктът е стабилен до срока на годност, отпечатан върху етикета на флакона, когато се съхранява при тези условия. Да не се използва след изтичане на срока на годност. Съхранението при условия, различни от посочените, трябва да бъде проверено. Разредените реагенти трябва да се използват незабавно; съхранявайте останалия реагент при 2°C до 8°C. Стабилността на разреждения от потребителя реагент не е установена от Biocare.



60 Berry Drive
Pacheco, CA 94553
USA

8/190



TP v3 (12/15/2021)

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080



Westervoortsedijk 60
8627 AT Arnhem
The Netherlands

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Bulgarian

BIOCARE
M E D I C A L

Положителните и отрицателните контроли трябва да се провеждат едновременно с всички проби от пациенти. Ако се наблюдава неочаквано оцветяване, което не може да се обясни с вариации в лабораторните процедури и се подозира проблем с антиялото, свържете се с техническата поддръжка на Biocare на 1-800-542-2002 или чрез информацията за техническа поддръжка, предоставена на biocare.net.

Подготовка на пробата:

Тъканчетата, фиксирани във формалин, са подходящи за използване преди вграждане в парафин. Костните тъкани трябва да бъдат декалцифицирани преди обработката на тъканите, за да се улесни разрязването на тъканите и да се предотврати повреда на остриетата на микротомата.^{1,2}

Правилно фиксирани и вградени тъкани, експресиращи определената антигенна цел, трябва да се съхраняват на хладно място. Законът за подобряване на клиничната лаборатория (CLIA) от 1988 г. изисква в 42 CFR § 493.1259(b), че „Лабораторията трябва да съхранява оцветени слайдове най-малко десет години от датата на изследване и съхранявайте блоковете с проби най-малко две години от датата на изследването.“³

Третиране на тъкани преди оцветяване:

Извършете индуцирано от топлина извличане на епитоп (HIER) съгласно препоръчания протокол по-долу. Доказано е, че рутинното използване на HIER преди ИНС минимизира несъответствието и стандартизира оцветяването.^{4,5}

Предупреждение и предпазни мерки :

1. Това антияло съдържа по-малко от 0,1% натриев азид. Концентрации под 0,1% не са опасни материали, които не подлежат на докладване, съгласно US 29 CFR 1910.1200, съобщение за опасност на OSHA и Директива 91/155/ЕС на ЕО. Натриевият азид (NaN₃), използван като консервант, е токсичен при поглъщане. Натриевият азид може да реагира с оловни и медни водопроводи, за да образува силно експлозивни метални азиди. При изхвърляне, изплакнете с големи количества вода, за да предотвратите натрупването на азид във водопроводната инсталация. (Център за контрол на заболяванията, 1976 г., Национален институт по безопасност и здраве при работа, 1976 г.)⁶

2. Пробите, преди и след фиксиране, и всички материали, изложени на тях, трябва да се третират като способни да предадат инфекция и да се изхвърлят с подходящи предпазни мерки. Никога не пипетирайте реагенти с уста и избягвайте контакт на кожата и лигавиците с реагентите и пробите. Ако реактиви или проби влязат в контакт с чувствителни зони, измийте ги с обилно количество вода.⁷

3. Микробното замърсяване на реагентите може да доведе до увеличаване на неспецифичното оцветяване.

4. Инкубационни времена или температури, различни от посочените, могат да дадат грешни резултати. Потребителят трябва да потвърди всяка такава промяна.

5. Не използвайте реагент след срока на годност, отпечатан върху флакона.

6. Предварително разреден реагент на антияло е оптимално разреден за употреба. По-нататъшното разреждане може да доведе до загуба на антигенно оцветяване.

7. Разреждането на концентрирания реагент за антияло трябва да бъде валидирано преди употреба. Всякакви използвания разреждател, който не е специално препоръчан, също трябва да бъде валидиран за съвместимост и стабилност.

8. Изхвърлете всички използвани реагенти и всички други замърсени материали за еднократна употреба, като следвате процедурите за инфекциозни или потенциално инфекциозни отпадъци. Отговорност на всяка лаборатория е да борави с твърди и течни отпадъци в съответствие с тяхното естество и степен на опасност и да ги третира и

изхвърля (или да ги накара да бъдат третирани и изхвърлени) в съответствие с всички приложими разпоредби.

9. Следвайте местните разпоредби за изхвърляне за вашето местоположение заедно с препоръките в информационния лист за безопасност, за да определите безопасното изхвърляне на този продукт 10. ИЛБ е достъпен при поискване и се намира на <http://biocare.net>.

11. За да съобщите за предполагаеми сериозни инциденти, свързани с това устройство, свържете се с местния представител на Biocare и компетентния орган на държавата членка или държавата, в която е установен потребителят.

Инструкции за употреба:

Препоръчителни протоколи за оцветяване за PRAME [EPR20330]:

IntelliPATH FLX and manual use:

API3252 за IntelliPATH FLX и ръчна употреба е стандартизиран със система за откриване MACH 4. Използвайте TBS за стъпките на измиване.	
Peroxide Block:	Блокирайте за 5 минути с Peroxidized 1.
Pretreatment:	Извършете извличане на топлина с помощта на Borg Decloaker. Обърнете се към информационния лист на Borg Decloaker за конкретни инструкции.
Protein Block (Optional):	Инкубирайте за 5-10 минути при RT с Background Punisher.
Primary Antibody:	Инкубирайте за 30 минути при RT.
Detection:	Сонда: N/A Полимер: Инкубирайте за 30 минути при RT с вторично конюгиран полимер.
Chromogen:	Инкубирайте за 5 минути при стайна температура с DAB на Biocare – ИЛИ – Инкубирайте за 5-7 минути при стайна температура с Warp Red.
Counterstain	Контраоцветяване с хематоксилин. Изплакнете с дейонизирана вода. Нанесете Tacha's Bluing Solution за 1 минута. Изплакнете с дейонизирана вода.

ONCORE Pro Automated Slide Staining System:

OPAI3252 е предназначен за използване с ONCORE Pro. Обърнете се към ръководството за потребителя за конкретни инструкции за употреба. Параметрите на протокола в редактора на протоколи трябва да бъдат програмирани, както следва:

Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	PRAME Rb	PRAME Rb AP
Protocol Template (Description):	Special Template (ONCORE Pro-Tect Detection Required)	Rb AP Template 1
Dewaxing (DS Buffer Option):	DS2-50	DS Buffer
Antigen Retrieval (AR Option):	AR1, high pH; 103°C	AR1, high pH; 103°C
Block Option:	Buffer	Buffer
Reagent Name, Time, Temp.:	PRAME Rb, 45 min., 25°C	PRAME Rb, 30 min., 25°C

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Bulgarian

BIOCARE
M E D I C A L

Ventana BenchMark ULTRA:

AVI3252 е предназначен за използване с BenchMark ULTRA. Обърнете се към ръководството за потребителя за конкретни инструкции за употреба. Препоръчителните параметри на протокола са както следва:

Template/Detection:	OptiView DAB IHC
Pretreatment Protocol:	CC1 64 minutes
Peroxidase:	Pre-Primary Peroxidase Inhibitor
Primary Antibody:	32 minutes, 36°C

Серия Q – за Leica BOND-III:

AL13252 е предназначен за използване с Leica BOND-III. Обърнете се към ръководството за потребителя за конкретни инструкции за употреба. Препоръчителните параметри на протокола са както следва:

Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	IHC Protocol F	IHC Protocol J
Detection:	Bond Polymer Refine	Bond Polymer Refine Red
HIER:	20 min with ER2	20 min with ER2
Peroxide Block:	5 min	
Marker (Primary Antibody):	15 min	15 min
Post Primary:	8 min	
Polymer:	8 min	
Post Primary AP:		20 min
Polymer AP:		30 min
Mixed Chromogen Refine:	10 min	10 min + 5 min
Hematoxylin:	5 min	5 min

Контрол на качеството:

Обърнете се към стандартите за качество на CLSI за проектиране и прилагане на имунохистохимични анализи; Одобreno ръководство-второ издание (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA САЩ (www.clsi.org). 2011⁸

Положителен тъканен контрол: Меланом, нормален тестис

Материалите за външна положителна контрола трябва да бъдат пресни проби, фиксирани, обработени и вградени възможно най-скоро по същия начин като пробата(ите) на пациента. Положителните тъканни контроли са показателни за правилно подготвени тъкани и подходящи техники за оцветяване. Във всеки цикъл на оцветяване трябва да се включи една положителна външна тъканна контрола за всеки набор от условия на теста.

Тъканите, използвани за материалите за външна положителна контрола, трябва да бъдат избрани от проби от пациенти с добре охарактеризирани ниски нива на положителна целева активност, която дава слабо положително оцветяване. Ниското ниво на положителност за външни положителни контроли е предназначено да осигури откриване на фини промени в чувствителността на първичното анти тяло от нестабилност или проблеми с IHC методологията. Предлаганите в търговската мрежа предметни стъкла за контрол на тъкани или проби, обработени по различен начин от пробата(ите) на пациента, валидират само ефективността на реагента и не проверяват подготовката на тъканите.

Известни положителни тъканни контроли трябва да се използват само за наблюдение на правилната работа на обработените тъкани и тестови реагенти, а не като помощ при формулиране на конкретна диагноза на проби от пациенти. Ако положителните тъканни контроли не успеят да покажат положително оцветяване, резултатите с тестовите проби трябва да се считат за невалидни.

Отрицателен тъканен контрол:

Използвайте отрицателна тъканна контрола (известна като PRAME отрицателна), фиксирана, обработена и вградена по начин, идентичен с пробата(ите) на пациента с всяко оцветяване, за да проверите специфичността на IHC първичното анти тяло за демонстрация на целевия антиген и за предоставяне на индикация за специфично фоново оцветяване (фалшиво положително оцветяване). Освен това разнообразието от различни видове клетки, присъстващи в повечето тъканни срезове, може да бъдат използвани от лабораторията като вътрешни отрицателни контролни места за проверка на работата на IHC спецификации. Типовете и източниците на проби, които могат да се използват за отрицателна тъкан контролите са изброени в раздела Характеристики на ефективността.

Ако се появи специфично оцветяване (фалшиво положително оцветяване) в отрицателната тъканна контрола, резултатите от пробите на пациента трябва да се считат за невалидни.

Неспецифичен отрицателен контролен реагент:

Използвайте неспецифична отрицателна контрола на реагента на мястото на първичното анти тяло с разрез от всяка проба от пациент, за да оцените неспецифичното оцветяване и позволяват по-добра интерпретация на специфичното оцветяване на антигенното място. В идеалния случай отрицателната реактивна контрола съдържа PRAME IgG анти тяло, произведено от супернатанта на тъканна култура по същия начин като първичната анти тяло, но не проявява специфична реактивност с човешки тъкани в същата матрица/разтвор като анти тялото на Biocare. Разрежете отрицателно контролно анти тяло до същата концентрация на имуноглобулин или протеин като разреденото първично анти тяло, като се използва идентичен разределител. Ако фетален телешки серум се задържа в чистото анти тяло след обработката, фетален телешки серум с протеинова концентрация, еквивалентна на разредената първично анти тяло в същия разределител също е подходящо за употреба. (Вижте предоставения реагент). Само разределител може да се използва като по-малко желана алтернатива на описаните по-горе отрицателни реактивни контроли. Инкубационният период за отрицателната реактивна контрола трябва да съответства на този на първичното анти тяло.

Когато се използват панели от няколко анти тела върху серийни срезове, зоните с отрицателно оцветяване на един слайд могат да служат като отрицателна/неспецифична свързваща фонова контрола за други анти тела. За разграничаване на ендогенна ензимна активност или неспецифично свързване на ензими от специфична имунореактивност, допълнителни тъкани на пациента могат да бъдат оцветени изключително със субстрат-хромоген или ензимни комплекси (PAP, авидин-биотин, стрептавидин) и съответно субстрат-хромоген.

Проверка на анализа:

Преди първоначалното използване на анти тяло или система за оцветяване в диагностична процедура, потребителят трябва да провери специфичността на анти тялото, като го тества върху поредица от вътрешни тъкани с известни имунохистохимични характеристики, представляващи известни положителни и отрицателни тъкани. Обърнете се към процедурите за контрол на качеството, описани по-рано в този раздел на листовката на продукта и към препоръките за контрол на качеството на Програмата за сертифициране на CAP⁹ за имунохистохимия и/или насоките за IHC на NCCLS¹⁰). Тези процедури за контрол на качеството трябва да се повтарят за всяка нова партида анти тяло или винаги, когато има промяна в параметрите на анализа. Тъканите, изброени в раздела за характеристиките на ефективността, са подходящи за проверка на анализа.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Bulgarian

BIOCARE
M E D I C A L

Отстраняване на неизправности:

Следвайте препоръките за специфичен протокол за антитела съгласно предоставения лист с данни. Ако възникнат нетипични резултати, свържете се с техническата поддръжка на Biocare на 1-800-542-2002.

Тълкуване на оцветяването:

Положителен тъканен контрол:

Положителната тъканна контрола, оцветена с посоченото антитяло, трябва първо да се изследва, за да се установи, че всички реагенти функционират правилно. Подходящото оцветяване на прицелните клетки (както е посочено по-горе) е показателно за положителна реактивност. Ако положителните тъканни контроли не успеят да покажат положително оцветяване, всички резултати с тестовите проби трябва да се считат за невалидни.

Цветът на реакционния продукт може да варира в зависимост от използваните субстратни хромогени. Вижте листовките на опаковката на субстрата за очакваните цветни реакции. Освен това метакромазията може да се наблюдава при вариации на метода на оцветяване.¹¹

Когато се използва противооцветяване, в зависимост от продължителността на инкубацията и ефикасността на използваното противооцветяване, противооцветяването ще доведе до оцветяване на клетъчните ядра. Прекомерното или непълно контрастно оцветяване може да компрометира правилното тълкуване на резултатите. Обърнете се към протокола(ите) за препоръчаното контраоцветяване.

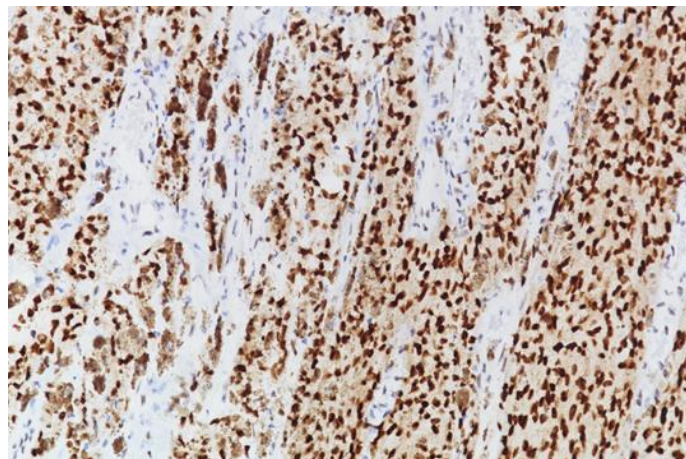
Отрицателен тъканен контрол :

Отрицателната тъканна контрола трябва да се изследва след положителната тъканна контрола, за да се провери специфичността на маркирането на целевия антиген от първичното антитяло. Липсата на специфично оцветяване в отрицателната тъканна контрола потвърждава липсата на кръстосана реактивност на антитела към клетки/клетъчни компоненти . Ако се появи специфично оцветяване (фалшиво положително оцветяване) в отрицателната външна тъканна контрола, резултатите от пробата от пациента трябва да се считат за невалидни.

Неспецифичното оцветяване, ако е налице, обикновено има дифузен вид. Спорадично оцветяване на съединителната тъкан може да се наблюдава и в срезове от прекомерно фиксирани с формалин тъкани. Използвайте непокътнати клетки за тълкуване на резултатите от оцветяването. Некротичните или дегенерирани клетки често се оцветяват неспецифично.

Тъкан на пациента:

Изследвайте проби от пациенти, оцветени с посоченото антитяло последно. Положителният интензитет на оцветяване трябва да се оценява в контекста на всяко неспецифично фоново оцветяване на отрицателната контрола с реагент. Както при всеки имунохистохимичен тест, отрицателният резултат означава, че антигенът не е открит, а не че антигенът липсва в изследваните клетки/тъкан. Ако е необходимо, използвайте панел от антитела за идентифициране на фалшиво-отрицателни реакции.



Меланом, оцветен с PRAME [EPR20330] антитяло.

Обърнете се към Резюме и обяснение, ограничения и характеристики на ефективността за конкретна информация относно посочената имунореактивност на антитела.

Ограничения:

Общи ограничения:

1. За *ин витро* диагностична употреба
2. Този продукт е само за професионална употреба: Имунохистохимията е многоетапен диагностичен процес, който се състои от специализирано обучение за избор на подходящи реагенти; подбор, фиксиране и обработка на тъкани; подготовка на ИНС слайда; и интерпретация на резултатите от оцветяването.
3. Оцветяването на тъканта зависи от обработката и обработката на тъканта преди оцветяването. Неправилното фиксиране, замразяване, размразяване, измиване, сушене, нагряване, нарязване или замърсяване с други тъкани или течности може да доведе до артефакти, улавяне на антитела или фалшиво отрицателни резултати. Непоследователните резултати може да се дължат на вариации в методите за фиксиране и вграждане или на присъщи нередности в тъканта.¹²
4. Прекомерното или непълно контрастно оцветяване може да компрометира правилното тълкуване на резултатите.
5. Клиничната интерпретация на всяко положително или отрицателно оцветяване трябва да се оценява в контекста на клиничното представяне, морфологията и други хистопатологични критерии. Клиничната интерпретация на всяко положително или отрицателно оцветяване трябва да бъде допълнена от морфологични изследвания, като се използват подходящи положителни и отрицателни вътрешни и външни контроли, както и други диагностични тестове. Отговорност на квалифициран патолог, който е запознат с правилното използване на ИНС антитела, реагенти и методи, е да интерпретира всички стъпки, използвани за подготовка и тълкуване на крайния ИНС препарат.
6. Оптималното разреждане на антитялото и протоколите за конкретно приложение могат да варират. Те включват, но не се ограничават до фиксиране, метод за извличане на топлина, времена на инкубация, дебелина на тъканния участък и използван комплект за откриване. Поради превъзходната чувствителност на тези уникални реагенти, посочените препоръчителни времена на инкубация и титри не са приложими за други системи за откриване, тъй като резултатите може да варират. Препоръките и протоколите в информационния лист се основават на изключителното използване на продуктите Biocare. В крайна сметка отговорност на изследователя е да определи оптималните условия.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Bulgarian

BIOCARE
M E D I C A L

7. Този продукт не е предназначен за използване в поточна цитометрия. Характеристиките на ефективността не са определени за поточна цитометрия.
8. Тъкани от хора, заразени с вируса на хепатит В и съдържащи повърхностен антиген на хепатит В (HBsAg), могат да проявят неспецифично оцветяване с пероксидаза от хрян.¹³
9. Реагентите могат да покажат неочаквани реакции в нетествани преди това тъкани. Възможността за неочаквани реакции дори в тествани тъканни групи не може да бъде напълно елиминирана поради биологичната вариабилност на експресията на антиген в неоплазми или други патологични тъкани.¹⁴ Свържете се с техническата поддръжка на Biocare на 1-800-542-2002 или чрез информацията за техническа поддръжка, предоставена на biocare.net, с документираните неочаквани реакции.
10. Нормалните/неимуни серуми от същия животински източник като вторичните антисеруми, използвани в етапите на блокиране, могат да причинят фалшиво отрицателни или фалшиво положителни резултати поради автоантитела или естествени антитела.
11. Могат да се наблюдават фалшиви положителни резултати поради неимунологично свързване на протеини или продукти на субстратна реакция. Те могат също да бъдат причинени от псевдопероксидазна активност (еритроцити), ендогенна пероксидазна активност (цитохром С) или ендогенен биотин (напр. черен дроб, гърди, мозък, бъбрек) в зависимост от вида на използваното имунооцветяване.¹²

Специфични за продукта ограничения:

Няма допълнителни специфични за продукта ограничения.

Характеристики на изпълнение:

Възпроизводимост:

Възпроизводимостта на ефективността на анти тялото беше проверена чрез тестване на избрана нормална и туморна тъкан в различни дни и различни инструменти с множество оператори. Оцветяването на избраните тъкани беше последователно и извършено според очакванията.

Имунореактивност:

Следните положителни и отрицателни имунореактивности са демонстрирани в таблици 1 и 2 по-долу.

Предоставеният по-долу списък не е изчерпателен, но характеризира видовете имунореактивност, наблюдавани с посоченото анти тяло.

Не е известна неспецифична реактивност на анти тяла, наблюдавана в този продукт.

Обобщение на очакваните резултати:

Разпространението на PRAME в нормални и болестни тъкани е оценено с помощта на тъканни микрочипове (TMAs).

Тестваните нормални тъкани са оцветени според очакванията, с високи нива на оцветяване, наблюдавани в тестисите и без оцветяване в други тъкани.

Оцветяването на PRAME се наблюдава във високо ниво при меланома, както се очаква, и при различни нива в други ракови тъкани като яйчници, бял дроб, простата и гърда.

Аналитична производителност:

Бяха проведени тестове за оцветяване за чувствителност и специфичност и резултатите са изброени по-долу.

Чувствителност и специфичност:

Таблица 1: Чувствителността и специфичността на анти тялото се определят чрез тестване на FFPE нормални тъкани.

Тъкан	Положителни случаи	Общо случаи
Мозъчен мозък	0	6
Малък мозък	0	3
Надбъбречна	0	3
Яйчник	0	3
Панкреас	0	3
Трахеята	0	3
хипофиза	0	3
тестис*	3	3
Щитовидна жлеза	0	3
Гърди	0	3
далак	0	3
сливица	0	3
Тимус	0	3
Костен мозък**	0	1
Бял дроб	0	3
сърце	0	3
хранопровод	0	3
Стомах	0	3
Тънко черво	0	3
Дебело черво	0	3
Черен дроб	0	3
Слюнчена жлеза	0	3
Бъбрек	0	3
Простата	0	3
Матка	0	3
Маточна шийка	0	3
Скелетни мускули	0	3
кожа	0	3
Периферен нерв	0	3
Облицовъчни клетки	0	3
Глава, шия и слюнчени жлези	0	6
Лимфен възел	0	3

* 3-4 сила ядрено оцветяване

** Липсват две проби

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Bulgarian

BIOCARE
M E D I C A L

Таблица 2: Чувствителността и специфичността на антитялото се определя чрез тестване на различни FFPE неопластични тъкани.

Патология	Положителни случаи	Общо случаи
Меланом	29	39
Рак на яйчниците	9	44
Рак на гърдата	10	26
Рак на дебелото черво	4	43
Рак на белия дроб	21	50
Рак на простатата	18	41
Адренокортикален карцином	0	1
Рак на пикочния мехур	0	2
Менингиом	0	2
астроцитом	0	1
Плоскоклетъчен карцином (хранопровод)	0	2
Аденокарцином (стомах)	0	2
Аденокарцином (тънко черво)	0	1
Аденокарцином (на дебелото черво и ректума)	0	6
Рак на бъбреците	0	2
Рак на черния дроб	0	4
Лимфом	0	3
Плоскоклетъчен карцином (глава и шия, устна кухина, език)	0	1
Назофарингеален карцином	1	1
Аденокарцином (панкреас)	0	1
Аденокарцином (на простатата)	0	2
Аденоиден кистичен карцином (глава и шия, слюнчени жлези)	0	1
Плоскоклетъчен карцином (кожа)	0	1
Семином	0	2
Рак на щитовидната жлеза	0	2
Рак на маточната шийка	0	2
Рак на ендометриума	1	2

Експресията на PRAME в различни неоплазми може да показва променлив процент туморна позитивност. Обърнете се към Таблица 3 за процентите на туморни клетки с положително оцветяване (категоризирани по квартали), наблюдавани в различни неоплазми, намерени в Таблица 2.

Таблица 3: Процентно положително оцветяване на туморни клетки в различни FFPE неоплазми.

носни кърпи	Процент на оцветяване на туморни клетки # Случаи, показващи процент на оцветяване от общо # Случаи (%)				
	<1%	1-25%	26-50%	51-75%	> 75%
Рак на яйчниците	35/44 (79,5%)	2/44 (4,5%)	3/44 (6,8%)	3/44 (6,8%)	1/44 (2,3%)
Рак на гърдата	16/26 (61,5%)	7/26 (26,9%)	1/26 (3,8%)	2/26 (7,7%)	0 (0%)
Рак на дебелото черво	39/43 (88,4%)	4/43 (11,6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Рак на белия дроб	29/50 (58,0%)	7/50 (14,0%)	4/50 (8,0%)	7/50 (14,0%)	3/50 (6,0%)
Рак на простатата	23/41 (56,1%)	9/41 (22,0%)	3/41 (7,3%)	2/41 (4,9%)	4/41 (9,8%)
Назофарингеален карцином	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1/1 (100%)
Рак на ендометриума	1/2 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	1/2 (50%)	0 (0%)
Меланом	10/39 (25,6%)	6/39 (15,4%)	5/39 (12,8%)	6/39 (15,4%)	12/39 (30,8%)

Процентно оцветяване на туморни клетки, представено за всички интензитети на оцветяване.

Оцветяване на тъкани, показващо различни нива на експресия на PRAME протеин.

Резултатите от аналитичното тестване на ефективността показаха, че антитялото PRAME [EPR20330] може правилно да открие PRAME протеина, когато използва дефинирания IHC протокол. Резултатите от аномалните тъканни тестове подкрепят заключението, че PRAME [EPR20330] е чувствителен към протеина PRAME, когато се използват препоръчителните IHC протоколи. Антитялото PRAME [EPR20330] е в състояние да открие ниски до високи нива на протеина PRAME. Тестването на нормалната тъкан не показа неочаквано откриване на PRAME над 32 типа тъкан. Нямаше неочаквана кръстосана реактивност. Резултатите подкрепят твърдението, че антитялото PRAME [EPR20330] е силно специфично (аналитична специфичност) към протеина PRAME.

Клинично представяне:

Бяха проведени тестове за оцветяване за диагностична чувствителност и специфичност и резултатите са изброени по-долу. Положителната и отрицателната имунореактивност е записана в Таблица 4.

Три слайда за ТМА меланома бяха оцветени в Biocare и изпратени на външен патолог, за да бъдат прочетени и оценени. Меланомните тъкани показват разнообразие от резултати на оцветяване, вариращи от 0 (отрицателни) до силни (4). Повечето меланоцитни невуси не показват PRAME реактивност, но няколко имат силна реактивност.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Bulgarian

BIOCARE
M E D I C A L

Таблица 4: Процентно положително оцветяване на туморни клетки в различни FFPE меланоцитни неоплазми и кожа.

носни кърпи	Процент на оцветяване на туморни клетки # Случаи, показващи процент на оцветяване от общо # Случаи (%)				
	<1%	1-25%	26-50%	51-75%	> 75%
Меланом	28/133 (21,1%)	50/133 (37,6%)	10/133 (7,5%)	8/133 (6,0%)	37/133 (27,8%)
Метастатичен меланом	7/38 (18,4%)	10/38 (26,3%)	3/38 (7,9%)	2/38 (5,3%)	16/38 (42,1%)
Меланоцитни невуси	12/14 (85,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2/12 (14,3%)
кожа	10/10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Процентно оцветяване на туморни клетки, представено за всички интензитети на оцветяване.

Оцветяване на тъкани, показващо различни нива на експресия на PRAME протеин.

Първичната крайна точка на теста беше да се оцени диагностичната чувствителност на антиялото PRAME [EPR20330] в IHC процедурата, дефинирана като степента на откриване на положителен меланом на потвърдените положителни проби. [TP/(TP+FN)]

Вторична крайна точка беше да се оцени диагностичната специфичност - отрицателната честота на откриване за потвърдени меланомни отрицателни проби. [TN/(TN+FP)]

Има 35 фалшиво отрицателни случая на меланом, които са получили патологична оценка на златния стандарт като меланом, но са били отрицателни за PRAME. 136 случая са били наистина положителни, тъй като са били диагностицирани с меланом и са показали сигнал за PRAME. Бяха открити два фалшиви положителни резултата в 14-те проби от меланоцитни невузи, които бяха диагностицирани като доброкачествени и които показваха сигнал за PRAME.

От данните изчислената диагностична чувствителност = $136/(136+35) = 79,5\%$

От данните изчислената диагностична специфичност = $22/(22+2) = 91,7\%$

Въз основа на нашите изчисления достигахме до приблизителна диагностична чувствителност от 79,5% и приблизителна диагностична специфичност от 91,7% за откриване на меланом.

От това заключаваме, че антиялото PRAME [EPR20330], както е тествано от Biocare върху проби от меланом и меланоцитни невузи, е чувствително към меланом и силно специфично към меланома.

Отстраняване на неизправности: (Оставете обяснение за всяка от точките по-долу)

1. Няма оцветяване на предметни стъкла – Проверете, за да определите, че са използвани подходящи тъкани за положителна контрола, антиялото и продукти за откриване.
2. Слабо оцветяване на всички предметни стъкла – Проверете, за да определите, че са използвани подходящи тъкани за положителна контрола, антиялото и продукти за откриване.
3. Прекален фон на всички предметни стъкла – Възможно е да има високи нива на ендогенен биотин (ако се използват продукти за откриване на базата на биотин), ендогенна HRP активност, превръщаща хромогена в оцветен краен продукт (използвайте

пероксидазен блок) или прекомерно неспецифично протеиново взаимодействие (използвайте протеин блок, като блокиращ разтвор на базата на серум или казеин).

4. Тъканните срезове се измиват от предметните стъкла по време на инкубацията – Проверете предметните стъкла, за да се уверите, че са положително заредени.
5. Специфично оцветяване е твърде тъмно – Проверете протокола, за да определите дали към предметното стъкло е приложен правилен титър на антиялото, както и правилните времена на инкубация за всички реагенти. Освен това се уверете, че протоколът има достатъчно стъпки на промиване, за да се отстранят излишните реагенти след приключване на стъпките на инкубация.

Препратки:

1. Kiernan JA. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. J Histotechnol. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. Biotech Histochem. 1996 Jan;71(5):263-70.
6. Center for Disease Control Manual. Guide: Safety Management, NO. CDC-22, Atlanta, GA. April 30, 1976 "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts."
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
8. CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011
9. College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. <http://www.cap.org> (800) 323-4040.
10. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
11. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques. Histochemistry 1987; 86:471-478.
12. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Lab Med 1983;14:767.
13. Omata M, Liew CT, Ashcavi M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradishperoxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. Am J Clin Path 1980;73:626.
14. Herman GE and Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech & Histochem 1991;66:194.
15. Zhang W, et al. PRAME expression and promoter hypermethylation in epithelial ovarian cancer. Oncotarget, 2016 Jul; 7(29):45352-69.
16. Lezcano C, et al. PRAME expression in melanocytic tumors. Am J Surg Pathol. 2018 Nov; 42(11):1456-65.

Ultraline антиялата са разработени единствено от Biocare Medical LLC и не предполагат одобрение или одобрение на Biocare антиялото от Ventana Medical Systems, Inc или Roche. Biocare, Ventana и Roche не са свързани, свързани или свързани по никакъв начин. Ventana®, BenchMark®, ultraView и OptiView са търговски марки на Roche.

Антиялата от серията Q са разработени единствено от Biocare Medical LLC и не предполагат одобрение или одобрение на антиялата Biocare от Leica Biosystems. Biocare и Leica Biosystems не са свързани, свързани или свързани по никакъв начин. Leica, Leica Biosystems, BOND-MAX и BOND-III са търговски марки на Leica Biosystems.

Резюмецо за безопасност и ефективност можете да намерите тук: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Chinese (Simplified)

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats				
Format	Catalog Number	Description	Dilution	Diluent
Concentrate	ACI 3252 A, B	0.1, 0.5 mL	1:100	Van Gogh Yellow
Predilute	API 3252 AA, G20, H	6.0, 20, 25 mL	Ready-to-use	N/A
ONCORE Pro	OPAI 3252 T60	60 tests	Ready-to-use	N/A
Q Series-- For Leica BOND-III	ALI 3252 G7	7.0 mL	Ready-to-use	N/A
UltraLine -- For BenchMark	AVI 3252 G, G25	6.0, 25 mL	Ready-to-use	N/A

有可能的使用：

用于体外诊断

PRAME [EPR20330] 是一种兔单克隆抗体，供实验室使用，在使用非免疫组织化学染色的常规组织病理学对肿瘤进行初步诊断后，通过福尔马林固定石蜡中的免疫组织化学 (IHC) 定性鉴定 PRAME 蛋白。包埋 (FFPE) 人体组织。任何染色或染色缺失的临床解释均应通过使用适当对照的形态学研究来补充，并在患者的临床病史和由合格病理学家进行的其他诊断测试的背景下进行评估，以帮助做出任何其他临床决定。

总结与说明：

PRAME 位于染色体 22q11.22 上，编码 509 个氨基酸的蛋白质。PRAME 是一种常染色体癌睾丸抗原 (CTA) 基因，已显示在黑色素瘤、各种非黑色素细胞恶性肿瘤 (包括非小细胞肺癌、乳腺癌、卵巢癌和其他几种引用的肿瘤) 中表达。除睾丸、卵巢、肾上腺和文献中引用的其他一些组织外，正常健康组织不表达 PRAME。^(15,16)

程序原则：

该抗体产品可用作福尔马林固定、石蜡包埋的组织切片的免疫组织化学检测中的一抗。一般来说，免疫组织化学 (IHC) 染色技术允许通过连续应用抗原来可视化抗原 抗原的特异性抗体 (一抗)、一抗的二抗 (可选连接抗体/探针)、酶复合物和显色底物以及插入的洗涤步骤。色原的酶促激活在抗原位点产生可见的反应产物。然后可以对样本进行复染，并盖上盖玻片。使用光解释结果显微镜并有助于病理生理过程的鉴别诊断，这可能或可能与特定抗原无关。

材料和方法：

提供的试剂：

宿主来源：兔单克隆

物种反应性：人类。其他物种未测试。

克隆：EPR20330

同种型：IgG

蛋白质浓度：特定 IgG 浓度：联系 Biocare 的技术支持

特异性：PRAME

细胞定位：细胞核和细胞膜

方法：亲和纯化重组兔单克隆抗体。

重构、混合、稀释、滴定：

预稀释的抗体试剂经过最佳稀释，可与上述染色系统一起使用。进一步稀释可能会导致抗原染色丧失。这用户必须验证任何此类更改。用户实验室的组织处理和技术程序的差异可能会产生显着的差异，需要定期进行内部控制 (参见质量控制部分)。

浓缩试剂需要按照上表所示进行稀释。

已知应用：

免疫组织化学 (福尔马林固定石蜡包埋组织)

供货形式：缓冲盐水溶液，pH 5.9-7.9，含有蛋白质载体和少于 0.1% 叠氮化钠防腐剂。有关更多详细信息，请参阅安全数据表。

需要但未提供的材料和试剂：

显微镜载玻片带正电。

阳性和阴性组织对照

沙漠室 (或类似的干燥箱)

二甲苯或二甲苯替代品

乙醇或试剂醇

解密室 (高压锅)

去离子水或蒸馏水

洗涤缓冲液

预处理试剂

过氧化物酶阻断

蛋白质块 (可选)

检测探针和聚合物

阴性对照试剂

显色剂

苏木精 (复染)

上蓝试剂

封固剂

盖玻片

光学显微镜 (40-400X 放大倍率)

抗体产品的配置可用于上表所示的仪器。

储存和稳定性：

储存于 2°C 至 8°C。在这些条件下储存时，该产品在小瓶标签上印刷的有效期内是稳定的。请勿在有效期后使用。必须验证在指定条件以外的任何条件下的储存。稀释后的试剂应及时使用；将所有剩余试剂储存在 2°C 至 8°C 下。Biocare 尚未确定用户稀释试剂的稳定性。

阳性和阴性对照应与所有患者标本同时进行。如果观察到意外染色，且无法通过实验室程序的变化来解释，并且怀疑抗体存在问题，请致电 1-800-542-2002 或通过 biocare.net 上提供的技术支持信息联系 Biocare 的技术支持。

样品制备：

用福尔马林固定的组织适合在石蜡包埋之前使用。在组织处理之前应将骨组织脱钙，以利于组织切割并防止损坏切片刀片。^{1,2}



60 Berry Drive
Pacheco, CA 94553
USA

15/190



TP v3 (12/15/2021)

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080



Westervoortsedijk 60
6827 AT Arnhem
The Netherlands

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Chinese (Simplified)

BIOCARE
M E D I C A L

正确固定和包埋表达特定抗原靶标的组织应保存在阴凉处。1988年《临床实验室改进法案》(CLIA)在42 CFR § 493.1259(b)中要求“实验室必须保留染色玻片自染色玻片之日起至少十年”检查并保留样本块自检查之日起至少两年。³

染色前组织的处理：

根据下面推荐的方案执行热诱导表位修复 (HIER)。在 IHC 之前常规使用 HIER 已被证明可以最大限度地减少不一致并使染色标准化。^{4,5}

警告和注意事项：

- 该抗体含有低于 0.1% 的叠氮化钠。根据 US 29 CFR 1910.1200、OSHA 危险通报和 EC 指令 91/155/EC，浓度低于 0.1% 不属于应报告危险物质。用作防腐剂的叠氮化钠 (NaN₃) 摄入后有毒。叠氮化钠可能与铅和铜管道发生反应，形成高度爆炸性的金属叠氮化物。处置后，用大量水冲洗，以防止叠氮化物在管道中积聚。（疾病控制中心，1976年，国家职业安全与健康研究所，1976年）⁶
- 固定前后的标本以及所有暴露于其中的材料均应按照能够传播感染的方式进行处理，并采取适当的预防措施进行处置。切勿用嘴吸取试剂，并避免试剂和标本接触皮肤和粘膜。如果试剂或标本接触到敏感区域，请用大量水清洗。⁷
- 试剂的微生物污染可能导致非特异性染色增加。
- 未指定的孵育时间或温度可能会产生错误的结果。用户必须验证任何此类更改。
- 试剂瓶上印有有效期后请勿使用。
- 预稀释抗体试剂最佳稀释后使用。进一步稀释可能会导致抗原染色丧失。
- 浓缩抗体试剂的稀释在使用前必须经过验证。任何使用非特别推荐的稀释剂也必须验证其兼容性和稳定性。
- 按照传染性或潜在传染性废物的程序处理所有用过的试剂和任何其他受污染的一次性材料。每个实验室有责任根据固体和液体废物的性质和危险程度处理固体和液体废物，并根据任何适用的法规对其进行处理和处置（或委托他人处理和处置）。
- 请遵循您所在位置的当地处置法规以及安全数据表中的建议，以确定本产品的安全处置
- SDS 可根据要求提供，位于 <http://biocare.net>。
- 要报告与本设备相关的可疑严重事件，请联系当地 Biocare 代表以及用户所在成员国或国家的主管当局。

使用说明：

PRAME [EPR20330] 的推荐染色方案：

IntelliPATH FLX 和手动使用：

API3252 用于 IntelliPATH FLX 和手动使用，已通过 MACH 4 检测系统进行标准化。使用 TBS 进行洗涤步骤。	
Peroxide Block:	用过氧化物 1 封闭 5 分钟。
Pretreatment:	使用 Borg Decloaker 执行热检索。有关具体说明，请参阅 Borg Decloaker 数据表。
Protein Block (Optional):	使用背景惩罚器在室温下孵育 5-10 分钟。
Primary Antibody:	室温孵育 30 分钟。
Detection:	探头：不适用
	聚合物：与次级共轭聚合物一起在室温下孵育 30 分钟。

Chromogen:	使用 Biocare 的 DAB 在室温下孵育 5 分钟 - 或 - 使用 Warp Red 在室温下孵育 5-7 分钟。
Counterstain	用苏木精复染。用去离子水冲洗。使用 Tacha 的蓝化溶液 1 分钟。用去离子水冲洗。

ONCORE Pro Automated Slide Staining System:

OPAI3252 适用于 ONCORE Pro。具体使用说明请参阅用户手册。协议编辑器中的协议参数应按如下方式编程：		
Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	PRAME Rb	PRAME Rb AP
Protocol Template (Description):	Special Template (ONCORE Pro-Tect Detection Required)	Rb AP Template 1
Dewaxing (DS Buffer Option):	DS2-50	DS Buffer
Antigen Retrieval (AR Option):	AR1, high pH; 103°C	AR1, high pH; 103°C
Block Option:	Buffer	Buffer
Reagent Name, Time, Temp.:	PRAME Rb, 45 min., 25°C	PRAME Rb, 30 min., 25°C

Ventana BenchMark ULTRA:

AVI3252 旨在与 BenchMark ULTRA 一起使用。具体使用说明请参阅用户手册。推荐协议参数如下：	
模板/检测：	OptiView DAB IHC
预处理方案：	CC1 64 分钟
过氧化物酶：	前初级过氧化物酶抑制剂
一抗：	32 分钟，36°C

Q 系列 - 适用于徕卡 BOND-III:

ALI3252 旨在与 Leica BOND-III 配合使用。具体使用说明请参阅用户手册。推荐协议参数如下：		
Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	IHC Protocol F	IHC Protocol J
Detection:	Bond Polymer Refine	Bond Polymer Refine Red
HIER:	ER2 20 分钟	ER2 20 分钟
Peroxide Block:	5 分钟	
Marker (Primary Antibody):	15 分钟	15 分钟
Post Primary:	8 分钟	
Polymer:	8 分钟	
Post Primary AP:		20 分钟
Polymer AP:		30 分钟
Mixed Chromogen Refine:	10 分钟	10 分钟+5 分钟
Hematoxylin:	5 分钟	5 分钟

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Chinese (Simplified)

BIOCARE
M E D I C A L

质量控制：

请参阅 CLSI 免疫组织化学检测设计和实施的质量标准；批准指南 - 第二版 (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org)。2011年^{8月}

阳性组织对照：黑色素瘤，正常睾丸

外部阳性对照材料应为新鲜标本，以与患者样本相同的方式尽快固定、处理和包埋。阳性组织对照表明正确制备的组织 and 正确的染色技术。每次染色运行中应包括每组测试条件的一个阳性外部组织对照。

用于外部阳性对照材料的组织应选自具有良好特征的低水平阳性靶标活性的患者标本，该活性呈弱阳性染色。外部阳性对照的低阳性水平旨在确保检测由于 IHC 方法不稳定或问题而导致的一抗敏感性的细微变化。市售的组织对照载玻片或与患者样本不同处理的样本仅验证试剂性能，并不验证组织制备。

已知的阳性组织对照只能用于监测处理过的组织和测试试剂的正确性能，而不是帮助制定患者样本的具体诊断。如果阳性组织对照未能表现出阳性染色，则测试样本的结果应被视为无效。

阴性组织对照：

每次染色时，使用与患者样本相同的方式固定、处理和包埋阴性组织对照（已知为 PRAME 阴性），以验证 IHC 一抗的特异性 展示目标抗原，并提供特定背景染色的指示（假阳性染色）。此外，大多数组织切片中存在多种不同的细胞类型，可以被实验室人员用作内部阴性对照位点以验证 IHC 的性能规格。可用于阴性组织的标本类型和来源 控制措施列于“性能特征”部分。

如果阴性组织对照中出现特异性染色（假阳性染色），则患者标本的结果应被视为无效。

非特异性阴性试剂对照：

使用非特异性阴性试剂对照代替一抗，并使用每个患者标本的切片来评估非特异性染色和

可以更好地解释抗原位点的特异性染色。理想情况下，阴性试剂对照包含由组织培养上清液产生的 PRAME IgG 抗体，其方式与初级试剂相同 抗体，但在与 Biocare 抗体相同的基质/溶液中与人体组织不表现出特异性反应性。将阴性对照抗体稀释至与稀释的一抗相同的免疫球蛋白或蛋白质浓度 抗体使用相同的稀释剂。如果处理后的纯抗体中保留胎牛血清，则胎牛血清的蛋白质浓度相当于稀释后的抗体浓度。同一稀释液中的一抗也适合使用。（参见提供的试剂）。单独的稀释剂可以用作先前描述的阴性试剂对照的不太理想的替代品。阴性试剂对照的孵育时间应与一抗的孵育时间相对应。

当在连续切片上使用多个抗体组时，一张载玻片的阴性染色区域可以用作其他抗体的阴性/非特异性结合背景对照。为了区分内源性酶活性或酶的非特异性结合与特异性免疫反应性，可以分别用底物-色原或酶复合物（PAP、亲和素-生物素、链霉亲和素）和底物-色原专门对其他患者组织进行染色。

测定验证：

在诊断程序中初次使用抗体或染色系统之前，用户应通过在一系列具有代表已知阳性和阴性组织的已知免疫组织化学性能特征的内部组织上进行测试来验证抗体的特异性。请参阅之前在产品插页的本节中概述的质量控制程序以

及 CAP 免疫组织化学认证计划⁹和/或 NCCLS IHC 指南¹⁰) 的质量控制建议。对于每个新抗体批次，或每当检测参数发生变化时，都应重复这些质量控制程序。性能特征部分列出的组织适合用于测定验证。

故障排除：

根据提供的数据表，遵循抗体特定方案建议。如果出现非典型结果，请致电 1-800-542-2002 联系 Biocare 的技术支持。

染色解读：

阳性组织对照：

应首先检查用指定抗体染色的阳性组织对照，以确定所有试剂均正常工作。靶细胞的适当染色（如上所述）表明呈阳性反应。如果阳性组织对照未能表现出阳性染色，则测试样本的任何结果均应被视为无效。

反应产物的颜色可能会根据所使用的底物发色团而变化。有关预期的颜色反应，请参阅基材包装插页。此外，在染色方法的变化中可以观察到异染。¹¹ 当使用复染剂时，根据孵育长度和所用复染剂的效力，复染将导致细胞核着色。过度或不完整的复染可能会影响结果的正确解释。请参阅建议的复染方案。

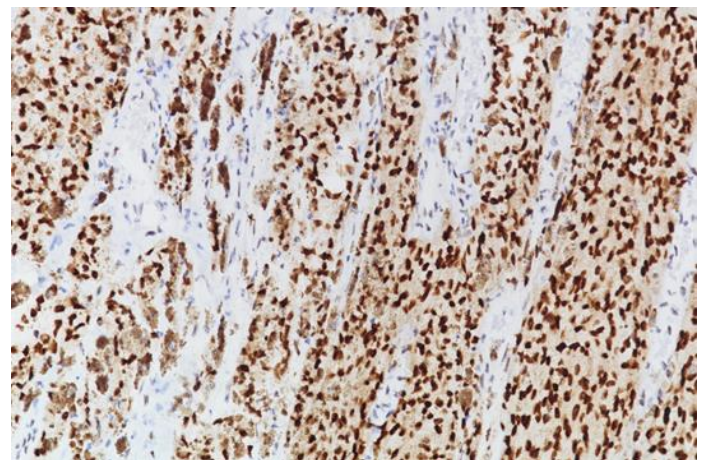
阴性组织对照：

应在阳性组织对照后检查阴性组织对照，以验证一抗标记靶抗原的特异性。阴性组织对照中缺乏特异性染色证实了抗体与细胞/细胞成分不存在交叉反应性。如果在阴性外部组织对照中出现特异性染色（假阳性染色），则患者标本的结果应被视为无效。

非特异性染色（如果存在）通常呈弥漫性外观。在过度福尔马林固定的组织切片中也可以观察到结缔组织的零星染色。使用完整的细胞来解释染色结果。坏死或退化的细胞通常会出现非特异性染色。

患者组织：

检查用指定抗体染色的患者标本 最后的。阳性染色强度应在阴性试剂对照的任何非特异性背景染色的背景下进行评估。与任何免疫组织化学测试一样，阴性结果意味着未检测到抗原，而不是所检测的细胞/组织中不存在抗原。如有必要，使用一组抗体来识别假阴性反应。



PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Chinese (Simplified)

BIOCARE
M E D I C A L

用 PRAME [EPR20330] 抗体对黑色素瘤进行染色。

有关指定抗体免疫反应性的具体信息，请参阅摘要和解释、限制和性能特征。

限制：

一般限制：

1. 用于体外诊断用途
2. 该产品仅供专业用途：免疫组织化学是一个多步骤的诊断过程，包括选择适当试剂的专门培训；组织选择、固定和处理；IHC 载玻片的制备；以及染色结果的解释。
3. 组织染色取决于染色前组织的处理和保存。不正确的固定、冷冻、解冻、清洗、干燥、加热、切片或被其他组织或液体污染可能会产生伪影、抗体捕获或假阴性结果。结果不一致可能是由于固定和嵌入方法的变化，或组织内固有的不规则性。¹²
4. 过度或不完整的复染可能会影响结果的正确解释。
5. 任何阳性或阴性染色的临床解释应在临床表现、形态学和其他组织病理学标准的背景下进行评估。任何阳性或阴性染色的临床解释均应通过使用适当的阳性和阴性内部和外部对照以及其他诊断测试的形态学研究来补充。熟悉 IHC 抗体、试剂和方法的合格病理学家有责任解释用于准备和解释最终 IHC 制剂的所有步骤。
6. 针对特定应用的最佳抗体稀释度和方案可能会有所不同。这些包括但不限于固定、热回收方法、孵育时间、组织切片厚度和使用的检测试剂盒。由于这些独特试剂具有卓越的灵敏度，所列推荐的孵育时间和滴度不适用于其他检测系统，因为结果可能会有所不同。数据表建议和协议基于 Biocare 产品的独家使用。最终，研究者有责任确定最佳条件。
7. 本产品不适用于流式细胞术。流式细胞术的性能特征尚未确定。
8. 感染乙型肝炎病毒并含有乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 的人的组织可能会出现辣根过氧化物酶的非特异性染色。¹³
9. 试剂可能会在先前未测试的组织中表现出意想不到的反应。由于肿瘤或其他病理组织中抗原表达的生物变异性，即使在测试的组织组中也不能完全消除意外反应的可能性。¹⁴请致电 1-800-542-2002 联系 Biocare 的技术支持，或通过 biocare.net 上提供的技术支持信息联系，并记录意外反应。
10. 由于自身抗体或天然抗体，与封闭步骤中使用的二抗血清来自相同动物来源的正常/非免疫血清可能会导致假阴性或假阳性结果。
11. 由于蛋白质或底物反应产物的非免疫结合，可能会出现假阳性结果。它们也可能由假过氧化物酶活性（红细胞）、内源性过氧化物酶活性（细胞色素C）或内源性生物素（例如肝脏、乳腺、脑、肾）引起，具体取决于所用免疫染色的类型。¹²

产品特定限制：

没有额外的产品特定限制。

性能特点：

重现性：

通过多个操作员在不同日期和不同仪器上测试选定的正常组织和肿瘤组织，验证了抗体性能的重现性。所选组织的染色一致且按预期进行。

免疫反应性：

以下阳性和阴性免疫反应性已在下表1和2中得到证实。

下面提供的列表并不详尽，但描述了用所示抗体观察到的免疫反应类型的特征。

在该产品中没有观察到已知的非特异性抗体反应性。

预期结果摘要：

使用组织微阵列 (TMA) 评估正常和疾病状态组织中 PRAME 的患病率。

测试的正常组织如预期染色，在睾丸中观察到高水平的染色，而在其他组织中没有染色。

正如预期的那样，在黑色素瘤中观察到 PRAME 染色水平较高，而在其他癌症组织（如卵巢、肺癌、前列腺和乳腺癌）中也观察到不同水平的 PRAME 染色。

分析性能：

进行了敏感性和特异性的染色测试，结果列出如下。

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Chinese (Simplified)

BIOCARE
M E D I C A L

敏感性和特异性：

表 1：通过测试 FFPE 正常组织确定抗体的敏感性和特异性。

组织	正面案例	总病例数
大脑	0	6
小脑	0	3
肾上腺	0	3
子宫	0	3
胰腺	0	3
气管	0	3
垂体	0	3
睾丸*	3	3
甲状腺	0	3
胸部	0	3
脾	0	3
扁桃体	0	3
胸腺	0	3
骨髓**	0	1
肺	0	3
心	0	3
食管	0	3
胃	0	3
小肠	0	3
胃	0	3
小肠	0	3
胃	0	3
肝	0	3
唾液腺	0	3
肾	0	3
前列腺	0	3
子宫	0	3
宫颈	0	3
骨骼肌	0	3
皮肤	0	3
周围神经	0	3
衬里细胞	0	3
头、颈和唾液腺	0	6
淋巴结	0	3

* 3-4 强度核染色

** 缺少两个样本

表 2：通过测试多种 FFPE 肿瘤组织来确定抗体的敏感性和特异性。

病理	正面案例	总病例数
黑色素瘤	29	39
卵巢癌	9	44
乳腺癌	10	26
结肠癌	4	43
肺癌	21	50
前列腺癌	18	41
肾上腺皮质癌	0	1
膀胱癌	0	2
脑膜瘤	0	2
星形细胞瘤	0	1
鳞状细胞癌 (食道)	0	2
腺癌 (胃)	0	2
腺癌 (小肠)	0	1
腺癌 (结肠和直肠)	0	6
肾癌	0	2
肝癌	0	4
淋巴瘤	0	3
鳞状细胞癌 (头颈癌、口腔癌、舌癌)	0	1
鼻咽癌	1	1
腺癌 (胰腺)	0	1
腺癌 (前列腺)	0	2
腺样囊性癌 (头颈部、唾液腺)	0	1
鳞状细胞癌 (皮肤)	0	1
精原细胞瘤	0	2
甲状腺癌	0	2
宫颈癌	0	2
子宫内膜癌	1	2

各种肿瘤中的 PRAME 表达可能表现出不同的肿瘤阳性百分比。请参阅表 3，了解在表 2 中发现的各种肿瘤中观察到的阳性染色肿瘤细胞百分比（按四分位数分类）。

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Chinese (Simplified)

BIOCARE
M E D I C A L

表 3：各种 FFPE 肿瘤中阳性肿瘤细胞染色的百分比。

纸巾	肿瘤细胞染色百分比				
	# 个病例显示染色占总数 # 个病例的百分比 (%)				
	<1%	1-25%	26-50%	51-75%	> 75%
卵巢癌	35/44 (79.5%)	2/44 (4.5%)	3/44 (6.8%)	3/44 (6.8%)	1/44 (2.3%)
乳腺癌	16/26 (61.5%)	7/26 (26.9%)	1/26 (3.8%)	2/26 (7.7%)	0 (0%)
结肠癌	39/43 (88.4%)	4/43 (11.6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
肺癌	29/50 (58.0%)	7/50 (14.0%)	4/50 (8.0%)	7/50 (14.0%)	3/50 (6.0%)
前列腺癌	23/41 (56.1%)	9/41 (22.0%)	3/41 (7.3%)	2/41 (4.9%)	4/41 (9.8%)
鼻咽癌	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1/1 (100%)
子宫内膜癌	1/2 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	1/2 (50%)	0 (0%)
黑色素瘤	10/39 (25.6%)	6/39 (15.4%)	5/39 (12.8%)	6/39 (15.4%)	12/39 (30.8%)

所有染色强度的肿瘤细胞染色百分比。

组织染色显示不同水平的 PRAME 蛋白表达。

分析性能测试结果表明，使用定义的 IHC 方案时，PRAME [EPR20330] 抗体可以正确检测 PRAME 蛋白。异常组织测试结果支持这样的结论：在使用推荐的 IHC 方案时，PRAME [EPR20330] 对 PRAME 蛋白敏感。PRAME [EPR20330] 抗体能够检测低水平到高水平的 PRAME 蛋白。正常组织检测显示，在 32 种组织类型中未意外检测到 PRAME。没有意外的交叉反应。结果支持 PRAME [EPR20330] 抗体对 PRAME 蛋白具有高度特异性（分析特异性）的说法。

临床表现：

进行了诊断敏感性和特异性的染色测试，结果列出如下。阳性和阴性免疫反应性记录于表 4 中。

三张黑色素瘤 TMA 载玻片在 Biocare 染色并发送给外部病理学家进行读取和分级。黑色素瘤组织显示出多种染色评分，范围从 0（阴性）到强（4）。大多数黑色素细胞没有表现出 PRAME 反应性，但少数有很强的反应性。

表 4：各种 FFPE 黑色素细胞肿瘤和皮肤中的阳性肿瘤细胞染色百分比。

纸巾	肿瘤细胞染色百分比				
	# 个病例显示染色占总数 # 个病例的百分比 (%)				
	<1%	1-25%	26-50%	51-75%	> 75%
黑色素瘤	28/133 (21.1%)	50/133 (37.6%)	10/133 (7.5%)	8/133 (6.0%)	37/133 (27.8%)
转移性黑色素瘤	7/38 (18.4%)	10/38 (26.3%)	3/38 (7.9%)	2/38 (5.3%)	16/38 (42.1%)
黑色素细胞痣	12/14 (85.7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2/12 (14.3%)
皮肤	10/10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

所有染色强度的肿瘤细胞染色百分比。

组织染色显示不同水平的 PRAME 蛋白表达。

该测试的主要终点是评估 PRAME [EPR20330] 抗体在 IHC 程序中的诊断敏感性，定义为已确认的阳性样本的阳性黑色素瘤检出率。[TP/(TP+FN)]

次要终点是评估诊断特异性——已确认的黑色素瘤阴性样本的阴性检出率。[TN/(TN+FP)]

有 35 例假阴性黑色素瘤病例已接受黑色素瘤金标准病理学评估，但 PRAME 呈阴性。136 例为真阳性，因为他们被诊断患有黑色素瘤并显示出 PRAME 信号。在诊断为良性的 14 个黑色素细胞痣样本中检测到两个假阳性，显示出 PRAME 信号。

从数据来看，估计的诊断灵敏度 = $136/(136+35) = 79.5\%$

从数据来看，估计的诊断特异性 = $22/(22+2) = 91.7\%$

根据我们的计算，我们得出黑色素瘤检测的估计诊断灵敏度为 79.5%，估计诊断特异性为 91.7%。

由此我们得出结论，经 Biocare 对黑色素瘤和黑色素细胞痣样本进行测试，PRAME [EPR20330] 抗体对黑色素瘤敏感且对黑色素瘤具有高度特异性。

故障排除：（对以下各点提供解释）

- 任何载玻片均未染色 - 检查以确定是否使用了适当的阳性对照组织、抗体和检测产品。
- 所有载玻片的弱染色 - 检查以确定是否使用了适当的阳性对照组织、抗体和检测产品。
- 所有载玻片的背景过多 - 可能存在高水平的内源生物素（如果使用基于生物素的检测产品）、将色原转化为有色最终产物的内源 HRP 活性（使用过氧化物酶块）或过量的非特异性蛋白质相互作用（使用蛋白质封闭液，例如基于血清或酪蛋白的封闭液）。
- 孵化过程中组织切片会从载玻片上洗掉——检查载玻片以确保它们带正电。

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Chinese (Simplified)

BIOCARE
M E D I C A L

5. 特异性染色太深 – 检查实验方案以确定是否对载玻片应用了正确的抗体滴度以及所有试剂的正确孵育时间。此外，确保方案有足够的清洗步骤，以在孵育步骤完成后去除多余的试剂。

参考：

1. Kiernan JA. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. *Theory and Practice of Histotechnology*. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. *J Histotechnol*. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. *Biotech Histochem*. 1996 Jan;71(5):263-70.
6. Center for Disease Control Manual. Guide: Safety Management, NO. CDC-22, Atlanta, GA. April 30, 1976 "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts."
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition* CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
8. CLSI *Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2)* CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011
9. College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. [Http://www.cap.org](http://www.cap.org) (800) 323-4040.
10. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
11. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques. *Histochemistry* 1987; 86:471-478.
12. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. *Lab Med*1983;14:767.
13. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradishperoxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *Am J Clin Path* 1980;73:626.
14. Herman GE and Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. *Biotech & Histochem* 1991;66:194.
15. Zhang W, et al. PRAME expression and promoter hypermethylation in epithelial ovarian cancer. *Oncotarget*, 2016 Jul; 7(29):45352-69.
16. Lezcano C, et al. PRAME expression in melanocytic tumors. *Am J Surg Pathol*. 2018 Nov; 42(11):1456-65.

UltraLine 抗体由 Biocare Medical LLC 单独开发，并不意味着 Ventana Medical Systems, Inc 或罗氏批准或认可 Biocare 抗体。Biocare、Ventana 和罗氏不存在任何附属、关联或关联。Ventana®、BenchMark®、ultraView 和 OptiView 是罗氏的商标。

Q 系列抗体由 Biocare Medical LLC 单独开发，并不意味着 Leica Biosystems 批准或认可 Biocare 抗体。Biocare 和 Leica Biosystems 不存在任何附属、关联或关联。Leica、Leica Biosystems、BOND-MAX 和 BOND-III 是 Leica Biosystems 的商标。

安全性和性能摘要可在此处找到：<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>。

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Chinese (Traditional)

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats				
Format	Catalog Number	Description	Dilution	Diluent
Concentrate	ACI 3252 A, B	0.1, 0.5 mL	1:100	Van Gogh Yellow
Predilute	API 3252 AA, G20, H	6.0, 20, 25 mL	Ready-to-use	N/A
ONCORE Pro	OPAI 3252 T60	60 tests	Ready-to-use	N/A
Q Series-- For Leica BOND-III	ALI 3252 G7	7.0 mL	Ready-to-use	N/A
UltraLine -- For BenchMark	AVI 3252 G, G25	6.0, 25 mL	Ready-to-use	N/A

免疫組織化學 (福馬林固定石蠟包埋組織)

有可能的使用：

用於體外診斷

PRAME [EPR20330] 是一種兔單株抗體，供實驗室使用，在使用非免疫組織化學染色的常規組織病理學對腫瘤進行初步診斷後，透過福馬林固定石蠟中的免疫組織化學(IHC)定性鑑定 PRAME 蛋白。包埋 (FFPE) 人體組織。任何染色或染色缺失的臨床解釋應透過使用適當對照的形態學研究來補充，並應在患者的臨床病史和由合格病理學家進行的其他診斷測試的背景下來進行評估，以幫助做出任何其他臨床決定。

總結與說明：

PRAME位於染色體22q11.22上，編碼509個胺基酸的蛋白質。PRAME是一種常染色體癌基因(CTA)基因，已顯示在黑色素瘤、各種非黑色素細胞惡性腫瘤(包括非小細胞肺癌、乳腺癌、卵巢癌和其他幾種引用的腫瘤)中表達。除睪丸、卵巢、腎上腺和文獻中引用的其他一些組織外，正常健康組織不表達 PRAME。(15,16)

程序原則：

此抗體產品可用作福馬林固定、石蠟包埋的組織切片的免疫組織化學檢測中的一抗。一般來說，免疫組織化學(IHC)染色技術允許透過連續應用抗原來可視化抗原。抗原的特異性抗體(一抗)、一抗的二抗(可選連接抗體/探針)、酵素複合物和顯色底物以及插入的洗滌步驟。色原的酵素活化在抗原位點產生可見的反應產物。然後可以將樣本複染，並蓋上蓋玻片。使用光解釋結果顯微鏡並有助於病理生理過程的鑑別診斷，這可能或可能與特定抗原無關。

材料與方法：

提供的試劑：

寄主來源：兔單克隆

物種反應性：人類。其他物種未測試。

克隆：EPR20330

同種型：IgG

蛋白質濃度：特定 IgG 濃度：聯絡 Biocare 的技術支持

特異性：PRAME

細胞定位：細胞核和細胞膜

方法：親和純化重組兔單株抗體。

重構、混合、稀釋、滴定：

預先稀釋的抗體試劑經過最佳稀釋，可與上述染色系統一起使用。進一步稀釋可能會導致抗原染色喪失。這用戶必須驗證任何此類更改。使用者實驗室的組織處理和技術程序的差異可能會產生顯著的結果差異，需要定期進行內部控制(請參閱品質控制部分)。濃縮試劑需要依照上表所示進行稀釋。

已知應用：

供貨形式：緩衝鹽水溶液，pH 5.9-7.9，含蛋白質載體和少於 0.1% 疊氮化鈉防腐劑。有關更多詳細信息，請參閱安全資料表。

需要但未提供的材料和試劑：

顯微鏡載玻片帶正電。

陽性和陰性組織對照

沙漠室(或類似的乾燥箱)

二甲苯或二甲苯替代品

乙醇或試劑醇

解密室(高壓鍋)

去離子水或蒸餾水

洗滌緩衝液

預處理試劑

過氧化物酶阻斷

蛋白質塊(可選)

檢測探針和聚合物

陰性對照試劑

顯色劑

蘇木精(複染)

上藍試劑

封固劑

蓋玻片

光學顯微鏡(40-400X 放大倍率)

抗體產品的配置可用於上表所示的儀器。

儲存和穩定性：

儲存於 2°C 至 8°C。在這些條件下儲存時，該產品在小瓶標籤上印刷的有效期內是穩定的。請勿在有效期限後使用。必須驗證在指定條件以外的任何條件下的儲存。稀釋後的試劑應及時使用；將所有剩餘試劑儲存在 2°C 至 8°C 下。Biocare 尚未確定使用者稀釋試劑的穩定性。

陽性和陰性對照應與所有患者檢體同時進行。如果觀察到意外染色，且無法透過實驗室程序的變化來解釋，並且懷疑抗體存在問題，請致電 1-800-542-2002 或透過 biocare.net 上提供的技術支援資訊聯絡 Biocare 的技術支援。

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Chinese (Traditional)

BIOCARE
M E D I C A L

樣品製備：

用福馬林固定的組織適合在石蠟包埋前使用。在組織處理之前應將骨組織脫鈣，以利於組織切割並防止損壞切片機刀片。^{1,2}

正確固定和包埋表達特定抗原標靶的組織應保存在陰涼處。1988 年的臨床實驗室改進法案 (CLIA) 在 42 CFR § 493.1259(b) 中要求“實驗室必須保留染色玻片自染色玻片之日起至少十年”檢查並保留樣本塊自檢查之日起至少兩年。³

染色前組織的處理：

根據下面建議的方案執行熱誘導表位修復 (HIER)。在 IHC 之前常規使用 HIER 已被證明可以最大限度地減少不一致並使染色標準化。^{4,5}

警告和注意事項：

1. 此抗體含有低於 0.1% 的疊氮化鈉。根據 US 29 CFR 1910.1200、OSHA 危險通報和 EC 指令 91/155/EC，濃度低於 0.1% 不屬於應報告危險物質。用作防腐劑的疊氮化鈉 (NaN₃) 攝取後有毒。疊氮化鈉可能與鉛和銅管道反應，形成高度爆炸性的金屬疊氮化物。處置後，用大量水沖洗，以防止疊氮化物在管道中積聚。(疾病管制中心，1976 年，國家職業安全與健康研究所，1976 年)⁶
2. 固定前後的標本以及所有暴露於其中的材料應按照能夠傳播感染的方式進行處理，並採取適當的預防措施進行處置。切勿用嘴巴吸取試劑，並避免試劑和檢體接觸皮膚和黏膜。如果試劑或檢體接觸到敏感區域，請用大量水清洗。⁷
3. 試劑的微生物污染可能導致非特異性染色增加。
4. 未指定的孵育時間或溫度可能會產生錯誤的結果。用戶必須驗證任何此類更改。
5. 試劑瓶上印有有效期限後請勿使用。
6. 預稀釋抗體試劑最佳稀釋後使用。進一步稀釋可能會導致抗原染色喪失。
7. 濃縮抗體試劑的稀釋在使用前必須經過驗證。任何使用非特別推薦的稀釋劑也必須驗證其相容性和穩定性。
8. 依照傳染性或潛在傳染性廢棄物的程序處置所有用過的試劑和任何其他受污染的一次性材料。每個實驗室都有責任根據固體和液體廢物的性質和危險程度處理固體和液體廢物，並根據任何適用的法規對其進行處理和處置（或委託他人處理和處置）。
9. 請遵循您在位置的當地處置法規以及安全資料表中的建議，以確定本產品的安全處置
10. SDS 可依要求提供，位於 <http://biocare.net>。
11. 若要通報與本設備相關的可疑嚴重事件，請聯絡當地 Biocare 代表以及使用者所在會員國或國家的主管機關。

使用說明：

PRAME [EPR20330] 的建議染色方案：

IntelliPATH FLX and manual use:

API3252 用於 IntelliPATH FLX 和手動使用，已透過 MACH 4 檢測系統進行標準化。使用 TBS 進行洗滌步驟。	
Peroxide Block:	用過氧化物 1 封閉 5 分鐘。
Pretreatment:	使用 Borg Decloaker 執行熱檢索。有關具體說明，請參閱 Borg Decloaker 資料表。

Protein Block (Optional):	使用背景懲罰器在室溫下孵育 5-10 分鐘。
Primary Antibody:	室溫孵育 30 分鐘。
Detection:	探頭：不適用 聚合物：與次級共軛聚合物一起在室溫下孵育 30 分鐘。
Chromogen:	使用 Biocare 的 DAB 在室溫下孵育 5 分鐘 – 或 – 使用 Warp Red 在室溫下孵育 5-7 分鐘。
Counterstain	用蘇木精複染。用去離子水沖洗。使用 Tacha 的藍化溶液 1 分鐘。用去離子水沖洗。

ONCORE Pro Automated Slide Staining System:

OPAI3252 適用於 ONCORE Pro。具體使用說明請參閱使用手冊。協議編輯器中的協定參數應如下編程：		
Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	普拉姆 Rb	PRAME Rb AP
Protocol Template (Description):	特殊模板（需要 ONCORE Pro-Tect 檢測）	鉬 AP 模板 1
Dewaxing (DS Buffer Option):	DS2-50	DS 緩衝器
Antigen Retrieval (AR Option):	AR1, 高 pH 值；103°C	AR1, 高 pH 值；103°C
Block Option:	緩衝	緩衝
Reagent Name, Time, Temp.:	PRAME Rb, 45 分鐘, 25°C	PRAME Rb, 30 分鐘, 25°C

Ventana BenchMark ULTRA:

AVI3252 旨在與 BenchMark ULTRA 一起使用。具體使用說明請參閱使用手冊。推薦協議參數如下：	
Template/Detection:	OptiView DAB IHC
Pretreatment Protocol:	CC1 64 分鐘
Peroxidase:	前初級過氧化物酶抑制劑
Primary Antibody:	32 分鐘, 36°C

Q Series – For Leica BOND-III:

ALI3252 旨在與 Leica BOND-III 配合使用。具體使用說明請參閱使用手冊。推薦協議參數如下：		
Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	IHC Protocol F	IHC Protocol J
Detection:	黏合聚合物精煉	黏合聚合物精煉紅
HIER:	ER2 20 分鐘	ER2 20 分鐘
Peroxide Block:	5 分鐘	
Marker (Primary Antibody):	15 分鐘	15 分鐘

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Chinese (Traditional)

BIOCARE
M E D I C A L

Post Primary:	8 分鐘	
Polymer:	8 分鐘	
Post Primary AP:		20 分鐘
Polymer AP:		30 分鐘
Mixed Chromogen Refine:	10 分鐘	10 分鐘+5 分鐘
Hematoxylin:	5 分鐘	5 分鐘

品質控制：

請參閱 CLSI 免疫組織化學檢測設計和實施的品質標準；核准指南 - 第二版 (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org)。2011年^{8月}

陽性組織對照：黑色素瘤，正常睪丸

外部陽性對照材料應為新鮮標本，盡快以與病患樣本相同的方式固定、處理和包埋。陽性組織對照顯示正確製備的組織和正確的染色技術。每次染色運行中應包括每組測試條件的一個陽性外部組織對照。

用於外部陽性對照材料的組織應選自具有良好特徵的低水平陽性標靶活性的患者標本，該活性呈弱陽性染色。外部陽性對照的低陽性水平旨在確保檢測由於 IHC 方法不穩定或問題而導致的一抗敏感性的細微變化。市售的組織對照玻片或與病人樣本不同處理的樣本僅驗證試劑性能，並不驗證組織製備。已知的陽性組織對照只能用於監測處理過的組織和測試試劑的正確性能，而不是幫助制定患者樣本的特定診斷。如果陽性組織對照未能表現出陽性染色，則測試樣本的結果應被視為無效。

陰性組織對照：

每次染色時，使用與患者樣本相同的方式固定、處理和包埋陰性組織對照（已知為 PRAME 陰性），以驗證 IHC 一抗的特異性 展示目標抗原，並提供特定背景染色的指示（假陽性染色）。此外，大多數組織切片中存在多種不同的細胞類型，可以被實驗室人員用作內部陰性對照位點以驗證 IHC 的性能規格。可用於陰性組織的標本類型和來源 控制措施列於「性能特徵」部分。

如果陰性組織對照中出現特異性染色（假陽性染色），則病患檢體的結果應視為無效。

非特異性陰性試劑對照：

使用非特異性陰性試劑對照代替一抗，並使用每個患者標本的切片來評估非特異性染色和

可以更好地解釋抗原位點的特異性染色。理想情況下，陰性試劑對照包含由組織培養上清液產生的 PRAME IgG 抗體，其方式與初級試劑相同 抗體，但在與 Biocare 抗體相同的基質/溶液中與人體組織不表現出特異性反應性。將陰性對照抗體稀釋至與稀釋的一抗相同的免疫球蛋白或蛋白質濃度 抗體使用相同的稀釋劑。如果處理後的純抗體中保留胎牛血清，則胎牛血清的蛋白質濃度相當於稀釋後的抗體濃度。同一稀釋液中的一抗也適合使用。（參見提供的試劑）。單獨的稀釋劑可以用作先前描述的陰性試劑對照的不太理想的替代品。陰性試劑對照的孵育時間應與一抗的孵育時間相對應。

當在連續切片上使用多個抗體組時，一張玻片的負染色區域可以用作其他抗體的負/非特異性結合背景對照。為了區分內源性酵素活性或酵素的非特異性

結合與特異性免疫反應性，可以分別以底物-色原或酵素複合物（PAP、親和素-生物素、鏈徽親和素）和底物-色原專門對其他患者組織進行染色。

測定驗證：

在診斷程序中首次使用抗體或染色系統之前，使用者應透過在一系列具有代表已知陽性和陰性組織的已知免疫組織化學性能特徵的內部組織上進行測試來驗證抗體的特異性。請參閱先前在產品插頁的本節中概述的品質控制程序以及 CAP 免疫組織化學認證計劃⁹和/或 NCCLS IHC 指南¹⁰的品質控制建議。對於每個新抗體批次，或每當測定參數發生變化時，都應重複這些品質控制程序。性能特徵部分列出的組織適合用於測定驗證。

故障排除：

根據提供的數據表，遵循抗體特定方案建議。如果出現非典型結果，請致電 1-800-542-2002 聯絡 Biocare 的技術支援。

染色解讀：

陽性組織對照：

應先檢查用指定抗體染色的陽性組織對照，以確定所有試劑均正常運作。標靶細胞的適當染色（如上所述）顯示呈陽性反應。如果陽性組織對照未能表現出陽性染色，則測試樣本的任何結果應被視為無效。

反應產物的顏色可能會根據所使用的底物髮色團而改變。有關預期的顏色反應，請參閱基材包裝插頁。此外，在染色方法的變化中可以觀察到異染。¹¹ 當使用複染劑時，根據培養長度和所用複染劑的效力，複染將導致細胞核著色。過度或不完整的複染可能會影響結果的正確解釋。請參閱建議的複染方案。

陰性組織對照：

應在陽性組織對照後檢查陰性組織對照，以驗證一抗標記標靶抗原的特異性。陰性組織對照中缺乏特異性染色證實了抗體與細胞/細胞成分不存在交叉反應性。如果在陰性外部組織對照中出現特異性染色（假陽性染色），則病患檢體的結果應被視為無效。

非特異性染色（如果存在）通常呈現瀰漫性外觀。在過度福馬林固定的組織切片中也可以觀察到結締組織的零星染色。使用完整的細胞來解釋染色結果。壞死或退化的細胞通常會出現非特異性染色。

患者組織：

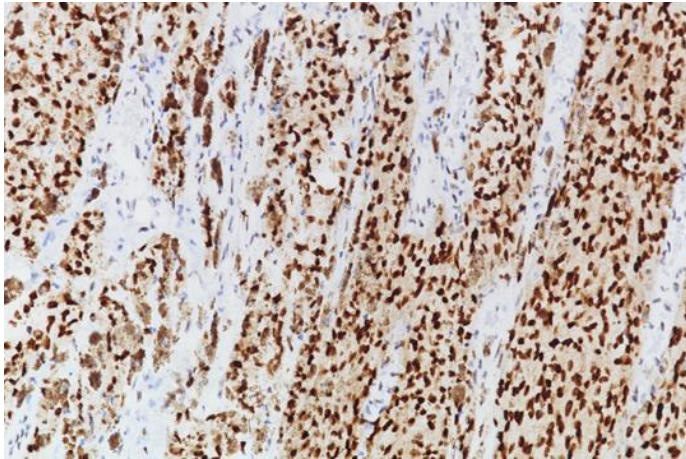
檢查用指定抗體染色的病人標本 最後的。陽性染色強度應在陰性試劑對照的任何非特異性背景染色的背景下進行評估。與任何免疫組織化學測試一樣，陰性結果意味著未檢測到抗原，而不是所檢測的細胞/組織中不存在抗原。如有必要，請使用一組抗體來識別假陰性反應。

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Chinese (Traditional)

BIOCARE
M E D I C A L



以 PRAME [EPR20330] 抗體對黑色素瘤進行染色。

有關指定抗體免疫反應性的具體信息，請參閱摘要和解釋、限制和性能特徵。

限制：

一般限制：

1. 用於體外診斷用途
2. 本產品僅供專業用途：免疫組織化學是一個多步驟的診斷過程，包括選擇適當試劑的專門培訓；組織選擇、固定和處理；IHC 載玻片的製備；以及染色結果的解釋。
3. 組織染色取決於染色前組織的處理和處理。不正確的固定、冷凍、解凍、清洗、乾燥、加熱、切片或被其他組織或液體污染可能會產生偽影、抗體捕獲或假陰性結果。結果不一致可能是由於固定和嵌入方法的變化，或組織內固有的不規則性。¹²
4. 過度或不完整的複染可能會影響結果的正確解釋。
5. 任何陽性或陰性染色的臨床解釋應在臨床表現、形態學和其他組織病理學標準的背景下進行評估。任何陽性或陰性染色的臨床解釋應透過使用適當的陽性和陰性內部和外部對照以及其他診斷測試的形態學研究來補充。熟悉 IHC 抗體、試劑和方法的合格病理學家有責任解釋用於準備和解釋最終 IHC 製劑的所有步驟。
6. 針對特定應用的最佳抗體稀釋度和方案可能會有所不同。這些包括但不限於固定、熱回收方法、孵育時間、組織切片厚度和使用的檢測試劑盒。由於這些獨特試劑具有卓越的靈敏度，所列建議的孵育時間和滴度不適用於其他檢測系統，因為結果可能會有所不同。數據表建議和協議基於 Biocare 產品的獨家使用。最終，研究者有責任確定最佳條件。
7. 本產品不適用於流式細胞儀。流式細胞儀的性能特徵尚未確定。
8. 感染B型肝炎病毒並含有乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 的人的組織可能會出現辣根過氧化物酶的非特異性染色。¹³
9. 試劑可能會在先前未測試的組織中表現出意想不到的反應。由於腫瘤或其他病理組織中抗原表達的生物變異性，即使在測試的組織組中也不能完全消除意外反應的可能性。¹⁴請致電 1-800-542-2002 或透過 biocare.net 上提供的技術支援資訊聯繫 Biocare 的技術支持，並記錄意外反應。
10. 由於自體抗體或天然抗體，與封閉步驟中使用的二抗血清來自相同動物來源的正常/非免疫血清可能會導致假陰性或假陽性結果。

11. 由於蛋白質或底物反應產物的非免疫結合，可能會出現假陽性結果。它們也可能由假過氧化物酶活性（紅血球）、內源性過氧化物酶活性（細胞色素C）或內源性生物素（例如肝臟、乳腺、腦、腎）引起，這取決於所用免疫染色的種類。¹²

產品特定限制：

沒有額外的產品特定限制。

性能特點：

重現性：

透過多個操作員在不同日期和不同儀器上測試選定的正常組織和腫瘤組織，驗證了抗體性能的重現性。所選組織的染色一致且如預期進行。

免疫反應性：

以下陽性和陰性免疫反應性已在表1和2中得到證實。

下面提供的清單並不詳盡，但描述了用所示抗體觀察到的免疫反應類型的特徵。

在該產品中沒有觀察到已知的非特異性抗體反應性。

預期結果摘要：

使用組織微陣列 (TMA) 評估正常和疾病狀態組織中 PRAME 的盛行率。

測試的正常組織如預期染色，在睪丸中觀察到高水平的染色，而在其他組織中沒有染色。

如預期的那樣，在黑色素瘤中觀察到 PRAME 染色水平較高，而在其他癌症組織（如卵巢、肺癌、前列腺和乳腺癌）中也觀察到不同水平的 PRAME 染色。

分析性能：

進行了敏感性和特異性的染色測試，結果列出如下。

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Chinese (Traditional)

BIOCARE
M E D I C A L

敏感性和特異性：

表 1：透過測試 FFPE 正常組織來確定抗體的敏感性和特異性。

組織	正面案例	總病例數
大腦	0	6
小腦	0	3
腎上腺	0	3
子宮	0	3
胰臟	0	3
氣管	0	3
腦下垂體	0	3
睪丸*	3	3
甲狀腺	0	3
胸部	0	3
脾	0	3
扁桃腺	0	3
胸腺	0	3
骨髓**	0	1
肺	0	3
心	0	3
食道	0	3
胃	0	3
小腸	0	3
盲腸	0	3
肝	0	3
唾液腺	0	3
腎	0	3
攝護腺	0	3
子宮	0	3
子宮頸	0	3
骨骼肌	0	3
皮膚	0	3
週邊神經	0	3
襯裡細胞	0	3
頭、頸和唾液腺	0	6
淋巴結	0	3

* 3-4 強度核染色

** 缺少兩個樣本

表 2：透過測試多種 FFPE 腫瘤組織來確定抗體的敏感性和特異性。

病理	正面案例	總病例數
黑色素瘤	29	39
卵巢癌	9	44
乳癌	10	26
結腸癌	4	43
肺癌	21	50
攝護腺癌	18	41
腎上腺皮質癌	0	1
膀胱癌	0	2
腦膜瘤	0	2
星狀細胞瘤	0	1
鱗狀細胞癌 (食道)	0	2
腺癌 (胃)	0	2
腺癌 (小腸)	0	1
腺癌 (結腸和直腸)	0	6
腎癌	0	2
肝癌	0	4
淋巴瘤	0	3
鱗狀細胞癌 (頸頸癌、口腔癌、舌癌)	0	1
鼻咽癌	1	1
腺癌 (胰臟)	0	1
腺癌 (前列腺)	0	2
腺樣囊性癌 (頸頸部、唾液腺)	0	1
鱗狀細胞癌 (皮膚)	0	1
精原細胞瘤	0	2
甲狀腺癌	0	2
子宮頸癌	0	2
子宮內膜癌	1	2

各種腫瘤中的 PRAME 表現可能表現出不同的腫瘤陽性百分比。請參閱表 3，以了解在表 2 中發現的各種腫瘤中觀察到的陽性染色腫瘤細胞百分比（按四分位數分類）。

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Chinese (Traditional)

BIOCARE
M E D I C A L

表 3：各種 FFPE 腫瘤中陽性腫瘤細胞染色的百分比。

紙巾	腫瘤細胞染色百分比				
	# 個病例顯示染色佔總數 # 個病例的百分比 (%)				
	<1%	1-25%	26-50%	51-75%	> 75%
卵巢癌	35/44 (79.5%)	2/44 (4.5%)	3/44 (6.8%)	3/44 (6.8%)	1/44 (2.3%)
乳癌	16/26 (61.5%)	7/26 (26.9%)	1/26 (3.8%)	2/26 (7.7%)	0 (0%)
結腸癌	39/43 (88.4%)	4/43 (11.6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
肺癌	29/50 (58.0%)	7/50 (14.0%)	4/50 (8.0%)	7/50 (14.0%)	3/50 (6.0%)
攝護腺癌	23/41 (56.1%)	9/41 (22.0%)	3/41 (7.3%)	2/41 (4.9%)	4/41 (9.8%)
鼻咽癌	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1/1 (100%)
子宮內膜癌	1/2 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	1/2 (50%)	0 (0%)
黑色素瘤	10/39 (25.6%)	6/39 (15.4%)	5/39 (12.8%)	6/39 (15.4%)	12/39 (30.8%)

所有染色強度的腫瘤細胞染色百分比。

組織染色顯示不同程度的 PRAME 蛋白表現。

分析性能測試結果表明，使用定義的 IHC 方案時，PRAME [EPR20330] 抗體可以正確檢測 PRAME 蛋白。異常組織測試結果支持這樣的結論：在使用建議的 IHC 方案時，PRAME [EPR20330] 對 PRAME 蛋白敏感。PRAME [EPR20330] 抗體能夠偵測低量到大量的 PRAME 蛋白。正常組織檢測顯示，在 32 種組織類型中未意外偵測到 PRAME。沒有意外的交叉反應。結果支持 PRAME [EPR20330] 抗體對 PRAME 蛋白具有高度特異性（分析特異性）的說法。

臨床表現：

進行了診斷敏感性和特異性的染色測試，結果列出如下。陽性和陰性免疫反應性記錄於表 4 中。

三張黑色素瘤 TMA 玻片在 Biocare 染色並發送給外部病理學家進行讀取和分級。黑色素瘤組織顯示多種染色評分，範圍從 0（陰性）到強（4）。大多數黑色素細胞痣沒有表現出 PRAME 反應性，但少數有很強的反應性。

表 4：各種 FFPE 黑色素細胞腫瘤和皮膚中的陽性腫瘤細胞染色百分比。

紙巾	腫瘤細胞染色百分比				
	# 個病例顯示染色佔總數 # 個病例的百分比 (%)				
	<1%	1-25%	26-50%	51-75%	> 75%
黑色素瘤	28/133 (21.1%)	50/133 (37.6%)	10/133 (7.5%)	8/133 (6.0%)	37/133 (27.8%)
轉移性黑色素瘤	7/38 (18.4%)	10/38 (26.3%)	3/38 (7.9%)	2/38 (5.3%)	16/38 (42.1%)
黑色素細胞痣	12/14 (85.7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2/12 (14.3%)
皮膚	10/10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

所有染色強度的腫瘤細胞染色百分比。

組織染色顯示不同程度的 PRAME 蛋白表現。

此測試的主要終點是評估 PRAME [EPR20330] 抗體在 IHC 程序中的診斷敏感性，定義為已確認的陽性樣本的陽性黑色素瘤檢出率。[TP/(TP+FN)]

次要終點是評估診斷特異性—已確認的黑色素瘤陰性樣本的陰性檢出率。[TN/(TN+FP)]

有 35 例假陰性黑色素瘤病例已接受黑色素瘤金標準病理學評估，但 PRAME 呈現陰性。136 例為真陽性，因為他們被診斷出患有黑色素瘤並顯示 PRAME 訊號。在診斷為良性的 14 個黑色素細胞痣樣本中檢測到兩個假陽性，顯示 PRAME 訊號。

從數據來看，估計的診斷靈敏度 = $136/(136+35) = 79.5\%$

從數據來看，估計的診斷特異性 = $22/(22+2) = 91.7\%$

根據我們的計算，我們得出黑色素瘤檢測的估計診斷靈敏度為 79.5%，估計診斷特異性為 91.7%。

由此我們得出結論，經 Biocare 對黑色素瘤和黑色素細胞痣樣本進行測試，PRAME [EPR20330] 抗體對黑色素瘤敏感且對黑色素瘤具有高度特異性。

故障排除：（對以下各點提供解釋）

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody

901-3252-092023

Chinese (Traditional)

BIOCARE
M E D I C A L

1. 任何玻片均未染色 - 檢查以確定是否使用了適當的陽性對照組織、抗體和檢測產品。
2. 所有玻片的弱染色 - 檢查以確定是否使用了適當的陽性對照組織、抗體和檢測產品。
3. 所有玻片的背景過多- 可能存在高水平的內源性生物素（如果使用基於生物素的檢測產品）、將色原轉化為有色最終產物的內源性HRP 活性（使用過氧化物酶塊）或過量的非特异性蛋白質交互作用（使用蛋白質封閉液，例如基於血清或酪蛋白的封閉液）。
4. 孵育過程中組織切片會從載玻片上洗掉 - 檢查載玻片以確保它們帶正電。
5. 特异性染色太深 - 檢查實驗方案以確定是否對玻片應用了正確的抗體滴度以及所有試劑的正確孵育時間。此外，確保方案有足夠的清洗步驟，以便在孵育步驟完成後去除多餘的試劑。

在任何附屬、關聯或關聯。Ventana®、BenchMark®、ultraView 和 OptiView 是羅氏的商標。

Q 系列抗體由 Biocare Medical LLC 單獨開發，並不表示 Leica Biosystems 對 Biocare 抗體的批准或認可。Biocare 和 Leica Biosystems 不存在任何附屬、關聯或關聯。Leica、Leica Biosystems、BOND-MAX 和 BOND-III 是 Leica Biosystems 的商標。

安全性和效能摘要可在此處找到：<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>。

參考：

1. Kiernan JA. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. J Histotechnol. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. Biotech Histochem. 1996 Jan;71(5):263-70.
6. Center for Disease Control Manual. Guide: Safety Management, NO. CDC-22, Atlanta, GA. April 30, 1976 "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts."
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
8. CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011
9. College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. [Http://www.cap.org](http://www.cap.org) (800) 323-4040.
10. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
11. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques. Histochemistry 1987; 86:471-478.
12. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Lab Med 1983;14:767.
13. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradishperoxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. Am J Clin Path 1980;73:626.
14. Herman GE and Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech & Histochem 1991;66:194.
15. Zhang W, et al. PRAME expression and promoter hypermethylation in epithelial ovarian cancer. Oncotarget, 2016 Jul; 7(29):45352-69.
16. Lezcano C, et al. PRAME expression in melanocytic tumors. Am J Surg Pathol. 2018 Nov; 42(11):1456-65.

Ultraline 抗體由 Biocare Medical LLC 單獨開發，並不表示 Ventana Medical Systems, Inc 或羅氏批准或認可 Biocare 抗體。Biocare、Ventana 和羅氏不存

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Croatian

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats				
Format	Catalog Number	Description	Dilution	Diluent
Concentrate	ACI 3252 A, B	0.1, 0.5 mL	1:100	Van Gogh Yellow
Predilute	API 3252 AA, G20, H	6.0, 20, 25 mL	Ready-to-use	N/A
ONCORE Pro	OPAI 3252 T60	60 tests	Ready-to-use	N/A
Q Series-- For Leica BOND-III	ALI 3252 G7	7.0 mL	Ready-to-use	N/A
UltraLine -- For BenchMark	AVI 3252 G, G25	6.0, 25 mL	Ready-to-use	N/A

Namjena:

Za *in vitro* dijagnostičku upotrebu

PRAME [EPR20330] je zečje monoklonsko protutijelo koje je namijenjeno za laboratorijsku upotrebu nakon što je početna dijagnoza tumora postavljena konvencionalnom histopatologijom korištenjem neimunoloških histokemijskih boja, u kvalitativnoj identifikaciji PRAME proteina imunohistokemijom (IHC) u parafinu fiksiranom u formalinu ugrađena (FFPE) ljudska tkiva. Kliničko tumačenje bilo kakvog bojenja ili njegovog izostanka treba nadopuniti morfološkim studijama uz korištenje odgovarajućih kontrola i treba ga procijeniti u kontekstu pacijentove kliničke povijesti i drugih dijagnostičkih testova od strane kvalificiranog patologa kao pomoć u donošenju drugih kliničkih odluka.

Sažetak i objašnjenje:

PRAME se nalazi na kromosomu 22q11.22 i kodira protein od 509 aminokiselina. PRAME je autosomni gen za antigen raka testisa (CTA) za koji se pokazalo da se eksprimira u melanomu, raznim nemelanocitnim malignim neoplazmama, uključujući karcinom pluća nemalih stanica, karcinom dojke, karcinom jajnika i nekoliko drugih navedenih. Nije poznato da normalna zdrava tkiva izražavaju PRAME osim testisa, jajnika, nadbubrežnih žlijezda i nekoliko drugih koji se navode u literaturi. ^(15,16)

Princip postupka:

Ovaj proizvod s antitijelima može se koristiti kao primarno antitijelo u imunohistokemijskom testiranju isječka tkiva fiksiranih formalinom, u parafinu. Općenito, imunohistokemijski (IHC) tehnike bojenja omogućuju vizualizaciju antigena putem sekvencijalne primjene a specifično protutijelo na antigen (primarno protutijelo), sekundarno protutijelo na primarno protutijelo (opcionalna veza protutijelo/sonda), enzimski kompleks i kromogeni supstrat s umetnutim koracima ispiranja. Enzimska aktivacija kromogena rezultira vidljivim produktom reakcije na mjestu antigena. Uzorak se zatim može obojiti i prekriti. Rezultati se tumače pomoću svjetla mikroskop i pomoć u diferencijalnoj dijagnozi patofizioloških procesa, koji mogu ili ne moraju biti povezani s određenim antigenom.

Materijali i metode:

Priloženi reagensi:

Izvor domaćina: monoklonski kunić

Reaktivnost vrste: Ljudski. Ostale vrste nisu testirane.

Klon: EPR20330

Izotip: IgG

Koncentracija proteina: Specifična koncentracija IgG: Kontaktirajte tehničku podršku tvrtke Biocare

Specifičnost: PRAME

Stanična lokalizacija: jezgra i stanična membrana

Metoda: afinitetno pročišćeni rekombinantni zečji monoklonski.

Rekonstitucija, miješanje, razrjeđivanje, titracija:

Prethodno razrijeđeni reagens za antitijela optimalno je razrijeđen za upotrebu s gore navedenim sustavima bojenja. Daljnje razrjeđivanje može rezultirati gubitkom antigenske boje. Korisnik mora potvrditi svaku takvu promjenu. Razlike u obradi tkiva i tehničkim postupcima u laboratoriju korisnika mogu proizvesti značajnu varijabilnost u rezultatima zbog čega je potrebno redovito obavljanje internih kontrola (vidi odjeljak Kontrola kvalitete).

Koncentrirani reagens zahtijeva razrjeđivanje kako je navedeno u gornjoj tablici.

Poznate primjene:

Imunohistokemija (tkiva fiksirana formalinom i parafinom)

Isporučuje se kao: puferirana slana otopina, pH 5,9-7,9 koja sadrži proteinski nosač i manje od 0,1% konzervansa natrijevog azida. Pogledajte Sigurnosno-tehnički list za dodatne pojedinosti.

Potrebni materijali i reagensi koji nisu isporučeni:

Mikroskopska stakalca pozitivno nabijena.

Pozitivne i negativne kontrole tkiva

Pustinjska komora (ili slična pećnica za sušenje)

Ksilen ili zamjena za ksilen

Etanol ili reagens alkohol

Komora za skidanje maske (lonac pod pritiskom)

Deionizirana ili destilirana voda

Pufer za pranje

Reagensi za prethodnu obradu

Blok peroksidaze

Proteinski blok (po izboru)

Sonda za detekciju i polimer

Reagensi za negativnu kontrolu

Kromogeni

Hematoksilin (kontrabojenje)

Reagens za plavljenje

Montažni medij

Pokrivno staklo

Svjetlosni mikroskop (40-400X povećanje)

Konfiguracije proizvoda s antitijelima dostupne su za upotrebu na instrumentima navedenima u gornjoj tablici.

Škladištenje i stabilnost:

Čuvati na temperaturi od 2°C do 8°C. Proizvod je stabilan do isteka roka valjanosti otisnutog na naljepnici bočice, kada se čuva pod ovim uvjetima. Ne koristiti nakon isteka roka valjanosti. Mora se provjeriti skladištenje pod bilo kojim uvjetima osim navedenih. Razrijeđene reagente treba upotrijebiti odmah; pohranite preostali reagens na 2°C do 8°C. Biocare nije utvrdio stabilnost korisnički razrijeđenog reagensa.

Pozitivne i negativne kontrole treba provesti istovremeno sa svim uzorcima pacijenata. Ako se primijeti neočekivano bojenje koje se ne može objasniti varijacijama u laboratorijskim postupcima i ako se sumnja na problem s antitijelima, obratite se Biocareovoj tehničkoj podršci na 1-800-542-2002 ili putem informacija o tehničkoj podršci na biocare.net.

Priprema uzorka:

Maramice fiksirane u formalinu prikladne su za upotrebu prije ugradnje u parafin. Koštana tkiva treba dekalificirati prije obrade tkiva kako bi se olakšalo rezanje tkiva i spriječilo oštećenje oštrica mikrotoma. ^{1,2}

Ispravno fiksirana i ugrađena tkiva koja ekspiriraju specificirani ciljni antigen trebaju biti pohranjena na hladnom mjestu. Zakon o poboljšanju



60 Berry Drive
Pacheco, CA 94553
USA

29/190



TP v3 (12/15/2021)

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080



Westervoortsedijk 60
8627 AT Arnhem
The Netherlands

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Croatian

kliničkog laboratorija (CLIA) iz 1988. zahtijeva u 42 CFR § 493.1259(b) da „laboratorij mora zadržati obojena stakalca najmanje deset godina od datuma ispitivanja i čuvati blokove uzoraka najmanje dvije godine od datuma ispitivanja.”³

Obrada tkiva prije bojenja:

Provedite toplinski inducirano vraćanje epitopa (HIER) prema dolje preporučenom protokolu. Pokazalo se da rutinska uporaba HIER-a prije IHC-a smanjuje nedosljednost i standardizira bojenje.^{4,5}

Upozorenje i mjere opreza:

- Ovo antitijelo sadrži manje od 0,1% natrijevog azida. Koncentracije manje od 0,1% nisu opasni materijali koji se ne mogu prijaviti prema US 29 CFR 1910.1200, OSHA obavijesti o opasnosti i EC Direktivi 91/155/EC. Natrijev azid (NaN₃) koji se koristi kao konzervans je otrovan ako se proguta. Natrijev azid može reagirati s olovnim i bakrenim vodovodnim instalacijama stvarajući vrlo eksplozivne metalne azide. Nakon odlaganja, isperite velikom količinom vode kako biste spriječili nakupljanje azida u vodovodu. (Centar za kontrolu bolesti, 1976., Nacionalni institut za sigurnost i zdravlje na radu, 1976.)⁶
- Uzorcima, prije i nakon fiksacije, i svim materijalima koji su im bili izloženi treba rukovati kao da mogu prenijeti infekciju i treba ih zbrinuti uz odgovarajuće mjere opreza. Nikada nemojte pipetirati reagense ustima i izbjegavajte kontakt kože i sluznice s reagensima i uzorcima. Ako reagensi ili uzorci dođu u dodir s osjetljivim područjima, operite ih velikom količinom vode.⁷
- Mikrobna kontaminacija reagensa može rezultirati povećanjem nespecifičnog bojenja.
- Vremena inkubacije ili temperature koje nisu navedene mogu dati pogrešne rezultate. Korisnik mora potvrditi svaku takvu promjenu.
- Nemojte koristiti reagens nakon isteka roka valjanosti otisnutog na bočici.
- Prethodno razrijeđeni reagens za antitijela je optimalno razrijeđen za upotrebu. Daljnje razrjeđivanje može rezultirati gubitkom antigenske boje.
- Razrjeđivanje koncentriranog reagensa protutijela mora se provjeriti prije upotrebe. Bilo koje upotrijebljeni razrjeđivač koji nije izričito preporučen također mora biti potvrđen za kompatibilnost i stabilnost.
- Odložite sve korištene reagense i bilo koji drugi kontaminirani materijal za jednokratnu upotrebu prema postupcima za zarazni ili potencijalno zarazni otpad. Odgovornost je svakog laboratorija postupati s krutim i tekućim otpadom u skladu s njihovom prirodom i stupnjem opasnosti te ga tretirati i zbrinjavati (ili dati ih obraditi i zbrinuti) u skladu s primjenjivim propisima.
- Slijedite lokalne propise o odlaganju za svoju lokaciju zajedno s preporukama u sigurnosno-tehničkom listu kako biste utvrdili sigurno odlaganje ovog proizvoda
- STL je dostupan na zahtjev i nalazi se na <http://biocare.net>.
- Za prijavu sumnje na ozbiljne incidente povezane s ovim uređajem obratite se lokalnom predstavniku tvrtke Biocare i nadležnom tijelu države članice ili države u kojoj korisnik ima poslovni nastan.

Upute za korištenje:

Preporučeni protokoli bojenja za PRAME [EPR20330]:

IntelliPATH FLX and manual use:

API3252 za IntelliPATH FLX i ručnu upotrebu, standardiziran je s MACH 4 sustavom detekcije. Koristite TBS za korake pranja.	
Peroxide Block:	Blokirajte 5 minuta s Peroxidized 1.
Pretreatment:	Izvršite povrat topline koristeći Borg Decloaker. Konkretne upute potražite u podatkovnoj tablici Borg Decloaker- a.
Protein Block (Optional):	Inkubirajte 5-10 minuta na sobnoj temperaturi uz Background Punisher.
Primary Antibody:	Inkubirajte 30 minuta na sobnoj temperaturi.
Detection:	Sonda: N/A

BIOCARE
M E D I C A L

	Polimer: Inkubirajte 30 minuta na sobnoj temperaturi sa sekundarno konjugiranim polimerom.
Chromogen:	Inkubirajte 5 minuta na sobnoj temperaturi s Biocare DAB – ILI – Inkubirajte 5-7 minuta na sobnoj temperaturi s Warp Red.
Counterstain	Kontrabojanje hematoksilinom. Isprati deioniziranom vodom. Nanesite Tachinu Bluing otopinu na 1 minutu. Isprati deioniziranom vodom.

ONCORE Pro Automated Slide Staining System:

OPAI3252 je namijenjen za korištenje s ONCORE Pro. Posebne upute za uporabu potražite u korisničkom priručniku. Parametri protokola u uređivaču protokola trebaju biti programirani na sljedeći način:		
Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	PRAME Rb	PRAME Rb AP
Protocol Template (Description):	Poseban predložak (Potrebno otkrivanje ONCORE Protect)	Rb AP predložak 1
Dewaxing (DS Buffer Option):	DS2-50	DS međuspremnik
Antigen Retrieval (AR Option):	AR1, visoki pH; 103°C	AR1, visoki pH; 103°C
Block Option:	Pufer	Pufer
Reagent Name, Time, Temp.:	PRAME Rb, 45 min., 25°C	PRAME Rb, 30 min., 25°C

Ventana BenchMark ULTRA:

AVI3252 je namijenjen za korištenje s BenchMark ULTRA. Posebne upute za uporabu potražite u korisničkom priručniku. Preporučeni parametri protokola su sljedeći:	
Template/Detection:	OptiView DAB IHC
Pretreatment Protocol:	CC1 64 minute
Peroxidase:	Pre-primarni inhibitor peroksidaze
Primary Antibody:	32 minute, 36°C

O Series – For Leica BOND-III:

ALI3252 je namijenjen za korištenje s Leica BOND-III. Posebne upute za uporabu potražite u korisničkom priručniku. Preporučeni parametri protokola su sljedeći:		
Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	IHC Protocol F	IHC Protocol J
Detection:	Bond Polymer Refine	Bond Polymer Refine Red
HIER:	20 min s ER2	20 min s ER2
Peroxide Block:	5 min	
Marker (Primary Antibody):	15 min	15 min
Post Primary:	8 min	
Polymer:	8 min	
Post Primary AP:		20 min
Polymer AP:		30 min
Mixed Chromogen Refine:	10 min	10 min + 5 min
Hematoxylin:	5 min	5 min

Kontrola kvalitete:

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Croatian

BIOCARE
M E D I C A L

Pogledajte standarde kvalitete CLSI za dizajn i provedbu imunohistokemijskih testova; Odobrene smjernice-drugo izdanje (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA SAD (www.clsi.org). 2011⁸

Pozitivna kontrola tkiva: Melanom, normalan testis

Materijali za vanjsku pozitivnu kontrolu trebaju biti svježi uzorci fiksirani, obrađeni i ugrađeni što je prije moguće na isti način kao i uzorci pacijenata. Pozitivne kontrole tkiva indikativne su za pravilno pripremljena tkiva i pravilne tehnike bojenja. Jedna pozitivna vanjska kontrola tkiva za svaki niz uvjeta ispitivanja treba biti uključena u svako bojenje.

Tkiva koja se koriste za materijale za vanjsku pozitivnu kontrolu trebaju se odabrati iz uzoraka pacijenata s dobro karakteriziranim niskim razinama pozitivne ciljne aktivnosti koja daje slabo pozitivno bojenje. Niska razina pozitivnosti za vanjske pozitivne kontrole osmišljena je kako bi se osiguralo otkrivanje suptilnih promjena u primarnoj osjetljivosti antitijela zbog nestabilnosti ili problema s IHC metodologijom. Komercijalno dostupna kontrolna stakalca tkiva ili uzorci obrađeni na drugačiji način od uzorka(a) pacijenta potvrđuju samo učinkovitost reagensa, a ne potvrđuju pripremu tkiva.

Poznate pozitivne kontrole tkiva trebale bi se koristiti samo za praćenje ispravne učinkovitosti obrađenih tkiva i testnih reagensa, a ne kao pomoć u formuliranju specifične dijagnoze uzoraka pacijenata. Ako pozitivne kontrole tkiva ne pokažu pozitivno bojenje, rezultate testnih uzoraka treba smatrati nevažecima.

Negativna kontrola tkiva:

Upotrijebite negativnu kontrolu tkiva (za koju se zna da je PRAME negativna) fiksiranu, obrađenu i ugrađenu na način identičan uzorcima pacijenta sa svakim bojenjem kako biste potvrdili specifičnost IHC primarnog protutijela za demonstraciju ciljnog antigena i davanje indikacije specifičnog pozadinskog bojenja (lažno pozitivno bojenje). Također, raznolikost različitih tipova stanica prisutnih u većini dijelova tkiva može koristiti ih laboratorij kao mjesta interne negativne kontrole za provjeru rada IHC-a tehnički podaci. Vrste i izvori uzoraka koji se mogu koristiti za negativno tkivo kontrole su navedene u odjeljku Karakteristike izvedbe.

Ako dođe do specifičnog bojenja (lažno pozitivno bojenje) u negativnoj kontroli tkiva, rezultate s uzorcima pacijenata treba smatrati nevažecima.

Nespecifična negativna kontrola reagensa:

Upotrijebite nespecifičnu negativnu kontrolu reagensa umjesto primarnog protutijela s dijelom svakog pacijentovog uzorka za procjenu nespecifičnog bojenja i omogućuju bolje tumačenje specifičnog bojenja na mjestu antigena. U idealnom slučaju, negativna kontrola reagensa sadrži PRAME IgG antitijelo proizvedeno iz supernatanta kulture tkiva na isti način kao primarni antitijelo, ali ne pokazuje specifičnu reaktivnost s ljudskim tkivima u istoj matrici/otopini kao Biocare antitijelo. Razrijedite negativnu kontrolnu protutijelo na istu koncentraciju imunoglobulina ili proteina kao razrijeđeno primarno antitijelo korištenjem identičnog razrjeđivača. Ako se fetalni teleći serum zadrži u čistom antitijelu nakon obrade, fetalni teleći serum u koncentraciji proteina koja je jednaka razrijeđenom primarno protutijelo u istom razrjeđivaču također je prikladno za upotrebu. (Pogledajte isporučeni reagens). Sam razrjeđivač može se koristiti kao manje poželjna alternativa prethodno opisanim negativnim kontrolama reagensa. Razdoblje inkubacije za negativnu kontrolu reagensa treba odgovarati onom primarnog protutijela.

Kada se paneli nekoliko protutijela koriste na serijskim presjecima, negativno obojena područja jednog stakalca mogu poslužiti kao negativna/nespecifična pozadinska kontrola za druga protutijela. Kako bi se razlikovala endogena aktivnost enzima ili nespecifično vezanje enzima od specifične imunoreaktivnosti, dodatna tkiva bolesnika mogu se obojiti isključivo supstrat-kromogenom ili enzimskim kompleksima (PAP, avidin-biotin, streptavidin) odnosno supstrat-kromogenom.

Provjera testa:

Prije početne upotrebe antitijela ili sustava za bojenje u dijagnostičkom postupku, korisnik bi trebao potvrditi specifičnost antitijela testiranjem na nizu kućnih tkiva s poznatim karakteristikama imunohistokemijske učinkovitosti koja predstavljaju poznata pozitivna i negativna tkiva. Pogledajte postupke kontrole kvalitete koji su prethodno opisani u ovom odjeljku uputa za proizvod i preporuke za kontrolu kvalitete Programa certifikacije CAP⁹ za imunohistokemiju i/ili NCCLS IHC smjernice¹⁰). Ove postupke kontrole kvalitete treba ponoviti za svaku novu seriju antitijela ili kad god dođe do promjene parametara testa. Tkiva navedena u Odjeljku o karakteristikama rada prikladna su za provjeru testa.

Rješavanje problema:

Slijedite preporuke protokola specifičnih za antitijela u skladu s dostavljenom podatkovnom tablicom. Ako se pojave netipični rezultati, kontaktirajte Biocare tehničku podršku na 1-800-542-2002.

Tumačenje bojenja:

Pozitivna kontrola tkiva:

Prvo treba ispitati pozitivnu kontrolu tkiva obojenu navedenim protutijelima kako bi se utvrdilo da svi reagensi ispravno funkcioniraju. Odgovarajuće bojenje ciljnih stanica (kako je gore navedeno) pokazatelj je pozitivne reaktivnosti. Ako pozitivne kontrole tkiva ne pokažu pozitivno bojenje, sve rezultate s ispitnim uzorcima treba smatrati nevažecima.

Boja produkta reakcije može varirati ovisno o korištenim kromogenima supstrata. Za očekivane reakcije boja pogledajte upute za pakiranje supstrata. Nadalje, metakromazija se može uočiti u varijacijama metode bojenja.¹¹

Kada se koristi protubojenje, ovisno o duljini inkubacije i jačini korištenog protubojenja, suprotno bojenje će rezultirati obojenjem staničnih jezgri. Pretjerano ili nepotpuno kontrastno bojenje može ugroziti pravilno tumačenje rezultata. Pogledajte protokol(e) za preporučeno kontrastno bojenje.

Negativna kontrola tkiva :

Negativnu kontrolu tkiva treba ispitati nakon pozitivne kontrole tkiva kako bi se potvrdila specifičnost označavanja ciljnog antigena primarnim protutijelom. Odsutnost specifičnog bojenja u negativnoj kontroli tkiva potvrđuje nedostatak unakrsne reaktivnosti protutijela na stanice/stanične komponente. Ako dođe do specifičnog bojenja (lažno pozitivno bojenje) u negativnoj vanjskoj kontroli tkiva, rezultate uzorka s pacijenta treba smatrati nevažecima.

Nespecifično bojenje, ako je prisutno, obično ima difuzan izgled. Sporadično bojenje vezivnog tkiva također se može primijetiti u dijelovima tkiva koji su previše fiksirani formalinom. Koristite intaktne stanice za tumačenje rezultata bojenja. Nekrotične ili degenerirane stanice često se boje nespecifično.

Tkivo pacijenta:

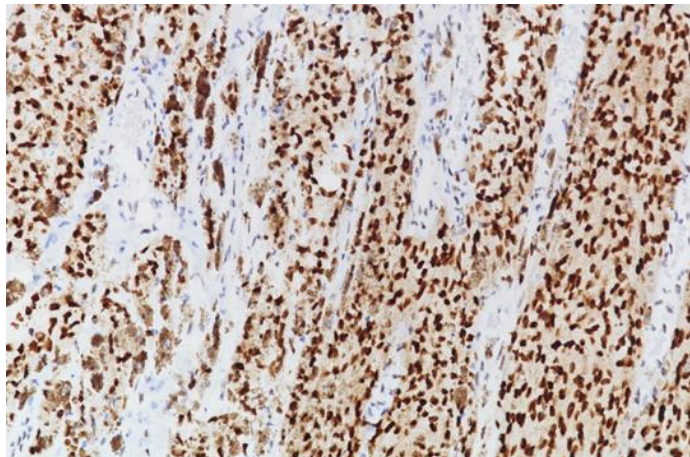
Pregledajte uzorke pacijenata obojene navedenim protutijelima posljednji. Intenzitet pozitivnog bojenja treba procijeniti u kontekstu bilo kojeg nespecifičnog pozadinskog bojenja negativne kontrole reagensa. Kao i kod svakog imunohistokemijskog testa, negativan rezultat znači da antigen nije otkriven, a ne da antigen nije bio prisutan u testiranim stanicama/tkivu. Ako je potrebno, upotrijebite panel protutijela za identifikaciju lažno negativnih reakcija.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Croatian

BIOCARE
M E D I C A L



Melanom obojen PRAME [EPR20330] protutijelom.

Pogledajte Sažetak i objašnjenje, Ograničenja i Radne karakteristike za specifične informacije u vezi s indiciranim imunoreaktivnošću protutijela.

Ograničenja:

Opća ograničenja:

1. Za *in vitro* dijagnostičku upotrebu
2. Ovaj proizvod je samo za profesionalnu upotrebu: Imunohistokemija je višestupanjski dijagnostički proces koji se sastoji od specijalizirane obuke u odabiru odgovarajućih reagensa; selekcija, fiksacija i obrada tkiva; priprema IHC stakalca; i tumačenje rezultata bojenja.
3. Bojanje tkiva ovisi o rukovanju i obradi tkiva prije bojenja. Neodgovarajuće fiksiranje, zamrzavanje, odmrzavanje, pranje, sušenje, zagrijavanje, rezanje ili kontaminacija drugim tkivima ili tekućinama može proizvesti artefakte, hvatanje antitijela ili lažno negativne rezultate. Nedosljedni rezultati mogu biti posljedica varijacija u metodama fiksacije i ugradnje ili inherentnih nepravilnosti unutar tkiva.¹²
4. Pretjerano ili nepotpuno kontrastno bojenje može ugroziti pravilno tumačenje rezultata.
5. Kliničku interpretaciju bilo kojeg pozitivnog ili negativnog bojenja treba procijeniti u kontekstu kliničke slike, morfologije i drugih histopatoloških kriterija. Kliničku interpretaciju bilo kojeg pozitivnog ili negativnog bojenja treba nadopuniti morfološkim studijama uz korištenje odgovarajućih pozitivnih i negativnih unutarnjih i vanjskih kontrola, kao i drugih dijagnostičkih testova. Odgovornost je kvalificiranog patologa koji je upoznat s pravilnom upotrebom IHC protutijela, reagensa i metoda za tumačenje svih koraka korištenih za pripremu i tumačenje konačnog IHC pripravka.
6. Optimalno razrjeđenje protutijela i protokoli za određenu primjenu mogu varirati. To uključuje, ali nije ograničeno na fiksaciju, metodu vraćanja topline, vrijeme inkubacije, debljinu presjeka tkiva i korišteni pribor za otkrivanje. Zbog vrhunske osjetljivosti ovih jedinstvenih reagensa, navedena preporučena vremena inkubacije i titri nisu primjenjivi na druge sustave detekcije jer rezultati mogu varirati. Preporuke i protokoli u podatkovnom listu temelje se na isključivoj upotrebi Biocare proizvoda. U konačnici, odgovornost je istraživača da odredi optimalne uvjete.
7. Ovaj proizvod nije namijenjen za upotrebu u protočnoj citometriji. Radne karakteristike nisu utvrđene za protočnu citometriju.
8. Tkiva osoba zaraženih virusom hepatitisa B i koja sadrže površinski antigen hepatitisa B (HBsAg) mogu pokazivati nespecifično obojenje peroksidazom hrena.¹³
9. Reagensi mogu pokazati neočekivane reakcije u prethodno netestiranim tkivima. Mogućnost neočekivanih reakcija čak ni u testiranim skupinama tkiva ne može se u potpunosti eliminirati zbog biološke varijabilnosti

ekspresije antigena u novotvorinama, odnosno drugim patološkim tkivima.¹⁴ Kontaktirajte Biocare tehničku podršku na 1-800-542-2002, ili putem informacija o tehničkoj podršci na biocare.net, s dokumentiranom neočekivanom reakcijom(ama).

10. Normalni/neimuni serumi iz istog životinjskog izvora kao i sekundarni antiserumi korišteni u koracima blokiranja mogu izazvati lažno negativne ili lažno pozitivne rezultate zbog autoantitijela ili prirodnih antitijela.
11. Lažno pozitivni rezultati mogu se vidjeti zbog neimunološkog vezanja proteina ili proizvoda reakcije supstrata. Također mogu biti uzrokovane aktivnošću pseudo peroksidaze (eritrociti), endogenom aktivnošću peroksidaze (citokrom C) ili endogenim biotinom (npr. jetra, dojka, mozak, bubreg) ovisno o vrsti korištenog imunološkog bojenja.¹²

Specifična ograničenja proizvoda:

Nema dodatnih specifičnih ograničenja proizvoda.

Karakteristike izvedbe:

Ponovljivost:

Ponovljivost učinka protutijela potvrđena je testiranjem odabranog normalnog i tumorskog tkiva različitim danima i različitim instrumentima s više operatera. Bojanje odabranih tkiva bilo je dosljedno i izvedeno prema očekivanjima.

Imunoreaktivnost:

Sljedeće pozitivne i negativne imunoreaktivnosti prikazane su u tablicama 1 i 2 u nastavku.

Dolje navedeni popis nije iscrpan, ali karakterizira vrste imunoreaktivnosti uočene s navedenim protutijelima.

U ovom proizvodu nije uočena nikakva poznata nespecifična reaktivnost protutijela.

Sažetak očekivanih rezultata:

Prevalencija PRAME-a u normalnim i bolesnim tkivima procijenjena je pomoću mikronizova tkiva (TMA).

Testirana normalna tkiva obojena su prema očekivanjima, s visokim razinama bojenja uočeni u testisima i bez bojanja u drugim tkivima.

Bojanje PRAME-a opaženo je na visokoj razini u melanomu kao što se i očekivalo, te na različitim razinama u drugim tkivima raka kao što su jajnici, pluća, prostata i dojke.

Analitička izvedba:

Provedeni su testovi bojenja za osjetljivost i specifičnost, a rezultati su navedeni u nastavku.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Croatian

BIOCARE
M E D I C A L

Osjetljivost i specifičnost:

Tablica 1: Osjetljivost i specifičnost protutijela određena je testiranjem FFPE normalnih tkiva.

Tkivo	Pozitivni slučajevi	Ukupno slučajeva
Veliki mozak	0	6
Cerebelum	0	3
Nadbubrežne žlijezde	0	3
Jajnik	0	3
Gušterača	0	3
Dušnik	0	3
Hipofiza	0	3
Testis*	3	3
Štitnjača	0	3
Grudi	0	3
Slezena	0	3
Krajnik	0	3
Thymus	0	3
Koštana srž**	0	1
Pluća	0	3
Srce	0	3
Jednjak	0	3
Trbuh	0	3
Tanko crijevo	0	3
Debelo crijevo	0	3
Jetra	0	3
Žlijezda slinovnica	0	3
Bubreg	0	3
Prostata	0	3
Maternica	0	3
Cerviks	0	3
Skeletni mišić	0	3
Koža	0	3
Periferni živac	0	3
Oblaganje stanica	0	3
Glava, vrat i žlijezda slinovnica	0	6
Limfni čvor	0	3

* Nuklearno bojenje jačine 3-4

** Nedostaju dva uzorka

Tablica 2: Osjetljivost i specifičnost protutijela određena je testiranjem različitih FFPE neoplastičnih tkiva.

Patologija	Pozitivni slučajevi	Ukupno slučajeva
Melanoma	29	39
Rak jajnika	9	44
Rak dojke	10	26
Rak crijeva	4	43
Rak pluća	21	50
Rak prostate	18	41
Adrenokortikalni karcinom	0	1
Rak mjehura	0	2
Meningeom	0	2
Astroцитom	0	1
Karcinom skvamoznih stanica (jednjaka)	0	2
Adenokarcinom (želudac)	0	2
Adenokarcinom (tankog crijeva)	0	1
Adenokarcinom (kolon i rektum)	0	6
Rak bubrega	0	2
Rak jetre	0	4
Limfom	0	3
Karcinom skvamoznih stanica (glava i vrat, usna šupljina, jezik)	0	1
Nazofaringealni karcinom	1	1
Adenokarcinom (gušterače)	0	1
Adenokarcinom (prostate)	0	2
Adenoidno cistični karcinom (glava i vrat, žlijezda slinovnica)	0	1
Karcinom skvamoznih stanica (kože)	0	1
Seminoma	0	2
Rak štitnjače	0	2
Rak grlića maternice	0	2
Rak endometrija	1	2

Ekspresija PRAME u različitim neoplazmama može pokazivati varijabilni postotak tumorske pozitivnosti. Pogledajte Tablicu 3 za postotke pozitivno obojenih tumorskih stanica (kategorizirane po kvartilima) opažene u različitim neoplazmama koje se nalaze u Tablici 2.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Croatian

BIOCARE
M E D I C A L

Tablica 3: Postotak pozitivnih tumorskih stanica u različitim neoplazmama FFPE.

Maramice	Postotak obojenja stanica tumora # slučajeva koji pokazuju postotak bojenja od ukupnog broja slučajeva (%)				
	<1%	1-25%	26-50%	51-75%	> 75%
Rak jajnika	35/44 (79,5%)	2/44 (4,5%)	3/44 (6,8%)	3/44 (6,8%)	1/44 (2,3%)
Rak dojke	16/26 (61,5%)	7/26 (26,9%)	1/26 (3,8%)	2/26 (7,7%)	0 (0%)
Rak crijeva	39/43 (88,4%)	4/43 (11,6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Rak pluća	29/50 (58,0%)	7/50 (14,0%)	4/50 (8,0%)	7/50 (14,0%)	3/50 (6,0%)
Rak prostate	23/41 (56,1%)	9/41 (22,0%)	3/41 (7,3%)	2/41 (4,9%)	4/41 (9,8%)
Nazofaringealni karcinom	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1/1 (100%)
Rak endometrija	1/2 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	1/2 (50%)	0 (0%)
Melanoma	10/39 (25,6%)	6/39 (15,4%)	5/39 (12,8%)	6/39 (15,4%)	12/39 (30,8%)

*Postotak obojenja tumorskih stanica prikazan za sve intenzitete bojenja.
Bojanje na tkivima pokazuje različite razine ekspresije PRAME proteina.*

Rezultati analitičkog testiranja učinkovitosti pokazali su da protutijelo PRAME [EPR20330] može ispravno detektirati protein PRAME pri korištenju definiranog IHC protokola. Abnormalni rezultati testa tkiva podržavaju zaključak da je PRAME [EPR20330] osjetljiv na protein PRAME kada se koriste preporučeni IHC protokoli. Antitijelo PRAME [EPR20330] može detektirati niske do visoke razine proteina PRAME. Testiranje normalnog tkiva nije pokazalo neočekivano otkrivanje PRAME-a u 32 tipa tkiva. Nije bilo neočekivane križne reakcije. Rezultati podupiru tvrdnju da je protutijelo PRAME [EPR20330] visoko specifično (analitička specifičnost) za protein PRAME.

Klinička izvedba:

Provedeni su testovi bojenja za dijagnostičku osjetljivost i specifičnost, a rezultati su navedeni u nastavku. Pozitivna i negativna imunoreaktivnost zabilježena je u tablici 4.

Tri slajda TMA melanoma obojena su u Biocareu i poslana vanjskom patologu na očitavanje i ocjenu. Tkiva melanoma pokazala su različite rezultate bojanja u rasponu od 0 (negativno) do jakog (4). Većina melanocitnih nevusa nije pokazala PRAME reaktivnost, ali nekoliko ih je imalo jaku reaktivnost.

Tablica 4: Postotak pozitivnog bojenja tumorskih stanica u različitim FFPE melanocitnim neoplazmama i koži.

Maramice	Postotak obojenja stanica tumora # slučajeva koji pokazuju postotak bojenja od ukupnog broja slučajeva (%)				
	<1%	1-25%	26-50%	51-75%	> 75%
Melanoma	28/133 (21,1%)	50/133 (37,6%)	10/133 (7,5%)	8/133 (6,0%)	37/133 (27,8%)
Metastatski melanom	7/38 (18,4%)	10/38 (26,3%)	3/38 (7,9%)	2/38 (5,3%)	16/38 (42,1%)
Melanocitni nevusi	12/14 (85,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2/12 (14,3%)
Koža	10/10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

*Postotak obojenja tumorskih stanica prikazan za sve intenzitete bojenja.
Bojanje na tkivima pokazuje različite razine ekspresije PRAME proteina.*

Primarna krajnja točka testa bila je procjena dijagnostičke osjetljivosti PRAME [EPR20330] protutijela u IHC postupku, definirana kao stopa otkrivanja pozitivnog melanoma u potvrđeno pozitivnim uzorcima. [TP/(TP+FN)]

Sekundarna krajnja točka bila je procjena dijagnostičke specifičnosti - negativna stopa otkrivanja za potvrđene uzorke negativne na melanom. [TN/(TN+FP)]

Bilo je 35 lažno negativnih slučajeva melanoma koji su dobili zlatnu standardnu patološku procjenu kao melanom, ali su bili negativni za PRAME. 136 slučajeva bilo je stvarno pozitivno jer im je dijagnosticiran melanom i pokazali su signal za PRAME. Dva lažno pozitivna rezultata otkrivena su u 14 uzoraka melanocitnih nevusa koji su dijagnosticirani kao benigni, a koji su pokazali signal za PRAME.

Iz podataka, procijenjena dijagnostička osjetljivost = $136 / (136 + 35) = 79,5\%$

Iz podataka, procijenjena dijagnostička specifičnost = $22 / (22 + 2) = 91,7\%$

Na temelju naših izračuna dolazimo do procijenjene dijagnostičke osjetljivosti od 79,5% i procijenjene dijagnostičke specifičnosti od 91,7% za otkrivanje melanoma.

Iz ovoga zaključujemo da je protutijelo PRAME [EPR20330], kako ga je Biocare testirao na uzorcima melanoma i melanocitnih nevusa, osjetljivo na melanom i vrlo specifično za melanom.

Rješavanje problema: (Navedite objašnjenje za svaku od točaka u nastavku)

1. Nema bojanja niti na jednom predmetnom stakalcu – Provjerite jesu li korištena odgovarajuća pozitivna kontrola tkiva, antitijela i proizvoda za otkrivanje.
2. Slabo bojenje svih stakalca – Provjerite je li korišteno odgovarajuće tkivo pozitivne kontrole, antitijela i proizvodi za otkrivanje.
3. Prevelika pozadina svih stakalca – Mogu postojati visoke razine endogenog biotina (ako se koriste proizvodi za detekciju na bazi biotina), endogena HRP aktivnost koja pretvara kromogen u obojeni krajnji proizvod (koristite blok peroksidaze) ili prekomjerna nespecifična interakcija proteina (koristite protein blok, kao što je otopina za blokiranje na bazi seruma ili kazeina).
4. Dijelovi tkiva ispiru se sa stakalca tijekom inkubacije – Provjerite stakalca kako biste bili sigurni da su pozitivno nabijena.
5. Specifično bojenje pretamno – Provjerite protokol kako biste utvrdili je li na stakalcu primijenjen ispravan titar protutijela, kao i ispravna

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Croatian

BIOCARE
M E D I C A L

vremena inkubacije za sve reagense. Osim toga, osigurajte da protokol ima dovoljno koraka ispiranja za uklanjanje viška reagensa nakon završetka koraka inkubacije.

Reference:

1. Kiernan JA. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. *Theory and Practice of Histotechnology*. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. *J Histotechnol*. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. *Biotech Histochem*. 1996 Jan;71(5):263-70.
6. Center for Disease Control Manual. Guide: Safety Management, NO. CDC-22, Atlanta, GA. April 30, 1976 "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts."
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition* CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
8. CLSI *Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2)* CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011
9. College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. [Http://www.cap.org](http://www.cap.org) (800) 323-4040.
10. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. *Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline*. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
11. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. *Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques*. *Histochemistry* 1987; 86:471-478.
12. Nadji M, Morales AR. *Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls*. *Lab Med*1983;14:767.
13. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. *Nonimmunologic binding of horseradishperoxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry*. *Am J Clin Path* 1980;73:626.
14. Herman GE and Elfont EA. *The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control*. *Biotech & Histochem* 1991;66:194.
15. Zhang W, et al. *PRAME expression and promoter hypermethylation in epithelial ovarian cancer*. *Oncotarget*, 2016 Jul; 7(29):45352-69.
16. Lezczano C, et al. *PRAME expression in melanocytic tumors*. *Am J Surg Pathol*. 2018 Nov; 42(11):1456-65.

Ultraline razvila je isključivo tvrtka Biocare Medical LLC i ne impliciraju odobrenje ili podršku Biocare antitijela od strane Ventana Medical Systems, Inc ili Roche. Biocare, Ventana i Roche nisu ni na koji način povezani, povezani ili povezani. Ventana®, BenchMark®, ultraView i OptiView zaštitni su znakovi tvrtke Roche.

Protutijela serije Q razvila je isključivo tvrtka Biocare Medical LLC i ne podrazumijevaju odobrenje ili podršku Biocare protutijela od strane Leica Biosystems. Biocare i Leica Biosystems nisu ni na koji način povezani, povezani ili povezani. Leica, Leica Biosystems, BOND-MAX i BOND-III zaštitni su znakovi tvrtke Leica Biosystems.

Sažetak sigurnosti i učinkovitosti možete pronaći ovdje:
<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Czech

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats				
Format	Catalog Number	Description	Dilution	Diluent
Concentrate	ACI 3252 A, B	0.1, 0.5 mL	1:100	Van Gogh Yellow
Predilute	API 3252 AA, G20, H	6.0, 20, 25 mL	Ready-to-use	N/A
ONCORE Pro	OPAI 3252 T60	60 tests	Ready-to-use	N/A
Q Series-- For Leica BOND-III	ALI 3252 G7	7.0 mL	Ready-to-use	N/A
UltraLine -- For BenchMark	AVI 3252 G, G25	6.0, 25 mL	Ready-to-use	N/A

Zamýšlené použití:

Pro diagnostické použití *in vitro*

PRAME [EPR20330] je králičí monoklonální protilátka, která je určena k laboratornímu použití po prvotní diagnóze nádoru konvenční histopatologií s použitím neimunologického histochemického barvení, při kvalitativní identifikaci proteinu PRAME imunohistochemicky (IHC) v parafinu fixovaném formalínem. embedded (FFPE) lidských tkání. Klinická interpretace jakéhokoli zbarvení nebo jeho nepřítomnosti by měla být doplněna morfoloogickými studii s použitím vhodných kontrol a měla by být vyhodnocena v kontextu pacientovy klinické anamnézy a dalších diagnostických testů kvalifikovaným patologem jako pomůcka při provádění jakýchkoli dalších klinických stanovení.

Shrnutí a vysvětlení:

PRAME se nachází na chromozomu 22q11.22 a kóduje protein o 509 aminokyselinách. PRAME je gen autosomálního karcinomu varlat antigenu (CTA), u kterého bylo prokázáno, že je exprimován u melanomu, různých nemelanocytárních maligních novotvarů, včetně nemalobuněčného karcinomu plic, karcinomu prsu, karcinomu vaječníků a několika dalších citovaných. Není známo, že by normální zdravé tkáně exprimovaly PRAME kromě varlat, vaječníků, nadledvin a několika dalších citovaných v literatuře. (15,16)

Princip postupu:

Tento protilátkový produkt může být použit jako primární protilátka při imunohistochemickém testování formalínem fixovaných, parafinem zalitých tkáňových řezů. Obecně platí, že imunohistochemické (IHC) techniky barvení umožňují vizualizaci antigenů prostřednictvím sekvenční aplikace a specifická protilátka k antigenu (primární protilátka), sekundární protilátka k primární protilátce (volitelná vazba protilátka/sonda), enzymový komplex a chromogenní substrát s vloženými promývacími kroky. Enzymatická aktivace chromogenu vede k viditelnému reakčnímu produktu v místě antigenu. Vzorek pak může být kontrastně obarven a kryt nasunut. Výsledky jsou interpretovány pomocí světla mikroskop a pomůcka při diferenciální diagnostice patofyziologických procesů, které mohou popř nemusí být spojen s konkrétním antigenem.

Materiály a metody:

Dodávaná činidla:

Zdroj hostitele: Králičí monoklonální

Druhá reaktivita: Člověk. Jiné druhy nebyly testovány.

Klon: EPR20330

Izotyp: IgG

Koncentrace proteinu: Specifická koncentrace IgG: Kontaktujte technickou podporu Biocare

Specifičnost: PRAME

Buněčná lokalizace: Jádro a buněčná membrána

Metoda: Afinitně purifikovaný rekombinantní králičí monoklonální.

Rekonstituce, míchání, ředění, titrace:

Předředěné protilátkové činidlo je optimálně naředěno pro použití s výše uvedenými barvicími systémy. Další ředění může vést ke ztrátě barvení antigenu. Uživatel musí každou takovou změnu potvrdit. Rozdíly ve zpracování tkání a technických postupech v laboratoři uživatele mohou

způsobit značnou variabilitu výsledků, což vyžaduje pravidelné provádění interních kontrol (viz část Kontrola kvality).
Koncentrované činidlo vyžaduje ředění, jak je uvedeno v tabulce výše.

Známé aplikace:

Imunohistochemie (tkáňě zalité v parafinu fixované formalínem)

Dodává se jako: Pufrovaný fyziologický roztok, pH 5,9-7,9 obsahující proteinový nosič a méně než 0,1 % konzervační látky azidu sodného. Další podrobnosti viz Bezpečnostní list.

Potřebné materiály a činidla, které nejsou součástí dodávky:

Mikroskopická sklíčka kladně nabitá.
Pozitivní a negativní tkáňové kontroly
Pouštní komora (nebo podobná sušárna)
Xylen nebo náhrada xylyenu
Ethanol nebo reagenční alkohol
Odmašťovací komora (tlakový hrnec)
Deionizovaná nebo destilovaná voda
Promývací pufr
Činidla pro předúpravu
Peroxidázový blok
Proteinový blok (volitelné)
Detekční sonda a polymer
Negativní kontrolní činidla
Chromogeny
Hematoxylin (kontrabarva)
Blueingovo činidlo
Montážní médium
Krycí sklo
Světelný mikroskop (40-400x zvětšení)

Konfigurace protilátkového produktu jsou k dispozici pro použití s nástroji uvedenými v tabulce výše.

Skladování a stabilita:

Skladujte při teplotě 2°C až 8°C. Při skladování za těchto podmínek je přípravek stabilní do data expirace vytištěného na štítku lahvičky. Nepoužívejte po uplynutí doby použitelnosti. Skladování za jakýchkoliv jiných než uvedených podmínek musí být ověřeno. Zředěná činidla by měla být použita okamžitě; veškeré zbývající činidlo skladujte při teplotě 2°C až 8°C. Stabilita uživatelem naředěného činidla nebyla společností Biocare stanovena.

Pozitivní a negativní kontroly by měly být prováděny současně se všemi vzorky pacientů. Pokud zpozorujete neočekávané zbarvení, které nelze vysvětlit odchylkami v laboratorních postupech, a máte podezření na problém s protilátkou, kontaktujte technickou podporu Biocare na čísle 1-800-542-2002 nebo prostřednictvím informací o technické podpoře na biocare.net.

Příprava vzorku:

Tkáňě fixované ve formalínu jsou vhodné pro použití před zalitím parafínem. Kostní tkáň by měla být před zpracováním tkáňě odvápňena, aby se usnadnilo řezání tkáňě a zabránilo se poškození čepelí mikrotomu.^{1, 2}



60 Berry Drive
Pacheco, CA 94553
USA

36/190



TP v3 (12/15/2021)

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080



Westervoortsedijk 60
8627 AT Arnhem
The Netherlands

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Czech

BIOCARE
M E D I C A L

Správně fixované a zapuštěné tkáně exprimující specifikovaný cílový antigen by měly být skladovány na chladném místě. Zákon o zlepšování klinických laboratorí (CLIA) z roku 1988 vyžaduje v 42 CFR § 493.1259(b), že „Laboratoř musí uchovávat obarvená sklíčka nejméně deset let od data vyšetření a uchovávat bloky vzorků nejméně dva roky od data vyšetření.“³

Ošetření tkání před barvením:

Provedte Heat Induced Epitope Retrieval (HIER) podle doporučeného protokolu níže. Ukázalo se, že rutinní použití HIER před IHC minimalizuje nekonzistenci a standardizuje barvení.^{4,5}

Upozornění a bezpečnostní opatření :

1. Tato protilátka obsahuje méně než 0,1 % azidu sodného . Koncentrace nižší než 0,1 % nejsou podle US 29 CFR 1910.1200, sdělení OSHA Hazard a směrnice EC 91/155/EC nebezpečnými materiály, které nelze hlásit. Azid sodný (NaN₃) používaný jako konzervační prostředek je při požití toxický. Azid sodný může reagovat s oloveným a měděným potrubím za vzniku vysoce výbušných azidů kovů . Po likvidaci vypláchněte velkým množstvím vody, abyste zabránili usazování azidů v potrubí. (Centrum pro kontrolu nemoci, 1976, Národní institut bezpečnosti a ochrany zdraví při práci, 1976)⁶

2. Se vzorky před a po fixaci a se všemi materiály, které jim byly vystaveny, je třeba zacházet tak, jako by mohly přenášet infekci, a likvidovat je s náležitými opatřeními. Nikdy nepipetujte reagencie ústy a vyhněte se kontaktu kůže a sliznic s reagencemi a vzorky. Pokud se činidla nebo vzorky dostanou do kontaktu s citlivými oblastmi, omyjte je velkým množstvím vody.⁷

3. Mikrobiální kontaminace činidel může vést ke zvýšení nespecifického zbarvení.

4. Jiné než specifikované doby inkubace nebo teploty mohou vést k chybným výsledkům. Uživatel musí každou takovou změnu potvrdit.

5. Nepoužívejte činidlo po uplynutí doby použitelnosti vytištěné na lahvičce.

6. Předředěná protilátková reagencie je pro použití optimálně naředěna . Další ředění může vést ke ztrátě barvení antigenu.

7. Ředění koncentrované protilátky musí být před použitím validováno. Žádný použitý ředidlo, které není výslovně doporučeno, musí být také ověřeno z hlediska kompatibility a stability.

8. Zlikvidujte všechna použitá činidla a jakýkoli jiný kontaminovaný materiál na jedno použití podle postupů pro infekční nebo potenciálně infekční odpad. Je odpovědností každé laboratoře nakládat s pevným a kapalným odpadem podle jejich povahy a stupně nebezpečnosti a zacházet s ním a likvidovat jej (nebo je nechat zpracovat a zlikvidovat) v souladu s platnými předpisy.

9. Pro určení bezpečné likvidace tohoto produktu dodržujte místní předpisy pro likvidaci odpadu ve vaší lokalitě spolu s doporučeními v bezpečnostním listu

10. Bezpečnostní list je k dispozici na vyžádání a je umístěn na <http://biocare.net>.

11. Chcete-li nahlásit podezření na vážné incidenty související s tímto zařízením, kontaktujte místního zástupce společnosti Biocare a příslušný úřad členského státu nebo země, ve které je uživatel usazen.

Návod k použití:

Doporučené protokoly barvení pro PRAME [EPR20330]:

IntelliPATH FLX and manual use:

API3252 pro IntelliPATH FLX a ruční použití, byl standardizován s detekčním systémem MACH 4. Pro promývací kroky použijte TBS.

Peroxide Block:	Blokujte po dobu 5 minut pomocí Peroxidazed 1.
Pretreatment:	Provedte získání tepla pomocí Borg Decloaker . Konkrétní pokyny naleznete v datovém listu Borg Decloaker .
Protein Block (Optional):	Inkubujte 5-10 minut při teplotě místnosti pomocí Background Punisher.
Primary Antibody:	Inkubujte 30 minut při teplotě místnosti.

Detection:	Sonda: N/A Polymer: Inkubujte 30 minut při teplotě místnosti se sekundárním konjugovaným polymerem.
Chromogen:	Inkubujte 5 minut při RT s Biocare DAB – OR – Inkubujte 5-7 minut při RT s Warp Red.
Counterstain	Kontrabarva hematoxylinem. Opláchněte deionizovanou vodou. Aplikujte Tacha's Blueing Solution na 1 minutu. Opláchněte deionizovanou vodou.

ONCORE Pro Automated Slide Staining System:

OPAI3252 je určen pro použití s ONCORE Pro. Konkrétní pokyny k použití naleznete v uživatelské příručce. Parametry protokolu v Editoru protokolu by měly být naprogramovány následovně:

Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	PRAME Rb	PRAME Rb AP
Protocol Template (Description):	vyžadována detekce ochrany ONCORE)	Rb AP šablona 1
Dewaxing (DS Buffer Option):	DS2-50	DS Buffer
Antigen Retrieval (AR Option):	AR1, vysoké pH; 103 °C	AR1, vysoké pH; 103 °C
Block Option:	Buffer	Buffer
Reagent Name, Time, Temp.:	PRAME Rb, 45 min., 25 °C	PRAME Rb, 30 min., 25 °C

BenchMark Ventana ULTRA :

AVI3252 je určen pro použití s BenchMark ULTRA. Konkrétní pokyny k použití naleznete v uživatelské příručce. Doporučené parametry protokolu jsou následující:

Template/Detection:	OptiView DAB IHC
Pretreatment Protocol:	CC1 64 minut
Peroxidase:	Pre-primární inhibitor peroxidázy
Primary Antibody:	32 minut, 36 °C

Q Series – For Leica BOND-III:

ALI3252 je určen pro použití s Leica BOND-III. Konkrétní pokyny k použití naleznete v uživatelské příručce. Doporučené parametry protokolu jsou následující:

Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	IHC Protocol F	IHC Protocol J
Detection:	Bond Polymer Refine	Bond Polymer Refine Red
HIER:	20 minut s ER2	20 minut s ER2
Peroxide Block:	5 min	
Marker (Primary Antibody):	15 min	15 min
Post Primary:	8 min	
Polymer:	8 min	
Post Primary AP:		20 min
Polymer AP:		30 min
Mixed Chromogen Refine:	10 min	10 min + 5 min
Hematoxylin:	5 min	5 min

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Czech

BIOCARE
M E D I C A L

Kontrola kvality:

Viz standardy kvality CLSI pro návrh a implementaci imunohistochemických testů; Schválená směrnice – druhé vydání (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011⁸

Pozitivní tkáňová kontrola: Melanom, normální varle

Materiály pro externí pozitivní kontrolu by měly být čerstvé vzorky fixované, zpracované a zalité co nejdříve stejným způsobem jako vzorky pacienta. Pozitivní tkáňové kontroly ukazují na správně připravené tkáňe a správné techniky barvení. V každém cyklu barvení by měla být zahrnuta jedna pozitivní externí tkáňová kontrola pro každou sadu testovacích podmínek.

Tkáňe použité pro externí materiály pro pozitivní kontrolu by měly být vybrány ze vzorků pacientů s dobře charakterizovanou nízkou úrovní pozitivní cílové aktivity, která poskytuje slabé pozitivní barvení. Nízká úroveň pozitivity externích pozitivních kontrol je navržena tak, aby zajistila detekci jemných změn citlivosti primární protilátky z nestability nebo problémů s metodikou IHC. Komerčně dostupná tkáňová kontrolní sklíčka nebo vzorky zpracované odlišně od vzorku (vzorků) pacienta pouze ověřují účinnost reagensů a neověřují přípravu tkáňe.

Známe pozitivní tkáňové kontroly by se měly používat pouze pro monitorování správného výkonu zpracovaných tkání a testovacích činidel, spíše než jako pomůcka při formulování specifické diagnózy vzorků pacientů. Pokud pozitivní tkáňové kontroly nevykazují pozitivní zbarvení, výsledky s testovacími vzorky by měly být považovány za neplatné.

Negativní tkáňová kontrola:

Použijte negativní tkáňovou kontrolu (známou jako PRAME negativní), fixovanou, zpracovanou a zalitou stejným způsobem jako vzorek (vzorky) pacienta s každým barvením, abyste ověřili specifitu primární IHC protilátky pro prokázání cílového antigenu a poskytnutí indikace specifického barvení pozadí (falešně pozitivní barvení). Také může být rozmanitost různých typů buněk přítomných ve většině tkáňových řezů být používány laboratoří jako interní negativní kontrolní místa k ověření výkonu IHC Specifikace. Typy a zdroje vzorků, které lze použít pro negativní tkáň ovládací prvky jsou uvedeny v části Výkonové charakteristiky.

Pokud se u negativní tkáňové kontroly objeví specifické zbarvení (falešně pozitivní barvení), výsledky se vzorky pacienta by měly být považovány za neplatné.

Nespecifická kontrola negativních činidel:

Použijte nespecifickou negativní reagenční kontrolu místo primární protilátky s řezem každého vzorku pacienta k vyhodnocení nespecifického zbarvení a umožňují lepší interpretaci specifického zbarvení v místě antigenu. V ideálním případě negativní reagenční kontrola obsahuje protilátku PRAME IgG produkovanou ze supernatantu tkáňové kultury stejným způsobem jako primární protilátka, ale nevykazuje žádnou specifickou reaktivitu s lidskými tkáněmi ve stejné matici/roztoku jako protilátka Biocare. Nařed'te negativní kontrolní protilátku na stejnou koncentraci imunoglobulinu nebo proteinu jako naředěná primární protilátka protilátka za použití identického ředidla. Pokud fetální telecí sérum zůstane po zpracování v čisté protilátce, použijte fetální telecí sérum v koncentraci proteinu ekvivalentní zředěné primární protilátka ve stejném ředidle je také vhodná pro použití. (Viz dodané činidlo). Samotné ředidlo může být použito jako méně žádoucí alternativa k dříve popsáným negativním reagenčním kontrolám. Inkubační doba pro negativní reagenční kontrolu by měla odpovídat inkubační době primární protilátky.

Když se na sériových řezech použijí panely několika protilátek, negativně barvené oblasti jednoho sklíčka mohou sloužit jako negativní/nespecifická vazebná kontrola pozadí pro jiné protilátky. Pro odlišení endogenní enzymové aktivity nebo nespecifické vazby enzymů od specifické imunoreaktivity mohou být další tkáňe pacienta obarveny výhradně substrát-chromogen nebo komplex enzymů (PAP, avidin-biotin, streptavidin) a substrát-chromogen, v daném pořadí.

Ověření testu:

Před prvním použitím protilátky nebo barvicího systému v diagnostickém postupu by měl uživatel ověřit specifitu protilátky testováním na řadě vlastních tkání se známými imunohistochemickými výkonnostními charakteristikami, které představují známé pozitivní a negativní tkáňe. Viz postupy kontroly kvality dříve uvedené v této části příbalové informace k produktu a doporučení kontroly kvality certifikačního programu CAP⁹ pro imunohistochemii a/nebo směrnice NCCLS IHC¹⁰). Tyto postupy kontroly kvality by se měly opakovat pro každou novou šarži protilátek nebo kdykoli dojde ke změně parametrů testu. Tkáňe uvedené v části Výkonnostní charakteristiky jsou vhodné pro ověření testu.

Odstraňování problémů:

Dodržujte doporučení specifického protokolu protilátek podle dodaného datového listu. Pokud se objeví atypické výsledky, kontaktujte technickou podporu Biocare na čísle 1-800-542-2002.

Interpretace barvení:

Pozitivní tkáňová kontrola:

Pozitivní tkáňová kontrola obarvená indikovanou protilátkou by měla být nejprve vyšetřena, aby se zjistilo, že všechna činidla fungují správně. Vhodné barvení cílových buněk (jak je uvedeno výše) svědčí o pozitivní reaktivitě. Pokud pozitivní tkáňové kontroly nevykazují pozitivní zbarvení, jakékoli výsledky s testovacími vzorky by měly být považovány za neplatné.

Barva reakčního produktu se může lišit v závislosti na použitých substrátových chromogenech. Očekávané barevné reakce naleznete v příbalových informacích substrátu. Dále může být ve variantách způsobu barvení pozorována metachromázie.¹¹

Když se použije kontrastní barvivo, v závislosti na délce inkubace a síle použitého kontrastního barviva, povede kontrastní barvivo ke zbarvení buněčných jader. Nadměrné nebo neúplné kontrastní barvení může ohrozit správnou interpretaci výsledků. Doporučené kontrastní barvivo viz protokoly(y).

Negativní tkáňová kontrola :

Negativní tkáňová kontrola by měla být vyšetřena po pozitivní tkáňové kontrole, aby se ověřila specifita značení cílového antigenu primární protilátkou. Absence specifického barvení v negativní tkáňové kontrole potvrzuje nedostatek zkřížené reaktivity protilátek s buňkami/buněčnými složkami. Pokud se u negativní externí tkáňové kontroly objeví specifické zbarvení (falešně pozitivní barvení), výsledky se vzorkem pacienta by měly být považovány za neplatné.

Nespecifické zbarvení, pokud je přítomno, má obvykle difúzní vzhled. Sporadické barvení pojivové tkáňe lze také pozorovat v řezech z tkání nadměrně fixovaných formalínem. Pro interpretaci výsledků barvení použijte neporušené buňky. Nekrotické nebo degenerované buňky se často barví nespecificky.

Pacientská tkáň:

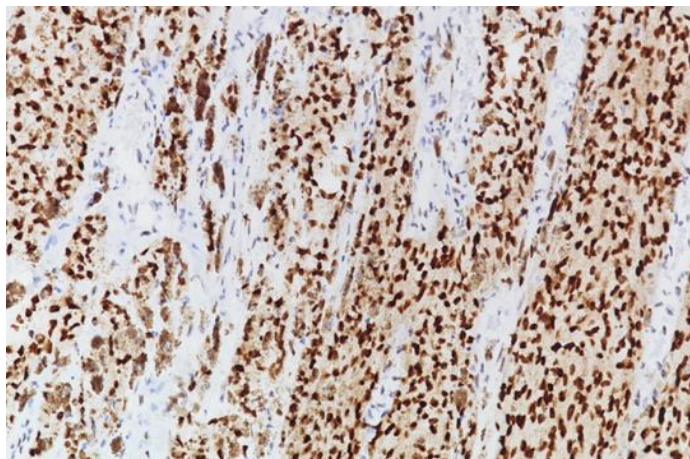
Prohlédněte si vzorky pacientů obarvené indikovanou protilátkou poslední. Intenzita pozitivního zbarvení by měla být posouzena v kontextu jakéhokoli nespecifického zbarvení pozadí negativní kontroly reagensů. Jako u každého imunohistochemického testu negativní výsledek znamená, že antigen nebyl detekován, nikoli že antigen v testovaných buňkách/tkáni chyběl. V případě potřeby použijte panel protilátek k identifikaci falešně negativních reakcí.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Czech

BIOCARE
M E D I C A L



Melanom obarvený protilátkou PRAME [EPR20330].

Specifické informace týkající se indikované imunoreaktivity protilátek naleznete v části Souhrn a vysvětlení, omezení a výkonnostní charakteristiky.

Omezení:

Obecná omezení:

1. Pro diagnostické použití *in vitro*
2. Tento produkt je určen pouze pro profesionální použití: Imunohistochemie je vícestupňový diagnostický proces, který se skládá ze specializovaného školení ve výběru vhodných činidel; výběr tkáně, fixace a zpracování; příprava podložního sklíčka IHC; a interpretaci výsledků barvení.
3. Barvení tkáně závisí na manipulaci a zpracování tkáně před barvením. Nesprávná fixace, zmrazování, rozmrazování, mytí, sušení, zahřívání, krájení nebo kontaminace jinými tkáněmi nebo tekutinami může způsobit artefakty, zachycení protilátek nebo falešně negativní výsledky. Nekonzistentní výsledky mohou být způsobeny odchylkami v metodách fixace a zalévání nebo přirozenými nepravidelnostmi v tkáni.¹²
4. Nadměrné nebo neúplné kontrastní barvení může ohrozit správnou interpretaci výsledků.
5. Klinická interpretace jakéhokoli pozitivního nebo negativního zbarvení by měla být vyhodnocena v kontextu klinické prezentace, morfologie a dalších histopatologických kritérií. Klinická interpretace jakéhokoli pozitivního nebo negativního zbarvení by měla být doplněna morfologickými studii s použitím správných pozitivních a negativních interních a externích kontrol, jakož i dalších diagnostických testů. Je odpovědností kvalifikovaného patologa, který je obeznámen se správným použitím IHC protilátek, činidel a metod, aby interpretoval všechny kroky použité k přípravě a interpretaci konečného IHC přípravku.
6. Optimální ředění protilátky a protokoly pro konkrétní aplikaci se mohou lišit. Mezi ně patří mimo jiné fixace, metoda získávání tepla, inkubační doby, tloušťka řezu tkáně a použitá detekční souprava. Vzhledem k vynikající citlivosti těchto jedinečných činidel nelze uvedené doporučené inkubační doby a titry použít pro jiné detekční systémy, protože výsledky se mohou lišit. Doporučení a protokoly datových listů jsou založeny na výhradním použití produktů Biocare. V konečném důsledku je odpovědností vyšetřovatele určit optimální podmínky.
7. Tento produkt není určen pro použití v průtokové cytometrii. Výkonnostní charakteristiky nebyly pro průtokovou cytometrii stanoveny.
8. Tkáně osob infikovaných virem hepatitidy B a obsahující povrchový antigen hepatitidy B (HBsAg) mohou vykazovat nespecifické barvení křenuvou peroxidázou.¹³

9. Reagencie mohou vykazovat neočekávané reakce v dříve netestovaných tkáních. Možnost neočekávaných reakcí i u testovaných skupin tkání nelze zcela eliminovat z důvodu biologické variability exprese antigenu v novotvarech nebo jiných patologických tkáních.¹⁴ Kontaktujte technickou podporu společnosti Biocare na čísle 1-800-542-2002 nebo prostřednictvím informací o technické podpoře uvedených na biocare.net se zdokumentovanými neočekávanými reakcemi.
10. Normální/neimunitní séra ze stejného zvířecího zdroje jako sekundární antiséra použitá v blokovacích krocích mohou způsobit falešně negativní nebo falešně pozitivní výsledky v důsledku autoprotilátek nebo přirozených protilátek.
11. Falešně pozitivní výsledky mohou být pozorovány v důsledku neimunologické vazby proteinů nebo produktů reakce substrátu. Mohou být také způsobeny pseudoperoxidázovou aktivitou (erythrocyty), endogenní peroxidázovou aktivitou (cytochrom C) nebo endogenním biotinem (např. játra, prsa, mozek, ledviny) v závislosti na typu použitého imunobarviva.¹²

Specifická omezení produktu:

Žádná další specifická omezení produktu.

Výkonnostní charakteristiky:

Reprodukovatelnost:

Reprodukovatelnost účinnosti protilátek byla ověřena testováním vybrané normální a nádorové tkáně v různých dnech a na různých přístrojích s více operátory. Barvení vybraných tkání bylo konzistentní a provedlo se podle očekávání.

Imunoreaktivita:

V tabulkách 1 a 2 níže byly prokázány následující pozitivní a negativní imunoreaktivity.

Níže uvedený seznam není vyčerpávající, ale charakterizuje typy imunoreaktivity pozorované u uvedených protilátek.

U tohoto produktu není pozorována žádná známá nespecifická protilátková reaktivita.

Shrnutí očekávaných výsledků:

Prevalence PRAME v normálních tkáních a tkáních ve stavu onemocnění byla hodnocena pomocí Tissue Microarrays (TMAs).

Normální testované tkáně se barvily podle očekávání, přičemž ve varlatech byly pozorovány vysoké úrovně barvení a v jiných tkáních nebylo barvení. Barvení PRAME bylo pozorováno na vysoké úrovni u melanomu, jak se očekávalo, a na různých úrovních v jiných rakovinných tkáních, jako jsou vaječníky, plíce, prostata a prsa.

Analytický výkon:

Byly provedeny barvicí testy na citlivost a specifitu a výsledky jsou uvedeny níže.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Czech

BIOCARE
M E D I C A L

Citlivost a specifčnost:

Tabulka 1: Citlivost a specifčnost protilátky byla stanovena testováním normálních tkání FFPE.

Tkáň	Pozitivní případy	Celkem případů
Mozek	0	6
Mozeček	0	3
Nadledvinky	0	3
Vaječník	0	3
Slinivka břišní	0	3
Průdušnice	0	3
Hypofýza	0	3
Varle*	3	3
Štítná žláza	0	3
Prsa	0	3
Slezina	0	3
Mandle	0	3
Brzlík	0	3
kostní dřeň**	0	1
Plíce	0	3
Srdce	0	3
Jícen	0	3
Žaludek	0	3
Tenké střevo	0	3
Dvojtečka	0	3
Játra	0	3
Slinná žláza	0	3
ledviny	0	3
Prostata	0	3
Děloha	0	3
Čípek	0	3
Kosterní sval	0	3
Kůže	0	3
Periferní nerv	0	3
Výstelkové buňky	0	3
Hlava, krk a slinná žláza	0	6
Lymfatická uzlina	0	3

* 3-4 silné jaderné barvení

** Chybí dva vzorky

Tabulka 2: Citlivost a specifčnost protilátky byla stanovena testováním různých FFPE neoplastických tkání.

Patologie	Pozitivní případy	Celkem případů
melanom	29	39
Rakovina vaječníků	9	44
Rakovina prsu	10	26
Rakovina tlustého střeva	4	43
Rakovina plic	21	50
Rakovina prostaty	18	41
Adrenokortikální karcinom	0	1
Rakovina močového měchýře	0	2
Meningiom	0	2
Astrocytom	0	1
Spinocelulární karcinom (jícen)	0	2
Adenokarcinom (žaludek)	0	2
Adenokarcinom (tenké střevo)	0	1
Adenokarcinom (tračník a konečník)	0	6
Rakovina ledvin	0	2
Rakovina jater	0	4
Lymfom	0	3
Spinocelulární karcinom (hlava a krk, dutina ústní, jazyk)	0	1
Karcinom nosohltanu	1	1
Adenokarcinom (pankreas)	0	1
Adenokarcinom (prostata)	0	2
Adenoidní cystický karcinom (hlava a krk, slinná žláza)	0	1
Spinocelulární karcinom (kůže)	0	1
Seminom	0	2
Rakovina štítné žlázy	0	2
Rakovina děložního hrdla	0	2
Rakovina endometria	1	2

Expres PRAME v různých novotvarech může vykazovat různé procento nádorové pozitivnosti. Procenta pozitivního barvení nádorových buněk (roztříděná podle kvartilů) pozorovaná u různých novotvarů nalezených v tabulce 2 viz tabulka 3.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Czech

BIOCARE
M E D I C A L

Tabulka 3: Procento pozitivního barvení nádorových buněk u různých novotvarů FFPE.

Papírové kapesníky	Procento barvení nádorových buněk # případů vykazujících barvení Procento z celkového počtu # případů (%)				
	<1 %	1–25 %	26–50 %	51–75 %	> 75 %
Rakovina vaječníků	35/44 (79,5 %)	2/44 (4,5 %)	3/44 (6,8 %)	3/44 (6,8 %)	1/44 (2,3 %)
Rakovina prsu	16/26 (61,5 %)	26,7 (26,9 %)	1/26 (3,8 %)	2/26 (7,7 %)	0 (0 %)
Rakovina tlustého střeva	39/43 (88,4 %)	4/43 (11,6 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Rakovina plic	29/50 (58,0 %)	7/50 (14,0 %)	4/50 (8,0 %)	7/50 (14,0 %)	3/50 (6,0 %)
Rakovina prostaty	23/41 (56,1 %)	9/41 (22,0 %)	3/41 (7,3 %)	2/41 (4,9 %)	4/41 (9,8 %)
Karcinom nosohltanu	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	1/1 (100%)
Rakovina endometria	1/2 (50 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	1/2 (50 %)	0 (0 %)
melanom	10/39 (25,6 %)	6/39 (15,4 %)	5/39 (12,8 %)	6/39 (15,4 %)	12/39 (30,8 %)

Procento barvení nádorových buněk prezentované pro všechny intenzity barvení.

Barvení na tkáních ukazující různé úrovně exprese proteinu PRAME.

Výsledky testování analytické výkonnosti prokázaly, že protilátka PRAME [EPR20330] může správně detekovat protein PRAME při použití definovaného protokolu IHC. Abnormální výsledky tkáňových testů podporují závěr, že PRAME [EPR20330] je citlivý na protein PRAME při použití doporučených IHC protokolů. Protilátka PRAME [EPR20330] je schopna detekovat nízké až vysoké hladiny proteinu PRAME. Testování normální tkáně neukázalo žádnou neočekávanou detekci PRAME u 32 typů tkání. Nedošlo k žádné neočekávané zkřížené reaktivitě. Výsledky podporují tvrzení, že protilátka PRAME [EPR20330] je vysoce specifická (analytická specifita) k proteinu PRAME.

Klinický výkon:

Byly provedeny barvicí testy na diagnostickou citlivost a specifitu a výsledky jsou uvedeny níže. Pozitivní a negativní imunoreaktivita byla zaznamenána v tabulce 4.

Tři sklíčka TMA s melanomem byla obarvena v Biocare a odeslána externímu patologovi ke čtení a hodnocení. Tkáně melanomu vykazovaly rozmanitost skóre barvení v rozmezí od 0 (negativní) po silné (4). Většina melanocytárních nálezů nevykazovala žádnou reaktivitu PRAME, ale několik mělo silnou reaktivitu.

Tabulka 4: Procento pozitivního barvení nádorových buněk v různých FFPE melanocytárních novotvarech a kůži.

Papírové kapesníky	Procento barvení nádorových buněk # případů vykazujících barvení Procento z celkového počtu # případů (%)				
	<1 %	1–25 %	26–50 %	51–75 %	> 75 %
melanom	28/133 (21,1 %)	50/133 (37,6 %)	10/133 (7,5 %)	8/133 (6,0 %)	37/133 (27,8 %)
Metastatický melanom	7/38 (18,4 %)	10/38 (26,3 %)	3/38 (7,9 %)	2/38 (5,3 %)	16/38 (42,1 %)
Melanocytární névy	14/12 (85,7 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	2/12 (14,3 %)
Kůže	10/10 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)

Procento barvení nádorových buněk prezentované pro všechny intenzity barvení.

Barvení na tkáních ukazující různé úrovně exprese proteinu PRAME.

Primárním koncovým bodem testu bylo vyhodnocení diagnostické senzitivity protilátky PRAME [EPR20330] v IHC postupu, definované jako míra pozitivní detekce melanomu u potvrzených pozitivních vzorků. [TP/(TP+FN)]

Sekundárním cílem bylo vyhodnocení diagnostické specifity – míra negativní detekce pro potvrzený melanom negativní vzorky. [TN/(TN+FP)]

Vyskytlo se 35 falešně negativních případů melanomu, které získaly zlatý standard patologického hodnocení jako melanom, ale byly negativní na PRAME. 136 případů bylo skutečně pozitivních v tom, že u nich byl diagnostikován melanom a vykazovaly signál pro PRAME. Dva falešně pozitivní byly detekovány ve 14 vzorcích melanocytárních nálezů, které byly diagnostikovány jako benigní, které vykazovaly signál pro PRAME.

Z dat odhadovaná diagnostická citlivost = $136 / (136 + 35) = 79,5 \%$

Z dat odhadovaná diagnostická specifita = $22 / (22 + 2) = 91,7 \%$

Na základě našich výpočtů jsme dospěli k odhadované diagnostické senzitivitě 79,5 % a odhadované diagnostické specifitě 91,7 % pro detekci melanomu.

Z toho vyvozujeme, že protilátka PRAME [EPR20330], testovaná společností Biocare na vzorcích melanomu a melanocytárních nálezů, je citlivá na melanom a vysoce specifická pro melanom.

Odstraňování problémů:

 (Poskytněte vysvětlení pro každý z bodů níže)

1. Žádné barvení sklíček – Zkontrolujte, zda byly použity vhodné pozitivní kontrolní tkáně, protilátky a detekční produkty.
2. Slabé zbarvení všech sklíček – Zkontrolujte, zda byly použity vhodné pozitivní kontrolní tkáně, protilátky a detekční produkty.
3. Nadměrné pozadí všech preparátů – Mohou existovat vysoké hladiny endogenního biotinu (pokud používáte detekční produkty na bázi biotinu), endogenní aktivita HRP přeměňující chromogen na barevný konečný produkt (použijte peroxidázový blok) nebo nadměrná nespecifická proteinová interakce (použijte protein blok, jako je blokovací roztok na bázi séra nebo kaseinu).
4. Tkáňové řezy smyjte sklíčka během inkubace – Zkontrolujte sklíčka, abyste se ujistili, že jsou kladně nabitá.
5. Specifické barvení je příliš tmavé – Zkontrolujte protokol, abyste zjistili, zda byl na podložní sklíčko aplikován správný titr protilátek, a také správné inkubační doby pro všechna činidla. Dále zajistěte, aby protokol

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Czech

BIOCARE
M E D I C A L

obsahoval dostatek promývacích kroků k odstranění přebytečných činidel po dokončení inkubačních kroků.

Reference:

1. Kiernan JA. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. *Theory and Practice of Histotechnology*. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. *Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule*, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. *J Histotechnol*. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. *Biotech Histochem*. 1996 Jan;71(5):263-70.
6. Center for Disease Control Manual. Guide: Safety Management, NO. CDC-22, Atlanta, GA. April 30, 1976 "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts."
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition* CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
8. CLSI *Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2)* CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011
9. College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. [Http://www.cap.org](http://www.cap.org) (800) 323-4040.
10. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
11. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques. *Histochemistry* 1987; 86:471-478.
12. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. *Lab Med*1983;14:767.
13. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradishperoxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *Am J Clin Path* 1980;73:626.
14. Herman GE and Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. *Biotech & Histochem* 1991;66:194.
15. Zhang W, et al. PRAME expression and promoter hypermethylation in epithelial ovarian cancer. *Oncotarget*, 2016 Jul; 7(29):45352-69.
16. Lezcano C, et al. PRAME expression in melanocytic tumors. *Am J Surg Pathol*. 2018 Nov; 42(11):1456-65.

Ultraline jsou vyvinuty výhradně společností Biocare Medical LLC a neznamenají schválení nebo schválení protilátek Biocare společností Ventana Medical Systems, Inc nebo Roche. Biocare, Ventana a Roche nejsou žádným způsobem přidružené, spojené ani propojené. Ventana®, BenchMark®, ultraView a OptiView jsou ochranné známky společnosti Roche.

Protilátky řady Q jsou vyvinuty výhradně společností Biocare Medical LLC a neznamenají schválení nebo schválení protilátek Biocare společností Leica Biosystems. Biocare a Leica Biosystems nejsou žádným způsobem přidruženy, přidruženy ani propojeny. Leica, Leica Biosystems, BOND-MAX a BOND-III jsou ochranné známky společnosti Leica Biosystems.

Shrnutí bezpečnosti a výkonu lze nalézt zde: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Danish

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats				
Format	Catalog Number	Description	Dilution	Diluent
Concentrate	ACI 3252 A, B	0.1, 0.5 mL	1:100	Van Gogh Yellow
Predilute	API 3252 AA, G20, H	6.0, 20, 25 mL	Ready-to-use	N/A
ONCORE Pro	OPAI 3252 T60	60 tests	Ready-to-use	N/A
Q Series-- For Leica BOND-III	ALI 3252 G7	7.0 mL	Ready-to-use	N/A
UltraLine -- For BenchMark	AVI 3252 G, G25	6.0, 25 mL	Ready-to-use	N/A

Anvendelsesformål:

Til *in vitro* diagnostisk brug

PRAME [EPR20330] er et monoklonalt kaninantistof, der er beregnet til laboratoriebrug, efter at den indledende diagnose af tumor er blevet stillet ved konventionel histopatologi ved brug af ikke-immunologiske histokemiske farvninger, i kvalitativ identifikation af PRAME- protein ved immunhistokemi (IHC) i formalinfikseret paraffin- indlejrede (FFPE) humane væv. Den kliniske fortolkning af enhver farvning eller dens fravær bør suppleres med morfologiske undersøgelser med brug af passende kontroller og bør evalueres i sammenhæng med patientens kliniske historie og andre diagnostiske test af en kvalificeret patolog som en hjælp til at foretage andre kliniske bestemmelser.

Sammenfatning og forklaring:

PRAME er placeret på kromosom 22q11.22 og koder for et protein på 509 aminosyrer. PRAME er et autosomalt cancer-testis antigen (CTA) gen, som har vist sig at blive udtrykt i melanom, forskellige ikke-melanocytiske maligne neoplasmer, herunder ikke-småcellet lungekræft, brystcarcinom, ovariecarcinom og flere andre nævnte. Normalt sundt væv er ikke kendt for at udtrykke PRAME bortset fra testikler, æggestokke, binyrer og nogle få andre, der er nævnt i litteraturen. ^(15,16)

Procedureprincip:

Dette antistofprodukt kan anvendes som det primære antistof i immunhistokemisk testning af formalinfikserede, paraffinindlejrede vævssnit. Generelt immunhistokemisk (IHC) farvningsteknikker muliggør visualisering af antigener via sekventiel påføring af en specifikt antistof til antigenet (primært antistof), et sekundært antistof til det primære antistof (valgfrit link-antistof/probe), et enzymkompleks og et kromogen substrat med indskudte vasketrin. Den enzymatiske aktivering af kromogenet resulterer i et synligt reaktionsprodukt på antigenstedet. Prøven kan derefter modfarves og dækslet glides. Resultater fortolkes ved hjælp af et lys mikroskop og hjælp til differentialdiagnose af patofysiologiske processer, som evt er muligvis ikke forbundet med et bestemt antigen.

Materialer og metoder:

Medfølgende reagenser:

Værtskilde: Kanin monoklonal

Artsreaktivitet: Menneske. Andre arter ikke testet.

Klon: EPR20330

Isotype: IgG

Proteinkoncentration: Specifik IgG-koncentration: Kontakt Biocares tekniske support

Specifitet: PRAME

Cellulær lokalisering: Nucleus og cellemembran

Metode: Affinitetsoprenset rekombinant kanin monoklonal.

Rekonstitution, blanding, fortynding, titrering:

Forfortyndet antistofreagens er optimalt fortyndet til brug med de ovenfor anførte farvningssystemer. Yderligere fortynding kan resultere i tab af antigenfarvning. Brugeren skal validere enhver sådan ændring. Forskelle i vævsbehandling og tekniske procedurer i brugerens laboratorium kan give betydelige variationer i resultater, hvilket nødvendiggør regelmæssig udførelse af interne kontroller (se afsnittet Kvalitetskontrol). Koncentreret reagens kræver fortynding som angivet i tabellen ovenfor.

Kendte applikationer:

Immunhistokemi (formalinfikseret paraffinindlejret væv)

Leveres som: Bufret saltvandsopløsning, pH 5,9-7,9 indeholdende en proteinbærer og mindre end 0,1 % natriumazidkonserveringsmiddel . Se sikkerhedsdatabladet for yderligere detaljer.

Nødvendige, men ikke medfølgende materialer og reagenser:

Objektglas til mikroskop positivt ladet.
Positive og negative vævskontroller
Ørkenkammer (eller lignende tørreovn)
Xylen eller xylenestatning
Ethanol eller reagens alkohol
Afdækningskammer (trykkoger)
Deioniseret eller destilleret vand
Vaskebuffer
Forbehandlingsreagenser
Peroxidase blokering
Proteinblok (valgfrit)
Detektionssonde og polymer
Negative kontrolreagenser
Chromogener
Hæmatoxylin (modfarvning)
Blåreagens
Monteringsmedium
Dækglas
Lysmikroskop (40-400X forstørrelse)

Konfigurationer af antistofproduktet er tilgængelige til brug på de instrumenter, der er angivet i tabellen ovenfor.

Opbevaring og stabilitet:

Opbevares ved 2°C til 8°C. Produktet er stabilt til den udløbsdato, der er trykt på hætteglasetiketten, når det opbevares under disse forhold. Må ikke bruges efter udløbsdatoen. Opbevaring under alle andre forhold end de specificerede skal verificeres. Fortyndede reagenser bør anvendes omgående; Opbevar eventuelt resterende reagens ved 2°C til 8°C. Stabiliteten af brugerfortyndet reagens er ikke blevet fastslået af Biocare .

Positive og negative kontroller skal køres samtidigt med alle patientprøver. Hvis der observeres uventet farvning, som ikke kan forklares med variationer i laboratorieprocedurer, og der er mistanke om et problem med antistoffet, skal du kontakte Biocares tekniske support på 1-800-542-2002 eller via den tekniske supportinformation, der findes på biocare.net.

Prøveforberedelse:

Væv fikseret i formalin er velegnet til brug før paraffinindstøbning. Ossøst væv bør afkalkes før vævsbehandling for at lette vævsskæring og forhindre beskadigelse af mikrotoblade. ^{1, 2}

Korrekt fikserede og indlejrede væv, der udtrykker det specificerede antigenmål, skal opbevares på et køligt sted. Clinical Laboratory Improvement Act (CLIA) fra 1988 kræver i 42 CFR § 493.1259(b), at "Laboratoriet skal opbevare farvede objektglas mindst ti år fra datoen for undersøgelse og behold prøveblokke mindst to år fra eksamensdatoen." ³

 Biocare Medical

60 Berry Drive
Pacheco, CA 94553
USA

43/190



TP v3 (12/15/2021)

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080

 EMERGO EUROPE

Westervoortsedijk 60
8627 AT Arnhem
The Netherlands

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Danish

BIOCARE
M E D I C A L

Behandling af væv før farvning:

Udfør Heat Induced Epitope Retrieval (HIER) i henhold til den anbefalede protokol nedenfor. Den rutinemæssige brug af HIER før IHC har vist sig at minimere inkonsistens og standardisere farvning. ^{4,5}

Advarsel og forholdsregler:

1. Dette antistof indeholder mindre end 0,1 % natriumazid . Koncentrationer mindre end 0,1 % er ikke rapporterbare farlige materialer i henhold til US 29 CFR 1910.1200, OSHA Hazard Communication og EC-direktiv 91/155/EC. Natriumazid (NaN₃) brugt som konserveringsmiddel er giftigt, hvis det indtages . Natriumazid kan reagere med bly- og kobber og danne højeksplosive metalazider . Efter bortskaftelse skylles med store mængder vand for at forhindre ophobning af azid i rørledninger. (Center for Disease Control, 1976, National Institute of Occupational Safety and Health, 1976) ⁶
2. Prøver før og efter fiksering og alle materialer, der udsættes for dem, skal håndteres, som om de er i stand til at overføre infektion og bortskaftes med passende forholdsregler. Pipetter aldrig reagenser gennem munden, og undgå at komme i kontakt med hud og slimhinder med reagenser og prøver. Hvis reagenser eller prøver kommer i kontakt med følsomme områder, skal du vaske med rigelige mængder vand. ⁷
3. Mikrobiel kontaminering af reagenser kan resultere i en stigning i uspecifik farvning.
4. Andre inkubationstider eller temperaturer end de angivne kan give fejlagtige resultater. Brugeren skal validere enhver sådan ændring.
5. Brug ikke reagens efter den udløbsdato, der er trykt på hætteglasset.
6. Forfortyndet antistofreagens er optimalt fortyndet til brug . Yderligere fortynding kan resultere i tab af antigenfarvning.
7. Fortynding af koncentreret antistofreagens skal valideres før brug. Nogen anvendt fortyndingsmiddel, som ikke specifikt anbefales, skal også valideres for kompatibilitet og stabilitet.
8. Bortskaft alle brugte reagenser og alle andre forurenede engangsmaterialer ved at følge procedurer for infektiøst eller potentielt infektiøst affald. Det er hvert laboratoriums ansvar at håndtere fast og flydende affald i henhold til deres art og grad af farlighed og at behandle og bortskaft det (eller få dem behandlet og bortskaftet) i overensstemmelse med gældende regler.
9. Følg lokale bortskaftelsesregler for din placering sammen med anbefalingerne i sikkerhedsdatabladet for at bestemme sikker bortskaftelse af dette produkt
10. SDS er tilgængeligt efter anmodning og findes på <http://biocare.net>.
11. For at rapportere formodede alvorlige hændelser relateret til denne enhed, skal du kontakte den lokale Biocare- repræsentant og den kompetente myndighed i den medlemsstat eller det land, hvor brugeren er etableret.

Brugsanvisning:

Anbefalede farvningsprotokoller til PRAME [EPR20330]:

IntelliPATH FLX and manual use:

API3252 til IntelliPATH FLX og manuel brug, er blevet standardiseret med MACH 4 detektionssystem. Brug TBS til vasketrin.	
Peroxide Block:	Bloker i 5 minutter med Peroxidized 1.
Pretreatment:	Udfør varmhentning ved hjælp af Borg Decloaker . Se Borg Decloaker -databladet for specifikke instruktioner.
Protein Block (Optional):	Inkuber i 5-10 minutter ved stuetemperatur med Background Punisher.
Primary Antibody:	Inkuber i 30 minutter ved stuetemperatur.
Detection:	Sonde: N/A
	Polymer: Inkuber i 30 minutter ved stuetemperatur med en sekundær-konjugeret polymer.

Chromogen:	Inkuber i 5 minutter ved RT med Biocares DAB – ELLER – Inkuber i 5-7 minutter ved RT med Warp Red.
Counterstain	Modfarv med hæmatoxylin. Skyl med deioniseret vand. Påfør Tacha's Blueing Solution i 1 minut. Skyl med deioniseret vand.

ONCORE Pro Automated Slide Staining System:

OPAI3252 er beregnet til brug med ONCORE Pro. Se brugervejledningen for specifikke instruktioner til brug. Protokolparametre i protokoleditoren skal programmeres som følger:		
Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	PRAME Rb	PRAME Rb AP
Protocol Template (Description):	Special Template (ONCORE Pro-Tect Detection Required)	Rb AP Template 1
Dewaxing (DS Buffer Option):	DS2-50	DS Buffer
Antigen Retrieval (AR Option):	AR1, high pH; 103°C	AR1, high pH; 103°C
Block Option:	Buffer	Buffer
Reagent Name, Time, Temp.:	PRAME Rb, 45 min., 25°C	PRAME Rb, 30 min., 25°C

Ventana BenchMark ULTRA:

AVI3252 er beregnet til brug med BenchMark ULTRA. Se brugervejledningen for specifikke instruktioner til brug. De anbefalede protokolparametre er som følger:	
Template/Detection:	OptiView DAB IHC
Pretreatment Protocol:	CC1 64 minutes
Peroxidase:	Pre-Primary Peroxidase Inhibitor
Primary Antibody:	32 minutes, 36°C

Q Series – For Leica BOND-III:

ALI3252 er beregnet til brug med Leica BOND-III. Se brugervejledningen for specifikke instruktioner til brug. De anbefalede protokolparametre er som følger:		
Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	IHC Protocol F	IHC Protocol J
Detection:	Bond Polymer Refine	Bond Polymer Refine Red
HIER:	20 min with ER2	20 min with ER2
Peroxide Block:	5 min	
Marker (Primary Antibody):	15 min	15 min
Post Primary:	8 min	
Polymer:	8 min	
Post Primary AP:		20 min
Polymer AP:		30 min
Mixed Chromogen Refine:	10 min	10 min + 5 min
Hematoxylin:	5 min	5 min

Kvalitetskontrol:

Se CLSI kvalitetsstandarder for design og implementering af immunhistokemiske analyser; Godkendt guideline-anden udgave (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011 ⁸

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Danish

BIOCARE
M E D I C A L

Positiv vævskontrol: Melanom, normal testikel

Ekstern positivt kontrolmateriale skal være friske prøver, fikseret, behandlet og indlejret så hurtigt som muligt på samme måde som patientprøven/-erne. Positive vævskontroller er tegn på korrekt forberedt væv og korrekte farvningsmetoder. En positiv ekstern vævskontrol for hvert sæt af testbetingelser bør inkluderes i hver farvningskørsel.

De væv, der anvendes til de eksterne positive kontrolmaterialer, bør vælges fra patientprøver med velkarakteriserede lave niveauer af den positive målaktivitet, der giver svag positiv farvning. Det lave niveau af positivitet for eksterne positive kontroller er designet til at sikre påvisning af subtile ændringer i det primære antistoffølsomhed fra ustabilitet eller problemer med IHC-metoden. Kommercielt tilgængelige vævskontrolobjektglas eller -prøver, der er behandlet anderledes end patientprøven(-erne), validerer kun reagensydelse og verificerer ikke vævsforberedelse.

Kendte positive vævskontroller bør kun bruges til at overvåge den korrekte ydeevne af behandlet væv og testreagenser, snarere end som en hjælp til at formulere en specifik diagnose af patientprøver. Hvis de positive vævskontroller ikke viser positiv farvning, bør resultaterne med testprøverne betragtes som ugyldige.

Negativ vævskontrol:

Brug en negativ vævskontrol (kendt for at være PRAME-negativ) fikseret, behandlet og indlejret på en måde, der er identisk med patientprøven/patienterne med hver farvningskørsel for at verificere specificiteten af det primære IHC-antistof for demonstration af målantigenet og for at give en indikation af specifik baggrundsfarvning (falsk positiv farvning). Det kan også de mange forskellige celletyper, der findes i de fleste vævssnit bruges af laboratoriet som interne negative kontrolsteder for at verificere IHC's ydeevne specifikationer. Typer og kilder til prøver, der kan bruges til negativt væv kontroller er angivet i afsnittet Ydelsesegenskaber.

Hvis der forekommer specifik farvning (falsk positiv farvning) i den negative vævskontrol, bør resultaterne med patientprøverne betragtes som ugyldige.

Uspecifik negativ reagenskontrol:

Brug en uspecifik negativ reagenskontrol i stedet for det primære antistof med et udsnit af hver patientprøve til at evaluere uspecifik farvning og tillade bedre fortolkning af specifik farvning på antigenstedet. Ideelt set indeholder en negativ reagenskontrol et PRAME IgG-antistof fremstillet af vævskultursupernatant på samme måde som den primære antistof, men udviser ingen specifik reaktivitet med humant væv i samme matrix/opløsning som Biocare -antistoffet. Fortynd et negativt kontrolantistof til samme immunglobulin- eller proteinkoncentration som det fortyndede primære antistof og anvendelse af det identiske fortyndingsmiddel. Hvis føtal kalveserum tilbageholdes i det rene antistof efter forarbejdning, skal føtal kalveserum i en proteinkoncentration svarende til det fortyndede primært antistof i samme fortyndingsmiddel er også egnet til anvendelse. (Se det medfølgende reagens). Fortyndingsmiddel alene kan anvendes som et mindre ønskeligt alternativ til de tidligere beskrevne negative reagenskontroller. Inkubationsperioden for den negative reagenskontrol skal svare til den for det primære antistof.

Når paneler af flere antistoffer anvendes på serielle snit, kan de negativt farvningsområder på et objektglas tjene som en negativ/uspecifik bindingsbaggrundskontrol for andre antistoffer. For at differentiere endogen enzymaktivitet eller uspecifik binding af enzymer fra specifik immunreaktivitet, kan yderligere patientvæv udelukkende farves med henholdsvis substrat-chromogen eller enzymkomplekser (PAP, avidin-biotin, streptavidin) og substrat-chromogen.

Assaybekræftelse:

Før den første brug af et antistof eller et farvningssystem i en diagnostisk procedure, skal brugeren verificere antistoffets specificitet ved at teste det på en række interne væv med kendte immunhistokemiske præstationskarakteristika, der repræsenterer kendte positive og negative

væv. Der henvises til de kvalitetskontrolprocedurer, der tidligere er beskrevet i dette afsnit af produktindlægget og til kvalitetskontrolbefalingerne i CAP Certification Program⁹ for Immunohistochemistry og/eller NCCLS IHC-retningslinjen¹⁰). Disse kvalitetskontrolprocedurer bør gentages for hvert nyt antistoflot, eller når der er en ændring i assayparametrene. Væv, der er anført i afsnittet om ydeevnekarakteristika, er egnede til assayverifikation.

Fejlfinding:

Følg de antistofspecifikke protokolbefalinger i henhold til det medfølgende datablad. Hvis der opstår atypiske resultater, skal du kontakte Biocares tekniske support på 1-800-542-2002.

Fortolkning af farvning:

Positiv vævskontrol:

Den positive vævskontrol farvet med det angivne antistof bør undersøges først for at sikre, at alle reagenser fungerer korrekt. Den passende farvning af målceller (som angivet ovenfor) er tegn på positiv reaktivitet. Hvis de positive vævskontroller ikke viser positiv farvning, bør alle resultater med testprøverne betragtes som ugyldige.

Farven på reaktionsproduktet kan variere afhængigt af de anvendte substratchromogener. Se substratets indlægsedler for forventede farvereaktioner. Yderligere kan metakromasi observeres i variationer af farvningsmetoden.¹¹

Når der anvendes en modfarvning, vil modfarvning, afhængigt af inkubationslængden og styrken af den anvendte modfarvning, resultere i en farvning af cellekernerne. Overdreven eller ufuldstændig modfarvning kan kompromittere korrekt fortolkning af resultater. Se protokollen(er) for anbefalet modfarvning.

Negativ vævskontrol:

Den negative vævskontrol bør undersøges efter den positive vævskontrol for at verificere specificiteten af mærkningen af målantigenet med det primære antistof. Fraværet af specifik farvning i den negative vævskontrol bekræfter manglen på antistofkrydsreaktivitet over for celler/cellulære komponenter. Hvis specifik farvning (falsk positiv farvning) forekommer i den negative eksterne vævskontrol, bør resultaterne med patientprøven betragtes som ugyldige.

Uspecifik farvning, hvis den er til stede, har normalt et diffust udseende. Sporadisk farvning af bindevæv kan også observeres i snit fra formalinfikseret væv. Brug intakte celler til fortolkning af farvningsresultater. Nekrotiske eller degenererede celler farves ofte uspecifikt.

Patientvæv:

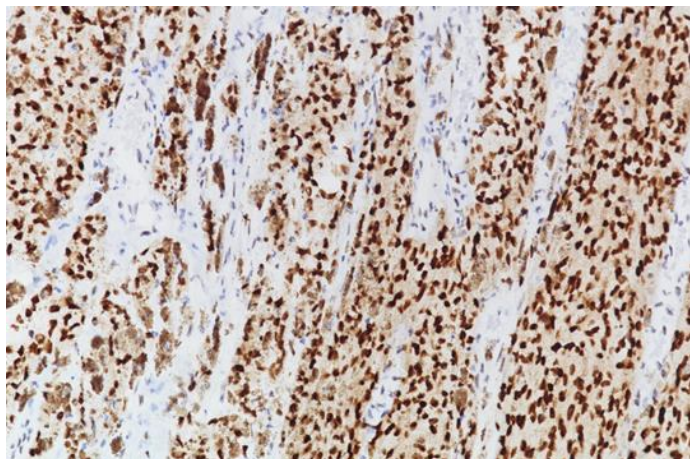
Undersøg patientprøver farvet med angivet antistof sidst. Positiv farvningsintensitet bør vurderes i sammenhæng med enhver uspecifik baggrundsfarvning af den negative reagenskontrol. Som med enhver immunhistokemisk test betyder et negativt resultat, at antigenet ikke blev påvist, ikke at antigenet var fraværende i de analyserede celler/væv. Brug om nødvendigt et panel af antistoffer til at identificere falsk-negative reaktioner.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Danish

BIOCARE
M E D I C A L



Melanom farvet med PRAME [EPR20330] antistof.

Se Resumé og forklaring, begrænsninger og ydeevnekaraktistika for specifik information vedrørende indiceret antistof-immunreaktivitet.

Begrænsninger:

Generelle begrænsninger:

1. Til *in vitro* diagnostisk brug
2. Dette produkt er kun til professionel brug: Immunhistokemi er en flertrins diagnostisk proces, der består af specialiseret træning i udvælgelsen af de passende reagenser; vævsudvælgelse, fiksering og behandling; forberedelse af IHC-glasset; og fortolkning af farvningsresultaterne.
3. Vævsfarvning er afhængig af håndtering og behandling af vævet før farvning. Forkert fiksering, frysning, optøning, vask, tørring, opvarmning, sektionering eller kontaminering med andre væv eller væsker kan producere artefakter, antistoffangning eller falsk negative resultater. Inkonsistente resultater kan skyldes variationer i fikserings- og indlejningsmetoder eller iboende uregelmæssigheder i vævet.¹²
4. Overdreven eller ufuldstændig modfarvning kan kompromittere korrekt fortolkning af resultater.
5. Den kliniske fortolkning af enhver positiv eller negativ farvning bør evalueres i sammenhæng med klinisk præsentation, morfologi og andre histopatologiske kriterier. Den kliniske fortolkning af enhver positiv eller negativ farvning bør suppleres med morfologiske undersøgelser med korrekte positive og negative interne og eksterne kontroller samt andre diagnostiske tests. Det er en kvalificeret patologs ansvar, som er fortrolig med den korrekte brug af IHC-antistoffer, reagenser og metoder, at fortolke alle de trin, der bruges til at forberede og fortolke det endelige IHC-præparat.
6. Den optimale antistoffortynding og protokoller til en specifik anvendelse kan variere. Disse omfatter, men er ikke begrænset til fiksering, varmhentningsmetode, inkubationstider, vævssnittykkelse og det anvendte detektionskit. På grund af den overlegne følsomhed af disse unikke reagenser er de anbefalede inkubationstider og titere, der er anført, ikke anvendelige for andre detektionssystemer, da resultaterne kan variere. Databladets anbefalinger og protokoller er baseret på eksklusiv brug af Biocare- produkter. I sidste ende er det efterforskerens ansvar at bestemme optimale forhold.
7. Dette produkt er ikke beregnet til brug i flowcytometri. Ydeevnekaraktistika er ikke blevet bestemt for flowcytometri.
8. Væv fra personer inficeret med hepatitis B-virus og indeholdende hepatitis B-overfladeantigen (HBsAg) kan udvise uspecifik farvning med peberrodsperoxidase.¹³
9. Reagenser kan udvise uventede reaktioner i tidligere utestede væv. Muligheden for uventede reaktioner selv i testede vævsgrupper kan ikke fuldstændigt elimineres på grund af biologisk variabilitet af

antigenekspression i neoplasmer eller andre patologiske væv.¹⁴ Kontakt Biocares tekniske support på 1-800-542-2002, eller via de tekniske supportoplysninger, der findes på biocare.net, med dokumenterede uventede reaktioner.

10. Normale/ikke-immune sera fra samme dyrekilde som sekundære antisera, der anvendes i blokeringsstrin, kan forårsage falsk-negative eller falsk-positive resultater på grund af autoantistoffer eller naturlige antistoffer.
11. Falsk-positive resultater kan ses på grund af ikke-immunologisk binding af proteiner eller substratreaktionsprodukter. De kan også være forårsaget af pseudoperoxidaseaktivitet (erythrocytter), endogen peroxidaseaktivitet (cytochrom C) eller endogen biotin (f.eks. lever, bryst, hjerne, nyre) afhængigt af den anvendte type immunfarvning.¹²

Produktspecifikke begrænsninger:

Ingen yderligere produktspecifikke begrænsninger.

Ydelseskaraktistika:

Reproducerbarhed:

Reproducerbarheden af antistofydelse blev verificeret ved at teste udvalgt normalt væv og tumorvæv på forskellige dage og forskellige instrumenter med flere operatører. Farvning af de udvalgte væv var konsistent og udført som forventet.

Immunreaktivitet:

Følgende positive og negative immunreaktiviteter er blevet påvist i tabel 1 og 2 nedenfor.

Listen nedenfor er ikke udtømmende, men karakteriserer de typer af immunreaktiviteter, der observeres med det angivne antistof.

Der er ingen kendt ikke-specifik antistofreaktivitet observeret i dette produkt.

Oversigt over forventede resultater:

Prævalensen af PRAME i normalt væv og væv i sygdomstilstande blev evalueret ved hjælp af Tissue Microarrays (TMA'er).

Det normale testede væv farvede som forventet, med høje niveauer af farvning observeret i testikler og ingen farvning i andet væv.

Farvning af PRAME blev observeret på et højt niveau i melanom som forventet og ved varierende niveauer i andre cancervæv såsom ovarie, lunge, prostata og bryst.

Analytisk ydeevne:

Farvningstests for sensitivitet og specificitet blev udført, og resultaterne er anført nedenfor.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Danish

BIOCARE
M E D I C A L

Følsomhed og specificitet:

Tablet 1: Antistoffets følsomhed og specificitet blev bestemt ved at teste FFPE normale væv.

Væv	Positive tilfælde	Sager i alt
Cerebrum	0	6
Lillehjernen	0	3
Binyre	0	3
Ovarie	0	3
Bugspytkirtel	0	3
Luftrør	0	3
Hypofyse	0	3
Testis*	3	3
Skjoldbruskkirtel	0	3
Bryst	0	3
Milt	0	3
Mandel	0	3
Thymus	0	3
Knoglemarv**	0	1
Lunge	0	3
Hjerte	0	3
Spiserøret	0	3
Mave	0	3
Tyndtarm	0	3
Kolon	0	3
Lever	0	3
Spytkirtlen	0	3
Nyre	0	3
Prostata	0	3
Livmoder	0	3
Livmoderhalsen	0	3
Skelet muskel	0	3
Hud	0	3
Perifer nerve	0	3
Foring celler	0	3
Hoved, hals og spytkirtel	0	6
Lymfeknude	0	3

* 3-4 styrker nuklear farvning

** To prøver mangler

Tablet 2: Antistoffets følsomhed og specificitet blev bestemt ved at teste en række forskellige FFPE neoplastiske væv.

Patologi	Positive tilfælde	Sager i alt
Melanom	29	39
Kræft i æggestokkene	9	44
Brystkræft	10	26
Tyktarmskræft	4	43
Lungekræft	21	50
Prostatakræft	18	41
Binyrebarkcarcinom	0	1
Blærekræft	0	2
Meningiom	0	2
Astrocytom	0	1
Planocellulært carcinom (esophagus)	0	2
Adenocarcinom (mave)	0	2
Adenocarcinom (tyndtarm)	0	1
Adenocarcinom (tyktarm og endetarm)	0	6
Nyrekræft	0	2
Leverkræft	0	4
Lymfom	0	3
Planocellulært carcinom (hoved og hals, mundhule, tunge)	0	1
Nasopharyngeal carcinom	1	1
Adenocarcinom (bugspytkirtel)	0	1
Adenocarcinom (prostata)	0	2
Adenoid cystisk carcinom (hoved og hals, spytkirtel)	0	1
Planocellulært carcinom (hud)	0	1
Seminom	0	2
Kræft i skjoldbruskkirtlen	0	2
Livmoderhalskræft	0	2
Endometrium cancer	1	2

PRAME-ekspression i forskellige neoplasmer kan udvise variabel procent tumorpositivitet. Se tabel 3 for positiv farvning af tumorcelleprocenter (kategoriseret efter kvartiler) observeret i forskellige neoplasmer fundet i tabel 2.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Danish

BIOCARE
M E D I C A L

Table 3: Procent positiv tumorcellefärvning i forskellige FFPE neoplasmer.

Væv	Procent Tumorceller Färvning # Tilfælde Udviser Färvning Procent af Total # Tilfælde (%)				
	<1 %	1-25 %	26-50 %	51-75 %	> 75 %
Kræft i æggestokkene	35/44 (79,5 %)	2/44 (4,5 %)	3/44 (6,8 %)	3/44 (6,8 %)	1/44 (2,3 %)
Brystkræft	16/26 (61,5 %)	26/7 (26,9 %)	1/26 (3,8 %)	26/2 (7,7 %)	0 (0 %)
Tyktarmskræft	39/43 (88,4 %)	4/43 (11,6 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Lungekræft	29/50 (58,0 %)	7/50 (14,0 %)	4/50 (8,0 %)	7/50 (14,0 %)	3/50 (6,0 %)
Prostatakræft	23/41 (56,1 %)	9/41 (22,0 %)	3/41 (7,3 %)	2/41 (4,9 %)	4/41 (9,8 %)
Nasopharyngeal carcinom	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	1/1 (100 %)
Endometrium cancer	1/2 (50 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	1/2 (50 %)	0 (0 %)
Melanom	10/39 (25,6 %)	6/39 (15,4 %)	5/39 (12,8 %)	6/39 (15,4 %)	39/12 (30,8 %)

Procent tumorcellefärvning præsenteret for alle färvningsintensiteter.

Färvning på væv, der viser varierende niveauer af PRAME-proteinexpression.

Resultaterne af den analytiske ydeevnetest viste, at PRAME [EPR20330]-antistoffet korrekt kan detektere PRAME-proteinet ved brug af den definerede IHC-protokol. De unormale vævstestresultater understøtter konklusionen om, at PRAME [EPR20330] er følsom over for PRAME-proteinet, når de anbefalede IHC-protokoller anvendes. PRAME [EPR20330] antistoffet er i stand til at detektere lave til høje niveauer af PRAME proteinet. Den normale vævstest viste ingen uventet påvisning af PRAME over 32 vævstyper. Der var ingen uventet krydsreaktivitet. Resultaterne understøtter påstanden, at PRAME [EPR20330] antistof er meget specifikt (analytisk specificitet) for PRAME-proteinet.

Klinisk ydeevne:

Färvningstests for diagnostisk sensitivitet og specificitet blev udført, og resultaterne er anført nedenfor. Positiv og negativ immunreaktivitet er blevet registreret i tabel 4.

Tre melanom TMA-objektglas blev farvet hos Biocare og sendt til en ekstern patolog for at blive læst og bedømt. Melanomvæv viste en mangfoldighed af färvningsscore, der spændte fra 0 (negativ) til stærk (4). De fleste melanocytiske nevi viste ingen PRAME-reaktivitet, men nogle få havde stærk reaktivitet.

Table 4: Procent positiv tumorcellefärvning i forskellige FFPE melanocytiske neoplasmer og hud.

Væv	Procent Tumorceller Färvning # Tilfælde Udviser Färvning Procent af Total # Tilfælde (%)				
	<1 %	1-25 %	26-50 %	51-75 %	> 75 %
Melanom	28/133 (21,1 %)	50/133 (37,6 %)	10/133 (7,5 %)	8/133 (6,0 %)	37/133 (27,8 %)
Metastatisk melanom	7/38 (18,4 %)	38/10 (26,3 %)	3/38 (7,9 %)	2/38 (5,3 %)	16/38 (42,1 %)
Melanocytisk nevi	14/12 (85,7 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	2/12 (14,3 %)
Hud	10/10 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)

Procent tumorcellefärvning præsenteret for alle färvningsintensiteter.

Färvning på væv, der viser varierende niveauer af PRAME-proteinexpression.

Testens primære endepunkt var at evaluere den diagnostiske følsomhed af PRAME [EPR20330]-antistoffet i IHC-proceduren, defineret som den positive melanomdetektionsrate for de bekræftede positive prøver. [TP/(TP+FN)]

Et sekundært endepunkt var at evaluere den diagnostiske specificitet - den negative detektionsrate for bekræftede melanom-negative prøver. [TN/(TN+FP)]

Der var 35 falsk negative melanomtilfælde, der havde modtaget guldstandard patologisk vurdering som melanom, men som var negative for PRAME. 136 tilfælde var sandt positive, idet de blev diagnosticeret som melanom og viste signal for PRAME. To falske positive blev påvist i de 14 melanocytiske nevi-prøver, der blev diagnosticeret som benigne, og som viste signal for PRAME.

Ud fra dataene er den estimerede diagnostiske sensitivitet = $136 / (136 + 35) = 79,5 \%$

Ud fra dataene er den estimerede diagnostiske specificitet = $22 / (22 + 2) = 91,7 \%$

Baseret på vores beregninger kommer vi frem til en estimeret diagnostisk sensitivitet på 79,5 % og en estimeret diagnostisk specificitet på 91,7 % for påvisning af melanom.

Ud fra dette konkluderer vi, at PRAME [EPR20330] antistoffet, som testet af Biocare på melanom og melanocytiske nevi prøver, er følsomt over for melanom og meget specifikt for melanom.

Fejlfinding: (Giv forklaring for hvert af punkterne nedenfor)

1. Ingen färvning af nogen objektglas - Tjek for at fastslå, om der er brugt passende positivt kontrolvæv, antistof og detektionsprodukter.
2. Svag färvning af alle objektglas - Tjek for at fastslå, om der er anvendt passende positivt kontrolvæv, antistof og detektionsprodukter.
3. Overdreven baggrund af alle objektglas - Der kan være høje niveauer af endogent biotin (hvis der bruges biotinbaserede detektionsprodukter), endogen HRP-aktivitet, der omdanner kromogen til farvet slutprodukt (brug peroxidaseblok) eller overskydende uspecifik proteininteraktion (brug et protein blokerings, såsom serum- eller kaseinbaseret blokeringsopløsning).
4. Vævssektioner vasker objektglas af under inkubation - Tjek objektglas for at sikre, at de er positivt ladede.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Danish

BIOCARE
M E D I C A L

5. Specifik farvning for mørk – Tjek protokollen for at bestemme, om korrekt antistof-titer blev anvendt på objektglasset, samt korrekte inkubationstider for alle reagenser. Sørg desuden for, at protokollen har nok vasketrin til at fjerne overskydende reagenser, efter at inkubationstrinene er afsluttet.

Referencer:

1. Kiernan JA. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. *Theory and Practice of Histotechnology*. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. *Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule*, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. *J Histotechnol*. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. *Biotech Histochem*. 1996 Jan;71(5):263-70.
6. Center for Disease Control Manual. *Guide: Safety Management*, NO. CDC-22, Atlanta, GA. April 30, 1976 "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts."
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition* CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
8. CLSI *Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2)* CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011
9. College of American Pathologists (CAP) *Certification Program for Immunohistochemistry*. Northfield IL. [Http://www.cap.org](http://www.cap.org) (800) 323-4040.
10. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. *Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline*. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
11. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. *Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques*. *Histochemistry* 1987; 86:471-478.
12. Nadji M, Morales AR. *Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls*. *Lab Med*1983;14:767.
13. Omata M, Liew CT, Ashcavi M, Peters RL. *Nonimmunologic binding of horseradishperoxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry*. *Am J Clin Path* 1980;73:626.
14. Herman GE and Elfont EA. *The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control*. *Biotech & Histochem* 1991;66:194.
15. Zhang W, *et al*. PRAME expression and promoter hypermethylation in epithelial ovarian cancer. *Oncotarget*, 2016 Jul; 7(29):45352-69.
16. Lezcano C, *et al*. PRAME expression in melanocytic tumors. *Am J Surg Pathol*. 2018 Nov; 42(11):1456-65.

Ultraline- antistoffer udvikles udelukkende af Biocare Medical LLC og indebærer ikke godkendelse eller godkendelse af Biocare- antistoffer fra Ventana Medical Systems, Inc. eller Roche. Biocare , Ventana og Roche er ikke tilknyttet, associeret eller relateret på nogen måde. Ventana®, BenchMark® , ultraView og OptiView er varemærker tilhørende Roche.

Q-seriens antistoffer udvikles udelukkende af Biocare Medical LLC og indebærer ikke godkendelse eller godkendelse af Biocare- antistoffer fra Leica Biosystems. Biocare og Leica Biosystems er ikke tilknyttet, associeret eller relateret på nogen måde. Leica, Leica Biosystems, BOND-MAX og BOND-III er varemærker tilhørende Leica Biosystems.

Resuméet af sikkerhed og ydeevne kan findes her:
<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Dutch

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats				
Format	Catalog Number	Description	Dilution	Diluent
Concentrate	ACI 3252 A, B	0.1, 0.5 mL	1:100	Van Gogh Yellow
Predilute	API 3252 AA, G20, H	6.0, 20, 25 mL	Ready-to-use	N/A
ONCORE Pro	OPAI 3252 T60	60 tests	Ready-to-use	N/A
Q Series-- For Leica BOND-III	ALI 3252 G7	7.0 mL	Ready-to-use	N/A
UltraLine -- For BenchMark	AVI 3252 G, G25	6.0, 25 mL	Ready-to-use	N/A

Beoogd gebruik:

Voor *in vitro* diagnostisch gebruik

PRAME [EPR20330] is een monokonaal konijnantilichaam dat bedoeld is voor laboratoriumgebruik nadat de initiële diagnose van een tumor is gesteld door conventionele histopathologie met behulp van niet-immunologische histochemische kleuringen, bij de kwalitatieve identificatie van PRAME- eiwit door immunohistochemie (IHC) in in formaline gefixeerde paraffine- ingebedde (FFPE) menselijke weefsels. De klinische interpretatie van elke kleuring of de afwezigheid ervan moet worden aangevuld met morfologisch onderzoek met behulp van de juiste controles en moet worden geëvalueerd binnen de context van de klinische geschiedenis van de patiënt en andere diagnostische tests door een gekwalificeerde patholoog als hulpmiddel bij het maken van andere klinische bepalingen.

Samenvatting en uitleg:

PRAME bevindt zich op chromosoom 22q11.22 en codeert voor een eiwit van 509 aminozuren. PRAME is een autosomaal kanker-testis-antigeen (CTA)-gen waarvan is aangetoond dat het tot expressie komt in melanoom, verschillende niet-melanocytische kwaadaardige neoplasmata, waaronder niet-kleincellige longkanker, borstcarcinoom, eierstokcarcinoom en verschillende andere genoemde. Het is niet bekend dat normale gezonde weefsels PRAME tot expressie brengen, behalve testis, eierstokken, bijniere en enkele andere die in de literatuur worden genoemd. ^(15,16)

Principe van procedure:

Dit antilichaamproduct kan worden gebruikt als het primaire antilichaam bij immunohistochemische tests van in formaline gefixeerde, in paraffine ingebedde weefselcoupes. In het algemeen immunohistochemisch (IHC) kleuringstechnieken maken de visualisatie van antigenen mogelijk via de opeenvolgende toepassing van een specifiek antilichaam tegen het antigeen (primaire antilichaam), een secundair antilichaam tegen het primaire antilichaam (optioneel bindingsantilichaam/probe), een enzymcomplex en een chromogeen substraat met tussenliggende wasstappen. De enzymatische activering van het chromogeen resulteert in een zichtbaar reactieproduct op de antigeenplaats. Het monster kan vervolgens worden tegengekleurd en afgedekt. De resultaten worden geïnterpreteerd met behulp van een lamp microscoop en hulp bij de differentiële diagnose van pathofysiologische processen, die mogelijk is mogelijk niet geassocieerd met een bepaald antigeen.

Materialen en methodes:

Meegeleverde reagentia:

Gastheerbron: monokonaal konijn

Soortreactiviteit: Menselijk. Andere soorten niet getest.

Kloon: EPR20330

Isotype: IgG

Eiwitconcentratie: Specifieke IgG-concentratie: Neem contact op met de technische ondersteuning van Biocare

Specificiteit: PRAME

Cellulaire lokalisatie: kern en celmembran

Methoden: Affiniteitsgezuiverd recombinant monokonaal konijn.

Reconstitutie, mengen, verdunnen, titratie:

Voorverdund antilichaamreagens wordt optimaal verdund voor gebruik met de hierboven genoemde kleursystemen. Verdere verdunning kan leiden tot

verlies van antigeenkleuring. De gebruiker moet een dergelijke wijziging valideren. Verschillen in weefselverwerking en technische procedures in het laboratorium van de gebruiker kunnen aanzienlijke variabiliteit in de resultaten veroorzaken, waardoor regelmatige uitvoering van interne controles noodzakelijk is (zie het hoofdstuk Kwaliteitscontrole). Geconcentreerd reagens vereist verdunning zoals aangegeven in de bovenstaande tabel.

Bekende toepassingen:

Immunohistochemie (formaline-gefixeerde, in paraffine ingebedde weefsels)

Geleverd als: gebufferde zoutoplossing, pH 5,9-7,9 met een eiwitdrager en minder dan 0,1% natriumazideconserveermiddel. Zie het veiligheidsinformatieblad voor aanvullende details.

Benodigde maar niet meegeleverde materialen en reagentia:

Microscopglaasjes positief geladen.
Positieve en negatieve weefselcontroles
Woestijnkamer (of soortgelijke droogoven)
Xyleen of xyleenvervanger
Ethanol of reagensalcohol
Onthulkamer (snellijkspan)
Gedeïoniseerd of gedestilleerd water
Wasbuffer
Reagentia voor voorbehandeling
Peroxidase-blok
Eiwitblok (optioneel)
Detectiesonde en polymeer
Negatieve controle reagentia
Chromogenen
Hematoxyline (tegenkleuring)
Blauwingsreagens
Montage medium
Dekglasje
Lichtmicroscoop (40-400x vergroting)

Configuraties van het antilichaamproduct zijn beschikbaar voor gebruik op de instrumenten aangegeven in de bovenstaande tabel.

Opslag en stabiliteit:

Bewaren bij 2°C tot 8°C. Het product is stabiel tot de vervaldatum die op het etiket van de injectieflacon staat, indien bewaard onder deze omstandigheden. Niet gebruiken na de vervaldatum. Opslag onder alle andere omstandigheden dan gespecificeerd moet worden geverifieerd. Verdere reagentia moeten onmiddellijk worden gebruikt; bewaar het resterende reagens bij 2°C tot 8°C. De stabiliteit van door de gebruiker verdund reagens is niet vastgesteld door Biocare.

Positieve en negatieve controles moeten gelijktijdig met alle patiëntmonsters worden uitgevoerd. Als er onverwachte kleuring wordt waargenomen die niet kan worden verklaard door variaties in laboratoriumprocedures en er wordt vermoed dat er een probleem is met het antilichaam, neem dan contact op met de technische ondersteuning van Biocare op 1-800-542-2002 of via de technische ondersteuningsinformatie op biocare.net.



60 Berry Drive
Pacheco, CA 94553
USA

50/190



TP v3 (12/15/2021)

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080



Westervoortsedijk 60
6827 AT Arnhem
The Netherlands

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Dutch

BIOCARE
M E D I C A L

Monstervoorbereiding:

In formaline gefixeerde weefsels zijn geschikt voor gebruik vóór het inbedden in paraffine. Botweefsel moet vóór de weefselverwerking worden ontkalkt om het snijden van het weefsel te vergemakkelijken en schade aan de microtoombladen te voorkomen.^{1,2}

Goed gefixeerde en ingebedde weefsels die het gespecificeerde antigeendoel tot expressie brengen, moeten op een koele plaats worden bewaard. De Clinical Laboratory Improvement Act (CLIA) van 1988 vereist in 42 CFR § 493.1259(b) dat "het laboratorium gekleurde objectglaasjes minstens tien jaar vanaf de datum van onderzoeken en monsterblokken ten minste twee jaar na de datum van onderzoek bewaren."³

Behandeling van weefsels voorafgaand aan kleuring:

Voer Heat Induced Epitope Retrieval (HIER) uit volgens het aanbevolen protocol hieronder. Er is aangetoond dat het routinematige gebruik van HIER voorafgaand aan IHC de inconsistentie minimaliseert en de kleuring standaardiseert.^{4,5}

Waarschuwing en voorzorgsmaatregelen :

1. Dit antilichaam bevat minder dan 0,1% natriumazide . Concentraties van minder dan 0,1% zijn geen gevaarlijke stoffen die moeten worden gerapporteerd volgens US 29 CFR 1910.1200, OSHA Hazard Communication en EC-richtlijn 91/155/EC. Natriumazide (NaN₃), gebruikt als conserveermiddel, is giftig bij inslikken . Natriumazide kan reageren met loden en koperen leidingen en zeer explosieve metaalaziden vormen . Wanneer u het afvoert, moet u het met grote hoeveelheden water spoelen om ophoping van azide in de leidingen te voorkomen. (Centrum voor Ziektebestrijding, 1976, Nationaal Instituut voor Veiligheid en Gezondheid op het werk, 1976)⁶

2. Monsters, voor en na fixatie, en alle materialen die eraan worden blootgesteld, moeten worden behandeld alsof ze infecties kunnen overdragen, en moeten met de juiste voorzorgsmaatregelen worden verwijderd. Pipetteer reagentia nooit via de mond en vermijd contact van de huid en slijmvliezen met reagentia en monsters. Als reagentia of monsters in contact komen met gevoelige gebieden, spoel ze dan met grote hoeveelheden water.⁷

3. Microbiële contaminatie van reagentia kan resulteren in een toename van niet-specifieke kleuring.

4. Andere incubatietijden of temperaturen dan gespecificeerd kunnen foutieve resultaten opleveren. De gebruiker moet een dergelijke wijziging valideren.

5. Gebruik geen reagens na de vervaldatum die op de injectieflacon staat vermeld.

6. Voorverdund antilichaamreagens wordt optimaal verdund voor gebruik . Verdere verdunding kan leiden tot verlies van antigeenkleuring.

7. De verdunding van geconcentreerd antilichaamreagens moet vóór gebruik worden gevalideerd. Elk Het gebruikte verdunningsmiddel dat niet specifiek wordt aanbevolen, moet ook worden gevalideerd op compatibiliteit en stabiliteit.

8. Gooi alle gebruikte reagentia en alle andere verontreinigde wegwerpmaterialen weg volgens de procedures voor besmettelijk of potentieel besmettelijk afval. Het is de verantwoordelijkheid van elk laboratorium om vast en vloeibaar afval te behandelen, afhankelijk van hun aard en mate van gevaar, en om dit te behandelen en te verwijderen (of te laten behandelen en verwijderen) in overeenstemming met de toepasselijke regelgeving.

9. Volg de plaatselijke verwijderingsvoorschriften voor uw locatie, samen met de aanbevelingen in het veiligheidsinformatieblad, om de veilige verwijdering van dit product te bepalen

10. Het veiligheidsinformatieblad is op aanvraag verkrijgbaar en bevindt zich op <http://biocare.net>.

11. Om vermoedelijke ernstige incidenten met betrekking tot dit apparaat te melden, dient u contact op te nemen met de plaatselijke Biocare-vertegenwoordiger en de bevoegde autoriteit van de lidstaat of het land waar de gebruiker gevestigd is.

Gebruiksaanwijzing:

Aanbevolen kleurprotocollen voor PRAME [EPR20330]:

IntelliPATH FLX and manual use:

API3252 voor IntelliPATH FLX en handmatig gebruik, is gestandaardiseerd met MACH 4-detectiesysteem. Gebruik TBS voor wasstappen.	
Peroxide Block:	Blokkeer gedurende 5 minuten met Peroxidized 1.
Pretreatment:	Voer warmteterugwinning uit met Borg Decloaker . Raadpleeg het gegevensblad van Borg Decloaker voor specifieke instructies.
Protein Block (Optional):	Incubeer gedurende 5-10 minuten bij kamertemperatuur met Background Punisher.
Primary Antibody:	Incubeer gedurende 30 minuten bij kamertemperatuur.
Detection:	Sonde: N.v.t Polymeer: Incubeer gedurende 30 minuten bij kamertemperatuur met een secundair geconjugeerd polymeer.
Chromogen:	Incubeer gedurende 5 minuten bij kamertemperatuur met DAB van Biocare – OF – Incubeer gedurende 5-7 minuten bij kamertemperatuur met Warp Red.
Counterstain	Tegenkleuring met hematoxyline. Spoelen met gedeïoniseerd water. Breng Tacha's Blueing Solution aan gedurende 1 minuut. Spoelen met gedeïoniseerd water.

ONCORE Pro Automated Slide Staining System:

OPIA3252 is bedoeld voor gebruik met de ONCORE Pro. Raadpleeg de gebruikershandleiding voor specifieke gebruiksinstructies. Protocolparameters in de Protocol-editor moeten als volgt worden geprogrammeerd:		
Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	PRAME Rb	PRAME Rb AP
Protocol Template (Description):	Special Template (ONCORE Pro-Tect Detection Required)	Rb AP Template 1
Dewaxing (DS Buffer Option):	DS2-50	DS Buffer
Antigen Retrieval (AR Option):	AR1, high pH; 103°C	AR1, high pH; 103°C
Block Option:	Buffer	Buffer
Reagent Name, Time, Temp.:	PRAME Rb, 45 min., 25°C	PRAME Rb, 30 min., 25°C

Ventana BenchMark ULTRA:

AVI3252 is bedoeld voor gebruik met de BenchMark ULTRA. Raadpleeg de gebruikershandleiding voor specifieke gebruiksinstructies. Aanbevolen protocolparameters zijn als volgt:	
Template/Detection:	OptiView DAB IHC
Pretreatment Protocol:	CC1 64 minutes
Peroxidase:	Pre-Primary Peroxidase Inhibitor
Primary Antibody:	32 minutes, 36°C

Q Series – For Leica BOND-III:

ALI3252 is bedoeld voor gebruik met de Leica BOND-III. Raadpleeg de gebruikershandleiding voor specifieke gebruiksinstructies. Aanbevolen protocolparameters zijn als volgt:	
--	--

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Dutch

BIOCARE
M E D I C A L

Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	IHC Protocol F	IHC Protocol J
Detection:	Bond Polymer Refine	Bond Polymer Refine Red
HIER:	20 min with ER2	20 min with ER2
Peroxide Block:	5 min	
Marker (Primary Antibody):	15 min	15 min
Post Primary:	8 min	
Polymer:	8 min	
Post Primary AP:		20 min
Polymer AP:		30 min
Mixed Chromogen Refine:	10 min	10 min + 5 min
Hematoxylin:	5 min	5 min

Kwaliteitscontrole:

Raadpleeg de CLSI-kwaliteitsnormen voor ontwerp en implementatie van immunohistochemische tests; Goedgekeurde richtlijn-tweede editie (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011 ⁸

Positieve weefselcontrole:

Melanoom, normale testis
Externe positieve controlematerialen moeten verse monsters zijn die zo snel mogelijk op dezelfde manier zijn gefixeerd, verwerkt en ingebed als de patiëntmonsters. Positieve weefselcontroles duiden op correct geprepareerde weefsels en juiste kleuringstechnieken. Bij elke kleuringssrun moet voor elke reeks testomstandigheden één positieve externe weefselcontrole worden meegenomen.

De weefsels die voor de externe positieve controlematerialen worden gebruikt, moeten worden geselecteerd uit patiëntspecimens met goed gekarakteriseerde lage niveaus van de positieve doelactiviteit die een zwakke positieve kleuring veroorzaken. Het lage niveau van positiviteit voor externe positieve controles is bedoeld om detectie van subtiele veranderingen in de primaire antilichaamgevoeligheid als gevolg van instabiliteit of problemen met de IHC-methodologie te garanderen. In de handel verkrijgbare objectglaasjes of monsters voor weefselcontrole die op een andere manier zijn verwerkt dan het/de patiëntmonster(s), valideren alleen de prestaties van het reagens en verifiëren de weefselpreparatie niet.

Bekende positieve weefselcontroles mogen alleen worden gebruikt voor het monitoren van de juiste prestatie van verwerkte weefsels en testreagentia, en niet als hulpmiddel bij het formuleren van een specifieke diagnose van patiëntmonsters. Als de positieve weefselcontroles geen positieve kleuring vertonen, moeten de resultaten met de testmonsters als ongeldig worden beschouwd.

Negatieve weefselcontrole:

Gebruik bij elke kleuringssrun een negatieve weefselcontrole (waarvan bekend is dat deze PRAME-negatief is), gefixeerd, verwerkt en ingebed op een manier die identiek is aan het/de patiëntmonster(s) om de specificiteit van het primaire IHC-antilichaam te verifiëren. demonstratie van het doelantigeen, en om een indicatie te geven van specifieke achtergrondkleuring (vals-positieve kleuring). Ook de verscheidenheid aan verschillende celtypen die in de meeste weefselcoupes aanwezig zijn, kan dat doen door het laboratorium worden gebruikt als interne negatieve controlelocaties om de prestaties van de IHC te verifiëren specificaties. De soorten en bronnen van specimens die voor negatief weefsel kunnen worden gebruikt bedieningselementen vindt u in het gedeelte Prestatiekenmerken.

Als er specifieke kleuring (vals-positieve kleuring) optreedt in de negatieve weefselcontrole, moeten de resultaten met de patiëntspecimens als ongeldig worden beschouwd.

Niet-specifieke negatieve reagenscontrole:

Gebruik een niet-specifieke negatieve reagenscontrole in plaats van het primaire antilichaam met een deel van elk patiëntmonster om niet-specifieke kleuring en

maken een betere interpretatie van specifieke kleuring op de antigeenplaats mogelijk. Idealiter bevat een negatieve reagenscontrole een PRAME IgG-antilichaam dat op dezelfde manier uit het supernatant van de weefselweek wordt geproduceerd als de primaire controle. antilichaam, maar vertoont geen specifieke reactiviteit met menselijke weefsels in dezelfde matrix/oplossing als het Biocare -antilichaam. Verdun een negatief controle-antilichaam tot dezelfde immunoglobuline- of eiwitconcentratie als het verdunde primaire antilichaam met behulp van hetzelfde verdunningsmiddel. Als foetaal kalfsserum na verwerking in het zuivere antilichaam achterblijft, moet foetaal kalfsserum met een eiwitconcentratie equivalent aan de verdunde primair antilichaam in hetzelfde verdunningsmiddel is ook geschikt voor gebruik. (Zie het meegeleverde reagens). Alleen verdunningsmiddel kan worden gebruikt als een minder wenselijk alternatief voor de eerder beschreven negatieve reagenscontroles. De incubatietijd voor de negatieve reagenscontrole moet overeenkomen met die van het primaire antilichaam.

Wanneer op seriële secties panels van verschillende antilichamen worden gebruikt, kunnen de negatief kleurende gebieden van één objectglaasje dienen als een negatieve/niet-specifieke bindende achtergrondcontrole voor andere antilichamen. Om endogene enzymactiviteit of niet-specifieke binding van enzymen te onderscheiden van specifieke immuunreactiviteit, kunnen extra patiëntweefsels uitsluitend worden gekleurd met respectievelijk substraat-chromogeen of enzymcomplexen (PAP, avidine-biotine, streptavidine) en substraat-chromogeen.

Assayverificatie:

Voorafgaand aan het eerste gebruik van een antilichaam of kleursysteem in een diagnostische procedure moet de gebruiker de specificiteit van het antilichaam verifiëren door het te testen op een reeks interne weefsels met bekende immunohistochemische prestatiekenmerken die bekende positieve en negatieve weefsels vertegenwoordigen. Raadpleeg de kwaliteitscontroleprocedures die eerder in dit gedeelte van de productbijsluiters zijn beschreven en de aanbevelingen voor kwaliteitscontrole van het CAP-certificeringsprogramma ⁹ voor immunohistochemie en/of de NCCLS IHC-richtlijn ¹⁰). Deze kwaliteitscontroleprocedures moeten worden herhaald voor elke nieuwe partij antilichamen, of telkens wanneer er een verandering in de testparameters optreedt. Weefsels vermeld in de sectie Prestatiekenmerken zijn geschikt voor assayverificatie.

Probleemoplossen:

Volg de antilichaamspecifieke protocolaanbevelingen volgens het meegeleverde gegevensblad. Als er atypische resultaten optreden, neem dan contact op met de technische ondersteuning van Biocare op 1-800-542-2002.

Interpretatie van kleuring:

Positieve weefselcontrole:

De positieve weefselcontrole, gekleurd met het aangegeven antilichaam, moet eerst worden onderzocht om er zeker van te zijn dat alle reagentia goed functioneren. De juiste kleuring van doelcellen (zoals hierboven aangegeven) is indicatief voor positieve reactiviteit. Als de positieve weefselcontroles geen positieve kleuring vertonen, moeten alle resultaten met de testmonsters als ongeldig worden beschouwd.

De kleur van het reactieproduct kan variëren afhankelijk van de gebruikte substraatchromogenen. Raadpleeg de bijsluiters van het substraat voor de verwachte kleurreacties. Verder kan metachromasie worden waargenomen bij variaties op de kleuringmethode. ¹¹

Wanneer een tegenkleuring wordt gebruikt, zal de tegenkleuring, afhankelijk van de incubatieduur en de sterkte van de gebruikte tegenkleuring, resulteren in een verkleuring van de celkernen. Overmatige of onvolledige

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Dutch

BIOCARE
M E D I C A L

tegenkleuring kan de juiste interpretatie van de resultaten in gevaar brengen. Raadpleeg protocol(len) voor aanbevolen tegenkleuring.

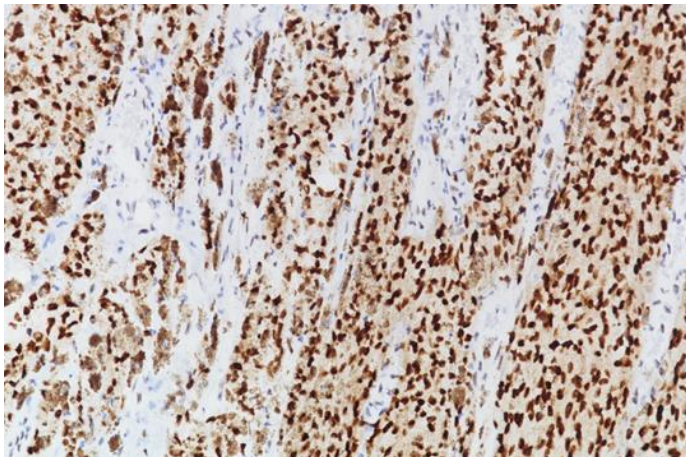
Negatieve weefselcontrole :

De negatieve weefselcontrole moet na de positieve weefselcontrole worden onderzocht om de specificiteit van de labeling van het doelantigeen door het primaire antilichaam te verifiëren. De afwezigheid van specifieke kleuring in de negatieve weefselcontrole bevestigt het ontbreken van kruisreactiviteit van antilichamen met cellen/cellulaire componenten . Als er specifieke kleuring (vals-positieve kleuring) optreedt in de negatieve externe weefselcontrole, moeten de resultaten met het patiëntmonster als ongedig worden beschouwd.

Niet-specifieke kleuring, indien aanwezig, heeft gewoonlijk een diffuus uiterlijk. Sporadische kleuring van bindweefsel kan ook worden waargenomen in coupes van overmatig formalinegefixeerd weefsel. Gebruik intacte cellen voor de interpretatie van kleuringsresultaten. Necrotische of gedegenerende cellen kleuren vaak niet-specifiek.

Patiëntenweefsel:

Onderzoek patiëntenspecimens die zijn gekleurd met het aangegeven antilichaam laatst. De positieve kleurintensiteit moet worden beoordeeld binnen de context van eventuele niet-specifieke achtergrondkleuring van de negatieve reagenscontrole. Zoals bij elke immunohistochemische test betekent een negatief resultaat dat het antigeen niet is gedetecteerd, en niet dat het antigeen afwezig was in de geteste cellen/weefsels. Gebruik indien nodig een panel antilichamen om vals-negatieve reacties te identificeren.



Melanoom gekleurd met PRAME [EPR20330]-antilichaam.

Raadpleeg de Samenvatting en uitleg, beperkingen en prestatiekenmerken voor specifieke informatie over de aangegeven immunoreactiviteit van antilichamen.

Beperkingen:

Algemene beperkingen:

1. Voor *in vitro* diagnostisch gebruik
2. Dit product is uitsluitend bedoeld voor professioneel gebruik: Immunohistochemie is een uit meerdere stappen bestaand diagnostisch proces dat bestaat uit gespecialiseerde training in de selectie van de juiste reagentia; weefselselectie, fixatie en verwerking; voorbereiding van het IHC-glaasje; en interpretatie van de kleuringsresultaten.
3. Weefselkleuring is afhankelijk van de behandeling en verwerking van het weefsel voorafgaand aan de kleuring. Onjuiste fixatie, invriezen, ontdooien, wassen, drogen, verwarmen, snijden of contaminatie met andere weefsels of vloeistoffen kan artefacten, het opsluiten van antilichamen of vals-negatieve resultaten veroorzaken. Inconsistente

resultaten kunnen te wijten zijn aan variaties in de fixatie- en inbeddingsmethoden, of aan inherente onregelmatigheden in het weefsel.¹²

4. Overmatige of onvolledige tegenkleuring kan de juiste interpretatie van de resultaten in gevaar brengen.
5. De klinische interpretatie van elke positieve of negatieve kleuring moet worden beoordeeld binnen de context van de klinische presentatie, morfologie en andere histopathologische criteria. De klinische interpretatie van elke positieve of negatieve kleuring moet worden aangevuld met morfologisch onderzoek waarbij gebruik wordt gemaakt van de juiste positieve en negatieve interne en externe controles, evenals andere diagnostische tests. Het is de verantwoordelijkheid van een gekwalificeerde patholoog die bekend is met het juiste gebruik van IHC-antilichamen, reagentia en methoden om alle stappen te interpreteren die worden gebruikt om het uiteindelijke IHC-preparaat voor te bereiden en te interpreteren.
6. De optimale antilichaamverduunning en protocollen voor een specifieke toepassing kunnen variëren. Deze omvatten, maar zijn niet beperkt tot, de fixatie, de warmtewinningsmethode, de incubatietijden, de dikte van de weefselsectie en de gebruikte detectiekit. Vanwege de superieure gevoeligheid van deze unieke reagentia zijn de vermelde aanbevolen incubatietijden en titers niet van toepassing op andere detectiesystemen, omdat de resultaten kunnen variëren. De aanbevelingen en protocollen in het gegevensblad zijn gebaseerd op exclusief gebruik van Biocare- producten. Uiteindelijk is het de verantwoordelijkheid van de onderzoeker om optimale omstandigheden te bepalen.
7. Dit product is niet bedoeld voor gebruik bij flowcytometrie. Prestatiekenmerken zijn niet bepaald voor flowcytometrie.
8. Weefsels van personen die zijn geïnfecteerd met het hepatitis B-virus en die hepatitis B-oppervlakteantigeen (HBsAg) bevatten, kunnen niet-specifieke kleuring vertonen met mierikswortelperoxidase.¹³
9. Reagentia kunnen onverwachte reacties vertonen in niet eerder geteste weefsels. De mogelijkheid van onverwachte reacties, zelfs in geteste weefselgroepen, kan niet volledig worden uitgesloten vanwege de biologische variabiliteit van antigeenexpressie in neoplasmata of andere pathologische weefsels.¹⁴ Neem contact op met de technische ondersteuning van Biocare op 1-800-542-2002, of via de technische ondersteuningsinformatie op biocare.net, met gedocumenteerde onverwachte reactie(s).
10. Normale/niet-immune sera uit dezelfde dierlijke bron als secundaire antisera die bij blokkeringsstappen worden gebruikt, kunnen vals-negatieve of vals-positieve resultaten veroorzaken als gevolg van auto-antilichamen of natuurlijke antilichamen.
11. Er kunnen vals-positieve resultaten optreden als gevolg van niet-immunologische binding van eiwitten of substraatreactieproducten. Ze kunnen ook worden veroorzaakt door pseudo-peroxidase-activiteit (erythrocyten), endogene peroxidase-activiteit (cytochrom C) of endogene biotine (bijvoorbeeld lever, borst, hersenen, nier), afhankelijk van het type immunokleuring dat wordt gebruikt.¹²

Productspecifieke beperkingen:

Geen aanvullende productspecifieke beperkingen.

Prestatiekenmerken:

Reproduceerbaarheid:

De reproduceerbaarheid van de antilichaamprestaties werd geverifieerd door het testen van geselecteerd normaal weefsel en tumorweefsel op verschillende dagen en verschillende instrumenten met meerdere operators. De kleuring van de geselecteerde weefsels was consistent en werd uitgevoerd zoals verwacht.

Immunoreactiviteit:

De volgende positieve en negatieve immunoreactiviteiten zijn aangetoond in de onderstaande tabellen 1 en 2.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Dutch

BIOCARE
M E D I C A L

De onderstaande lijst is niet uitputtend, maar karakteriseert de soorten immuunreactiviteiten die worden waargenomen met het aangegeven antilichaam.

Er is geen bekende niet-specifieke antilichaamreactiviteit waargenomen in dit product.

Samenvatting van verwachte resultaten:

De prevalentie van PRAME in normale weefsels en weefsels in de ziekte-toestand werd geëvalueerd met behulp van Tissue Microarrays (TMA's).

De geteste normale weefsels kleurden zoals verwacht, waarbij hoge niveaus van kleuring werden waargenomen in de testis en geen kleuring in andere weefsels.

Kleuring van PRAME werd zoals verwacht in een hoog niveau waargenomen bij melanoom, en op verschillende niveaus in andere kankerweefsels zoals eierstok-, long-, prostaat- en borstweefsel.

Analytische prestaties:

Er zijn kleurtests voor gevoeligheid en specificiteit uitgevoerd en de resultaten staan hieronder vermeld.

Gevoeligheid en specificiteit:

Tabel 1: De gevoeligheid en specificiteit van het antilichaam werden bepaald door het testen van normale FFPE-weefsels.

Zakdoek	Positieve gevallen	Totaal aantal gevallen
Hersenen	0	6
Cerebellum	0	3
Bijnier	0	3
Eierstok	0	3
Alveesklier	0	3
Luchtpijp	0	3
Hypofyse	0	3
Testis*	3	3
Schildklier	0	3
Borst	0	3
Milt	0	3
Tonsil	0	3
Thymus	0	3
Beenmerg**	0	1
Long	0	3
Hart	0	3
Slokdarm	0	3
Maag	0	3
Dunne darm	0	3
Dubbele punt	0	3
Lever	0	3
Speekselklier	0	3
Nier	0	3
Prostaat	0	3
Baarmoeder	0	3
Baarmoederhals	0	3
Skeletachtige spier	0	3
Huid	0	3
Perifere zenuw	0	3
Voerende cellen	0	3
Hoofd, nek en speekselklier	0	6
Lymfeknoop	0	3

* Kernkleuring met 3-4 sterktes

** Er ontbreken twee monsters

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Dutch

BIOCARE
M E D I C A L

Tabel 2: De gevoeligheid en specificiteit van het antilichaam werden bepaald door het testen van een verscheidenheid aan neoplastische FFPE-weefsels.

Pathologie	Positieve gevallen	Totaal aantal gevallen
Melanoma	29	39
Eierstokkanker	9	44
Borstkanker	10	26
Darmkanker	4	43
Longkanker	21	50
Prostaatcancer	18	41
Bijnierschorscarcinoom	0	1
Blaaskanker	0	2
Meningeoom	0	2
Astrocytoom	0	1
Plaveiselcelcarcinoom (slokdarm)	0	2
Adenocarcinoom (maag)	0	2
Adenocarcinoom (dunne darm)	0	1
Adenocarcinoom (colon en rectum)	0	6
Nierkanker	0	2
Leverkanker	0	4
lymfoom	0	3
Plaveiselcelcarcinoom (hoofd en nek, mondholte, tong)	0	1
Nasofarynxcarcinoom	1	1
Adenocarcinoom (alveesklier)	0	1
Adenocarcinoom (prostaat)	0	2
Adenoïd cystisch carcinoom (hoofd en nek, speekselklier)	0	1
Plaveiselcelcarcinoom (huid)	0	1
Seminoom	0	2
Schildklierkanker	0	2
Baarmoederhalskanker	0	2
Endometriumkanker	1	2

PRAME-expressie in verschillende neoplasmata kan een variabel percentage tumorpositiviteit vertonen. Raadpleeg Tabel 3 voor positief kleurende tumorcelpercentages (ingedeeld in kwartielen) waargenomen bij verschillende neoplasmata gevonden in Tabel 2.

Tabel 3: Percentage positieve tumorcelkleuring in verschillende FFPE-neoplasmata.

Weefsels	Percentage tumorcellen dat kleurt # gevallen die kleuring vertonen Percentage van totaal # gevallen (%)				
	<1%	1-25%	26-50%	51-75%	> 75%
Eierstokkanker	35/44 (79,5%)	2/44 (4,5%)	3/44 (6,8%)	3/44 (6,8%)	1/44 (2,3%)
Borstkanker	16/26 (61,5%)	7/26 (26,9%)	1/26 (3,8%)	2/26 (7,7%)	0 (0%)
Darmkanker	39/43 (88,4%)	4/43 (11,6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Longkanker	29/50 (58,0%)	7/50 (14,0%)	4/50 (8,0%)	7/50 (14,0%)	3/50 (6,0%)
Prostaatcancer	23/41 (56,1%)	9/41 (22,0%)	3/41 (7,3%)	2/41 (4,9%)	4/41 (9,8%)
Nasofarynxcarcinoom	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1/1 (100%)
Endometrium kanker	1/2 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	1/2 (50%)	0 (0%)
Melanoma	10/39 (25,6%)	6/39 (15,4%)	5/39 (12,8%)	6/39 (15,4%)	12/39 (30,8%)

Percentage tumorcelkleuring weergegeven voor alle kleurintensiteiten.

Kleuring op weefsels die verschillende niveaus van PRAME-eiwitexpressie laten zien.

De resultaten van de analytische prestatietests hebben aangetoond dat het PRAME [EPR20330]-antilichaam het PRAME-eiwit correct kan detecteren bij gebruik van het gedefinieerde IHC-protocol. De abnormale weefseltestresultaten ondersteunen de conclusie dat PRAME [EPR20330] gevoelig is voor het PRAME-eiwit bij gebruik van de aanbevolen IHC-protocollen. Het PRAME-antilichaam [EPR20330] kan lage tot hoge niveaus van het PRAME-eiwit detecteren. Uit het normale weefselonderzoek bleek dat er geen onverwachte detectie van PRAME in 32 weefseltypen was. Er was geen onverwachte kruisreactiviteit. De resultaten ondersteunen de bewering dat het PRAME [EPR20330]-antilichaam zeer specifiek (analytische specificiteit) is voor het PRAME-eiwit.

Klinische prestaties:

Er zijn kleurtests voor diagnostische gevoeligheid en specificiteit uitgevoerd en de resultaten worden hieronder vermeld. Positieve en negatieve immuunreactiviteit is vastgelegd in Tabel 4.

Biocare gekleurd en naar een externe patholoog gestuurd om te worden gelezen en beoordeeld. Melanoomweefsels vertoonden een diversiteit aan kleuringsscores variërend van 0 (negatief) tot sterk (4). De meeste melanocytische naevi vertoonden geen PRAME-reactiviteit, maar enkele hadden een sterke reactiviteit.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Dutch

BIOCARE
M E D I C A L

Tabel 4: Percentage positieve tumorcelkleuring in verschillende FFPE-melanocytische neoplasmata en huid.

Weefsels	Percentage tumorcellen dat kleurt # gevallen die kleuring vertonen Percentage van totaal # gevallen (%)				
	<1%	1-25%	26-50%	51-75%	> 75%
Melanoma	28/133 (21,1%)	50/133 (37,6%)	10/133 (7,5%)	8/133 (6,0%)	37/133 (27,8%)
Metastatisch melanoom	7/38 (18,4%)	10/38 (26,3%)	3/38 (7,9%)	2/38 (5,3%)	16/38 (42,1%)
Melanocytische naevi	12/14 (85,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2/12 (14,3%)
Huid	10/10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Percentage tumorcelkleuring weergegeven voor alle kleurintensiteiten.
Kleuring op weefsels die verschillende niveaus van PRAME-eiwitexpressie laten zien.

Het primaire eindpunt van de test was het evalueren van de diagnostische gevoeligheid van het PRAME [EPR20330]-antilichaam in de IHC-procedure, gedefinieerd als het positieve melanoomdetectiepercentage van de bevestigde positieve monsters. [TP/(TP+FN)]

Een secundair eindpunt was het evalueren van de diagnostische specificiteit: het negatieve detectiepercentage voor bevestigde melanoom-negatieve monsters. [TN/(TN+FP)]

Er waren 35 vals-negatieve gevallen van melanoom die de gouden standaard pathologische evaluatie als melanoom hadden ontvangen, maar die negatief waren voor PRAME. 136 gevallen waren echt positief in die zin dat bij hen de diagnose melanoom was gesteld en dat er een signaal voor PRAME was. Er werden twee valse positieven gedetecteerd in de 14 melanocytische naevi-monsters die als goedaardig waren gediagnosticeerd en die een signaal voor PRAME vertoonden.

Uit de gegevens blijkt dat de geschatte diagnostische gevoeligheid = $136 / (136 + 35) = 79,5\%$

Uit de gegevens blijkt dat de geschatte diagnostische specificiteit = $22 / (22 + 2) = 91,7\%$

Op basis van onze berekeningen komen we tot een geschatte diagnostische gevoeligheid van 79,5% en een geschatte diagnostische specificiteit van 91,7% voor melanoomdetectie.

Hieruit concluderen we dat het PRAME [EPR20330]-antilichaam, zoals getest door Biocare op melanoom- en melanocytische naevi-monsters, gevoelig is voor melanoom en zeer specifiek voor melanoom.

Probleemoplossing: (Geef uitleg voor elk van de onderstaande punten)

1. Geen kleuring van objectglasjes – Controleer of er geschikt positief controleweefsel, antilichaam en detectieproducten zijn gebruikt.
2. Zwakke kleuring van alle objectglasjes – Controleer of er geschikt positief controleweefsel, antilichaam en detectieproducten zijn gebruikt.
3. Overmatige achtergrond van alle objectglasjes – Er kunnen hoge niveaus van endogeen biotine zijn (bij gebruik van op biotine gebaseerde detectieproducten), endogene HRP-activiteit die chromogeen omzet in gekleurd eindproduct (gebruik peroxidaseblok) of overmatige niet-specifieke eiwitinteractie (gebruik een eiwit blok, zoals een blokkeeroplossing op basis van serum of caseïne).

4. Weefselcoupes worden tijdens de incubatie van de objectglasjes gewassen – Controleer de objectglasjes om er zeker van te zijn dat ze positief geladen zijn.
5. Specifieke kleuring te donker – Controleer het protocol om te bepalen of de juiste antilichaamtiter op het objectglasje is aangebracht, evenals de juiste incubatietijden voor alle reagentia. Zorg er bovendien voor dat het protocol voldoende wasstappen heeft om overtollige reagentia te verwijderen nadat de incubatiestappen zijn voltooid.

Referenties:

1. Kiernan JA. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. *Theory and Practice of Histotechnology*. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. *Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule*, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. *J Histotechnol*. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. *Biotech Histochem*. 1996 Jan;71(5):263-70.
6. Center for Disease Control Manual. *Guide: Safety Management*, NO. CDC-22, Atlanta, GA. April 30, 1976 "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts."
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition* CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
8. CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; *Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2)* CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011
9. College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. <http://www.cap.org> (800) 323-4040.
10. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. *Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)*. Wayne, PA. 1997;1-46.
11. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. *Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in immunoperoxidase techniques. Histochemistry* 1987; 86:471-478.
12. Nadjji M, Morales AR. *Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Lab Med*1983;14:767.
13. Omata M, Liew CT, Ashcavi M, Peters RL. *Nonimmunologic binding of horseradishperoxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. Am J Clin Path* 1980;73:626.
14. Herman GE and Elfont EA. *The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech & Histochem* 1991;66:194.
15. Zhang W, et al. *PRAME expression and promoter hypermethylation in epithelial ovarian cancer. Oncotarget*, 2016 Jul; 7(29):45352-69.
16. Lezcano C, et al. *PRAME expression in melanocytic tumors. Am J Surg Pathol*. 2018 Nov; 42(11):1456-65.

Ultraline- antilichamen zijn uitsluitend ontwikkeld door Biocare Medical LLC en impliceren geen goedkeuring of goedkeuring van Biocare- antilichamen door Ventana Medical Systems, Inc of Roche. Biocare, Ventana en Roche zijn op geen enkele manier verbonden, geassocieerd of gerelateerd. Ventana®, BenchMark®, ultraView en OptiView zijn handelsmerken van Roche.

Antilichamen uit de Q-serie zijn uitsluitend ontwikkeld door Biocare Medical LLC en impliceren geen goedkeuring of goedkeuring van Biocare- antilichamen door Leica Biosystems. Biocare en Leica Biosystems zijn op geen enkele manier geaffilieerd, geassocieerd of gerelateerd. Leica, Leica Biosystems, BOND-MAX en BOND-III zijn handelsmerken van Leica Biosystems.

Het overzicht van veiligheid en prestaties vindt u hier: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Estonian

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats				
Format	Catalog Number	Description	Dilution	Diluent
Concentrate	ACI 3252 A, B	0.1, 0.5 mL	1:100	Van Gogh Yellow
Predilute	API 3252 AA, G20, H	6.0, 20, 25 mL	Ready-to-use	N/A
ONCORE Pro	OPAI 3252 T60	60 tests	Ready-to-use	N/A
Q Series-- For Leica BOND-III	ALI 3252 G7	7.0 mL	Ready-to-use	N/A
UltraLine -- For BenchMark	AVI 3252 G, G25	6.0, 25 mL	Ready-to-use	N/A

Mõeldud kasutamiseks:

In vitro diagnostiliseks kasutamiseks

PRAME [EPR20330] on küüliku monoklonaalne antikeha, mis on ette nähtud laboratoorseks kasutamiseks pärast kasvaja esialgset diagnoosimist tavapärase histopatoloogia abil, kasutades mitteimmunoloogilisi histokeemilisi plekke, PRAME valgu kvalitatiivseks tuvastamiseks immunohistokeemia (IHC) abil formaliniiga fikseeritud parafiinis. varjatud (FFPE) inimkuded. Mis tahes värvimise või selle puudumise kliinilist tõlgendamist peaksid täiendama morfoloogilised uuringud, milles kasutatakse õigeid kontrolle, ning kvalifitseeritud patoloog peaks neid hindama patsiendi kliinilise ajaloo ja muude diagnostiliste testide kontekstis, et aidata teha muid kliinilisi määramisi.

Kokkuvõte ja selgitus:

PRAME asub kromosoomis 22q11.22 ja kodeerib 509 aminohappes koosnevat valku. PRAME on autosoomne vähi-munandi antigeeni (CTA) geen, mida on näidatud melanoomi, mitmesuguste mittelanotsüütiliste pahaloomuliste kasvujate, sealhulgas mitteväikerakk-kopsuvähi, rinnakartsinoomi, munasarjakartsinoomi ja mitmete teiste tsiteeritud kasvujate korral. Teadaolevalt normaalsed terved koed PRAME-i ei ekspresseeri, välja arvatud munandid, munasarjad, neerupealised ja mõned teised kirjanduses viidatud. ^(15,16)

Menetluse põhimõte:

Seda antikehaprodukti võib kasutada primaarse antikehana formaliniiga fikseeritud, parafiiniga manustatud koelõikude immunohistokeemia testimisel. Üldiselt immunohistokeemiline (IHC) värvimistehnikad võimaldavad visualiseerida antigeene, kasutades järjestikku a antigeeni vastane spetsiifiline antikeha (primaarne antikeha), primaarse antikeha sekundaarne antikeha (valikuline linkantikeha/sond), ensüümikompleks ja kromogeenne substraat, millesse on paigutatud pesemisetapid. Kromogeeni ensümaatilise aktiveerimine annab antigeeni kohas nähtava reaktsiooniproducti. Seejärel võib proovi värvida ja kaane libistada. Tulemusi tõlgendatakse valguse abil mikroskoop ja abi patofüsioloogiliste protsesside diferentsiaaldiagnostikas, mis võivad või ei pruugi olla seotud konkreetse antigeeniga.

Materjalid ja meetodid:

Kaasasolevad reaktiivid:

Host Allikas: Rabbit monoklonaalne

Liikide reaktsioonivõime: inimene. Teisi liike ei ole testitud.

Kloon: EPR20330

Isotüüp: IgG

Valgu kontsentratsioon: spetsiifiline IgG kontsentratsioon: võtke ühendust Biocare'i tehnilise toega

Spetsiifilisus: PRAME

Rakuline lokaliseerimine: tuum ja rakumembraan

Meetod: Afiinsuspuhastatud rekombinantne küülik, monoklonaalne.

Lahustamine, segamine, lahjendamine, tiitrimine:

Eellahjendatud antikehareaktiiv on ülaltoodud värvimissüsteemidega kasutamiseks optimaalselt lahjendatud. Edasine lahjendamine võib põhjustada antigeeni värvumise kadumise. Kasutaja peab kõik sellised muudatused kinnitama. Erinevused koetöötuses ja tehnilistes protseduurides kasutaja laboris võivad põhjustada tulemuste märkimisväärset varieeruvust,

mistõttu on vaja regulaarselt läbi viia ettevõttesesid kontrolle (vt kvaliteedikontrolli jaotist).

Kontsentreeritud reaktiiv vajab lahjendamist, nagu on näidatud ülaltoodud tabelis.

Tuntud rakendused:

Immunohistokeemia (formaliiniga fikseeritud parafiiniga kaetud koed)

Tarnitakse järgmiselt: puhverdatud soolalahus, pH 5,9–7,9, mis sisaldab valgukandjat ja vähem kui 0,1% naatriumasiidi säilitusainet. Lisateabe saamiseks vaadake ohutuskaarti.

Vajalikud materjalid ja reaktiivid, mida pole kaasas:

Mikroskoobi slaidid on positiivselt laetud.

Positiivsed ja negatiivsed koekontrollid
Desert Chamber (või sarnane kuivatusahi)

Ksüleen või ksüleeni asendaja

Etanool või reaktiivalkohol

Deklaratsioonikamber (survepliit)

Deioniseeritud või destilleeritud vesi

Pesupuhver

Eeltöötusreaktiivid

Peroksidaasi blokaad

Valguplokk (valikuline)

Tuvastussond ja polümeer

Negatiivsed kontrollreaktiivid

Kromogeenid

Hematoküliin (vastuvärv)

Sinistamise reaktiiv

Paigaldusvahend

Katteklaas

Valgusmikroskoop (40-400X suurendus)

Antikehatoote konfiguratsioonid on saadaval kasutamiseks ülaltoodud tabelis näidatud instrumentidel.

Säilitamine ja stabiilsus:

Hoida temperatuuril 2°C kuni 8°C. Toode on sellistes tingimustes säilitamisel stabiilne kuni viaali etiketile trükitud aegumiskuupäevani. Ärge kasutage pärast aegumiskuupäeva. Säilitamist muudes tingimustes kui ette nähtud tuleb kontrollida. Lahjendatud reaktiivid tuleb kohe ära kasutada; Hoidke järelejäänud reaktiivi temperatuuril 2 °C kuni 8 °C. Biocare ei ole kindlaks teinud kasutaja lahjendatud reaktiivi stabiilsust.

Positiivsed ja negatiivsed kontrollid tuleb läbi viia samaaegselt kõigi patsiendi proovidega. Kui täheldatakse ootamatut värvimist, mida ei saa seletada erinevustega laboratoorsetes protseduurides, ja kahtlustate probleemi antikehaga, võtke ühendust Biocare'i tehnilise toega numbril 1-800-542-2002 või veebisaidil biocare.net pakutava tehnilise toe teabe kaudu.

Proovi ettevalmistamine:

Formaliinis fikseeritud koed sobivad kasutamiseks enne parafiini manustamist. Luukuded tuleb enne kudede töötlemist katlakivi eemaldada, et hõlbustada kudede lõikamist ja vältida mikrotoomi labade kahjustamist. ^{1, 2}



60 Berry Drive
Pacheco, CA 94553
USA

57/190



TP v3 (12/15/2021)

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080



Westervoortsedijk 60
8627 AT Arnhem
The Netherlands

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Estonian

BIOCARE
M E D I C A L

Korralikult fikseeritud ja sisestatud kudesid, mis ekspresseerivad määratud sihtmärkantigeeni, tuleb hoida jahedas. 1988. aasta Clinical Laboratory Improvement Act (CLIA) nõuab artiklis 42 CFR § 493.1259(b), et „Labor peab säilitama värvitud objektiklaase vähemalt kümme aastat alates uurige ja säilitage prooviplokid vähemalt kaks aastat alates uurimise kuupäevast.“³

Kudede töötlemine enne värvimist:

Tehke kuumuse põhjustatud epitoomide otsimine (HIER) vastavalt allolevale soovitatud protokollile. On näidatud, et HIER-i rutiinne kasutamine enne IHC-d vähendab ebakõlasid ja standardiseerib värvimist.^{4,5}

Hoiatused ja ettevaatusabinõud :

1. See antikeha sisaldab vähem kui 0,1% naatriumasiidi . Alla 0,1% kontsentratsioonid ei ole USA 29 CFR 1910.1200, OSHA ohuteate ja EÜ direktiivi 91/155/EÜ kohaselt ohtlikud materjalid. Säilitusainena kasutatav naatriumasiid (NaN₃) on allaneelamisel mürgine . Naatriumasiid võib reageerida plii ja vase torustikuga , moodustades väga plahvatusohtlike metalliaside . Utiliseerimisel loputage suure koguse veega, et vältida asiidi kogunemist torustikku. (Haiguste tõrje keskus, 1976, riiklik tööohutuse ja töötervishoiu instituut, 1976)⁶
2. Proove enne ja pärast fikseerimist ning kõiki nendega kokkupuutuvaid materjale tuleb käsitseda nii, nagu need oleksid võimalised nakkust edasi kandma, ja kõrvaldada asjakohaste ettevaatusabinõudega. Ärge kunagi pipeteerige reaktiive suu kaudu ning vältige reaktiivide ja proovidega kokkupuudet naha ja limaskestadega. Kui reaktiivid või proovid puutuvad kokku tundlike piirkondadega, peske neid rohke veega.⁷
3. Reaktiivide mikroobne saastumine võib põhjustada mittespetsiifilise värvumise suurenemist.
4. Määratletust erinevad inkubatsiooniajad või temperatuurid võivad anda ekslikke tulemusi. Kasutaja peab kõik sellised muudatused kinnitama.
5. Ärge kasutage reaktiivi pärast vialille trükitud kõlblikkusaega.
6. Eellahjendatud antikehareaktiiv on kasutamiseks optimaalselt lahjendatud . Edasine lahjendamine võib põhjustada antigeeni värvumise kadumise.
7. Kontsentreeritud antikehareagendi lahjendamine tuleb enne kasutamist valideerida. Ükskõik milline kasutatav lahjendi, mis ei ole spetsiaalselt soovitatav, peab olema ka ühilduvuse ja stabiilsuse osas valideeritud.
8. Kõrvaldage kõik kasutatud reaktiivid ja kõik muud saastunud ühekordselt kasutatavad materjalid, järgides nakkusohtlike või potentsiaalselt nakkusohtlike jäätmeprotseduure. Iga labor vastutab tahkete ja vedelate jäätmeprotseduure eest vastavalt nende laadile ja ohtlikkuse astmele ning nende käitlemise ja kõrvaldamise (või töötlemise ja kõrvaldamise laskmise) eest vastavalt kehtivatele eeskirjadele.
9. Järgige oma asukohas kehtivaid kohalikke jäätmekäitluseeskirju ja ohutuskaardil olevaid soovitusi, et määrata kindlaks selle toote ohutu kõrvaldamine.
10. Ohutuskaart on saadaval nõudmisel ja asub aadressil <http://biocare.net>.
11. Selle seadmega seotud arvatavatest tõsistest intsidentidest teatamiseks võtke ühendust kohaliku Biocare'i esindaja ja selle liikmesriigi või riigi pädeva asutusega, kus kasutaja asub.

Kasutusjuhend:

PRAME [EPR20330] soovitatavad värvimisprotokollid:

IntelliPATH FLX and manual use:

API3252 IntelliPATH FLX ja käsitsi kasutamiseks on standarditud MACH 4 tuvastamissüsteemiga. Kasutage pesemisetappideks TBS-i.

Peroxide Block:	Blokeerige 5 minutit Peroxidized 1-ga.
Pretreatment:	Tehke soojuste otsimine Borg Decloakeri abil . Täpsemate juhiste saamiseks vaadake Borg Decloakeri andmelehte.
Protein Block (Optional):	Inkubeerige 5-10 minutit toatemperatuuril Background Punisheriga.

Primary Antibody:	Inkubeerige 30 minutit toatemperatuuril.
Detection:	Sond: puudub
	Polümeer: inkubeerida 30 minutit toatemperatuuril sekundaarse konjugeeritud polümeeriga.
Chromogen:	Inkubeerige 5 minutit toatemperatuuril Biocare'i DAB-ga – VÕI – Inkubeerige 5–7 minutit toatemperatuuril Warp Rediga.
Counterstain	Vastuvärvimine hematoksüliniga. Loputage deioniseeritud veega. Kandke 1 minutiks Tacha sinistamislahust. Loputage deioniseeritud veega.

ONCORE Pro Automated Slide Staining System:

OPAI3252 on mõeldud kasutamiseks koos ONCORE Proga. Täpsemad kasutusjuhised leiate kasutusjuhendist. Protokollid parameetrid protokolliredaktoris tuleks programmeerida järgmiselt.

Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	PRAME Rb	PRAME Rb AP
Protocol Template (Description):	Special Template (ONCORE Pro-Tect Detection Required)	Rb AP Template 1
Dewaxing (DS Buffer Option):	DS2-50	DS Buffer
Antigen Retrieval (AR Option):	AR1, high pH; 103°C	AR1, high pH; 103°C
Block Option:	Buffer	Buffer
Reagent Name, Time, Temp.:	PRAME Rb, 45 min., 25°C	PRAME Rb, 30 min., 25°C

Ventana BenchMark ULTRA:

AVI3252 on mõeldud kasutamiseks koos BenchMark ULTRAg. Täpsemad kasutusjuhised leiate kasutusjuhendist. Soovitatavad protokollid parameetrid on järgmised:

Template/Detection:	OptiView DAB IHC
Pretreatment Protocol:	CC1 64 minutes
Peroxidase:	Pre-Primary Peroxidase Inhibitor
Primary Antibody:	32 minutes, 36°C

Q Series – For Leica BOND-III:

ALI3252 on ette nähtud kasutamiseks koos Leica BOND-III-ga. Täpsemad kasutusjuhised leiate kasutusjuhendist. Soovitatavad protokollid parameetrid on järgmised:

Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	IHC Protocol F	IHC Protocol J
Detection:	Bond Polymer Refine	Bond Polymer Refine Red
HIER:	20 min with ER2	20 min with ER2
Peroxide Block:	5 min	
Marker (Primary Antibody):	15 min	15 min
Post Primary:	8 min	
Polymer:	8 min	
Post Primary AP:		20 min
Polymer AP:		30 min
Mixed Chromogen Refine:	10 min	10 min + 5 min
Hematoxylin:	5 min	5 min

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Estonian

BIOCARE
M E D I C A L

Kvaliteedi kontroll:

Vaadake CLSI kvaliteedistandardeid immunohistokeemiliste analüüside kavandamiseks ja rakendamiseks; Heakskiidetud juhiste teine väljaanne (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011⁸

Positiivne koekontroll: Melanoom, normaalne munand

Välised positiivsed kontrollmaterjalid peaksid olema värsked proovid, mis on fikseeritud, töödeldud ja sisestatud võimalikult kiiresti samamoodi nagu patsiendi proov(id). Positiivsed koekontrollid näitavad õigesti ettevalmistatud kudesid ja õigeid värvimistehnikaid. Igasse värvimistsükklisse tuleks lisada üks positiivne väline koekontroll iga katsetingimuste komplekti kohta.

Välise positiivsete kontrollmaterjalide jaoks kasutatavad koed tuleks valida patsiendi proovidest, millel on hästi iseloomustatud madal positiivse sihtaktiivsuse tase, mis annab nõrga positiivse värvumise. Välise positiivsete kontrollide madal positiivsus tase on loodud selleks, et tagada ebastabiilsusest või IHC meetodikaga seotud probleemidest tingitud väikeste muutuste tuvastamine primaarse antikeha tundlikkuses. Kaubanduslikult saadavad koekontrolli objektiklaasid või patsiendi proovidest erinevalt töödeldud proovid kinnitavad ainult reaktiivi toimivust ega kontrolli koe ettevalmistamist.

Teadaolevaid positiivseid koekontrolle tuleks kasutada ainult töödeldud kudede ja testreaktiivide õige toimimise jälgimiseks, mitte abivahendina patsiendi proovide spetsiifilise diagnoosi koostamisel. Kui positiivsed koekontrollid ei näita positiivset värvumist, tuleks analüüsitava proovide tulemused lugeda kehtetuks.

Negatiivsete kudede kontroll:

Kasutage igas värvimistsükklis negatiivset koekontrolli (teadaolevalt PRAME-negatiivne), mis on fikseeritud, töödeldud ja manustatud patsiendi proovi(de)ga identsel viisil, et kontrollida IHC primaarse antikeha spetsiifilisust. sihtantigeeni demonstreerimine ja spetsiifilise taustavärvimise indikaator (valepositiivne värvimine). Samuti võivad enamikus koeosades esinevad erinevad rakutüübid labori poolt kasutada sisemiste negatiivsete kontrollikohtadena, et kontrollida IHC toimivust spetsifikatsioonid. Negatiivse koe jaoks kasutatavate proovide tüübid ja allikad juhtelemendid on loetletud jaotises Toimivusnäitajad.

Kui negatiivse koekontrolli puhul ilmneb spetsiifiline värvumine (valepositiivne värvumine), tuleb patsiendi proovide tulemusi lugeda kehtetuks.

Mittespetsiifiline negatiivse reaktiivi kontroll:

Kasutage primaarse antikeha asemel mittespetsiifilist negatiivset reagendi kontrolli koos iga patsiendi proovi osaga, et hinnata mittespetsiifilist värvimist ja

võimaldavad paremini tõlgendada spetsiifilist värvumist antigeeni saidil. Ideaalis sisaldab negatiivne reaktiiv kontroll PRAME IgG antikeha, mis on toodetud koekultuuri supernatandist samamoodi nagu esmane. antikeha, kuid sellel ei ole spetsiifilist reaktsioonivõimet inimese kudedele samas maatriksis/lahuses kui Biocare'i antikeha. Lahjendage negatiivne kontrollantikeha sama immunoglobuliini või valgu kontsentratsioonini kui lahjendatud primaarne antikeha, kasutades identset lahjendit. Kui vasika loote seerum jääb pärast töötlemist puhtas antikehas alles, siis vasika loote seerumit valgukontsentratsiooniga, mis on samaväärne lahjendatud kontsentratsiooniga. kasutamiseks sobib ka primaarne antikeha samas lahjendis. (Vt kaasasolevat reaktiivi). Ainuüksi lahjendit võib kasutada vähem soovitava alternatiivina eelnevalt kirjeldatud negatiivsete reaktiivide kontrollidele. Negatiivse reaktiivi kontrolli inkubatsiooniperiood peaks vastama primaarse antikeha inkubatsiooniperioodile.

Kui seerialõikudel kasutatakse mitme antikeha paneele, võivad ühe objektiklaasi negatiivselt värvunud alad toimida negatiivse/mittespetsiifilise seondumise taustakontrollina teiste antikehade jaoks. Endogeense ensüümi aktiivsuse või ensüümide mittespetsiifilise seondumise eristamiseks spetsiifilisest immunoreaktiivsusest võib täiendavaid patsiendi kudesid

värvida ainult substraat-kromogeeni või ensüümi kompleksidega (PAP, avidiin-biotiin, streptavidiin) ja substraat-kromogeeni.

Testi kinnitamine:

Enne antikeha või värvimissüsteemi esmakordset kasutamist diagnostilises protseduuris peaks kasutaja kontrollima antikeha spetsiifilisust, testides seda mitmel ettevõttesisesel kudedel, millel on teadaolevad immunohistokeemilised omadused, mis esindavad teadaolevaid positiivseid ja negatiivseid kudesid. Vaadake eelnevalt tootelehe selles jaotises kirjeldatud kvaliteedikontrolli protseduure ja CAP sertifitseerimisprogrammi⁹ immunohistokeemia kvaliteedikontrolli soovitusi ja/või NCCLS IHC juhust¹⁰). Neid kvaliteedikontrolli protseduure tuleks korrata iga uue antikehapartii puhul või alati, kui analüüsiparameetrid muutuvad. Katse kontrollimiseks sobivad toimivusnäitajate jaotises loetletud koed.

Veotsing:

Järgige antikehaspetsiifilise protokolliga soovitusi vastavalt kaasasolevale andmelehele. Ebatüüpiliste tulemuste ilmnenemisel võtke ühendust Biocare'i tehnilise toega numbril 1-800-542-2002.

Värvimise tõlgendamine:

Positiivne koekontroll:

Näidatud antikehaga värvitud positiivset koekontrolli tuleks esmalt uurida, et teha kindlaks, kas kõik reaktiivid töötavad korralikult. Sihtrakkude sobiv värvimine (nagu ülalpool näidatud) näitab positiivset reaktsioonivõimet. Kui positiivsed koekontrollid ei näita positiivset värvumist, tuleks katseproovide tulemused lugeda kehtetuks.

Reaktsiooniproducti värvus võib varieeruda sõltuvalt kasutatud substraadi kromogeenidest. Oodatavate värvireaktsioonide kohta vaadake aluspinnal pakendi infolehti. Lisaks võib metakromaasiat täheldada värvimismeetodi variatsioonides.¹¹

Kui kasutatakse vastuvärvi, olenevalt kasutatud vastuvärvi inkubatsiooni pikkusest ja tõhususest, põhjustab vastuvärvimine raku tuumade värvuse. Liigne või mittetäielik vastuvärvimine võib kahjustada tulemuste õiget tõlgendamist. Soovitatud vastuvärvimise kohta vaadake protokoll/protokollis.

Negatiivsete kudede kontroll :

Negatiivset koekontrolli tuleks uurida pärast positiivset koekontrolli, et kontrollida sihtantigeeni märgistamise spetsiifilisust primaarse antikehaga. Spetsiifilise värvumise puudumine negatiivses koekontrollis kinnitab antikehade ristreaktiivsuse puudumist rakkude/rakukomponentide suhtes. Kui negatiivse väliskoe kontrolli korral ilmneb spetsiifiline värvumine (valepositiivne värvumine), tuleb patsiendi proovi tulemusi lugeda kehtetuks.

Mittespetsiifiline värvumine, kui see on olemas, on tavaliselt hajusa välimusega. Sidekoe juhuslikku värvimist võib täheldada ka liigselt formaliiniga fikseeritud kudede lõikudes. Värvimistulemuste tõlgendamiseks kasutage terveid rakke. Nekrootilised või degeneraatorunud rakud värvuvad sageli mittespetsiifiliselt.

Patsiendi kude:

Uurige näidatud antikehaga värvitud patsiendi proove viimane. Positiivset värvimise intensiivsust tuleks hinnata negatiivse reaktiivi kontrolli mis tahes mittespetsiifilise taustavärvimise kontekstis. Nagu iga immunohistokeemilise testi puhul, tähendab negatiivne tulemus seda, et antigeeni ei tuvastatud, mitte seda, et antigeen ei olnud analüüsitud rakkudes/koes. Vajadusel kasutage valenegatiivsete reaktsioonide tuvastamiseks antikehade paneeli.



60 Berry Drive
Pacheco, CA 94553
USA

59/190



TP v3 (12/15/2021)

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080



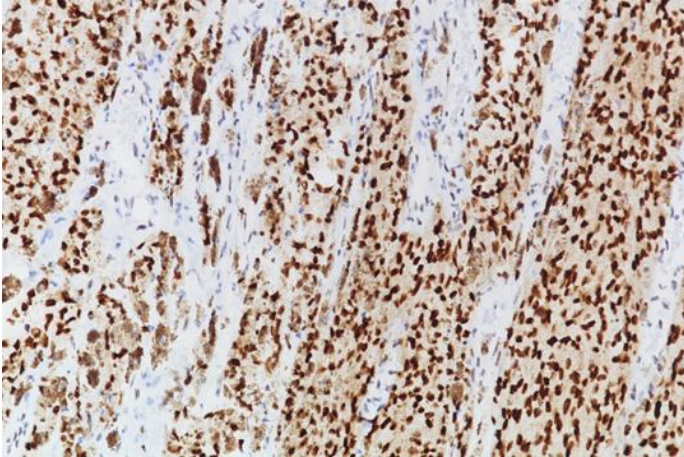
Westervoortsedijk 60
6827 AT Arnhem
The Netherlands

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Estonian

BIOCARE
M E D I C A L



PRAME [EPR20330] antikehaga värvitud melanoom.

Täpsemat teavet näidatud antikehade immunoreaktiivsuse kohta leiate jaotisest Kokkuvõtte ja selgitus, Piirangud ja Toimivusomadused.

Piirangud:

Üldised piirangud:

1. *In vitro* diagnostiliseks kasutamiseks
2. See toode on mõeldud ainult professionaalseks kasutamiseks: Immunohistokeemia on mitmeastmeline diagnostiline protsess, mis koosneb sobivate reaktiivide valimise erikoolitusest; kudede valik, fikseerimine ja töötlemine; IHC slaidi ettevalmistamine; ja värvimistulemuste tõlgendamine.
3. Kudede värvimine sõltub koe käsitsemisest ja töötlemisest enne värvimist. Ebaõige fikseerimine, külmutamine, sulatamine, pesemine, kuivatamine, kuumutamine, lõikamine või saastumine teiste kudede või vedelikega võib põhjustada artefakte, antikehade kinnijäämist või valenegatiivseid tulemusi. Ebajärjekindlad tulemused võivad olla tingitud fikseerimis- ja kinnistamismeetodite erinevustest või koe omastest ebakorrapärasustest.¹²
4. Liigne või mittetäielik vastuvärvimine võib kahjustada tulemuste õiget tõlgendamist.
5. Iga positiivse või negatiivse värvumise kliinilist tõlgendust tuleks hinnata kliinilise pildi, morfoloogia ja muude histopatoloogiliste kriteeriumide kontekstis. Positiivse või negatiivse värvumise kliinilist tõlgendamist tuleks täiendada morfoloogiliste uuringutega, milles kasutatakse nõuetekohast positiivset ja negatiivset sise- ja väliskontrolli ning muid diagnostilisi teste. Kvalifitseeritud patoloog, kes tunneb IHC antikehade, reaktiivide ja meetodite õiget kasutamist, vastutab kõigi IHC lõpliku preparaadi ettevalmistamiseks ja tõlgendamiseks kasutatud etappide tõlgendamise eest.
6. Antikehade optimaalne lahendus ja konkreetse rakenduse protokollid võivad erineda. Nende hulka kuuluvad (kuid mitte ainult) fikseerimine, kuumuse taastamise meetod, inkubatsiooniajad, koelõike paksus ja kasutatud tuvastamiskomplekt. Nende ainulaadsete reaktiivide ülima tundlikkuse tõttu ei ole loetletud soovitatavad inkubatsiooniajad ja tiitrid muude tuvastamissüsteemide puhul kohaldatavad, kuna tulemused võivad erineda. Andmelehe soovitusel ja protokollid põhinevad ainult Biocare toodete kasutamisel. Lõppkokkuvõttes vastutab uurija optimaalsete tingimuste kindlaksmääramise eest.
7. See toode ei ole ette nähtud kasutamiseks voolutsütomeetrias. Voolutsütomeetria jõudlusnäitajaid ei ole määratud.
8. B-hepatiidi viirusega nakatunud ja B-hepatiidi pinnaantigeeni (HBsAg) sisaldavate inimeste kudedel võib ilmnedä mädarõika peroksüdaasiga mittespetsiifiline värvumine.¹³
9. Reaktiivid võivad avaldada ootamatuid reaktsioone varem testimata kudedes. Ootamatute reaktsioonide võimalust isegi testitud

koerühmades ei saa täielikult välistada antigeeni ekspressiooni bioloogilise varieeruvuse tõttu kasvajates või muudes patoloogilistes kudedes.¹⁴ Dokumenteeritud ootamatu(te) reaktsiooni(de)ga võtke ühendust Biocare'i tehnilise toega numbril 1-800-542-2002 või veebisaidil biocare.net pakutava tehnilise toe teabe kaudu .

10. Normaalsed/mitteimmuunatud seerumid, mis pärinevad samast loomsest allikast kui blokeerimisetappides kasutatavad sekundaarsed antiseerumid, võivad autoantikehade või looduslike antikehade tõttu põhjustada valenegatiivseid või valepositiivseid tulemusi.
11. Valepositiivseid tulemusi võib näha valkude või substraadi reaktsiooniproduktide mitteimmunoloogilise seondumise tõttu. Need võivad olla põhjustatud ka pseudoperoksüdaasi aktiivsusest (erütrotsüüdid), endogeense peroksüdaasi aktiivsusest (tsütokroom C) või endogeensest biotiinist (nt maks, rind, aju, neer), olenevalt kasutatud immunovärvi tüübist.¹²

Tootepõhised piirangud:

Täiendavaid tootespetsiifilisi piiranguid pole.

Toimivusomadused:

Reprodutseeritavus:

Antikehade toimivuse reprodutseeritavust kontrolliti, testides valitud normaalset ja kasvajakudet erinevatel päevadel ja erinevatel instrumentidel mitme operaatoriga. Valitud kudede värvimine oli järjepidev ja viidi läbi ootuspäraselt.

Immunoreaktiivsus:

Tabelites 1 ja 2 on näidatud järgmised positiivsed ja negatiivsed immunoreaktiivsused.

Allpool esitatud loetelu ei ole ammendav, vaid iseloomustab näidatud antikehaga täheldatud immunoreaktiivsuse tüüpe.

Selle toote puhul ei ole täheldatud mittespetsiifiliste antikehade reaktsioonivõimet.

Oodatavate tulemuste kokkuvõtte:

PRAME levimust normaalses ja haigusseisundite kudedes hinnati kudede mikrokiipide (TMA) abil.

Testitud normaalsed koed värvusid ootuspäraselt, munandites täheldati kõrget värvimist ja teistes kudedes värvumist ei täheldatud. PRAME värvumist täheldati ootuspäraselt kõrgel tasemel melanoomi korral ja erinevatel tasemetel teistes vähikudedes, nagu munasarjas, kopsus, eesnäärmes ja rinnas.

Analüütiline jõudlus:

Viidi läbi tundlikkuse ja spetsiifilise värvimistestid ning tulemused on loetletud allpool .

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Estonian

BIOCARE
M E D I C A L

Tundlikkus ja spetsiifilisus:

Tabel 1: Antikeha tundlikkus ja spetsiifilisus määrati FFPE normaalsete kudede testimisega.

Pabertaskurätik	Positiivsed juhtumid	Juhtumid kokku
Suuraju	0	6
Väikeaju	0	3
Neerupealised	0	3
Munasarja	0	3
Pankreas	0	3
Hingetoru	0	3
Hüpopfüüsi	0	3
Munand*	3	3
Kilpnääre	0	3
Rind	0	3
Põrn	0	3
Tonsil	0	3
Harknääre	0	3
Luuüdi**	0	1
Kops	0	3
Süda	0	3
Söögitoru	0	3
Kõht	0	3
Peensoolde	0	3
Käärsool	0	3
Maks	0	3
Süljenääre	0	3
Neer	0	3
Eesnääre	0	3
Emakas	0	3
Emakakael	0	3
Skeletilihask	0	3
Nahk	0	3
Perifeerne närv	0	3
Vooderdavad rakud	0	3
Pea, kael ja süljenäärmed	0	6
Lümfisõlm	0	3

* 3-4 tugevusega tuumavärvimine

** Kaks näidist puudu

Tabel 2: Antikeha tundlikkus ja spetsiifilisus määrati erinevate FFPE neoplastiliste kudede testimise teel.

Patoloogia	Positiivsed juhtumid	Juhtumid kokku
Melanoom	29	39
Munasarjavähk	9	44
Rinnavähk	10	26
Käärsoolevähi	4	43
Kopsuvähk	21	50
Eesnäärmevähk	18	41
Adrenokortikaalne kartsinoom	0	1
Põievähk	0	2
Meningioom	0	2
Astrotsütoom	0	1
Lamerakk-kartsinoom (söögitoru)	0	2
Adenokartsinoom (mao)	0	2
Adenokartsinoom (peensool)	0	1
Adenokartsinoom (käärsool ja pärasool)	0	6
Neeruvähk	0	2
Maksavähk	0	4
Lümfioom	0	3
lamerakuline kartsinoom (pea ja kael, suuõõne, keel)	0	1
Nasofarüngeaalne kartsinoom	1	1
Adenokartsinoom (pankreas)	0	1
Adenokartsinoom (eesnäärme)	0	2
Adenoidne tsüstiline kartsinoom (pea ja kaela, süljenäärmed)	0	1
lamerakuline kartsinoom (nahk)	0	1
Seminoom	0	2
Kilpnäärmevähk	0	2
Emakakaelavähk	0	2
Endomeetriumi vähk	1	2

PRAME ekspressioonil erinevates neoplasmides võib kasvaja positiivsus olla erinev. Vt tabelist 3 positiivse värvumise kasvajarakkude protsenti (kategoriseeritud kvartiilide kaupa), mida täheldati tabelis 2 leitud mitmesugustes kasvajates.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Estonian

BIOCARE
M E D I C A L

Tabel 3: Protsentuaalne positiivne kasvajakarade värvumine erinevates FFPE neoplasmides.

Koed	Värvunud kasvajakarade protsent # juhtudest, millel on värvumine, protsent kogu # juhtumist (%)				
	<1%	1-25%	26-50%	51-75%	> 75%
Munasarjavähk	35/44 (79,5%)	2/44 (4,5%)	3/44 (6,8%)	3/44 (6,8%)	1/44 (2,3%)
Rinnavähk	16/26 (61,5%)	7/26 (26,9%)	1/26 (3,8%)	2/26 (7,7%)	0 (0%)
Käärsoolevähi	39/43 (88,4%)	4/43 (11,6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Kopsuvähk	29/50 (58,0%)	7/50 (14,0%)	4/50 (8,0%)	7/50 (14,0%)	3/50 (6,0%)
Eesnäärmevähk	23/41 (56,1%)	9/41 (22,0%)	3/41 (7,3%)	2/41 (4,9%)	4/41 (9,8%)
Nasofarüingealne kartsinoom	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1/1 (100%)
Endomeetriumi vähk	1/2 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	1/2 (50%)	0 (0%)
Melanoom	10/39 (25,6%)	6/39 (15,4%)	5/39 (12,8%)	6/39 (15,4%)	12/39 (30,8%)

Kasvajakarade värvumise protsent on esitatud kõigi värvumise intensiivsuste korral.

Kudede värvimine, mis näitab PRAME valgu ekspressiooni erinevat taset.

Analüütilise jõudluse testimise tulemused näitasid, et PRAME [EPR20330] antikeha suudab määratletud IHC protokollil kasutamisel PRAME valku õigesti tuvastada. Ebanormaalsete koetustide tulemused kinnitavad järeldust, et PRAME [EPR20330] on soovitatavate IHC protokollide kasutamisel tundlik PRAME valgu suhtes. Antikeha PRAME [EPR20330] suudab tuvastada PRAME valgu madalat kuni kõrget taset. Tavaline koeanalüüs ei näidanud PRAME ootamatut tuvastamist 32 koetüübi puhul. Ootamatut ristreaktsiooni ei esinenud. Tulemused toetavad väidet, et PRAME [EPR20330] antikeha on PRAME valgu suhtes väga spetsiifiline (analüütiline spetsiifilisus).

Kliiniline jõudlus:

Viidi läbi diagnostilise tundlikkuse ja spetsiifilisuse värvimistestid ning tulemused on loetletud allpool. Positiivne ja negatiivne immunoreaktiivsus on registreeritud tabelis 4.

Kolm melanoomi TMA slaidi värviti Biocare'is ja saadeti välisele patoloogile lugemiseks ja hindamiseks. Melanoomi kudedes oli värvimiskooride mitmekesisus vahemikus 0 (negatiivne) kuni tugeva (4). Enamik melanotsüütilistest nevidest ei näidanud PRAME-reaktiivsust, kuid mõnel oli tugev reaktiivsus.

Tabel 4: Protsentuaalne positiivne kasvajakarade värvumine erinevates FFPE melanotsüütilistes neoplasmides ja nahas.

Koed	Värvunud kasvajakarade protsent # juhtudest, millel on värvumine, protsent kogu # juhtumist (%)				
	<1%	1-25%	26-50%	51-75%	> 75%
Melanoom	28/133 (21,1%)	50/133 (37,6%)	10/133 (7,5%)	8/133 (6,0%)	37/133 (27,8%)
Metastaatiline melanoom	7/38 (18,4%)	10/38 (26,3%)	3/38 (7,9%)	2/38 (5,3%)	16/38 (42,1%)
Melanotsüütilised nevi	12/14 (85,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2/12 (14,3%)
Nahk	10/10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Kasvajakarade värvumise protsent on esitatud kõigi värvumise intensiivsuste korral.

Kudede värvimine, mis näitab PRAME valgu ekspressiooni erinevat taset.

Testi esmane tulemusnäitaja oli PRAME [EPR20330] antikeha diagnostilise tundlikkuse hindamine IHC protseduuris, mis määratleti kinnitatud positiivsete proovide positiivse melanoomi tuvastamise määrana. [TP/(TP+FN)]

Teise tulemusnäitaja oli diagnostilise spetsiifilisuse hindamine – kinnitatud melanoomi negatiivsete proovide negatiivne avastamismäär. [TN/(TN+FP)]

35 valenegatiivset melanoomi juhtumit olid saanud melanoomina kuldstandardi patoloogilise hinnangu, kuid olid PRAME suhtes negatiivsed. 136 juhtumit olid tõeliselt positiivsed, kuna neil diagnoositi melanoom ja neil oli signaal PRAME jaoks. 14 melanotsüütilise nevi proovis, mis diagnoositi healoomulisena, tuvastati kaks valepositiivset tulemust, mis näitasid signaali PRAME jaoks.

Andmete põhjal hinnanguline diagnostiline tundlikkus = $136 / (136 + 35) = 79,5\%$

Andmete põhjal hinnanguline diagnostiline spetsiifilisus = $22 / (22 + 2) = 91,7\%$

Meie arvutuste põhjal saame melanoomi tuvastamiseks hinnanguliseks diagnostiliseks tundlikkuseks 79,5% ja diagnostiliseks spetsiifilisuseks 91,7%.

Sellest järeldame, et PRAME [EPR20330] antikeha, mida Biocare testis melanoomi ja melanotsüütilise nevi proovidega, on melanoomi suhtes tundlik ja melanoomi suhtes väga spetsiifiline.

Veotsing: (selgitage iga alloleva punkti kohta)

- Objektiklaasid ei värvunud – Kontrollige, kas on kasutatud sobivat positiivset kontrollkudet, antikeha ja tuvastamisprodukte.
- Kõigi objektiklaaside nõrk värvumine – Kontrollige, kas on kasutatud sobivat positiivset kontrollkudet, antikeha ja tuvastamisprodukte.
- Kõigi slaidide liigne taust – võib esineda kõrge endogeense biotiini tase (kui kasutate biotiinipõhiseid tuvastamisprodukte), endogeenset HRP aktiivsust, mis muudab kromogeeni värviliseks lõpptooteks (kasutage peroksidaasi plokki), või võib esineda liigne mittespetsiifiline valgu interaktsioon (kasutage valku). blokk, nagu seerumi- või kaseiinipõhine blokeeriv lahus).
- Koeosad pesuvad slaididel inkubeerimise ajal maha – Kontrollige slaidi, et veenduda, et need on positiivselt laetud.
- Spetsiifiline värvumine on liiga tume – kontrollige protokollil, et teha kindlaks, kas objektiklaasile on rakendatud õige antikehade tiiter,

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Estonian

BIOCARE
M E D I C A L

samuti kõigi reaktiivide õiged inkubatsiooniajad. Lisaks veenduge, et protokollis on piisavalt pesemisetappe, et eemaldada pärast inkubatsioonietappide lõppu liigsed reaktiivid.

Viited:

1. Kiernan JA. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. J Histotechnol. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. Biotech Histochem. 1996 Jan;71(5):263-70.
6. Center for Disease Control Manual. Guide: Safety Management, NO. CDC-22, Atlanta, GA. April 30, 1976 "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts."
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
8. CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011
9. College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. [Http://www.cap.org](http://www.cap.org) (800) 323-4040.
10. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
11. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques. Histochemistry 1987; 86:471-478.
12. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Lab Med 1983;14:767.
13. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradishperoxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. Am J Clin Path 1980;73:626.
14. Herman GE and Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech & Histochem 1991;66:194.
15. Zhang W, et al. PRAME expression and promoter hypermethylation in epithelial ovarian cancer. Oncotarget, 2016 Jul; 7(29):45352-69.
16. Lezcano C, et al. PRAME expression in melanocytic tumors. Am J Surg Pathol. 2018 Nov; 42(11):1456-65.

Ultraline antikehad on välja töötanud ainult Biocare Medical LLC ja see ei tähenda, et Ventana Medical Systems, Inc või Roche on Biocare'i antikehadele heaks kiitnud või kinnitanud. Biocare, Ventana ja Roche ei ole mingil viisil seotud, seotud ega seotud. Ventana®, BenchMark®, ultraView ja OptiView on Roche kaubamärgid.

Q-seeria antikehad on välja töötanud ainult Biocare Medical LLC ja need ei tähenda, et Leica Biosystems on Biocare'i antikehadele heaks kiitnud või heaks kiitnud. Biocare ja Leica Biosystems ei ole mingil viisil seotud, seotud ega seotud. Leica, Leica Biosystems, BOND-MAX ja BOND-III on Leica Biosystems'i kaubamärgid.

Ohutuse ja toimivuse kokkuvõtte leiate siit:
<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Finnish

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats				
Format	Catalog Number	Description	Dilution	Diluent
Concentrate	ACI 3252 A, B	0.1, 0.5 mL	1:100	Van Gogh Yellow
Predilute	API 3252 AA, G20, H	6.0, 20, 25 mL	Ready-to-use	N/A
ONCORE Pro	OPAI 3252 T60	60 tests	Ready-to-use	N/A
Q Series-- For Leica BOND-III	ALI 3252 G7	7.0 mL	Ready-to-use	N/A
UltraLine -- For BenchMark	AVI 3252 G, G25	6.0, 25 mL	Ready-to-use	N/A

Käyttötarkoitus:

In vitro diagnostiseen käyttöön

PRAME [EPR20330] on kanin monoklonaalinen vasta-aine, joka on tarkoitettu laboratoriotuotteeseen sen jälkeen, kun tuumorin alkuperäinen diagnoosi on tehty tavanomaisella histopatologialla käyttäen ei-immunologisia histokemiallisia värjäyksiä, PRAME -proteiinin kvalitatiivisessa tunnistamisessa immunohistokemian (IHC) avulla formaliniinnitetyssä parafiinissa. upotettuja (FFPE) ihmiskudoksia. Kaikkien värjäytymien tai sen puuttumisen kliinistä tulkintaa tulisi täydentää morfologisilla tutkimuksilla, joissa käytetään asianmukaisia kontroleja, ja pätevän patologin tulee arvioida se potilaan kliinisen historian ja muiden diagnostisten testien yhteydessä muiden kliinisten määritelmien avuksi.

Yhteenvedo ja selitys:

PRAME sijaitsee kromosomissa 22q11.22 ja koodaa 509 aminohapon proteiinia. PRAME on autosomaalinen syöpä-kivesantigeeni (CTA) -geeni, jonka on osoitettu ilmentyvän melanomassa, erillisissä ei-melanosyyttisissä pahanlaatuisissa kasvaimissa, mukaan lukien ei-pienisolainen keuhkosyöpä, rintasyöpä, munasarjasyöpä ja monet muut mainitut. Normaaliin terveiden kudosten ei tiedetä ilmentävän PRAMEa paitsi kiveksissä, munasarjoissa, lisämunuaisissa ja muutamassa muussa kirjallisuudessa mainitussa. ^(15,16)

Menettelyn periaate:

Tätä vasta-ainetuotetta voidaan käyttää ensisijaisena vasta-aineena formaliniinilla kiinnitettyjen, parafiiniin upotettujen kudosteiden immunohistokemian testauksessa. Yleensä immunohistokemiallinen (IHC) värjäystekniikat mahdollistavat antigeenien visualisoinnin soveltamalla peräkkäin a spesifinen vasta-aine antigeenille (primaarinen vasta-aine), sekundaarinen vasta-aine primaariselle vasta-aineelle (valinnainen linkkivasta-aine/koetin), entsyymikompleksi ja kromogeeninen substraatti, jossa on pesuvaiheet. Kromogeenin entsyymäattinen aktivaatio johtaa näkyvään reaktiotuotteeseen antigeenikohdassa. Näyte voidaan sitten vastavärjätä ja kansi liu'uttaa. Tulokset tulkitaan valon avulla mikroskoopi ja apu patofysiologisten prosessien erotusdiagnoosissa, jotka voivat tai olla ei välttämättä liity tiettyyn antigeeniin.

Materiaalit ja menetelmät:

Mukana toimitetut reagenssit:

Isäntälähde: Rabbit monoklonaalinen

Lajien reaktiivisuus: Ihminen. Muita lajeja ei ole testattu.

Klooni: EPR20330

Isotyppi: IgG

Proteiinipitoisuus: Spesifinen IgG-pitoisuus: Ota yhteyttä Biocaren tekniseen tukeen

Erikoisuus: PRAME

Solujen lokalisointi: Tuma ja solukalvo

Menetelmä: Affiniteettipuhdistettu rekombinantti kani monoklonaalinen.

Liuttaminen, sekoitus, laimennus, titraus:

Esilaimennettu vasta-ainereagenssi on optimaalisesti laimennettu käytettäväksi yllä lueteltujen värjäysjärjestelmien kanssa. Lisälaimennus voi johtaa antigeenin värjäytymisen menetykseen. Käyttäjän on vahvistettava kaikki tällaiset muutokset. Erot kudosten käsittelyssä ja teknisissä menetelmissä käyttäjän laboratorioissa voivat aiheuttaa merkittäviä

vaihteluita tuloksissa, mikä edellyttää säännöllistä sisäistä valvontaa (katso Laadunvalvonta-osa).

Väkevä reagenssi vaatii laimentamisen yllä olevan taulukon mukaisesti.

Tunnetut sovellukset:

Immunohistokemia (formaliinilla kiinnitetyt parafiiniin upotetut kudokset)

Toimitetaan muodossa: Puskuroitu suolaliuos, pH 5,9-7,9, joka sisältää proteiinikantajaa ja alle 0,1 % natriumatsidia . Katso lisätietoja käyttöturvallisuustiedotteesta.

Tarvittavat materiaalit ja reagenssit, joita ei toimiteta:

Mikroskoopin objektilasit ovat positiivisesti varattuja.

Positiiviset ja negatiiviset kudoskontrollit

Desert Chamber (tai vastaava kuivausuuni)

Ksyleeni tai ksyleenin korvike

Etanoli tai reagenssialkoholi

Peittokammio (painekeitin)

Deionisoitu tai tislattu vesi

Pesupuskuri

Esikäsittelyreagenssit

Peroksidaasin esto

Proteiiniblokki (valinnainen)

Tunnistin ja polymeeri

Negatiiviset kontrollireagenssit

Kromogeenit

Hematoksyliini (vastavärjäys)

Sinitysreagenssi

Asennusväline

Suojalasi

Valomikroskooppi (40-400X suurennus)

Vasta-ainetuotteen konfiguraatiot ovat käytettävissä yllä olevassa taulukossa osoitetuissa instrumenteissa.

Varastointi ja vakaus:

Säilytä 2°C - 8°C. Tuote on stabiili injektiopullon etikettiin painettuun viimeiseen käyttöpäivään asti, kun sitä säilytetään näissä olosuhteissa. Älä käytä viimeisen käyttöpäivän jälkeen. Varastointi muissa kuin määritellyissä olosuhteissa on tarkistettava. Laimennetut reagenssit tulee käyttää viipymättä; Säilytä jäljellä oleva reagenssi 2-8 °C:ssa. Biocare ei ole vahvistanut käyttäjän laimennetun reagenssin stabiiliisuutta .

Positiiviset ja negatiiviset kontrollit tulee suorittaa samanaikaisesti kaikkien potilasnäytteiden kanssa. Jos havaitaan odottamatonta värjäytymistä, jota ei voida selittää laboratoriomenetelmien vaihteluilla, ja epäillään vasta-aineongelmaa, ota yhteyttä Biocaren tekniseen tukeen numeroon 1-800-542-2002 tai biocare.net-sivustolla olevien teknisen tuen tietojen kautta.

Näytteen valmistus:

Formaliiniin kiinnitetyt kudokset soveltuvat käytettäväksi ennen parafiiniin upottamista. Luukudokset tulee poistaa kalkki ennen kudosten käsittelyä kudoksen leikkaamisen helpottamiseksi ja mikrotomin terien vaurioitumisen estämiseksi. ^{1, 2}



60 Berry Drive
Pacheco, CA 94553
USA

64/190



TP v3 (12/15/2021)

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080



Westervoortsedijk 60
6827 AT Arnhem
The Netherlands

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Finnish

Asianmukaisesti kiinnitetty ja upotetut kudokset, jotka ilmentävät määritettyä antigeenikohdetta, tulee säilyttää viileässä paikassa. Vuoden 1988 Clinical Laboratory Improvement Act (CLIA) -lain 42 CFR § 493.1259(b) edellyttää, että "Laboratorion on säilytettävä värjätyt objektilasit vähintään kymmenen vuotta niiden päivämäärästä lukien. Tutkia ja säilyttää näytekappaleet vähintään kaksi vuotta tutkimuspäivästä."³

Kudosten hoito ennen värjäystä:

Suorita Heat Induced Epitope Retrieval (HIER) alla suositellun protokollan mukaisesti. HIER:n rutiinimaisen käytön ennen IHC:tä on osoitettu minimoivan epäjohdonmukaisuudet ja standardoivan värjäytymistä.^{4,5}

Varoitukset ja varotoimet :

- Tämä vasta-aine sisältää alle 0,1 % natriumatsidia . Alle 0,1 %:n pitoisuudet eivät ole raportoitavia vaarallisia aineita US 29 CFR 1910.1200, OSHA Hazard communicationin ja EY-direktiivin 91/155/EC mukaisesti. Säilöntäaineena käytetty natriumatsidi (NaN₃) on myrkyllistä nieltynä. Natriumatsidi voi reagoida lyijy- ja kupariputkiston kanssa muodostaen erittäin räjähtäviä metalliatsideja . Hävittämisen yhteydessä huuhtelee runsaalla vedellä, jotta putkistoihin ei kerry atsidia . (Center for Disease Control, 1976, National Institute of Occupational Safety and Health, 1976)⁶
- Näytteitä ennen kiinnitystä ja sen jälkeen sekä kaikkia niille altistettuja materiaaleja tulee käsitellä ikään kuin ne voisivat välittää infektiota, ja ne on hävitettävä asianmukaisin varotoimin. Älä koskaan pipetoi reagensseja suun kautta ja vältä koskettamasta ihoa ja limakalvoja reagenssien ja näytteiden kanssa. Jos reagenssit tai näytteet joutuvat kosketuksiin herkempien alueiden kanssa, pese runsaalla vedellä.⁷
- Reagenssien mikrobikontaminaatio voi johtaa epäspesifisen värjäytymisen lisääntymiseen.
- Muut kuin ilmoitetut inkubointiajat tai lämpötilat voivat antaa virheellisiä tuloksia. Käyttäjän on vahvistettava kaikki tällaiset muutokset.
- Älä käytä reagenssia pulloon painetun viimeisen käyttöpäivämäärän jälkeen.
- Esilaimennettu vasta-ainereagenssi on optimaalisesti laimennettu käyttöä varten . Lisälaimennus voi johtaa antigeenin värjäytymisen menetykseen.
- Väkevän vasta-ainereagenssin laimennus on validoitava ennen käyttöä. Minkä tahansa käytettävä laimennusaine, jota ei erityisesti suositella, on myös validoitava yhteensopivuuden ja stabiilisuuden suhteen.
- Hävitä kaikki käytetyt reagenssit ja muut saastuneet kertakäyttöiset materiaalit tarttuvan tai mahdollisesti tarttuvan jätteen käsittelyä koskevien menettelyjen mukaisesti. Jokaisen laboratorion vastuulla on käsitellä kiinteää ja nestemäistä jätettä niiden luonteen ja vaarallisuusasteen mukaisesti sekä käsitellä ja hävittää (tai käsitellä ja hävittää) soveltuvin määräysten mukaisesti.
- Noudata sijaintisi paikallisia hävitysmääräyksiä sekä käyttöturvallisuustiedotteen suosituksia määrittääksesi tämän tuotteen turvallisen hävittämisen.
- Käyttöturvallisuustiedote on saatavilla pyynnöstä, ja se sijaitsee osoitteessa <http://biocare.net>.
- Jos haluat ilmoittaa tähän laitteeseen liittyvistä epäilyistä vakavista tapahtumista, ota yhteyttä paikalliseen Biocaren edustajaan ja sen jäsenvaltion tai maan toimivaltaiseen viranomaiseen, johon käyttäjä on sijoittautunut.

Käyttöohjeet:

PRAME:n suositellut värjäysprotokollat [EPR20330]:

IntelliPATH FLX and manual use:

API3252 IntelliPATH FLX:lle ja manuaaliseen käyttöön on standardoitu MACH 4 -tunnistusjärjestelmällä. Käytä TBS:ää pesuvaiheisiin.	
Peroxide Block:	Estä 5 minuuttia Peroxidized 1:llä.
Pretreatment:	Suorita lämmön talteenotto käyttämällä Borg Decloakeria . Katso tarkemmat ohjeet Borg Decloaker -tietolomakkeesta.

BIOCARE
M E D I C A L

Protein Block (Optional):	Inkuboi 5-10 minuuttia huoneenlämpötilassa Background Punisherin kanssa.
Primary Antibody:	Inkuboi 30 minuuttia huoneenlämpötilassa.
Detection:	Anturi: N/A Polymeeri: Inkuboi 30 minuuttia huoneenlämpötilassa sekundaarikonjugoidun polymeerin kanssa.
Chromogen:	Inkuboi 5 minuuttia huoneenlämpötilassa Biocaren DAB:n kanssa – TAI – Inkuboi 5–7 minuuttia huoneenlämpötilassa Warp Redin kanssa.
Counterstain	Vastavärjäys hematoksyliinillä. Huuhtelee deionisoidulla vedellä. Levitä Tacha's Bluing -liuosta 1 minuutin ajan. Huuhtelee deionisoidulla vedellä.

ONCORE Pro Automated Slide Staining System:

OPAI3252 on tarkoitettu käytettäväksi ONCORE Pron kanssa. Katso käyttöoppaasta tarkat käyttöohjeet. Protokollaparametrit Protocol Editorissa tulee ohjelmoida seuraavasti:		
Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	PRAME Rb	PRAME Rb AP
Protocol Template (Description):	Special Template (ONCORE Pro-Tect Detection Required)	Rb AP Template 1
Dewaxing (DS Buffer Option):	DS2-50	DS Buffer
Antigen Retrieval (AR Option):	AR1, high pH; 103°C	AR1, high pH; 103°C
Block Option:	Buffer	Buffer
Reagent Name, Time, Temp.:	PRAME Rb, 45 min., 25°C	PRAME Rb, 30 min., 25°C

Ventana BenchMark ULTRA:

AVI3252 on tarkoitettu käytettäväksi BenchMark ULTRA:n kanssa. Katso käyttöoppaasta tarkat käyttöohjeet. Suositellut protokollaparametrit ovat seuraavat:	
Template/Detection:	OptiView DAB IHC
Pretreatment Protocol:	CC1 64 minutes
Peroxidase:	Pre-Primary Peroxidase Inhibitor
Primary Antibody:	32 minutes, 36°C

Q Series – For Leica BOND-III:

ALI3252 on tarkoitettu käytettäväksi Leica BOND-III:n kanssa. Katso käyttöoppaasta tarkat käyttöohjeet. Suositellut protokollaparametrit ovat seuraavat:		
Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	IHC Protocol F	IHC Protocol J
Detection:	Bond Polymer Refine	Bond Polymer Refine Red
HIER:	20 min with ER2	20 min with ER2
Peroxide Block:	5 min	
Marker (Primary Antibody):	15 min	15 min
Post Primary:	8 min	
Polymer:	8 min	
Post Primary AP:		20 min

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Finnish

BIOCARE
M E D I C A L

Polymer AP:		30 min
Mixed Chromogen Refine:	10 min	10 min + 5 min
Hematoxylin:	5 min	5 min

Laadunvalvonta:

Katso CLSI-laatustandardit immunohistokemiallisten määritysten suunnittelua ja toteutusta varten; Hyväksytty Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011⁸

Positiivinen kudostestaus: Melanooma, normaali kives

Ulkoiset positiiviset kontrollimateriaalit tulee olla tuoreita näytteitä, jotka on kiinnitetty, käsitelty ja upotettava mahdollisimman pian samalla tavalla kuin potilasnäytteet. Positiiviset kudostestaukset osoittavat oikein valmistettuja kudoksia ja asianmukaisia värjäystekniikoita. Yksi positiivinen ulkoinen kudostestaus jokaista testiolosuhteita kohden tulisi sisällyttää jokaiseen värjäysajoon.

Ulkoisiin positiivisiin kontrollimateriaaleihin käytetyt kudokset tulee valita potilasnäytteistä, joissa on hyvin karakterisoitu alhainen positiivinen kohdeaktiivisuus, joka antaa heikon positiivisen värjäytymisen. Ulkoisten positiivisten kontrollien alhainen positiivisuustaso on suunniteltu varmistamaan pienten muutosten havaitseminen primaarisen vasta-aineen herkkyudessa epästabiilisuudesta tai IHC-metodologian ongelmista. Kaupallisesti saatavilla olevat kudostestaukset tai näytteet, jotka on käsitelty eri tavalla kuin potilasnäyte(t), validoivat vain reagenssin suorituskyvyn, eivätkä ne varmista kudosten valmistelua.

Tunnettuja positiivisia kudostestauksia tulee käyttää vain prosessoitujen kudosten ja testireagenssin oikean suorituskyvyn seurantaan sen sijaan, että ne olisivat apuna potilasnäytteiden erityisen diagnoosin laadimisessa. Jos positiiviset kudostestaukset eivät osoita positiivista värjäytymistä, testinäytteiden tuloksia on pidettävä virheellisinä.

Negatiivisten kudosten testi:

Käytä negatiivista kudostestauksia (joka tiedetään olevan PRAME-negatiivinen), joka on kiinnitetty, käsitelty ja upotettu identtisellä tavalla potilasnäytteen (näytteiden) kanssa jokaisessa värjäysajossa varmistaaksesi IHC:n primaarisen vasta-aineen spesifisyyden. Kohdeantigeenin osoittamiseen ja spesifisen taustavärjäytymisen osoittamiseen (väärä positiivinen värjäys). Myös useimmat eri solutyypit, joita esiintyy useimmissa kudostestauksissa, voivat laboratorio käyttää niitä sisäisinä negatiivisina kontrollipaikkoina IHC:n suorituskyvyn tarkistamiseen tekniset tiedot. Näytetyypit ja -lähteet, joita voidaan käyttää negatiiviseen kudostestaukseen säätimet on lueteltu Suorituskyvyominaisuudet-osiossa.

Jos negatiivisessa kudostestauksessa esiintyy spesifistä värjäytymistä (väärä positiivinen värjäytyminen), potilasnäytteillä saatuja tuloksia on pidettävä virheellisinä.

Epäspesifinen negatiivinen reagenssikontrolli:

Käytä epäspesifistä negatiivista reagenssikontrollia primaarisen vasta-aineen sijasta kunkin potilasnäytteen leikkeen kanssa arvioidaksesi epäspesifistä värjäytymistä ja mahdollistaa spesifisen värjäytymisen paremman tulkinnan antigeenikohdassa. Ihannetapauksessa negatiivinen reagenssikontrolli sisältää PRAME IgG-vasta-aineen, joka on tuotettu kudostestauksen supernatantista samalla tavalla kuin primaarinen vasta-aine, mutta sillä ei ole spesifistä reaktiivisuutta ihmiskudosten kanssa samassa matriisissa/liuoksessa kuin Biocare- vasta-aine. Laimenna negatiivinen kontrollivasta-aine samaan immunoglobuliini- tai proteiinipitoisuuteen kuin laimennettu primäärinen vasta-aine vasta-aine käyttäen samaa laimennusainetta. Jos vasikan sikiön seerumi jää puhtaaseen vasta-aineeseen käsittelyn jälkeen, vasikan sikiön seerumi proteiinipitoisuudessa, joka vastaa laimennettua Primaarinen vasta-aine samassa laimentimessa soveltuu myös käytettäväksi. (Katso toimitettua reagenssia). Pelkkää laimennusainetta voidaan käyttää vähemmän toivottavana vaihtoehtona

aiemmin kuvatuille negatiivisille reagenssikontrolleille. Negatiivisen reagenssikontrollin inkubaatioajan tulee vastata primaarisen vasta-aineen inkubaatioaikaa.

Kun sarjaleikkeissä käytetään useiden vasta-aineiden paneeleja, yhden objektin negatiivisesti värjäytyneet alueet voivat toimia negatiivisena/epäspesifisenä sitoutumisen taustakontrollina muille vasta-aineille. Endogeenisen entsyymiaktiivisuuden tai entsyymien epäspesifisen sitoutumisen erottamiseksi spesifisestä immunoreaktiivisuudesta voidaan potilaan lisäksi värjätä yksinomaan substraatti-kromogeeni- tai entsyymikomplekseilla (PAP, avidiini-biotiini, streptavidini) ja substraatti-kromogeenilla, vastaavasti.

Määrittämisen vahvistus:

Ennen vasta-aineen tai värjäysjärjestelmän ensimmäistä käyttöä diagnostisessa toimenpiteessä käyttäjän tulee varmistaa vasta-aineen spesifisyys testaamalla se sarjalla yrityksen sisäisiä kudoksia, joiden immunohistokemialliset suorituskyvyominaisuudet tunnetaan ja jotka edustavat tunnettuja positiivisia ja negatiivisia kudoksia. Katso laadunvalvontamenettelyt, jotka on kuvattu aiemmin tässä tuoteselosteen osassa ja CAP-sertifiointiohjelman⁹ Immunohistochemistry laadunvalvontasuosituksissa ja/tai NCCLS IHC -ohjeessa¹⁰). Nämä laadunvalvontatoimenpiteet on toistettava jokaiselle uudelle vasta-aineerille tai aina, kun määrittämissä tapahtuu muutoksia. Suorituskyvyominaisuudet-osiossa luetellut kudokset soveltuvat määrittämisen todentamiseen.

Ongelmien kartoittaminen:

Noudata vasta-aineita koskevia protokollasuosituksia toimitetun tietolomakkeen mukaisesti. Jos epätyypillisiä tuloksia ilmenee, ota yhteyttä Biocaren tekniseen tukeen numerossa 1-800-542-2002.

Värjäyksen tulkinta:

Positiivinen kudostestaus:

Osoitetuilla vasta-aineilla värjätty positiivinen kudostestaus tulee ensin tutkia sen varmistamiseksi, että kaikki reagenssit toimivat oikein. Kohdesolujen asianmukainen värjäys (kuten edellä on osoitettu) osoittaa positiivista reaktiivisuutta. Jos positiiviset kudostestaukset eivät osoita positiivista värjäytymistä, testinäytteillä saatuja tuloksia on pidettävä virheellisinä.

Reaktiotuotteen väri voi vaihdella riippuen käytetyistä substraattikromogeenista. Katso odotetut värireaktiot alustan pakkauselosteista. Lisäksi metakromiaa voidaan havaita värjäysmenettelyn muunnelmassa.¹¹

Kun käytetään vastavärjäystä, riippuen käytetyn vastavärjäyksen inkubaation pituudesta ja tehokkuudesta, vastavärjäys johtaa soluytimien värjäämiseen. Liiallinen tai epätäydellinen vastavärjäys voi vaarantaa tulosten oikean tulkinnan. Katso suositellut vastavärjäyskäytännöt.

Negatiivisten kudosten testi:

Negatiivinen kudostestaus tulee tutkia positiivisen kudostestauksen jälkeen primaarisen vasta-aineen kohdeantigeenin leiman spesifisyyden varmistamiseksi. Spesifisen värjäytymisen puuttuminen negatiivisessa kudostestauksessa vahvistaa vasta-aineen ristireaktiivisuuden puuttumisen solu- ja solukomponentteja kohtaan. Jos negatiivisessa ulkoisessa kudostestauksessa esiintyy erityistä värjäytymistä (väärä positiivinen värjäytyminen), potilasnäytteen tuloksia on pidettävä virheellisinä.

Epäspesifinen värjäys, jos sitä esiintyy, on yleensä hajanainen. Sidekudoksen satunnaista värjäytymistä voidaan havaita myös leikkeissä, jotka ovat peräisin liikaa formaliinista kiinnitetystä kudoksesta. Käytä ehjiä soluja värjäystulosten tulkittamiseen. Nekroottiset tai rappeutuneet solut värjäytyvät usein epäspesifisesti.

PRAME [EPR20330]

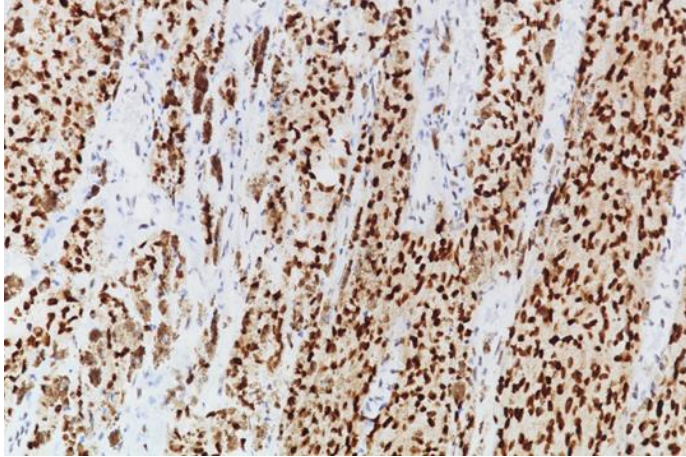
Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Finnish

BIOCARE
M E D I C A L

Potilaan kudos:

Tutki potilasnäytteet, jotka on värjätty osoitetulla vasta-aineella kestää. Positiivinen värjäytymisintensiteetti tulee arvioida negatiivisen reagenssikontrollin epäspesifisen taustavärjäyksen yhteydessä. Kuten missä tahansa immunohistokemiallisessa testissä, negatiivinen tulos tarkoittaa, että antigeeniä ei havaittu, ei sitä, että antigeeni puuttui määritetyistä soluista/kudoksesta. Käytä tarvittaessa vasta-ainepaneelia tunnistaksesi väärät negatiiviset reaktiot.



Melanooma värjätty PRAME [EPR20330] -vasta-aineella.

Katso Yhteenveto ja selitys, Rajoitukset ja Suorituskykyominaisuudet saadaksesi erityisiä tietoja osoitetusta vasta-aineen immunoreaktiivisuudesta.

Rajoitukset:

Yleiset rajoitukset:

1. *In vitro* diagnostiseen käyttöön
2. Tämä tuote on tarkoitettu vain ammattikäyttöön: Immunohistokemia on monivaiheinen diagnostinen prosessi, joka koostuu erityiskoulutuksesta sopivien reagenssien valinnassa; kudosten valinta, kiinnitys ja käsittely; IHC-levyn valmistus; ja värjäytulosten tulkinta.
3. Kudosvärjäys riippuu kudoksen käsittelystä ja prosessoinnista ennen värjäystä. Väärä kiinnitys, jäädyttäminen, sulattaminen, pesu, kuivaus, kuumennus, leikkaus tai kontaminaatio muilla kudoksilla tai nesteillä voi aiheuttaa artefakteja, vasta-aineiden vangitsemista tai vääriä negatiivisia tuloksia. Epäjohdonmukaiset tulokset voivat johtua vaihteluista kiinnitys- ja upotusmenetelmissä tai kudoksen sisäisistä epäsäännöllisyyksistä.¹²
4. Liiallinen tai epätäydellinen vastavärjäys voi vaarantaa tulosten oikean tulkinnan.
5. Kaikkien positiivisten tai negatiivisten värjäytymien kliininen tulkinta on arvioitava kliinisen esityksen, morfologian ja muiden histopatologisten kriteerien yhteydessä. Positiivisen tai negatiivisen värjäytymisen kliinistä tulkintaa tulisi täydentää morfologisilla tutkimuksilla, joissa käytetään asianmukaisia positiivisia ja negatiivisia sisäisiä ja ulkoisia kontrolleja sekä muita diagnostisia testejä. Pätevän patologin, joka tuntee IHC-vasta-aineiden, reagenssien ja menetelmien oikean käytön, vastuulla on tulkita kaikki vaiheet, joita käytetään lopullisen IHC-valmisteen valmistelussa ja tulkinnassa.
6. Optimaalinen vasta-aineen laimennus ja protokollat tietyille sovellukselle voivat vaihdella. Näitä ovat muun muassa kiinnitys, lämmön talteenottomenetelmä, inkubaatioajat, kudisleikkeen paksaus ja käytetty havaitsemispakkaus. Näiden ainutlaatuisten reagenssien ylivoimaisen herkkyyden vuoksi lueteltuja suositeltuja inkubointiaikoja ja tiittereitä ei voida soveltaa muihin tunnistusjärjestelmiin, koska tulokset voivat vaihdella. Käyttöturvallisuustiedotteen suositukset ja

protokollat perustuvat Biocare- tuotteiden yksinomaiseen käyttöön.

7. Viime kädessä on tutkijan vastuulla määrittää optimaaliset olosuhteet.
7. Tätä tuotetta ei ole tarkoitettu käytettäväksi virtausytometriassa. Virtausytometrian suorituskykyominaisuuksia ei ole määritetty.
8. Hepatiitti B -viruksella infektoiduneiden henkilöiden kudoksissa, jotka sisältävät hepatiitti B -pinta-antigeeniä (HBsAg), voi esiintyä epäspesifistä piparjuuriperoksidaasin värjäytymistä.¹³
9. Reagenssit voivat osoittaa odottamattomia reaktioita aiemmin testaamattomissa kudoksissa. Odottamattomien reaktioiden mahdollisuutta ei edes testatuissa kudosryhmissä voida täysin eliminoida antigeenin ilmentymisen biologisen vaihtelun vuoksi kasvaimissa tai muissa patologisissa kudoksissa.¹⁴ Ota yhteyttä Biocaren tekniseen tukeen numerossa 1-800-542-2002 tai biocare.net-sivustossa olevien teknisen tuen tietojen kautta ja kerro dokumentoiduista odottamattomista reaktioista.
10. Normaaliit/ei-immuniseerumit samasta eläinlähteestä kuin estovaiheissa käytetyt sekundaariset antiseerumit voivat aiheuttaa vääriä negatiivisia tai vääriä positiivisia tuloksia autovasta-aineista tai luonnollisista vasta-aineista johtuen.
11. Vääriä positiivisia tuloksia voidaan nähdä johtuen proteiinien tai substraattireaktiivien ei-immunologisesta sitoutumisesta. Ne voivat johtua myös pseudoperoksidaasiaktiivisuudesta (erytrosyytit), endogeenisestä peroksidaasiaktiivisuudesta (sytokromi C) tai endogeenisestä biotiinista (esim. maksa, rinta, aivot, munuaiset) riippuen käytetyn immunovärjäyksen tyypistä.¹²

Tuotekohtaiset rajoitukset:

Ei muita tuotekohtaisia rajoituksia.

Suorituskykyominaisuudet:

Toistettavuus:

Vasta-aineen suorituskyvyn toistettavuus varmistettiin testaamalla valittua normaalia ja kasvainkudosta eri päivinä ja erilaisilla instrumenteilla useilla käyttäjillä. Valittujen kudosten värjäys oli johdonmukaista ja suoritettiin odotetulla tavalla.

Immunoreaktiivisuus:

Seuraavat positiiviset ja negatiiviset immunoreaktiivisuudet on osoitettu alla olevissa taulukoissa 1 ja 2.

Alla oleva luettelo ei ole tyhjentyvä, mutta se kuvaa ilmoitetun vasta-aineen yhteydessä havaittuja immunoreaktiivisuustyyppjejä.

Tässä tuotteessa ei ole havaittu ei-spesifistä vasta-ainereaktiivisuutta.

Yhteenveto odotetuista tuloksista:

PRAME:n esiintyvyys normaaleissa ja sairaustilan kudoksissa arvioitiin käyttämällä Tissue Microarrays (TMA:ita).

Testatut normaalit kudokset värjäytyivät odotetusti, kiveksissä havaittiin korkeita värjäytymistasoja, eikä värjäytymistä muissa kudoksissa. PRAME:n värjäytymistä havaittiin odotetusti korkealla tasolla melanoomassa ja vaihtelevalla tasolla muissa syöpäkudoksissa, kuten munasarjassa, keuhkoissa, eturauhasessa ja rinnassa.

Analyttinen suorituskyky:

Värjäytestit herkkyyden ja spesifisyyden varalta suoritettiin ja tulokset on lueteltu alla .

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Finnish

BIOCARE
M E D I C A L

Herkkyyks ja spesifisyys:

Taulukko 1: Vasta-aineen herkkyyks ja spesifisyys määritettiin testaamalla normaaleja FFPE-kudoksia.

Kudos	Positiiviset tapaukset	Tapauksia yhteensä
Cerebrum	0	6
Pikkuaivot	0	3
Lisämunuainen	0	3
Munasarja	0	3
Haima	0	3
Henkitorvi	0	3
Aivolisäke	0	3
Kives*	3	3
Kilpirauhanen	0	3
Rinta	0	3
Perna	0	3
Tonsilla	0	3
Kateenkorva	0	3
Luuydin**	0	1
Lung	0	3
Sydän	0	3
Ruokatorvi	0	3
Vatsa	0	3
Ohutsuoli	0	3
Kaksoispiste	0	3
Maksa	0	3
Sylkirauhanen	0	3
Munuainen	0	3
Eturauhanen	0	3
Kohtu	0	3
Kohdunkaula	0	3
Luurankolihas	0	3
Iho	0	3
Ääreisherma	0	3
Vuorauksolut	0	3
Pää, niska ja sylkirauhanen	0	6
Imusolmuke	0	3

* 3-4 vahvuus ydinvärjäys

** Kaksi näytettä puuttuu

Taulukko 2: Vasta-aineen herkkyyks ja spesifisyys määritettiin testaamalla erilaisia FFPE-neoplastisia kudoksia.

Patologia	Positiiviset tapaukset	Tapauksia yhteensä
Melanooma	29	39
Munasarjasyöpä	9	44
Rintasyöpä	10	26
Paksusuolen syöpä	4	43
Keuhkosyöpä	21	50
Eturauhassyöpä	18	41
Lisämunuaiskuoren karsinooma	0	1
Virtsarakon syöpä	0	2
Meningioma	0	2
Astrocytooma	0	1
okasolusyöpä (ruokatorvi)	0	2
Adenokarsinooma (vatsa)	0	2
Adenokarsinooma (ohutsuoli)	0	1
Adenokarsinooma (paksu- ja peräsuolen)	0	6
Munuaissyöpä	0	2
Maksa syöpä	0	4
Lymfooma	0	3
okasolusyöpä (pää ja kaula, suuontelo, kieli)	0	1
Nenänielun karsinooma	1	1
Adenokarsinooma (haima)	0	1
Adenokarsinooma (eturauhanen)	0	2
Adenoidinen kystinen karsinooma (pää ja kaula, sylkirauhanen)	0	1
okasolusyöpä (iho)	0	1
Seminoma	0	2
Kilpirauhassyöpä	0	2
Kohdunkaulansyöpä	0	2
Endometriumin syöpä	1	2

PRAME-ilmentymisen erilaisissa kasvaimissa voi osoittaa vaihtelevan prosentin kasvainpositiivisuutta. Katso taulukosta 3 positiivisten värjäytyneiden kasvainsolujen prosenttiosuudet (luokiteltu kvartiileilla), jotka on havaittu taulukossa 2 löydettyissä erilaisissa kasvaimissa.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Finnish

BIOCARE
M E D I C A L

Taulukko 3: Positiivisten kasvainsolujen värjäytymisen prosenttiosuus erilaisissa FFPE-kasvainissa.

Kudokset	Värjäytyneiden kasvainsolujen prosenttiosuus tapauksista, joissa on värjäytymistä, prosenttiosuus tapausten kokonaismäärästä (%)				
	<1 %	1-25 %	26-50 %	51-75 %	> 75 %
Munasarjasyöpä	35/44 (79,5 %)	2/44 (4,5 %)	3/44 (6,8 %)	3/44 (6,8 %)	1/44 (2,3 %)
Rintasyöpä	16/26 (61,5 %)	26,7 (26,9 %)	1/26 (3,8 %)	2/26 (7,7 %)	0 (0 %)
Paksusuolen syöpä	39/43 (88,4 %)	4/43 (11,6 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Keuhkosyöpä	29/50 (58,0 %)	7/50 (14,0 %)	4/50 (8,0 %)	7/50 (14,0 %)	3/50 (6,0 %)
Eturauhassyöpä	23/41 (56,1 %)	9/41 (22,0 %)	3/41 (7,3 %)	2/41 (4,9 %)	4/41 (9,8 %)
Nenänielun karsinoma	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	1/1 (100 %)
Endometriumin syöpä	1/2 (50 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	1/2 (50 %)	0 (0 %)
Melanooma	10/39 (25,6 %)	6/39 (15,4 %)	5/39 (12,8 %)	6/39 (15,4 %)	12/39 (30,8 %)

Kasvainsolujen värjäytymisen prosenttiosuus kaikilla värjäytymisintensiteeteillä.

Kudosten värjäys, joka osoittaa vaihtelevia PRAME-proteiinin ilmentymistasoja.

Analyttisen suorituskyvyn testauksen tulokset osoittivat, että PRAME [EPR20330] -vasta-aine pystyy havaitsemaan PRAME-proteiinin oikein määriteltä IHC-protokollaa käytettäessä. Epänormaalit kudostestien tulokset tukevat johtopäätöstä, että PRAME [EPR20330] on herkkä PRAME-proteiinille käytettäessä suositeltuja IHC-protokollia. PRAME [EPR20330] -vasta-aine pystyy havaitsemaan PRAME-proteiinin alhaisia tai korkeita tasoja. Normaali kudostesti ei osoittanut odottamatonta PRAME:n havaitsemista 32 kudostyyppissä. Ei ollut odottamatonta ristireaktiivisuutta. Tulokset tukevat väitettä PRAME [EPR20330] -vasta-aine on erittäin spesifinen (analyttinen spesifisyys) PRAME-proteiinille.

Kliininen suorituskyky:

Diagnostisen herkkyyden ja spesifisyyden värjäytestit suoritettiin, ja tulokset on lueteltu alla. Positiivinen ja negatiivinen immunoreaktiivisuus on kirjattu taulukkoon 4.

Kolme melanooma-TMA-levyä värjättiin Biocaressa ja lähetettiin ulkopuoliselle patologille luettavaksi ja arvioitavaksi. Melanoomakudokset osoittivat erilaisia värjäytymispisteitä, jotka vaihtelivat 0:sta (negatiivinen) vahaan (4). Suurin osa melanosyyttisistä nevisista ei osoittanut PRAME-reaktiivisuutta, mutta muutamilla oli voimakas reaktiivisuus.

Taulukko 4: Positiivisten kasvainsolujen värjäytymisen prosenttiosuus erilaisissa FFPE-melanosyyttikasvainissa ja ihossa.

Kudokset	Värjäytyneiden kasvainsolujen prosenttiosuus tapauksista, joissa on värjäytymistä, prosenttiosuus tapausten kokonaismäärästä (%)				
	<1 %	1-25 %	26-50 %	51-75 %	> 75 %
Melanooma	28/133 (21,1 %)	50/133 (37,6 %)	10/133 (7,5 %)	8/133 (6,0 %)	37/133 (27,8 %)
Metastaattinen melanooma	7/38 (18,4 %)	10/38 (26,3 %)	3/38 (7,9 %)	2/38 (5,3 %)	16/38 (42,1 %)
Melanosyyttinen nevi	12/14 (85,7 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	2/12 (14,3 %)
Iho	10/10 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)

Kasvainsolujen värjäytymisen prosenttiosuus kaikilla värjäytymisintensiteeteillä.

Kudosten värjäys, joka osoittaa vaihtelevia PRAME-proteiinin ilmentymistasoja.

Testin ensisijainen päätepiste oli arvioida PRAME [EPR20330]-vasta-aineen diagnostinen herkkyys IHC-menetellessä, joka määrittää vahvistettujen positiivisten näytteiden positiivisen melanooman havaitsemisasteena. [TP/(TP+FN)]

Toissijainen päätepiste oli diagnostisen spesifisyyden arviointi - negatiivinen havaitsemisaste vahvistetuille melanoomanegatiivisille näytteille. [TN/(TN+FP)]

Oli 35 väärän negatiivista melanoomatapausta, jotka olivat saaneet kultaisen standardin patologisen arvioinnin melanoomaksi, mutta olivat negatiivisia PRAME:n suhteen. 136 tapausta oli todellisia positiivisia, koska niillä diagnosoitiin melanooma ja ne osoittivat signaalin PRAME:lle. Kaksi väärää positiivista havaittiin 14 melanosyyttisen nevi-näytteessä, jotka diagnosoitiin hyvinlaatuiseksi ja jotka osoittivat signaalia PRAME:lle.

Tiedoista arvioitu diagnostinen herkkyys = $136 / (136 + 35) = 79,5 \%$
Tiedoista arvioitu diagnostinen spesifisyys = $22 / (22 + 2) = 91,7 \%$

Laskelmiemme perusteella saamme arvioiduksi diagnostiseksi herkkyydeksi 79,5 % ja arvioiduksi diagnostiseksi spesifisyydeksi 91,7 % melanooman havaitsemiseksi.

Tästä päätelämme, että PRAME [EPR20330]-vasta-aine, jonka Biocare on testannut melanooma- ja melanosyyttisten nevi-näytteillä, on herkkä melanoomalle ja erittäin spesifinen melanoomalle.

Vianetsintä: (Anna selitys jokaiselle alla olevalle kohdalle)

- Objekttilasit ei värjäytyneet – Tarkista, että on käytetty asianmukaista positiivista kontrollikudosta, vasta-ainetta ja havaitsemistuotteita.
- Kaikkien objektilasien heikko värjäys – Tarkista, että on käytetty asianmukaista positiivista kontrollikudosta, vasta-ainetta ja havaitsemistuotteita.
- Kaikkien objektilasien liiallinen tausta – Endogeenistä biotiinia (jos käytät biotiinipohjaisia tunnistustuotteita), endogeenistä HRP-aktiivisuutta, joka muuttaa kromogeenin värilliseksi lopputuotteeksi (käytä peroksidaasialpaa), tai ylimääräistä epäspesifistä proteiiniuorovaikutusta (käytä proteiinia) esto, kuten seerumi- tai kaseiinipohjainen estoliuos).
- Kudososat pesivät objektilasit pois inkubaation aikana – Tarkista objektilasit varmistaaksesi, että ne ovat positiivisesti varautuneita.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Finnish

BIOCARE
M E D I C A L

5. Erityinen värjäys liian tumma – Tarkista protokolla määrittääksesi, onko objektilasiin käytetty oikea vasta-ainetiitteri, sekä oikeat inkubaatioajat kaikille reagenssille. Varmista lisäksi, että protokollassa on riittävästi pesuvaiheita ylimääräisten reagenssien poistamiseksi inkubointivaiheiden jälkeen.

Viitteet:

1. Kiernan JA. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. *Theory and Practice of Histotechnology*. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. *Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule*, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. *J Histotechnol*. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. *Biotech Histochem*. 1996 Jan;71(5):263-70.
6. Center for Disease Control Manual. *Guide: Safety Management*, NO. CDC-22, Atlanta, GA. April 30, 1976 "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts."
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition* CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
8. CLSI *Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2)* CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011
9. College of American Pathologists (CAP) *Certification Program for Immunohistochemistry*. Northfield IL. [Http://www.cap.org](http://www.cap.org) (800) 323-4040.
10. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. *Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline*. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
11. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. *Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques*. *Histochemistry* 1987; 86:471-478.
12. Nadji M, Morales AR. *Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls*. *Lab Med*1983;14:767.
13. Omata M, Liew CT, Ashcavi M, Peters RL. *Nonimmunologic binding of horseradishperoxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry*. *Am J Clin Path* 1980;73:626.
14. Herman GE and Elfont EA. *The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control*. *Biotech & Histochem* 1991;66:194.
15. Zhang W, *et al*. PRAME expression and promoter hypermethylation in epithelial ovarian cancer. *Oncotarget*, 2016 Jul; 7(29):45352-69.
16. Lezcano C, *et al*. PRAME expression in melanocytic tumors. *Am J Surg Pathol*. 2018 Nov; 42(11):1456-65.

Ultraline- vasta-aineet on kehittänyt yksinomaan Biocare Medical LLC, eivätkä ne tarkoita, että Ventana Medical Systems, Inc. tai Roche olisi hyväksynyt tai hyväksyneet Biocare- vasta-aineet. Biocare , Ventana ja Roche eivät ole sidoksissa, sidoksissa tai toisiinsa millään tavalla. Ventana®, BenchMark®, ultraView ja OptiView ovat Roehen tavaramerkkejä.

Q-sarjan vasta-aineet on kehittänyt yksinomaan Biocare Medical LLC, eivätkä ne tarkoita, että Leica Biosystems olisi hyväksynyt tai hyväksynyt Biocare- vasta-aineet. Biocare ja Leica Biosystems eivät ole millään tavalla sidoksissa, sidoksissa tai toisiinsa. Leica, Leica Biosystems, BOND-MAX ja BOND-III ovat Leica Biosystems'in tavaramerkkejä.

Yhteenveto turvallisuudesta ja suorituskyvystä löytyy täältä:
<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

French

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats				
Format	Catalog Number	Description	Dilution	Diluent
Concentrate	ACI 3252 A, B	0.1, 0.5 mL	1:100	Van Gogh Yellow
Predilute	API 3252 AA, G20, H	6.0, 20, 25 mL	Ready-to-use	N/A
ONCORE Pro	OPAI 3252 T60	60 tests	Ready-to-use	N/A
Q Series-- For Leica BOND-III	ALI 3252 G7	7.0 mL	Ready-to-use	N/A
UltraLine -- For BenchMark	AVI 3252 G, G25	6.0, 25 mL	Ready-to-use	N/A

Utilisation prévue :

Pour utilisation diagnostique *in vitro*

PRAME [EPR20330] est un anticorps monoclonal de lapin destiné à une utilisation en laboratoire après que le diagnostic initial de tumeur ait été posé par histopathologie conventionnelle utilisant des colorations histochimiques non immunologiques, dans l'identification qualitative de la protéine PRAME par immunohistochimie (IHC) dans de la paraffine fixée au formol. Tissus humains incorporés (FFPE). 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 d'autres tests diagnostiques par un pathologiste qualifié pour faciliter toute autre détermination clinique.

Résumé et explication :

PRAME est situé sur le chromosome 22q11.22 et code pour une protéine de 509 acides aminés. PRAME est un gène autosomique de l'antigène cancéro-testiculaire (CTA) qui s'est avéré exprimé dans le mélanome, diverses tumeurs malignes non mélanocytaires, notamment le cancer du poumon non à petites cellules, le carcinome du sein, le carcinome de l'ovaire et plusieurs autres cités. On ne sait pas que les tissus sains normaux expriment PRAME, à l'exception des testicules, des ovaires, des surrénales et de quelques autres cités dans la littérature. ^(15,16)

Principe de procédure :

Ce produit anticorps peut être utilisé comme anticorps primaire dans les tests immunohistochimiques de coupes de tissus fixées au formol et incluses en paraffine. En général, immunohistochimie (IHC) Les techniques de coloration permettent la visualisation des antigènes via l'application séquentielle d'un anticorps spécifique de l'antigène (anticorps primaire), un anticorps secondaire de l'anticorps primaire (lien optionnel anticorps/sonde), un complexe enzymatique et un substrat chromogénique avec étapes de lavage interposées. L'activation enzymatique du chromogène entraîne un produit de réaction visible au site de l'antigène. L'échantillon peut ensuite être contre-coloré et recouvert. Les résultats sont interprétés à l'aide d'une lumière microscope et aide au diagnostic différentiel des processus physiopathologiques, qui peuvent ou peut ne pas être associé à un antigène particulier.

Matériels et méthodes:

Réactifs fournis :

Source hôte : monoclonal de lapin

Réactivité des espèces : Humain. Autres espèces non testées.

Clone : EPR20330

Isotype : IgG

Concentration en protéines : Concentration spécifique en IgG : Contacter le support technique de Biocare

Spécificité : PRAME

Localisation cellulaire : noyau et membrane cellulaire

Méthode : Monoclonal de lapin recombinant purifié par affinité.

Reconstitution, Mélange, Dilution, Titrage :

Le réactif anticorps pré-dilué est dilué de manière optimale pour être utilisé avec les systèmes de coloration répertoriés ci-dessus. Une dilution supplémentaire peut entraîner une perte de la coloration antigénique. L'utilisateur doit valider une telle modification. Les différences dans le

traitement des tissus et les procédures techniques dans le laboratoire de l'utilisateur peuvent produire une variabilité significative des résultats nécessitant la réalisation régulière de contrôles internes (voir la section Contrôle qualité).

Le réactif concentré nécessite une dilution comme indiqué dans le tableau ci-dessus.

Applications connues :

Immunohistochimie (tissus inclus en paraffine fixés au formol)

Fourni comme : Solution saline tamponnée, pH 5,9-7,9 contenant un support protéique et moins de 0,1 % de conservateur azoture de sodium. Voir la fiche de données de sécurité pour plus de détails.

Matériels et réactifs nécessaires mais non fournis :

Lames de microscope chargées positivement.

Contrôles tissulaires positifs et négatifs

Chambre du désert (ou four de séchage similaire)

Xylène ou substitut de xylène

Éthanol ou alcool réactif

Chambre de décoffrage (autocuiseur)

Eau désionisée ou distillée

Tampon de lavage

Réactifs de prétraitement

Blocage de la peroxydase

Bloc de protéines (facultatif)

Sonde de détection et polymère

Réactifs de contrôle négatif

Chromogènes

Hématoxyline (contre-colorant)

Réactif de bleuissement

Support de montage

Lamelle de verre

Microscope optique (grossissement 40-400X)

Des configurations du produit anticorps sont disponibles pour une utilisation sur les instruments indiqués dans le tableau ci-dessus.

Stockage et stabilité :

Conserver entre 2 °C et 8 °C. Le produit est stable jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette du flacon, lorsqu'il est conservé dans ces conditions. Ne pas utiliser après la date de péremption. Le stockage dans des conditions autres que celles spécifiées doit être vérifié. Les réactifs dilués doivent être utilisés rapidement ; conserver tout réactif restant entre 2 °C et 8 °C. La stabilité du réactif dilué par l'utilisateur n'a pas été établie par Biocare.

Les contrôles positifs et négatifs doivent être effectués simultanément avec tous les échantillons de patients. Si une coloration inattendue est observée qui ne peut pas être expliquée par des variations dans les procédures de laboratoire et qu'un problème avec l'anticorps est suspecté, contactez le support technique de Biocare au 1-800-542-2002 ou via les informations d'assistance technique fournies sur biocare.net.

 Biocare Medical

60 Berry Drive

Pacheco, CA 94553

USA

71/190



TP v3 (12/15/2021)

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080

 EMERGO EUROPE

Westervoortsedijk 60

6827 AT Arnhem

The Netherlands

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

French

BIOCARE
M E D I C A L

Préparation des échantillons :

Les tissus fixés dans du formol peuvent être utilisés avant l'inclusion en paraffine. Les tissus osseux doivent être décalcifiés avant le traitement des tissus pour faciliter la coupe des tissus et éviter d'endommager les lames du microtome. ^{1, 2}

Les tissus correctement fixés et intégrés exprimant l'antigène cible spécifié doivent être conservés dans un endroit frais. La loi sur l'amélioration des laboratoires cliniques (CLIA) de 1988 exige dans 42 CFR § 493.1259(b) que « le laboratoire doit conserver les lames colorées au moins dix ans à compter de la date de l'examen et conserver les blocs d'échantillons au moins deux ans à compter de la date de l'examen. » ³

Traitement des tissus avant coloration :

Effectuer la récupération d'épitopes induite par la chaleur (HIER) selon le protocole recommandé ci-dessous. Il a été démontré que l'utilisation systématique de HIER avant l'IHC minimise les incohérences et standardise la coloration. ^{4,5}

Avertissement et précautions :

1. Cet anticorps contient moins de 0,1 % d'azote de sodium. Les concentrations inférieures à 0,1 % ne sont pas des matières dangereuses à déclaration obligatoire selon la norme US 29 CFR 1910.1200, la communication des dangers de l'OSHA et la directive CE 91/155/CE. L'azote de sodium (NaN₃) utilisé comme conservateur est toxique en cas d'ingestion. L'azote de sodium peut réagir avec la plomberie en plomb et en cuivre pour former des azotures métalliques hautement explosifs. Lors de son élimination, rincer abondamment à l'eau pour éviter l'accumulation d'azote dans la plomberie. (Center for Disease Control, 1976, Institut national de sécurité et de santé au travail, 1976) ⁶

2. Les échantillons, avant et après fixation, ainsi que tous les matériaux qui y sont exposés doivent être manipulés comme s'ils étaient susceptibles de transmettre une infection et éliminés avec les précautions appropriées. Ne jamais pipeter les réactifs par la bouche et éviter tout contact avec la peau et les muqueuses avec les réactifs et les échantillons. Si les réactifs ou les échantillons entrent en contact avec des zones sensibles, laver abondamment à l'eau. ⁷

3. La contamination microbienne des réactifs peut entraîner une augmentation des colorations non spécifiques.

4. Des durées d'incubation ou des températures autres que celles spécifiées peuvent donner des résultats erronés. L'utilisateur doit valider une telle modification.

5. Ne pas utiliser de réactif après la date de péremption imprimée sur le flacon.

6. Le réactif anticorps pré-dilué est dilué de manière optimale pour être utilisé. Une dilution supplémentaire peut entraîner une perte de la coloration antigénique.

7. La dilution du réactif anticorps concentré doit être validée avant utilisation. N'importe lequel Le diluant utilisé qui n'est pas spécifiquement recommandé doit également être validé pour sa compatibilité et sa stabilité.

8. Jetez tous les réactifs utilisés et tout autre matériel jetable contaminé en suivant les procédures relatives aux déchets infectieux ou potentiellement infectieux. Il appartient à chaque laboratoire de traiter les déchets solides et liquides selon leur nature et leur degré de dangerosité et de les traiter et de les éliminer (ou de les faire traiter et éliminer) conformément à toute réglementation applicable.

9. Suivez les réglementations locales d'élimination de votre emplacement ainsi que les recommandations de la fiche de données de sécurité pour déterminer l'élimination en toute sécurité de ce produit.

10. La FDS est disponible sur demande et se trouve sur <http://biocare.net>. Biocare local et l'autorité compétente de l'État membre ou du pays dans lequel l'utilisateur est établi.

Mode d'emploi:

Protocoles de coloration recommandés pour PRAME [EPR20330] :

IntelliPATH FLX and manual use:

API3252 pour IntelliPATH FLX et utilisation manuelle, a été standardisé avec le système de détection MACH 4. Utilisez TBS pour les étapes de lavage.	
Peroxide Block:	Bloquer pendant 5 minutes avec Peroxidized 1.
Pretreatment:	Effectuez la récupération de chaleur à l'aide de Borg Decloaker. Reportez-vous à la fiche technique de Borg Decloaker pour des instructions spécifiques.
Protein Block (Optional):	Incuber pendant 5 à 10 minutes à température ambiante avec Background Punisher.
Primary Antibody:	Incuber 30 minutes à température ambiante.
Detection:	Sonde : N/A
	Polymère : Incuber pendant 30 minutes à température ambiante avec un polymère secondairement conjugué.
Chromogen:	Incuber pendant 5 minutes à température ambiante avec le DAB de Biocare – OU – Incuber pendant 5 à 7 minutes à température ambiante avec Warp Red.
Counterstain	Contre-colorer à l'hématoxyline. Rincer à l'eau déminéralisée. Appliquez la solution bleuissante de Tacha pendant 1 minute. Rincer à l'eau déminéralisée.

ONCORE Pro Automated Slide Staining System:

OPAI3252 est destiné à être utilisé avec ONCORE Pro. Reportez-vous au manuel d'utilisation pour obtenir des instructions d'utilisation spécifiques. Les paramètres de protocole dans l'éditeur de protocole doivent être programmés comme suit :		
Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	PRAME Rb	PRAME Rb AP
Protocol Template (Description):	Special Template (ONCORE Pro-Tect Detection Required)	Rb AP Template 1
Dewaxing (DS Buffer Option):	DS2-50	DS Buffer
Antigen Retrieval (AR Option):	AR1, high pH; 103°C	AR1, high pH; 103°C
Block Option:	Buffer	Buffer
Reagent Name, Time, Temp.:	PRAME Rb, 45 min., 25°C	PRAME Rb, 30 min., 25°C

Ventana Benchmark ULTRA :

AVI3252 est destiné à être utilisé avec le BenchMark ULTRA. Reportez-vous au manuel d'utilisation pour obtenir des instructions d'utilisation spécifiques. Les paramètres de protocole recommandés sont les suivants :	
Template/Detection:	OptiView DAB IHC
Pretreatment Protocol:	CC1 64 minutes
Peroxidase:	Pre-Primary Peroxidase Inhibitor
Primary Antibody:	32 minutes, 36°C

Q Series – For Leica BOND-III:

ALI3252 est destiné à être utilisé avec le Leica BOND-III. Reportez-vous au manuel d'utilisation pour obtenir des instructions d'utilisation spécifiques. Les paramètres de protocole recommandés sont les suivants :

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

French

BIOCARE
M E D I C A L

Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	IHC Protocol F	IHC Protocol J
Detection:	Bond Polymer Refine	Bond Polymer Refine Red
HIER:	20 min with ER2	20 min with ER2
Peroxide Block:	5 min	
Marker (Primary Antibody):	15 min	15 min
Post Primary:	8 min	
Polymer:	8 min	
Post Primary AP:		20 min
Polymer AP:		30 min
Mixed Chromogen Refine:	10 min	10 min + 5 min
Hematoxylin:	5 min	5 min

Contrôle de qualité:

Reportez-vous aux normes de qualité du CLSI pour la conception et la mise en œuvre de tests d'immunohistochimie ; Directives approuvées-Deuxième édition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011⁸

Contrôle tissulaire positif : Mélanome, testicule normal

Les matériaux de contrôle positif externe doivent être des échantillons frais fixés, traités et incorporés dès que possible de la même manière que les échantillons du patient. Les contrôles tissulaires positifs indiquent des tissus correctement préparés et des techniques de coloration appropriées. Un contrôle tissulaire externe positif pour chaque ensemble de conditions de test doit être inclus dans chaque série de coloration.

Les tissus utilisés pour les matériaux de contrôle positif externe doivent être sélectionnés à partir d'échantillons de patients présentant de faibles niveaux bien caractérisés d'activité cible positive qui donnent une faible coloration positive. Le faible niveau de positivité des contrôles positifs externes est conçu pour garantir la détection de changements subtils dans la sensibilité des anticorps primaires dus à une instabilité ou à des problèmes avec la méthodologie IHC. Les lames de contrôle tissulaire disponibles dans le commerce ou les échantillons traités différemment des échantillons du patient valident uniquement les performances du réactif et ne vérifient pas la préparation des tissus.

Les contrôles tissulaires positifs connus ne doivent être utilisés que pour surveiller les performances correctes des tissus traités et des réactifs de test, plutôt que pour aider à formuler un diagnostic spécifique à partir d'échantillons de patients. Si les contrôles tissulaires positifs ne parviennent pas à démontrer une coloration positive, les résultats des échantillons de test doivent être considérés comme invalides.

Contrôle tissulaire négatif :

Utilisez un contrôle tissulaire négatif (connu pour être PRAME négatif) fixé, traité et intégré d'une manière identique aux échantillons du patient à chaque cycle de coloration pour vérifier la spécificité de l'anticorps primaire IHC pour démonstration de l'antigène cible et fournir une indication de la coloration de fond spécifique (coloration faussement positive). En outre, la variété des différents types de cellules présents dans la plupart des coupes de tissus peut être utilisé par le laboratoire comme sites de contrôle négatif interne pour vérifier les performances de l'IHC Caractéristiques. Les types et sources d'échantillons pouvant être utilisés pour les tissus négatifs les contrôles sont répertoriés dans la section Caractéristiques de performance.

Si une coloration spécifique (fausse coloration positive) se produit dans le contrôle tissulaire négatif, les résultats obtenus avec les échantillons du patient doivent être considérés comme invalides.

Contrôle réactif négatif non spécifique :

Utiliser un contrôle réactif négatif non spécifique à la place de l'anticorps primaire avec une section de chaque échantillon de patient pour évaluer la coloration non spécifique et permettre une meilleure interprétation de la coloration spécifique au site de l'antigène. Idéalement, un contrôle réactif négatif contient un anticorps PRAME IgG produit à partir du surnageant de culture tissulaire de la même manière que le réactif primaire, mais ne présente aucune réactivité spécifique avec les tissus humains dans la même matrice/solution que l'anticorps Biocare. Diluer un anticorps témoin négatif à la même concentration d'immunoglobuline ou de protéine que l'anticorps primaire dilué, anticorps en utilisant le même diluant. Si le sérum de veau fœtal est retenu dans l'anticorps pur après le traitement, le sérum de veau fœtal à une concentration en protéines équivalente à celle diluée. L'anticorps primaire dans le même diluant peut également être utilisé. (Se référer au réactif fourni). Le diluant seul peut être utilisé comme alternative moins souhaitable aux contrôles réactifs négatifs décrits précédemment. La période d'incubation du contrôle réactif négatif doit correspondre à celle de l'anticorps primaire.

Lorsque des panels de plusieurs anticorps sont utilisés sur des coupes en série, les zones de coloration négative d'une lame peuvent servir de contrôle de fond de liaison négatif/non spécifique pour d'autres anticorps. Pour différencier l'activité enzymatique endogène ou la liaison non spécifique des enzymes de l'immunoréactivité spécifique, des tissus supplémentaires du patient peuvent être colorés exclusivement avec des complexes substrat-chromogène ou enzymatiques (PAP, avidine-biotine, streptavidine) et substrat-chromogène, respectivement.

Vérification des analyses :

Avant la première utilisation d'un anticorps ou d'un système de coloration dans une procédure de diagnostic, l'utilisateur doit vérifier la spécificité de l'anticorps en le testant sur une série de tissus internes présentant des caractéristiques de performance immunohistochimiques connues représentant des tissus positifs et négatifs connus. Reportez-vous aux procédures de contrôle qualité décrites précédemment dans cette section de la notice du produit et aux recommandations de contrôle qualité du programme de certification CAP⁹ pour l'immunohistochimie et/ou de la ligne directrice NCCLS IHC¹⁰). Ces procédures de contrôle qualité doivent être répétées pour chaque nouveau lot d'anticorps ou chaque fois qu'il y a un changement dans les paramètres du test. Les tissus répertoriés dans la section Caractéristiques de performance conviennent à la vérification du test.

Dépannage:

Suivez les recommandations du protocole spécifique aux anticorps selon la fiche technique fournie. Si des résultats atypiques apparaissent, contactez le support technique de Biocare au 1-800-542-2002.

Interprétation de la coloration :

Contrôle tissulaire positif :

Le contrôle tissulaire positif coloré avec l'anticorps indiqué doit être examiné en premier pour s'assurer que tous les réactifs fonctionnent correctement. La coloration appropriée des cellules cibles (comme indiqué ci-dessus) indique une réactivité positive. Si les contrôles tissulaires positifs ne parviennent pas à démontrer une coloration positive, tous les résultats obtenus avec les échantillons de test doivent être considérés comme invalides.

La couleur du produit de réaction peut varier en fonction des chromogènes du substrat utilisé. Reportez-vous aux notices du substrat pour connaître les réactions de couleur attendues. De plus, une métachromasie peut être observée dans les variations de la méthode de coloration.¹¹

Lorsqu'une contre-coloration est utilisée, en fonction de la durée d'incubation et de la puissance de la contre-coloration utilisée, la contre-coloration entraînera une coloration des noyaux cellulaires. Une contre-coloration excessive ou incomplète peut compromettre la bonne interprétation des



60 Berry Drive
Pacheco, CA 94553
USA

73/190



TP v3 (12/15/2021)

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080



Westervoortsedijk 60
8627 AT Arnhem
The Netherlands

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

French

BIOCARE
M E D I C A L

résultats. Reportez-vous au(x) protocole(s) pour connaître la contre-coloration recommandée.

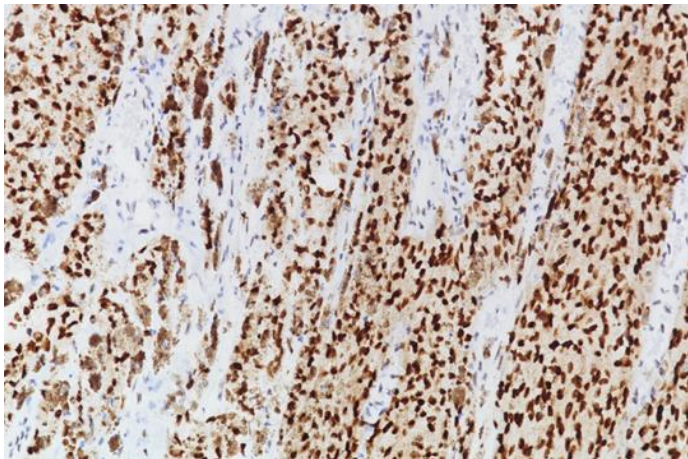
Contrôle tissulaire négatif :

Le contrôle tissulaire négatif doit être examiné après le contrôle tissulaire positif afin de vérifier la spécificité du marquage de l'antigène cible par l'anticorps primaire. L'absence de coloration spécifique dans le contrôle tissulaire négatif confirme l'absence de réactivité croisée des anticorps avec les cellules/composants cellulaires. Si une coloration spécifique (fausse coloration positive) se produit dans le contrôle tissulaire externe négatif, les résultats obtenus avec l'échantillon du patient doivent être considérés comme invalides.

La coloration non spécifique, si elle est présente, a généralement un aspect diffus. Des colorations sporadiques du tissu conjonctif peuvent également être observées dans des coupes de tissus excessivement fixés au formol. Utilisez des cellules intactes pour l'interprétation des résultats de coloration. Les cellules nécrotiques ou dégénérées se colorent souvent de manière non spécifique.

Tissu du patient :

Examiner les échantillons de patients colorés avec l'anticorps indiqué dernier. L'intensité de la coloration positive doit être évaluée dans le contexte de toute coloration de fond non spécifique du contrôle réactif négatif. Comme pour tout test immunohistochimique, un résultat négatif signifie que l'antigène n'a pas été détecté, et non que l'antigène était absent dans les cellules/tissus analysés. Si nécessaire, utilisez un panel d'anticorps pour identifier les réactions faussement négatives.



Mélanome coloré avec l'anticorps PRAME [EPR20330].

Reportez-vous au résumé et à l'explication, aux limites et aux caractéristiques de performance pour obtenir des informations spécifiques concernant l'immunoréactivité des anticorps indiquée.

Limites:

Limites générales :

1. Pour utilisation diagnostique *in vitro*
2. Ce produit est destiné à un usage professionnel uniquement : L'immunohistochimie est un processus de diagnostic en plusieurs étapes qui consiste en une formation spécialisée dans la sélection des réactifs appropriés ; sélection, fixation et traitement des tissus ; préparation de la lame IHC ; et interprétation des résultats de coloration.
3. La coloration des tissus dépend de la manipulation et du traitement du tissu avant la coloration. Une mauvaise fixation, congélation, décongélation, lavage, séchage, chauffage, sectionnement ou contamination par d'autres tissus ou fluides peut produire des artefacts,

un piégeage d'anticorps ou des résultats faussement négatifs. Des résultats incohérents peuvent être dus à des variations dans les méthodes de fixation et d'intégration, ou à des irrégularités inhérentes au tissu.¹²

4. Une contre-coloration excessive ou incomplète peut compromettre la bonne interprétation des résultats.
5. 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 utilisant des contrôles internes et externes positifs et négatifs appropriés ainsi que d'autres tests de diagnostic. Il est de la responsabilité d'un pathologiste qualifié qui connaît l'utilisation appropriée des anticorps, des réactifs et des méthodes IHC d'interpréter toutes les étapes utilisées pour préparer et interpréter la préparation IHC finale.
6. La dilution optimale des anticorps et les protocoles pour une application spécifique peuvent varier. Ceux-ci incluent, sans s'y limiter, la fixation, la méthode de récupération de chaleur, les temps d'incubation, l'épaisseur des coupes de tissus et le kit de détection utilisé. En raison de la sensibilité supérieure de ces réactifs uniques, les durées d'incubation recommandées et les titres indiqués ne s'appliquent pas à d'autres systèmes de détection, car les résultats peuvent varier. Les recommandations et protocoles de la fiche technique sont basés sur l'utilisation exclusive des produits Biocare. En fin de compte, il incombe à l'enquêteur de déterminer les conditions optimales.
7. Ce produit n'est pas destiné à être utilisé en cytométrie en flux. Les caractéristiques de performance n'ont pas été déterminées pour la cytométrie en flux.
8. Les tissus provenant de personnes infectées par le virus de l'hépatite B et contenant l'antigène de surface de l'hépatite B (AgHBs) peuvent présenter une coloration non spécifique à la peroxydase de raifort.¹³
9. Les réactifs peuvent présenter des réactions inattendues dans des tissus non testés auparavant. La possibilité de réactions inattendues, même dans les groupes de tissus testés, ne peut être complètement éliminée en raison de la variabilité biologique de l'expression de l'antigène dans les néoplasmes ou dans d'autres tissus pathologiques.¹⁴ Contactez le support technique de Biocare au 1-800-542-2002, ou via les informations de support technique fournies sur biocare.net, avec une ou plusieurs réactions inattendues documentées.
10. Les sérums normaux/non immuns provenant de la même source animale que les antisérums secondaires utilisés dans les étapes de blocage peuvent provoquer des résultats faussement négatifs ou faussement positifs en raison d'auto-anticorps ou d'anticorps naturels.
11. Des résultats faussement positifs peuvent être observés en raison d'une liaison non immunologique des protéines ou des produits de réaction du substrat. Ils peuvent également être causés par une activité pseudo-peroxydase (érythrocytes), une activité peroxydase endogène (cytochrome C) ou une biotine endogène (par exemple, foie, sein, cerveau, rein), selon le type d'immunocoloration utilisé.¹²

Limites spécifiques au produit :

Aucune limitation supplémentaire spécifique au produit.

Caractéristiques de performance:

Reproductibilité :

La reproductibilité des performances des anticorps a été vérifiée en testant certains tissus normaux et tumoraux à différents jours et sur divers instruments avec plusieurs opérateurs. La coloration des tissus sélectionnés était cohérente et réalisée comme prévu.

Immunoréactivité :

Les immunoréactivités positives et négatives suivantes ont été démontrées dans les tableaux 1 et 2 ci-dessous.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

French

La liste fournie ci-dessous n'est pas exhaustive mais caractérise les types d'immunoréactivités observées avec l'anticorps indiqué.

Aucune réactivité d'anticorps non spécifique connue n'a été observée dans ce produit.

Résumé des résultats attendus :

La prévalence de PRAME dans les tissus normaux et pathologiques a été évaluée à l'aide de microréseaux tissulaires (TMA).

Les tissus normaux testés se sont colorés comme prévu, avec des niveaux élevés de coloration observés dans les testicules et aucune coloration dans les autres tissus.

La coloration du PRAME a été observée à un niveau élevé dans le mélanome, comme prévu, et à des niveaux variables dans d'autres tissus cancéreux tels que l'ovaire, le poumon, la prostate et le sein.

Performances analytiques :

Des tests de coloration pour la sensibilité et la spécificité ont été effectués et les résultats sont indiqués ci-dessous .

BIOCARE
M E D I C A L

Sensibilité et spécificité :

Tableau 1 : La sensibilité et la spécificité de l'anticorps ont été déterminées en testant les tissus normaux FFPE.

Tissu	Cas positifs	Total des cas
Cerveau	0	6
Cervelet	0	3
Surrénal	0	3
Ovaire	0	3
Pancréas	0	3
Trachée	0	3
Pituitaire	0	3
Testicule*	3	3
Thyroïde	0	3
Sein	0	3
Rate	0	3
Amygdale	0	3
Thymus	0	3
Moelle osseuse**	0	1
Poumon	0	3
Cœur	0	3
Œsophage	0	3
Estomac	0	3
Intestin grêle	0	3
Côlon	0	3
Foie	0	3
Glande salivaire	0	3
Rein	0	3
Prostate	0	3
Utérus	0	3
Col de l'utérus	0	3
Muscle squelettique	0	3
Peau	0	3
Nerf périphérique	0	3
Cellules de revêtement	0	3
Tête, cou et glande salivaire	0	6
Ganglion lymphatique	0	3

* Coloration nucléaire de force 3-4

** Deux échantillons manquants

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

French

BIOCARE
M E D I C A L

Tableau 2 : La sensibilité et la spécificité de l'anticorps ont été déterminées en testant divers tissus néoplasiques FFPE.

Pathologie	Cas positifs	Total des cas
Mélanome	29	39
Cancer de l'ovaire	9	44
Cancer du sein	dix	26
Cancer du colon	4	43
Cancer du poumon	21	50
Cancer de la prostate	18	41
Carcinome corticosurrénalien	0	1
Cancer de la vessie	0	2
Méningiome	0	2
Astrocytome	0	1
Carcinome épidermoïde (œsophage)	0	2
Adénocarcinome (estomac)	0	2
Adénocarcinome (intestin grêle)	0	1
Adénocarcinome (côlon et rectum)	0	6
Cancer du rein	0	2
Cancer du foie	0	4
Lymphome	0	3
Carcinome épidermoïde (tête et cou, cavité buccale, langue)	0	1
Carcinome du nasopharynx	1	1
Adénocarcinome (pancréas)	0	1
Adénocarcinome (prostate)	0	2
Carcinome adénoïde kystique (tête et cou, glande salivaire)	0	1
Carcinome épidermoïde (peau)	0	1
Séminome	0	2
Cancer de la thyroïde	0	2
Cancer du col de l'utérus	0	2
Cancer de l'endomètre	1	2

L'expression de PRAME dans divers néoplasmes peut présenter un pourcentage variable de positivité tumorale. Reportez-vous au tableau 3 pour connaître les pourcentages de cellules tumorales à coloration positive (classés par quartiles) observés dans divers néoplasmes trouvés dans le tableau 2.

Tableau 3 : Pourcentage de coloration positive des cellules tumorales dans divers néoplasmes FFPE.

Tissus	Pourcentage de cellules tumorales marquées Nombre de cas présentant une coloration Pourcentage du nombre total de cas (%)				
	<1%	1-25%	26-50%	51-75%	> 75%
Cancer de l'ovaire	35/44 (79,5%)	2/44 (4,5%)	3/44 (6,8%)	3/44 (6,8%)	1/44 (2,3%)
Cancer du sein	16/26 (61,5%)	26/07 (26,9%)	1/26 (3,8%)	2/26 (7,7%)	0 (0%)
Cancer du colon	39/43 (88,4%)	4/43 (11,6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Cancer du poumon	29/50 (58,0%)	7/50 (14,0%)	4/50 (8,0%)	7/50 (14,0%)	3/50 (6,0%)
Cancer de la prostate	23/41 (56,1%)	9/41 (22,0%)	3/41 (7,3%)	2/41 (4,9%)	4/41 (9,8%)
Carcinome du nasopharynx	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1/1 (100%)
Cancer de l'endomètre	1/2 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	1/2 (50%)	0 (0%)
Mélanome	10/39 (25,6%)	6/39 (15,4%)	5/39 (12,8%)	6/39 (15,4%)	12/39 (30,8%)

Pourcentage de coloration des cellules tumorales présenté pour toutes les intensités de coloration.

Coloration sur des tissus montrant différents niveaux d'expression de la protéine PRAME.

Les résultats des tests de performances analytiques ont démontré que l'anticorps PRAME [EPR20330] peut détecter correctement la protéine PRAME lors de l'utilisation du protocole IHC défini. Les résultats anormaux des tests tissulaires confortent la conclusion selon laquelle PRAME [EPR20330] est sensible à la protéine PRAME lors de l'utilisation des protocoles IHC recommandés. L'anticorps PRAME [EPR20330] est capable de détecter des niveaux faibles à élevés de protéine PRAME. Les tests tissulaires normaux n'ont montré aucune détection inattendue de PRAME sur 32 types de tissus. Il n'y a pas eu de réactivité croisée inattendue. Les résultats soutiennent l'affirmation selon laquelle l'anticorps PRAME [EPR20330] est hautement spécifique (spécificité analytique) de la protéine PRAME.

Performance clinique :

Des tests de coloration pour la sensibilité et la spécificité diagnostiques ont été effectués et les résultats sont répertoriés ci-dessous. L'immunoréactivité positive et négative a été enregistrée dans le tableau 4.

Trois lames TMA de mélanome ont été colorées chez Biocare et envoyées à un pathologiste externe pour être lues et notées. Les tissus de mélanome présentaient une diversité de scores de coloration allant de 0 (négatif) à fort (4). La plupart des naevus mélanocytaires ne présentaient aucune réactivité au PRAME, mais quelques-uns présentaient une forte réactivité.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

French

BIOCARE
M E D I C A L

Tableau 4 : Pourcentage de coloration positive des cellules tumorales dans divers néoplasmes mélanocytaires FFPE et peau.

Tissus	Pourcentage de cellules tumorales marquées Nombre de cas présentant une coloration Pourcentage du nombre total de cas (%)				
	<1%	1-25%	26-50%	51-75%	> 75%
Mélanome	28/133 (21,1%)	50/133 (37,6%)	10/133 (7,5%)	8/133 (6,0%)	37/133 (27,8%)
Mélanome métastatique	7/38 (18,4%)	10/38 (26,3%)	3/38 (7,9%)	2/38 (5,3%)	16/38 (42,1%)
Naevus mélanocytaires	12/14 (85,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2/12 (14,3%)
Peau	10/10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Pourcentage de coloration des cellules tumorales présenté pour toutes les intensités de coloration.

Coloration sur des tissus montrant différents niveaux d'expression de la protéine PRAME.

Le critère d'évaluation principal du test était d'évaluer la sensibilité diagnostique de l'anticorps PRAME [EPR20330] dans la procédure IHC, définie comme le taux de détection positive du mélanome des échantillons positifs confirmés. [TP/(TP+FN)]

Un critère d'évaluation secondaire était d'évaluer la spécificité diagnostique - le taux de détection négatif pour les échantillons négatifs confirmés de mélanome. [TN/(TN+FP)]

Il y a eu 35 cas de mélanome faussement négatifs qui avaient reçu l'évaluation pathologique de référence en tant que mélanome mais qui étaient négatifs pour PRAME. 136 cas étaient de vrais positifs dans la mesure où ils avaient reçu un diagnostic de mélanome et présentaient un signal pour PRAME. Deux faux positifs ont été détectés dans les 14 échantillons de naevus mélanocytaires diagnostiqués comme bénins et montrant un signal pour PRAME.

À partir des données, la sensibilité diagnostique estimée = $136 / (136 + 35) = 79,5 \%$

À partir des données, la spécificité diagnostique estimée = $22 / (22 + 2) = 91,7 \%$

Sur la base de nos calculs, nous arrivons à une sensibilité diagnostique estimée à 79,5 % et une spécificité diagnostique estimée à 91,7 % pour la détection du mélanome.

Nous en concluons que l'anticorps PRAME [EPR20330], tel que testé par Biocare sur des échantillons de mélanome et de naevus mélanocytaires, est sensible au mélanome et hautement spécifique du mélanome.

Dépannage : (Fournissez une explication pour chacun des points ci-dessous)

1. Aucune coloration des lames – Vérifiez que le tissu de contrôle positif, les anticorps et les produits de détection appropriés ont été utilisés.
2. Faible coloration de toutes les lames – Vérifiez que le tissu de contrôle positif, les anticorps et les produits de détection appropriés ont été utilisés.
3. Fond excessif de toutes les lames – Il peut y avoir des niveaux élevés de biotine endogène (si vous utilisez des produits de détection à base de biotine), une activité HRP endogène convertissant le chromogène en produit final coloré (utiliser un bloc de peroxydase) ou une interaction

- protéique non spécifique excessive (utiliser un bloc, comme une solution de blocage à base de sérum ou de caséine).
4. Les coupes de tissus sont lavées sur les lames pendant l'incubation. Vérifiez les lames pour vous assurer qu'elles sont chargées positivement.
5. Coloration spécifique trop foncée – Vérifiez le protocole pour déterminer si le titre d'anticorps approprié a été appliqué à la lame, ainsi que les temps d'incubation appropriés pour tous les réactifs. De plus, assurez-vous que le protocole comporte suffisamment d'étapes de lavage pour éliminer les réactifs en excès une fois les étapes d'incubation terminées.

Les références:

1. Kiernan JA. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice.* New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. *Theory and Practice of Histotechnology.* St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. *Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.*
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. *J Histotechnol.* 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. *Biotech Histochem.* 1996 Jan;71(5):263-70.
6. *Center for Disease Control Manual. Guide: Safety Management, NO. CDC-22, Atlanta, GA. April 30, 1976 "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts."*
7. *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.*
8. *CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011*
9. *College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. Http://www.cap.org (800) 323-4040.*
10. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. *Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.*
11. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. *Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques. Histochemistry 1987; 86:471-478.*
12. Nadji M, Morales AR. *Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Lab Med 1983;14:767.*
13. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. *Nonimmunologic binding of horseradishperoxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. Am J Clin Path 1980;73:626.*
14. Herman GE and Elfont EA. *The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech & Histochem 1991;66:194.*
15. Zhang W, et al. *PRAME expression and promoter hypermethylation in epithelial ovarian cancer. Oncotarget, 2016 Jul; 7(29):45352-69.*
16. Lezcano C, et al. *PRAME expression in melanocytic tumors. Am J Surg Pathol. 2018 Nov; 42(11):1456-65.*

Ultraline sont développés uniquement par Biocare Medical LLC et n'impliquent pas l'approbation ou l'approbation des anticorps Biocare par Ventana Medical Systems, Inc ou Roche. Biocare, Ventana et Roche ne sont en aucun cas affiliés, associés ou liés. Ventana®, BenchMark®, ultraView et OptiView sont des marques déposées de Roche.

Les anticorps Q Series sont développés uniquement par Biocare Medical LLC et n'impliquent pas l'approbation ou l'approbation des anticorps Biocare par Leica Biosystems. Biocare et Leica Biosystems ne sont en aucun cas affiliés, associés ou liés. Leica, Leica Biosystems, BOND-MAX et BOND-III sont des marques commerciales de Leica Biosystems.

Le résumé de la sécurité et des performances peut être consulté ici : <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

German

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats				
Format	Catalog Number	Description	Dilution	Diluent
Concentrate	ACI 3252 A, B	0.1, 0.5 mL	1:100	Van Gogh Yellow
Predilute	API 3252 AA, G20, H	6.0, 20, 25 mL	Ready-to-use	N/A
ONCORE Pro	OPAI 3252 T60	60 tests	Ready-to-use	N/A
Q Series-- For Leica BOND-III	ALI 3252 G7	7.0 mL	Ready-to-use	N/A
UltraLine -- For BenchMark	AVI 3252 G, G25	6.0, 25 mL	Ready-to-use	N/A

Verwendungszweck:

Zur Verwendung *in der In-vitro-Diagnostik*

PRAME [EPR20330] ist ein monoklonaler Kaninchen-Antikörper, der für den Laborgebrauch bestimmt ist, nachdem die Erstdiagnose eines Tumors durch konventionelle Histopathologie unter Verwendung nichtimmunologischer histochemischer Färbungen gestellt wurde, bei der qualitativen Identifizierung des PRAME-Proteins durch Immunhistochemie (IHC) in formalinfixiertem Paraffin. eingebettetes (FFPE) menschliches Gewebe. Die klinische Interpretation jeglicher Verfärbung oder ihres Fehlens sollte durch morphologische Studien unter Verwendung geeigneter Kontrollen ergänzt und im Kontext der Krankengeschichte des Patienten und anderer diagnostischer Tests durch einen qualifizierten Pathologen als Hilfe für andere klinische Feststellungen bewertet werden.

Zusammenfassung und Erklärung:

PRAME befindet sich auf Chromosom 22q11.22 und kodiert für ein 509 Aminosäuren langes Protein. PRAME ist ein autosomales Krebs-Testis-Antigen (CTA)-Gen, das nachweislich in Melanomen, verschiedenen nichtmelanozytären bösartigen Neoplasien, einschließlich nichtkleinzelligem Lungenkrebs, Brustkarzinom, Eierstockkarzinom und mehreren anderen genannten, exprimiert wird. Es ist nicht bekannt, dass normales gesundes Gewebe PRAME exprimiert, mit Ausnahme von Hoden, Eierstöcken, Nebennieren und einigen anderen, die in der Literatur zitiert werden. ^(15,16)

Verfahrensgrundsatz:

Dieses Antikörperprodukt kann als primärer Antikörper bei immunhistochemischen Tests von formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten verwendet werden. Im Allgemeinen immunhistochemische (IHC) Färbetechniken ermöglichen die Visualisierung von Antigenen durch die sequentielle Anwendung von einem spezifischen Antikörper gegen das Antigen (primärer Antikörper), ein sekundärer Antikörper gegen den primären Antikörper (optionaler Link-Antikörper/Sonde), ein Enzymkomplex und ein chromogenes Substrat mit zwischengeschalteten Waschschrritten. Die enzymatische Aktivierung des Chromogens führt zu einem sichtbaren Reaktionsprodukt an der Antigenstelle. Anschließend kann die Probe gegengefärbt und abgedeckt werden. Die Ergebnisse werden mithilfe eines Lichts interpretiert Mikroskop und Hilfe bei der Differentialdiagnose pathophysiologischer Prozesse, die oder ist möglicherweise nicht mit einem bestimmten Antigen verbunden.

Materialien und Methoden:

Mitgelieferte Reagenzien:

Wirtszelle: monoklonales Kaninchen

Speziesreaktivität: Mensch. Andere Arten nicht getestet.

Klon: EPR20330

Isotyp: IgG

Proteinkonzentration: Spezifische IgG-Konzentration: Wenden Sie sich an den technischen Support von Biocare

Spezifität: PRAME

Zelluläre Lokalisierung: Kern und Zellmembran

Methode: Affinitätsgereinigtes rekombinantes Kaninchen-Monoklonal.

Rekonstitution, Mischen, Verdünnung, Titration:

Vorverdünntes Antikörperreagenz ist optimal für die Verwendung mit den oben aufgeführten Färbesystemen verdünnt. Eine weitere Verdünnung kann

zum Verlust der Antigenfärbung führen. Der Benutzer muss jede solche Änderung validieren. Unterschiede in der Gewebeerarbeitung und den technischen Verfahren im Labor des Benutzers können zu erheblichen Schwankungen der Ergebnisse führen, die die regelmäßige Durchführung interner Kontrollen erforderlich machen (siehe Abschnitt „Qualitätskontrolle“). Konzentriertes Reagenz muss wie in der Tabelle oben angegeben verdünnt werden.

Bekannte Anwendungen:

Immunhistochemie (formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Gewebe)

Geliefert als: Gepufferte Kochsalzlösung, pH 5,9–7,9, mit einem Proteinträger und weniger als 0,1 % Natriumazid- Konservierungsmittel. Weitere Einzelheiten finden Sie im Sicherheitsdatenblatt.

Benötigte, aber nicht bereitgestellte Materialien und Reagenzien:

Objektträger positiv geladen.
Positive und negative Gewebekontrollen
Wüstenkammer (oder ähnlicher Trockenofen)
Xylol oder Xylolersatz
Ethanol oder Reagenzalkohol
Enttarnungskammer (Schnellkochtopf)
Entionisiertes oder destilliertes Wasser
Waschpuffer
Reagenzien zur Vorbehandlung
Peroxidase-Block
Proteinblock (optional)
Nachweissonde und Polymer
Negativkontrollreagenzien
Chromogene
Hämatoxylin (Gegenfärbung)
Bläuerreagenz
Eindeckmedium
Schutzglas
Lichtmikroskop (40-400-fache Vergrößerung)

Konfigurationen des Antikörperprodukts sind für die Verwendung auf den in der Tabelle oben angegebenen Geräten verfügbar.

Lagerung und Stabilität:

Bei 2 °C bis 8 °C lagern. Bei Lagerung unter diesen Bedingungen ist das Produkt bis zum auf dem Fläschchenetikett aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden. Die Lagerung unter anderen als den angegebenen Bedingungen muss überprüft werden. Verdünnte Reagenzien sollten umgehend verwendet werden; Lagern Sie das restliche Reagenz bei 2 °C bis 8 °C. Die Stabilität des vom Benutzer verdünnten Reagenzes wurde von Biocare nicht nachgewiesen.

Positiv- und Negativkontrollen sollten gleichzeitig mit allen Patientenproben durchgeführt werden. Wenn eine unerwartete Färbung beobachtet wird, die nicht durch Abweichungen in den Laborverfahren erklärt werden kann, und ein Problem mit dem Antikörper vermutet wird, wenden Sie sich an den technischen Support von Biocare unter 1-800-542-2002 oder über die technischen Supportinformationen auf biocare.net.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

German

BIOCARE
M E D I C A L

Probenvorbereitung:

Zur Verwendung vor der Paraffineinbettung eignen sich in Formalin fixierte Gewebe. Knochengewebe sollte vor der Gewebearbeitung entkalkt werden, um das Gewebescheiden zu erleichtern und Schäden an den Mikrotomklingen zu verhindern.^{1, 2}

Ordnungsgemäß fixierte und eingebettete Gewebe, die das angegebene Antigen-Ziel exprimieren, sollten an einem kühlen Ort gelagert werden. Der Clinical Laboratory Improvement Act (CLIA) von 1988 schreibt in 42 CFR § 493.1259(b) vor, dass „das Labor gefärbte Objektträger mindestens zehn Jahre ab dem Datum aufbewahren muss.“ Prüfung durchführen und Probenblöcke mindestens zwei Jahre ab dem Datum der Prüfung aufbewahren.“³

Behandlung von Geweben vor der Färbung:

Führen Sie die hitzeinduzierte Epitopgewinnung (HIER) gemäß dem unten empfohlenen Protokoll durch. Es hat sich gezeigt, dass die routinemäßige Verwendung von HIER vor der IHC Inkonsistenzen minimiert und die Färbung standardisiert.^{4, 5}

Warnung und Vorsichtsmaßnahmen :

1. Dieser Antikörper enthält weniger als 0,1 % Natriumazid . Konzentrationen unter 0,1 % sind keine meldepflichtigen Gefahrstoffe gemäß US 29 CFR 1910.1200, OSHA Hazard Communication und EG-Richtlinie 91/155/EG. Natriumazid (NaN₃), das als Konservierungsmittel verwendet wird, ist bei Einnahme giftig. Natriumazid kann mit Blei- und Kupferleitungen reagieren und hochexplosive Metallazide bilden . Nach der Entsorgung mit großen Mengen Wasser spülen, um eine Azidbildung in den Leitungen zu verhindern. (Center for Disease Control, 1976, National Institute of Occupational Safety and Health, 1976)⁶
2. Proben vor und nach der Fixierung sowie alle ihnen ausgesetzten Materialien sollten so behandelt werden, als ob sie Infektionen übertragen könnten, und mit den entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen entsorgt werden. Pipettieren Sie Reagenzien niemals mit dem Mund und vermeiden Sie den Kontakt der Reagenzien und Proben mit der Haut und den Schleimhäuten. Wenn Reagenzien oder Proben mit empfindlichen Bereichen in Kontakt kommen , waschen Sie diese mit reichlich Wasser ab.⁷
3. Eine mikrobielle Kontamination der Reagenzien kann zu einer Zunahme unspezifischer Färbungen führen.
4. Andere als die angegebenen Inkubationszeiten oder Temperaturen können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Der Benutzer muss jede solche Änderung validieren.
5. Verwenden Sie das Reagenz nach dem auf dem Fläschchen aufgedruckten Verfallsdatum nicht mehr.
6. Das vorverdünnte Antikörperreagenz ist für den Gebrauch optimal verdünnt . Eine weitere Verdünnung kann zum Verlust der Antigenfärbung führen.
7. Die Verdünnung des konzentrierten Antikörperreagenzes muss vor der Verwendung validiert werden. Beliebige Verwendete Verdünnungsmittel, die nicht ausdrücklich empfohlen werden, müssen ebenfalls auf Kompatibilität und Stabilität validiert werden.
8. Entsorgen Sie alle gebrauchten Reagenzien und alle anderen kontaminierten Einwegmaterialien gemäß den Verfahren für infektiösen oder potenziell infektiösen Abfall. Es liegt in der Verantwortung jedes Labors, mit festen und flüssigen Abfällen entsprechend ihrer Art und Gefährlichkeit umzugehen und sie gemäß den geltenden Vorschriften zu behandeln und zu entsorgen (oder sie behandeln und entsorgen zu lassen).
9. Befolgen Sie die örtlichen Entsorgungsvorschriften für Ihren Standort sowie die Empfehlungen im Sicherheitsdatenblatt, um die sichere Entsorgung dieses Produkts zu gewährleisten
10. Das Sicherheitsdatenblatt ist auf Anfrage erhältlich und unter <http://biocare.net> zu finden.
11. Um vermutete schwerwiegende Vorfälle im Zusammenhang mit diesem Gerät zu melden, wenden Sie sich an den örtlichen Biocare- Vertreter und die zuständige Behörde des Mitgliedstaats oder Landes, in dem der Benutzer ansässig ist.

Gebrauchsanweisung:

Empfohlene Färbeprotokolle für PRAME [EPR20330]:

IntelliPATH FLX and manual use:

API3252 für IntelliPATH FLX und manuelle Verwendung wurde mit dem MACH 4-Erkennungssystem standardisiert. Verwenden Sie TBS für die Waschstschritte.	
Peroxide Block:	5 Minuten lang mit Peroxidazed 1 blockieren.
Pretreatment:	Führen Sie eine Wärmerückgewinnung mit Borg Decloaker durch . Spezifische Anweisungen finden Sie im Datenblatt des Borg Decloaker .
Protein Block (Optional):	5–10 Minuten bei RT mit Background Punisher inkubieren.
Primary Antibody:	30 Minuten bei RT inkubieren.
Detection:	Sonde: N/A Polymer: 30 Minuten bei RT mit einem sekundär konjugierten Polymer inkubieren.
Chromogen:	5 Minuten bei RT mit Biocare DAB inkubieren – ODER – 5–7 Minuten bei RT mit Warp Red inkubieren.
Counterstain	Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Mit entionisiertem Wasser spülen. Tragen Sie Tacha's Blueing Solution 1 Minute lang auf. Mit entionisiertem Wasser spülen.

ONCORE Pro Automated Slide Staining System:

OPAI3252 ist für die Verwendung mit dem ONCORE Pro vorgesehen. Spezifische Anweisungen zur Verwendung finden Sie im Benutzerhandbuch. Protokollparameter im Protokolleditor sollten wie folgt programmiert werden:		
Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	PRAME Rb	PRAME Rb AP
Protocol Template (Description):	Special Template (ONCORE Pro-Tect Detection Required)	Rb AP Template 1
Dewaxing (DS Buffer Option):	DS2-50	DS Buffer
Antigen Retrieval (AR Option):	AR1, high pH; 103°C	AR1, high pH; 103°C
Block Option:	Buffer	Buffer
Reagent Name, Time, Temp.:	PRAME Rb, 45 min., 25°C	PRAME Rb, 30 min., 25°C

Ventana Benchmark ULTRA:

AVI3252 ist für die Verwendung mit dem BenchMark ULTRA vorgesehen. Spezifische Anweisungen zur Verwendung finden Sie im Benutzerhandbuch. Die empfohlenen Protokollparameter sind wie folgt:	
Template/Detection:	OptiView DAB IHC
Pretreatment Protocol:	CC1 64 minutes
Peroxidase:	Pre-Primary Peroxidase Inhibitor
Primary Antibody:	32 minutes, 36°C

Q Series – For Leica BOND-III:

ALI3252 ist für die Verwendung mit dem Leica BOND-III vorgesehen. Spezifische Anweisungen zur Verwendung finden Sie im Benutzerhandbuch. Die empfohlenen Protokollparameter sind wie folgt:		
Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	IHC Protocol F	IHC Protocol J

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

German

BIOCARE
M E D I C A L

Detection:	Bond Polymer Refine	Bond Polymer Refine Red
HIER:	20 min with ER2	20 min with ER2
Peroxide Block:	5 min	
Marker (Primary Antibody):	15 min	15 min
Post Primary:	8 min	
Polymer:	8 min	
Post Primary AP:		20 min
Polymer AP:		30 min
Mixed Chromogen Refine:	10 min	10 min + 5 min
Hematoxylin:	5 min	5 min

Qualitätskontrolle:

Siehe CLSI-Qualitätsstandards für Design und Implementierung von Immunhistochemie-Assays; Genehmigte Richtlinie – Zweite Auflage (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011 ⁸

Positive Gewebekontrolle: Melanom, normaler Hoden

Externe positive Kontrollmaterialien sollten frische Proben sein, die so schnell wie möglich auf die gleiche Weise wie die Patientenprobe(n) fixiert, verarbeitet und eingebettet werden. Positive Gewebekontrollen weisen auf korrekt vorbereitetes Gewebe und geeignete Färbetechniken hin. In jedem Färbedurchlauf sollte eine positive externe Gewebekontrolle für jeden Satz Testbedingungen enthalten sein.

Die für die externen Positivkontrollmaterialien verwendeten Gewebe sollten aus Patientenproben mit gut charakterisierten niedrigen Konzentrationen der positiven Zielaktivität ausgewählt werden, die eine schwach positive Färbung ergeben. Der niedrige Positivitätsgrad für externe Positivkontrollen soll die Erkennung geringfügiger Veränderungen der primären Antikörperempfindlichkeit aufgrund von Instabilität oder Problemen mit der IHC-Methodik gewährleisten. Im Handel erhältliche Gewebekontrollobjektträger oder Proben, die anders als die Patientenprobe(n) verarbeitet wurden, validieren nur die Leistung der Reagenzien und nicht die Gewebepreparation.

Bekannt positive Gewebekontrollen sollten nur zur Überwachung der korrekten Leistung verarbeiteter Gewebe und Testreagenzien verwendet werden und nicht als Hilfe bei der Formulierung einer spezifischen Diagnose von Patientenproben. Wenn die positiven Gewebekontrollen keine positive Färbung zeigen, sollten die Ergebnisse mit den Testproben als ungültig betrachtet werden.

Negative Gewebekontrolle:

Verwenden Sie bei jedem Färbedurchlauf eine negative Gewebekontrolle (bekanntermaßen PRAME-negativ), die auf die gleiche Weise wie die Patientenprobe(n) fixiert, verarbeitet und eingebettet wird, um die Spezifität des IHC-Primärantikörpers zu überprüfen. Nachweis des Zielantigens und um einen Hinweis auf eine spezifische Hintergrundfärbung zu liefern (falsch positive Färbung). Auch die Vielfalt der verschiedenen Zelltypen, die in den meisten Gewebeschnitten vorhanden sind, kann dazu beitragen vom Laboratorium als interne Negativkontrollstellen zur Überprüfung der Leistung des IHC verwendet werden. Spezifikationen, die Arten und Quellen der Proben, die für negatives Gewebe verwendet werden können. Die Steuerelemente sind im Abschnitt „Leistungsmerkmale“ aufgeführt.

Wenn in der negativen Gewebekontrolle eine spezifische Färbung (falsch positive Färbung) auftritt, sollten die Ergebnisse mit den Patientenproben als ungültig betrachtet werden.

Unspezifische Negativreagenzkontrolle:

Verwenden Sie anstelle des Primärantikörpers eine unspezifische Negativreagenzkontrolle mit einem Abschnitt jeder Patientenprobe, um die unspezifische Färbung zu bewerten und

ermöglichen eine bessere Interpretation der spezifischen Färbung an der Antigenstelle. Idealerweise enthält eine negative Reagenzkontrolle einen PRAME-IgG-Antikörper, der auf die gleiche Weise wie die primäre aus Gewebekulturüberstand hergestellt wird. Antikörper, zeigt jedoch keine spezifische Reaktivität mit menschlichen Geweben in derselben Matrix/Lösung wie der Biocare- Antikörper. Verdünnen Sie einen negativen Kontrollantikörper auf die gleiche Immunglobulin- oder Proteinkonzentration wie der verdünnte Primärantikörper unter Verwendung des identischen Verdünnungsmittels. Wenn fötales Kälberserum nach der Verarbeitung im unverdünnten Antikörper zurückbleibt, fötales Kälberserum in einer Proteinkonzentration, die der verdünnten entspricht Primärantikörper im gleichen Verdünnungsmittel sind ebenfalls zur Verwendung geeignet. (Siehe mitgeliefertes Reagenz). Die Verwendung von Verdünnungsmittel allein kann eine weniger wünschenswerte Alternative zu den zuvor beschriebenen negativen Reagenzienkontrollen sein. Die Inkubationszeit der Negativreagenzkontrolle sollte der des Primärantikörpers entsprechen.

Wenn Panels mit mehreren Antikörpern auf Serienschritten verwendet werden, können die negativ gefärbten Bereiche eines Objektträgers als negative/unspezifische Bindungshintergrundkontrolle für andere Antikörper dienen. Um endogene Enzymaktivität oder unspezifische Bindung von Enzymen von spezifischer Immunreaktivität zu unterscheiden, können zusätzliche Patientengewebe ausschließlich mit Substrat-Chromogen oder Enzymkomplexen (PAP, Avidin-Biotin, Streptavidin) bzw. Substrat-Chromogen gefärbt werden.

Assay-Verifizierung:

Vor der ersten Verwendung eines Antikörpers oder Färbesystems in einem diagnostischen Verfahren sollte der Benutzer die Spezifität des Antikörpers überprüfen, indem er ihn an einer Reihe interner Gewebe mit bekannten immunhistochemischen Leistungsmerkmalen testet, die bekanntermaßen positive und negative Gewebe darstellen. Beachten Sie die zuvor in diesem Abschnitt der Produktbeilage beschriebenen Qualitätskontrollverfahren sowie die Qualitätskontrollempfehlungen des CAP-Zertifizierungsprogramms ⁹ für Immunhistochemie und/oder der NCCLS IHC-Richtlinie ¹⁰). Diese Qualitätskontrollverfahren sollten für jede neue Antikörpercharge oder bei jeder Änderung der Testparameter wiederholt werden. Die im Abschnitt „Leistungsmerkmale“ aufgeführten Gewebe sind für die Testverifizierung geeignet.

Fehlerbehebung:

Befolgen Sie die Antikörper-spezifischen Protokollempfehlungen gemäß dem bereitgestellten Datenblatt. Wenn atypische Ergebnisse auftreten, wenden Sie sich unter 1-800-542-2002 an den technischen Support von Biocare .

Interpretation der Färbung:

Positive Gewebekontrolle:

Die mit dem angegebenen Antikörper gefärbte positive Gewebekontrolle sollte zunächst untersucht werden, um sicherzustellen, dass alle Reagenzien ordnungsgemäß funktionieren. Die entsprechende Färbung der Zielzellen (wie oben angegeben) weist auf eine positive Reaktivität hin. Wenn die positiven Gewebekontrollen keine positive Färbung zeigen, sollten alle Ergebnisse mit den Testproben als ungültig betrachtet werden.

Die Farbe des Reaktionsprodukts kann abhängig von den verwendeten Substratchromogenen variieren. Informationen zu den erwarteten Farbreaktionen finden Sie in den Packungsbeilagen des Substrats. Darüber hinaus kann bei Variationen der Färbemethode Metachromasie beobachtet werden. ¹¹

Wenn eine Gegenfärbung verwendet wird, führt die Gegenfärbung je nach Inkubationsdauer und Wirksamkeit der verwendeten Gegenfärbung zu einer Färbung der Zellkerne. Übermäßiges oder unvollständiges Gegenfärben kann die korrekte Interpretation der Ergebnisse beeinträchtigen. Die empfohlene Gegenfärbung finden Sie im/in den Protokollen.

Negative Gewebekontrolle :

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

German

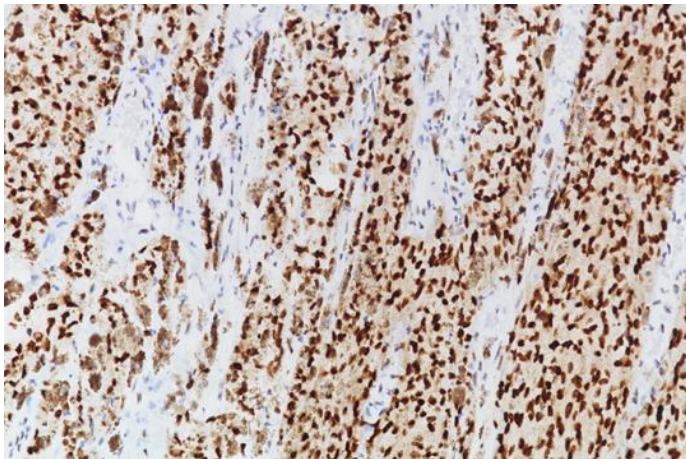
BIOCARE
M E D I C A L

Die negative Gewebekontrolle sollte nach der positiven Gewebekontrolle untersucht werden, um die Spezifität der Markierung des Zielantigens durch den Primärantikörper zu überprüfen. Das Fehlen einer spezifischen Färbung in der negativen Gewebekontrolle bestätigt das Fehlen einer Antikörper-Kreuzreaktivität mit Zellen/Zellkomponenten. Wenn bei der negativen externen Gewebekontrolle eine spezifische Färbung (falsch positive Färbung) auftritt, sollten die Ergebnisse mit der Patientenprobe als ungültig betrachtet werden.

Wenn eine unspezifische Färbung vorliegt, wirkt sie normalerweise diffus. In Schnitten aus übermäßig formalinfixiertem Gewebe kann es auch zu sporadischen Verfärbungen des Bindegewebes kommen. Verwenden Sie intakte Zellen zur Interpretation der Färberegebnisse. Nekrotische oder degenerierte Zellen verfärben sich häufig unspezifisch.

Patientengewebe:

Untersuchen Sie Patientenproben, die mit dem angegebenen Antikörper gefärbt sind zuletzt. Die Intensität der positiven Färbung sollte im Zusammenhang mit einer unspezifischen Hintergrundfärbung der negativen Reagenzkontrolle beurteilt werden. Wie bei jedem immunhistochemischen Test bedeutet ein negatives Ergebnis, dass das Antigen nicht nachgewiesen wurde und nicht, dass das Antigen in den untersuchten Zellen/Geweben fehlte. Verwenden Sie bei Bedarf ein Antikörper-Panel, um falsch-negative Reaktionen zu identifizieren.



Mit PRAME [EPR20330]-Antikörper gefärbtes Melanom.

Spezifische Informationen zur angegebenen Antikörper-Immunreaktivität finden Sie unter „Zusammenfassung und Erläuterung, Einschränkungen und Leistungsmerkmale“.

Einschränkungen:

Allgemeine Einschränkungen:

1. Zur Verwendung *in der In-vitro-Diagnostik*
2. Dieses Produkt ist nur für den professionellen Gebrauch bestimmt: Die Immunhistochemie ist ein mehrstufiger diagnostischer Prozess, der aus einer speziellen Schulung zur Auswahl der geeigneten Reagenzien besteht; Gewebeauswahl, -fixierung und -verarbeitung; Vorbereitung der IHC-Folie; und Interpretation der Färberegebnisse.
3. Die Gewebefärbung hängt von der Handhabung und Verarbeitung des Gewebes vor der Färbung ab. Unsachgemäßes Fixieren, Einfrieren, Auftauen, Waschen, Trocknen, Erhitzen, Schneiden oder Kontamination mit anderen Geweben oder Flüssigkeiten kann zu Artefakten, Antikörper einschließen oder falsch negativen Ergebnissen führen. Inkonsistente Ergebnisse können auf unterschiedliche Fixierungs- und Einbettungsmethoden oder auf inhärente Unregelmäßigkeiten im Gewebe zurückzuführen sein.¹²

4. Übermäßiges oder unvollständiges Gegenfärben kann die korrekte Interpretation der Ergebnisse beeinträchtigen.
5. Die klinische Interpretation jeder positiven oder negativen Färbung sollte im Kontext des klinischen Erscheinungsbilds, der Morphologie und anderer histopathologischer Kriterien bewertet werden. Die klinische Interpretation jeder positiven oder negativen Färbung sollte durch morphologische Studien unter Verwendung geeigneter positiver und negativer interner und externer Kontrollen sowie anderer diagnostischer Tests ergänzt werden. Es liegt in der Verantwortung eines qualifizierten Pathologen, der mit der ordnungsgemäßen Verwendung von IHC-Antikörpern, Reagenzien und Methoden vertraut ist, alle Schritte zur Vorbereitung und Interpretation der endgültigen IHC-Präparation zu interpretieren.
6. Die optimale Antikörperverdünnung und die Protokolle für eine bestimmte Anwendung können variieren. Dazu gehören unter anderem die Fixierung, die Wärmerückgewinnungsmethode, die Inkubationszeiten, die Dicke des Gewebeschnitts und das verwendete Nachweiskit. Aufgrund der überlegenen Empfindlichkeit dieser einzigartigen Reagenzien gelten die aufgeführten empfohlenen Inkubationszeiten und Titer nicht für andere Nachweissysteme, da die Ergebnisse variieren können. Die Empfehlungen und Protokolle im Datenblatt basieren auf der ausschließlichen Verwendung von Biocare-Produkten. Letztendlich liegt es in der Verantwortung des Forschers, optimale Bedingungen zu ermitteln.
7. Dieses Produkt ist nicht für die Verwendung in der Durchflusszytometrie bestimmt. Für die Durchflusszytometrie wurden keine Leistungsmerkmale ermittelt.
8. Gewebe von Personen, die mit dem Hepatitis-B-Virus infiziert sind und Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg) enthalten, können eine unspezifische Färbung mit Meerrettichperoxidase aufweisen.¹³
9. Reagenzien können in zuvor nicht getesteten Geweben unerwartete Reaktionen hervorrufen. Die Möglichkeit unerwarteter Reaktionen selbst in getesteten Gewebegruppen kann aufgrund der biologischen Variabilität der Antigenexpression in Neoplasmen oder anderen pathologischen Geweben nicht vollständig ausgeschlossen werden.¹⁴ Kontaktieren Sie den technischen Support von Biocare unter 1-800-542-2002 oder über die technischen Supportinformationen auf biocare.net mit dokumentierten unerwarteten Reaktionen.
10. Normale/nichtimmune Seren aus derselben tierischen Quelle wie sekundäre Antiseren, die in Blockierungsschritten verwendet werden, können aufgrund von Autoantikörpern oder natürlichen Antikörpern zu falsch negativen oder falsch positiven Ergebnissen führen.
11. Falsch positive Ergebnisse können aufgrund einer nicht immunologischen Bindung von Proteinen oder Substratreaktionsprodukten auftreten. Abhängig von der Art der verwendeten Immunfärbung können sie auch durch Pseudoperoxidaseaktivität (Erythrozyten), endogene Peroxidaseaktivität (Cytochrom C) oder endogenes Biotin (z. B. Leber, Brust, Gehirn, Niere) verursacht werden.¹²

Produktspezifische Einschränkungen:

Keine zusätzlichen produktspezifischen Einschränkungen.

Leistungsmerkmale:

Reproduzierbarkeit:

Die Reproduzierbarkeit der Antikörperleistung wurde überprüft, indem ausgewähltes Normal- und Tumorgewebe an verschiedenen Tagen und mit verschiedenen Instrumenten von mehreren Bedienern getestet wurde. Die Färbung der ausgewählten Gewebe verlief konsistent und verlief wie erwartet.

Immunreaktivität:

Die folgenden positiven und negativen Immunreaktivitäten wurden in den Tabellen 1 und 2 unten gezeigt.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

German

BIOCARE
M E D I C A L

Die nachstehende Liste erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit, sondern charakterisiert die Arten von Immunreaktivitäten, die mit dem angegebenen Antikörper beobachtet werden.

Bei diesem Produkt ist keine unspezifische Antikörperreaktivität bekannt.

Zusammenfassung der erwarteten Ergebnisse:

Die Prävalenz von PRAME in Geweben im Normalzustand und im Krankheitszustand wurde mithilfe von Tissue Microarrays (TMAs) bewertet.

Die getesteten normalen Gewebe verfärbten sich wie erwartet, wobei im Hoden ein hohes Maß an Verfärbung beobachtet wurde und in anderen Geweben keine Verfärbung.

Die Färbung von PRAME wurde erwartungsgemäß in hohem Maße bei Melanomen und in unterschiedlichem Ausmaß in anderen Krebsgeweben wie Eierstock, Lunge, Prostata und Brust beobachtet.

Analytische Leistung:

Es wurden Färbetests auf Sensitivität und Spezifität durchgeführt. Die Ergebnisse sind unten aufgeführt.

Sensitivität und Spezifität:

Tabelle 1: Sensitivität und Spezifität des Antikörpers wurden durch Testen normaler FFPE-Gewebe bestimmt.

Gewebe	Positive Fälle	Gesamtzahl der Fälle
Großhirn	0	6
Kleinhirn	0	3
Adrenalin	0	3
Eierstock	0	3
Pankreas	0	3
Lufttröhre	0	3
Hypophyse	0	3
Hoden*	3	3
Schilddrüse	0	3
Brust	0	3
Milz	0	3
Mandel	0	3
Thymusdrüse	0	3
Knochenmark**	0	1
Lunge	0	3
Herz	0	3
Speiseröhre	0	3
Magen	0	3
Dünndarm	0	3
Doppelpunkt	0	3
Leber	0	3
Speicheldrüse	0	3
Niere	0	3
Prostata	0	3
Gebärmutter	0	3
Gebärmutterhals	0	3
Skelettmuskulatur	0	3
Haut	0	3
Peripherer Nerv	0	3
Auskleidung von Zellen	0	3
Kopf, Hals und Speicheldrüse	0	6
Lymphknoten	0	3

* Kernfärbung der Stärke 3–4

** Zwei Proben fehlen

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

German

BIOCARE
M E D I C A L

Tabelle 2: Die Sensitivität und Spezifität des Antikörpers wurde durch Testen verschiedener neoplastischer FFPE-Gewebe bestimmt.

Pathologie	Positive Fälle	Gesamtzahl der Fälle
Melanom	29	39
Eierstockkrebs	9	44
Brustkrebs	10	26
Darmkrebs	4	43
Lungenkrebs	21	50
Prostatakrebs	18	41
Nebennierenrindenzarzinom	0	1
Blasenkrebs	0	2
Meningeom	0	2
Astrozytom	0	1
Plattenepithelkarzinom (Ösophagus)	0	2
Adenokarzinom (Magen)	0	2
Adenokarzinom (Dünndarm)	0	1
Adenokarzinom (Kolon und Rektum)	0	6
Nierenkrebs	0	2
Leberkrebs	0	4
Lymphom	0	3
Plattenepithelkarzinom (Kopf und Hals, Mundhöhle, Zunge)	0	1
Nasopharynxkarzinom	1	1
Adenokarzinom (Pankreas)	0	1
Adenokarzinom (Prostata)	0	2
Adenoid-zystisches Karzinom (Kopf und Hals, Speicheldrüse)	0	1
Plattenepithelkarzinom (Haut)	0	1
Seminom	0	2
Schilddrüsenkrebs	0	2
Gebärmutterhalskrebs	0	2
Endometriumkrebs	1	2

Die PRAME-Expression in verschiedenen Neoplasien kann eine unterschiedliche prozentuale Tumorpositivität aufweisen. In Tabelle 3 finden Sie die Prozentsätze positiv färbender Tumorzellen (nach Quartilen kategorisiert), die bei verschiedenen in Tabelle 2 aufgeführten Neoplasien beobachtet wurden.

Tabelle 3: Prozentsatz positiver Tumorzellfärbung bei verschiedenen FFPE-Neoplasien.

Taschentücher	Prozentsatz der gefärbten Tumorzellen # Fälle, die eine Färbung aufweisen / Prozentsatz der Gesamtzahl der Fälle (%)				
	<1 %	1-25 %	26-50 %	51-75 %	> 75 %
Eierstockkrebs	35/44 (79,5 %)	2/44 (4,5 %)	3/44 (6,8 %)	3/44 (6,8 %)	1/44 (2,3 %)
Brustkrebs	16/26 (61,5 %)	26,07 (26,9 %)	1/26 (3,8 %)	26,02 (7,7 %)	0 (0 %)
Darmkrebs	39/43 (88,4 %)	4/43 (11,6 %)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Lungenkrebs	29/50 (58,0 %)	7/50 (14,0 %)	4/50 (8,0 %)	7/50 (14,0 %)	3/50 (6,0 %)
Prostatakrebs	23/41 (56,1 %)	9/41 (22,0 %)	3/41 (7,3 %)	2/41 (4,9 %)	4/41 (9,8 %)
Nasopharynxkarzinom	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1/1 (100%)
Endometriumkrebs	1/2 (50 %)	0 (0%)	0 (0%)	1/2 (50 %)	0 (0%)
Melanom	10/39 (25,6 %)	6/39 (15,4 %)	5/39 (12,8 %)	6/39 (15,4 %)	12/39 (30,8 %)

Prozentsatz der Tumorzellfärbung für alle Färbungsintensitäten. Färbung von Geweben, die unterschiedliche Grade der PRAME-Proteinexpression zeigen.

Die Ergebnisse der analytischen Leistungstests zeigten, dass der PRAME-Antikörper [EPR20330] das PRAME-Protein bei Verwendung des definierten IHC-Protokolls korrekt erkennen kann. Die abnormalen Gewebetestergebnisse stützen die Schlussfolgerung, dass PRAME [EPR20330] bei Verwendung der empfohlenen IHC-Protokolle empfindlich auf das PRAME-Protein reagiert. Der PRAME-Antikörper [EPR20330] ist in der Lage, niedrige bis hohe Konzentrationen des PRAME-Proteins zu erkennen. Die normalen Gewebetests ergaben bei 32 Gewebetypen keinen unerwarteten Nachweis von PRAME. Es kam zu keiner unerwarteten Kreuzreaktivität. Die Ergebnisse stützen die Behauptung, dass der Antikörper PRAME [EPR20330] hochspezifisch (analytische Spezifität) für das PRAME-Protein ist.

Klinische Leistung:

Es wurden Färbetests zur diagnostischen Sensitivität und Spezifität durchgeführt. Die Ergebnisse sind unten aufgeführt. Positive und negative Immunreaktivität wurde in Tabelle 4 aufgezeichnet.

Biocare gefärbt und zur Untersuchung und Bewertung an einen externen Pathologen geschickt. Melanomgewebe zeigten eine Vielfalt an Färbungswerten im Bereich von 0 (negativ) bis stark (4). Die meisten melanozytären Nävi zeigten keine PRAME-Reaktivität, einige wiesen jedoch eine starke Reaktivität auf.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

German

BIOCARE
M E D I C A L

Tabelle 4: Prozentsatz positiver Tumorzellfärbung in verschiedenen melanozytären FFPE-Neoplasmen und in der Haut.

Taschentücher	Prozentsatz der gefärbten Tumorzellen # Fälle, die eine Färbung aufweisen Prozentsatz der Gesamtzahl der Fälle (%)				
	<1 %	1-25 %	26-50 %	51-75 %	> 75 %
Melanom	28/133 (21,1 %)	50/133 (37,6 %)	10/133 (7,5 %)	8/133 (6,0 %)	37/133 (27,8 %)
Metastasiertes Melanom	7/38 (18,4 %)	10/38 (26,3 %)	3/38 (7,9 %)	2/38 (5,3 %)	16/38 (42,1 %)
Melanozytäre Nävi	14/12 (85,7 %)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2/12 (14,3 %)
Haut	10/10 (100 %)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Prozentsatz der Tumorzellfärbung für alle Färbungsintensitäten.
Färbung von Geweben, die unterschiedliche Grade der PRAME-Proteinexpression zeigen.

Der primäre Endpunkt des Tests war die Bewertung der diagnostischen Sensitivität des PRAME-Antikörpers [EPR20330] im IHC-Verfahren, definiert als die positive Melanomerkennungsrate der bestätigten positiven Proben. [TP/(TP+FN)]

Ein sekundärer Endpunkt war die Bewertung der diagnostischen Spezifität – der Negativkennungsrate für bestätigte Melanom-negative Proben. [TN/(TN+FP)]

Es gab 35 falsch negative Melanomfälle, die die pathologische Goldstandardbewertung als Melanom erhalten hatten, aber PRAME-negativ waren. 136 Fälle waren tatsächlich positiv, da bei ihnen ein Melanom diagnostiziert wurde und sie ein Signal für PRAME zeigten. In den 14 melanozytären Nävi-Proben, die als gutartig diagnostiziert wurden und ein Signal für PRAME zeigten, wurden zwei falsch positive Ergebnisse festgestellt.

Aus den Daten ergibt sich eine geschätzte diagnostische Sensitivität von $136 / (136+35) = 79,5 \%$.

Aus den Daten ergibt sich eine geschätzte diagnostische Spezifität von $22 / (22+2) = 91,7 \%$.

Basierend auf unseren Berechnungen kommen wir zu einer geschätzten diagnostischen Sensitivität von 79,5 % und einer geschätzten diagnostischen Spezifität von 91,7 % für die Melanomerkennung.

Daraus schließen wir, dass der PRAME-Antikörper [EPR20330], wie von Biocare an Proben von Melanomen und melanozytären Nävi getestet, empfindlich gegenüber Melanomen und hochspezifisch gegenüber Melanomen ist.

Fehlerbehebung: (Erläutern Sie jeden der folgenden Punkte)

- Keine Färbung der Objektträger – Überprüfen Sie, ob geeignetes positives Kontrollgewebe, Antikörper und Nachweisprodukte verwendet wurden.
- Schwache Färbung aller Objektträger – Überprüfen Sie, ob geeignetes positives Kontrollgewebe, Antikörper und Nachweisprodukte verwendet wurden.
- Übermäßiger Hintergrund auf allen Objektträgern – Es können hohe Mengen an endogenem Biotin (bei Verwendung biotinbasierter Nachweisprodukte), endogene HRP-Aktivität, die Chromogen in ein farbiges Endprodukt umwandelt (Peroxidase-Block verwenden), oder übermäßige unspezifische Proteininteraktion (Verwendung eines

Proteins) vorhanden sein (z. B. eine Serum- oder Casein-basierte Blockierungslösung).

- Gewebeschnitte werden während der Inkubation von den Objektträgern abgewaschen – Überprüfen Sie die Objektträger, um sicherzustellen, dass sie positiv geladen sind.
- Spezifische Färbung zu dunkel – Überprüfen Sie das Protokoll, um festzustellen, ob der richtige Antikörpertiter auf den Objektträger aufgetragen wurde und ob die Inkubationszeiten für alle Reagenzien korrekt sind. Stellen Sie außerdem sicher, dass das Protokoll genügend Waschkritte enthält, um überschüssige Reagenzien nach Abschluss der Inkubationsschritte zu entfernen.

Verweise:

- Kiernan JA. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. New York: Pergamon Press 1981.
- Sheehan DC and Hrapchak BB. *Theory and Practice of Histotechnology*. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
- Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
- Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. *J Histotechnol*. 1999 Sep;22(3):177-92.
- Taylor CR, et al. *Biotech Histochem*. 1996 Jan;71(5):263-70.
- Center for Disease Control Manual. Guide: Safety Management, NO. CDC-22, Atlanta, GA. April 30, 1976 "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts."
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014*.
- CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011
- College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. <http://www.cap.org> (800) 323-4040.
- O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
- Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques. *Histochemistry* 1987; 86:471-478.
- Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. *Lab Med*1983;14:767.
- Omata M, Liew CT, Ashcavi M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradishperoxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *Am J Clin Path* 1980;73:626.
- Herman GE and Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. *Biotech & Histochem* 1991;66:194.
- Zhang W, et al. PRAME expression and promoter hypermethylation in epithelial ovarian cancer. *Oncotarget*, 2016 Jul; 7(29):45352-69.
- Lezcano C, et al. PRAME expression in melanocytic tumors. *Am J Surg Pathol*. 2018 Nov; 42(11):1456–65.

Ultraline- Antikörper werden ausschließlich von Biocare Medical LLC entwickelt und bedeuten nicht die Genehmigung oder Empfehlung von Biocare- Antikörpern durch Ventana Medical Systems, Inc oder Roche. Biocare , Ventana und Roche sind in keiner Weise verbunden, verbunden oder verbunden. Ventana®, BenchMark®, ultraView und OptiView sind Marken von Roche.

Antikörper der Q-Serie werden ausschließlich von Biocare Medical LLC entwickelt und bedeuten keine Genehmigung oder Empfehlung von Biocare-Antikörpern durch Leica Biosystems. Biocare und Leica Biosystems sind in keiner Weise verbunden, verbunden oder verbunden. Leica, Leica Biosystems, BOND-MAX und BOND-III sind Marken von Leica Biosystems.

Die Zusammenfassung der Sicherheit und Leistung finden Sie hier: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Greek

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats				
Format	Catalog Number	Description	Dilution	Diluent
Concentrate	ACI 3252 A, B	0.1, 0.5 mL	1:100	Van Gogh Yellow
Predilute	API 3252 AA, G20, H	6.0, 20, 25 mL	Ready-to-use	N/A
ONCORE Pro	OPAI 3252 T60	60 tests	Ready-to-use	N/A
Q Series-- For Leica BOND-III	ALI 3252 G7	7.0 mL	Ready-to-use	N/A
UltraLine -- For BenchMark	AVI 3252 G, G25	6.0, 25 mL	Ready-to-use	N/A

Προβλεπόμενη χρήση:

Για *in vitro* Διαγνωστική χρήση

Το PRAME [EPR20330] είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα κουνελιού που προορίζεται για εργαστηριακή χρήση αφού έχει γίνει η αρχική διάγνωση του όγκου με συμβατική ιστοπαθολογία χρησιμοποιώντας μη ανοσολογικές ιστοχημικές κηλίδες, στην ποιοτική ταυτοποίηση της πρωτεΐνης PRAME με ανοσοϊστοχημεία (IHC) σε παραφίνη σταθεροποιημένη με φορμαλίνη ενσωματωμένοι (FFPE) ανθρώπινοι ιστοί. Η κλινική ερμηνεία οποιασδήποτε χρώσης ή απουσίας της θα πρέπει να συμπληρώνεται από μορφολογικές μελέτες με τη χρήση κατάλληλων μαρτύρων και θα πρέπει να αξιολογείται στο πλαίσιο του κλινικού ιστορικού του ασθενούς και άλλων διαγνωστικών εξετάσεων από ειδικευμένο παθολόγο ως βοήθημα στη λήψη τυχόν άλλων κλινικών προσδιορισμών.

Περίληψη και Επεξήγηση:

Το PRAME βρίσκεται στο χρωμόσωμα 22q11.22 και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 509 αμινοξέων. Το PRAME είναι ένα γονίδιο αυτοσωματικού αντιγόνου καρκίνου-όρχεως (CTA) που έχει αποδειχθεί ότι εκφράζεται στο μελάνωμα, σε διάφορα μη μελανοκυτταρικά κακοήγη νεοπλασμάτα, συμπεριλαμβανομένου του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, του καρκινώματος του μαστού, του καρκινώματος των ωοθηκών και πολλών άλλων αναφερόμενων. Οι φυσιολογικοί υγιείς ιστοί δεν είναι γνωστό ότι εκφράζουν το PRAME εκτός από τους όρχεις, τις ωοθήκες, τα επινεφρίδια και μερικούς άλλους που αναφέρονται στη βιβλιογραφία. ^(15,16)

Αρχή Διαδικασίας:

Αυτό το προϊόν αντισώματος μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως το πρωτεύον αντίσωμα σε δοκιμές ανοσοϊστοχημείας τμημάτων ιστού μονιμοποιημένων με φορμαλίνη, ενσωματωμένων σε παραφίνη. Γενικά, η ανοσοϊστοχημική (IHC) οι τεχνικές χρώσης επιτρέπουν την οπτικοποίηση των αντιγόνων μέσω της διαδοχικής εφαρμογής του ειδικού αντισώματος στο αντιγόνο (πρωτεύον αντίσωμα), ένα δευτερεύον αντίσωμα στο πρωτεύον αντίσωμα (προαιρετικό αντίσωμα σύνδεσης/ανιχνευτής), ένα σύμπλεγμα ενζύμων και ένα χρωμογόνο υπόστρωμα με παρεμβαλλόμενα στάδια έκπλυσης. Η ενζυματική ενεργοποίηση του χρωμογόνου έχει ως αποτέλεσμα ένα ορατό προϊόν αντίδρασης στη θέση του αντιγόνου. Στη συνέχεια, το δείγμα μπορεί να αντιχρωματιστεί και να γλιστρήσει το κάλυμμα. Τα αποτελέσματα ερμηνεύονται χρησιμοποιώντας ένα φως μικροσκόπιο και βοήθεια στη διαφορική διάγνωση παθοφυσιολογικών διεργασιών, που μπορεί ή μπορεί να μην σχετίζεται με ένα συγκεκριμένο αντιγόνο.

Υλικά και μέθοδοι:

Παρεχόμενα αντιδραστήρια:

Πηγή υποδοχής: Rabbit monoclonal

Είδος Αντιδραστηριότητας: Ανθρώπος. Άλλα είδη που δεν έχουν δοκιμαστεί.

Κλώνος: EPR20330

Ισότυπος: IgG

Συγκέντρωση πρωτεΐνης: Ειδική συγκέντρωση IgG: Επικοινωνήστε με την τεχνική υποστήριξη της Biocare

Ειδικότητα: PRAME

Κυτταρικός εντοπισμός: Πυρήνας και κυτταρική μεμβράνη

Μέθοδος: Καθαρισμένο με συγγένεια ανασυνδυασμένο μονοκλωνικό κουνέλι.

Ανασύσταση, ανάμιξη, αραιώση, τιτλοδότηση:

Το προαραιωμένο αντιδραστήριο αντισώματος αραιώνεται βέλτιστα για χρήση με τα παραπάνω αναφερόμενα συστήματα χρώσης. Περαιτέρω αραιώση μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια χρώσης αντιγόνου. Ο χρήστης πρέπει να επικυρώσει οποιαδήποτε τέτοια αλλαγή. Οι διαφορές στην επεξεργασία ιστών και στις τεχνικές διαδικασίες στο εργαστήριο του χρήστη ενδέχεται να προκαλέσουν σημαντική διακύμανση στα αποτελέσματα που απαιτούν την τακτική εκτέλεση εσωτερικών ελέγχων (βλ. ενότητα Ποιοτικός έλεγχος).

Το συμπυκνωμένο αντιδραστήριο απαιτεί αραιώση όπως υποδεικνύεται στον παραπάνω πίνακα.

Γνωστές εφαρμογές:

Ανοσοϊστοχημεία (ιστοί ενσωματωμένοι σε παραφίνη σταθεροποιημένοι με φορμαλίνη)

Παρέχεται ως: Ρυθμισμένο αλατούχο διάλυμα, pH 5,9-7,9 που περιέχει φορέα πρωτεΐνης και λιγότερο από 0,1% συντηρητικό αζίδιο του νατρίου. Δείτε το Φύλλο Δεδομένων Ασφαλείας για πρόσθετες λεπτομέρειες.

Υλικά και αντιδραστήρια που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται:

Το μικροσκόπιο ολισθαίνει θετικά φορτισμένο.

Θετικοί και αρνητικοί έλεγχοι ιστών

Desert Chamber (ή παρόμοιος φούρνος στεγνώματος)

Ξυλόλιο ή υποκατάστατο Ξυλόλιου

Αιθανόλη ή αλκοόλη αντιδραστηρίου

Θάλαμος αποκάλυψης (χύτρα ταχύτητας)

Απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό

Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης

Αντιδραστήρια προεπεξεργασίας

Μπλοκ υπεροξειδάσης

Μπλοκ πρωτεΐνης (προαιρετικό)

Ανιχνευτής ανίχνευσης και πολυμερές

Αντιδραστήρια αρνητικού ελέγχου

Χρωμογόνο

Αιματοξυλίνη (αντίχρηση)

Μπλε αντιδραστήριο

Μέσο τοποθέτησης

Κάλυμμα

Μικροσκόπιο φωτός (μεγέθυνση 40-400X)

Οι διαμορφώσεις του προϊόντος αντισώματος είναι διαθέσιμες για χρήση στα όργανα που υποδεικνύονται στον παραπάνω πίνακα.

Αποθήκευση και σταθερότητα:

Φυλάσσεται στους 2°C έως 8°C. Το προϊόν είναι σταθερό μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην επικέτα του φιαλιδίου, όταν φυλάσσεται υπό αυτές τις συνθήκες. Να μη χρησιμοποιείται μετά την ημερομηνία λήξης. Η αποθήκευση υπό οποιαδήποτε συνθήκες εκτός από αυτές που καθορίζονται πρέπει να επαληθεύεται. Τα αραιωμένα αντιδραστήρια θα πρέπει να χρησιμοποιούνται αμέσως. φυλάξτε τυχόν υπολειπόμενο αντιδραστήριο στους 2°C έως 8°C. Η σταθερότητα του αντιδραστηρίου αραιωμένου χρήστη δεν έχει τεκμηριωθεί από τη Biocare .

Οι θετικοί και οι αρνητικοί μάρτυρες θα πρέπει να εκτελούνται ταυτόχρονα με όλα τα δείγματα ασθενών. Εάν παρατηρηθεί απροσδόκητη χρώση που δεν



60 Berry Drive
Pacheco, CA 94553
USA

85/190



TP v3 (12/15/2021)

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080



Westervoortsedijk 60
6827 AT Arnhem
The Netherlands

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Greek

μπορεί να εξηγηθεί από διαφορές στις εργαστηριακές διαδικασίες και υπάρχει υποψία για πρόβλημα με το αντίσωμα, επικοινωνήστε με την Τεχνική Υποστήριξη της Biocare στο 1-800-542-2002 ή μέσω των πληροφοριών τεχνικής υποστήριξης που παρέχονται στο biocare.net.

Προετοιμασία δείγματος:

Οι ιστοί στερεωμένοι σε φορμαλίνη είναι κατάλληλοι για χρήση πριν από την ενσωμάτωση παραφίνης. Οι οστικοί ιστοί θα πρέπει να απασβεστούν πριν από την επεξεργασία του ιστού για να διευκολυνθεί η κοπή του ιστού και να αποφευχθεί η ζημία στις λεπίδες του μικροτόμου. ^{1, 2}

Οι σωστά στερεωμένοι και ενσωματωμένοι ιστοί που εκφράζουν τον καθορισμένο στόχο αντιγόνου θα πρέπει να φυλάσσονται σε δροσερό μέρος. Ο νόμος για τη βελτίωση του κλινικού εργαστηρίου (CLIA) του 1988 απαιτεί στο 42 CFR § 493.1259(b) ότι «Το εργαστήριο πρέπει να διατηρεί λεκιασμένες αντικειμενοφόρους πλάκες τουλάχιστον δέκα χρόνια από την ημερομηνία εξέτασης και διατήρηση των τμημάτων δειγμάτων τουλάχιστον δύο χρόνια από την ημερομηνία εξέτασης.» ³

Θεραπεία ιστών πριν από τη χρώση:

Εκτελέστε Heat Induced Epitope Retrieval (HIER) σύμφωνα με το προτεινόμενο πρωτόκολλο παρακάτω. Η τακτική χρήση του HIER πριν από την IHC έχει αποδειχθεί ότι ελαχιστοποιεί την ασυνέπεια και τυποποιεί τη χρώση. ^{4,5}

Προειδοποίηση και προφυλάξεις :

1. Αυτό το αντίσωμα περιέχει λιγότερο από 0,1% αζίδιο του νατρίου . Οι συγκεντρώσεις μικρότερες από 0,1% δεν είναι επικίνδυνα υλικά που μπορούν να αναφερθούν σύμφωνα με το US 29 CFR 1910.1200, την ανακοίνωση κινδύνου OSHA και την Οδηγία 91/155/EC της ΕΚ. Το αζίδιο του νατρίου (NaN₃) που χρησιμοποιείται ως συντηρητικό είναι τοξικό εάν καταποθεί. Το αζίδιο του νατρίου μπορεί να αντιδράσει με τις υδραυλικές εγκαταστάσεις μολύβδου και χαλκού για να σχηματίσει εξαιρετικά εκρηκτικά αζίδια μετάλλων . Μετά την απόρριψη, ξεπλύνετε με μεγάλες ποσότητες νερού για να αποτρέψετε τη συσσώρευση αζιδίων στις υδραυλικές εγκαταστάσεις. (Center for Disease Control, 1976, National Institute of Occupational Safety and Health, 1976) ⁶

2. Τα δείγματα, πριν και μετά τη στερέωση, και όλα τα υλικά που εκτίθενται σε αυτά θα πρέπει να αντιμετωπίζονται σαν να είναι ικανά να μεταδώσουν μόλυνση και να απορρίπτονται με τις κατάλληλες προφυλάξεις. Ποτέ μην μεταφέρετε τα αντιδραστήρια με πιπέτα από το στόμα και αποφύγετε την επαφή του δέρματος και των βλεννογόνων με αντιδραστήρια και δείγματα. Εάν τα αντιδραστήρια ή τα δείγματα έρθουν σε επαφή με ευαίσθητες περιοχές, πλύνετε με άφθονη ποσότητα νερού. ⁷

3. Η μικροβιακή μόλυνση των αντιδραστηρίων μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της μη ειδικής χρώσης.

4. Χρόνοι επώασης ή θερμοκρασίες διαφορετικές από αυτές που καθορίζονται μπορεί να δώσουν εσφαλμένα αποτελέσματα. Ο χρήστης πρέπει να επικυρώσει οποιαδήποτε τέτοια αλλαγή.

5. Μη χρησιμοποιείτε το αντιδραστήριο μετά την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στο φιαλίδιο.

6. Το προαραιωμένο αντιδραστήριο αντισώματος αραιώνεται βέλτιστα για χρήση . Περαιτέρω αραιώση μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια χρώσης αντιγόνου.

7. Η αραιώση του συμπυκνωμένου αντιδραστηρίου αντισώματος πρέπει να επικυρωθεί πριν από τη χρήση. Οποιοσδήποτε αραιωτικό που χρησιμοποιείται και δεν συνιστάται ειδικά πρέπει επίσης να επικυρωθεί για συμβατότητα και σταθερότητα.

8. Απορρίψτε όλα τα χρησιμοποιημένα αντιδραστήρια και οποιαδήποτε άλλα μολυσμένα αναλώσιμα υλικά ακολουθώντας διαδικασίες για μολυσματικά ή δυνητικά μολυσματικά απόβλητα. Είναι ευθύνη κάθε εργαστηρίου να χειρίζεται στερεά και υγρά απόβλητα σύμφωνα με τη φύση και τον βαθμό επικινδυνότητάς τους και να τα χειρίζεται και να τα απορρίπτει (ή να τα αναθέτει σε επεξεργασία και απόρριψη) σύμφωνα με οποιουδήποτε ισχύοντες κανονισμούς.

9. Ακολουθήστε τους τοπικούς κανονισμούς απόρριψης για την τοποθέσι σας μαζί με συστάσεις στο Φύλλο Δεδομένων Ασφαλείας για να καθορίσετε την ασφαλή απόρριψη αυτού του προϊόντος

10. Το SDS είναι διαθέσιμο κατόπιν αιτήματος και βρίσκεται στη διεύθυνση <http://biocare.net>.

11. Για να αναφέρετε ύποπτα σοβαρά περιστατικά που σχετίζονται με αυτήν τη συσκευή, επικοινωνήστε με τον τοπικό αντιπρόσωπο της Biocare και την αρμόδια αρχή του κράτους μέλους ή της χώρας στην οποία είναι εγκατεστημένος ο χρήστης.

Οδηγίες χρήσης:

Συνιστώμενα πρωτόκολλα χρώσης για PRAME [EPR20330]:

IntelliPATH FLX and manual use:

Το API3252 για IntelliPATH FLX και χειροκίνητη χρήση, έχει τυποποιηθεί με σύστημα ανίχνευσης MACH 4. Χρησιμοποιήστε TBS για τα βήματα πλυσίματος.	
Peroxide Block:	Αποκλείστε για 5 λεπτά με Peroxidized 1.
Pretreatment:	Εκτελέστε ανάκτηση θερμότητας χρησιμοποιώντας το Borg Decloaker . Ανατρέξτε στο φύλλο δεδομένων Borg Decloaker για συγκεκριμένες οδηγίες.
Protein Block (Optional):	Επώαση για 5-10 λεπτά σε RT με Background Punisher.
Primary Antibody:	Επώαση για 30 λεπτά σε ΘΔ.
Detection:	Ανιχνευτής: N/A
	Πολυμερές: Επώαση για 30 λεπτά σε ΘΔ με ένα δευτερογενές συζευγμένο πολυμερές.
Chromogen:	Επώαση για 5 λεπτά σε RT με το DAB της Biocare – H – Επώαση για 5-7 λεπτά σε RT με Warp Red.
Counterstain	Αντίχρωση με αιματοξυλίνη. Ξεπλύνετε με αποιονισμένο νερό. Εφαρμόστε Tacha's Blueing Solution για 1 λεπτό. Ξεπλύνετε με αποιονισμένο νερό.

ONCORE Pro Automated Slide Staining System:

Το OPAI3252 προορίζεται για χρήση με το ONCORE Pro. Ανατρέξτε στο Εγχειρίδιο χρήστη για συγκεκριμένες οδηγίες χρήσης. Οι παράμετροι πρωτοκόλλου στον Επεξεργαστή Πρωτοκόλλου θα πρέπει να προγραμματιστούν ως εξής:

Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	PRAME Rb	PRAME Rb AP
Protocol Template (Description):	προστασίας ONCORE)	Πρότυπο Rb AP 1
Dewaxing (DS Buffer Option):	DS2-50	DS Buffer
Antigen Retrieval (AR Option):	AR1, υψηλό pH; 103°C	AR1, υψηλό pH; 103°C
Block Option:	Ρυθμιστής	Ρυθμιστής
Reagent Name, Time, Temp.:	PRAME Rb, 45 λεπτά, 25°C	PRAME Rb, 30 λεπτά, 25°C

Ventana BenchMark ULTRA:

Το AVI3252 προορίζεται για χρήση με το BenchMark ULTRA. Ανατρέξτε στο Εγχειρίδιο χρήστη για συγκεκριμένες οδηγίες χρήσης. Οι συνιστώμενες παράμετροι πρωτοκόλλου είναι οι εξής:

Template/Detection:	OptiView DAB IHC
Pretreatment Protocol:	CC1 64 minutes
Peroxidase:	Pre-Primary Peroxidase Inhibitor
Primary Antibody:	32 minutes, 36°C

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Greek

BIOCARE
M E D I C A L

O Series – For Leica BOND-III:

Το ALI3252 προορίζεται για χρήση με το Leica BOND-III. Ανατρέξτε στο Εγχειρίδιο χρήστη για συγκεκριμένες οδηγίες χρήσης. Οι συνιστώμενες παράμετροι πρωτοκόλλου είναι οι εξής:

Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	IHC Protocol F	IHC Protocol J
Detection:	Bond Polymer Refine	Bond Polymer Refine Red
HIER:	20 λεπτά με ER2	20 λεπτά με ER2
Peroxide Block:	5 λεπτά	
Marker (Primary Antibody):	15 λεπτά	15 λεπτά
Post Primary:	8 λεπτά	
Polymer:	8 λεπτά	
Post Primary AP:		20 λεπτά
Polymer AP:		30 λεπτά
Mixed Chromogen Refine:	10 λεπτά	10 λεπτά + 5 λεπτά
Hematoxylin:	5 λεπτά	5 λεπτά

Ελεγχος ποιότητας:

Ανατρέξτε στα πρότυπα ποιότητας του CLSI για τον σχεδιασμό και την εφαρμογή αναλύσεων ανοσοϊστοχημείας. Εγκεκριμένη Οδηγία-Δεύτερη έκδοση (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA ΗΠΑ (www.clsi.org). 2011⁸

Θετικός έλεγχος ιστού: Μελάνωμα, φυσιολογικός όρχις

Τα υλικά εξωτερικού θετικού ελέγχου θα πρέπει να είναι φρέσκα δείγματα που στερεώνονται, υποβάλλονται σε επεξεργασία και ενσωματώνονται το συντομότερο δυνατό με τον ίδιο τρόπο όπως το(α) δείγμα(α) ασθενούς. Οι θετικοί έλεγχοι ιστών είναι ενδεικτικοί των σωστά προετοιμασμένων ιστών και των κατάλληλων τεχνικών χρώσης. Ένας θετικός εξωτερικός μάρτυρας ιστού για κάθε σύνολο συνθηκών δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνεται σε κάθε δοκιμή χρώσης.

Οι ιστοί που χρησιμοποιούνται για τα υλικά εξωτερικού θετικού ελέγχου θα πρέπει να επιλέγονται από δείγματα ασθενών με καλά χαρακτηρισμένα χαμηλά επίπεδα θετικής δραστηριότητας στόχου που δίνει ασθενή θετική χρώση. Το χαμηλό επίπεδο θετικότητας για εξωτερικούς θετικούς μάρτυρες έχει σχεδιαστεί για να διασφαλίζει την ανίχνευση ανεπαίσθητων αλλαγών στην ευαισθησία του πρωτογενούς αντισώματος από ασάθεια ή προβλήματα με τη μεθοδολογία IHC. Οι πλάκες ελέγχου ιστού που διατίθενται στο εμπόριο ή τα δείγματα που έχουν υποστεί διαφορετική επεξεργασία από τα δείγματα ασθενούς επικυρώνουν μόνο την απόδοση του αντιδραστήριου και δεν επαληθεύουν την προετοιμασία ιστού.

Οι γνωστοί θετικοί μάρτυρες ιστών θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο για την παρακολούθηση της σωστής απόδοσης των επεξεργασμένων ιστών και των δοκιμαστικών αντιδραστηρίων, παρά ως βοήθημα στη διαμόρφωση μιας συγκεκριμένης διάγνωσης δειγμάτων ασθενών. Εάν οι θετικοί μάρτυρες ιστού δεν καταφέρουν να επιδείξουν θετική χρώση, τα αποτελέσματα με τα δείγματα δοκιμής θα πρέπει να θεωρούνται άκυρα.

Αρνητικός έλεγχος ιστού:

Χρησιμοποιήστε έναν αρνητικό μάρτυρα ιστού (γνωστό ότι είναι αρνητικός PRAME) σταθεροποιημένος, επεξεργασμένος και ενσωματωμένος με τρόπο πανομοιότυπο με το(α) δείγμα(α) ασθενούς με κάθε διαδικασία χρώσης για να επαληθεύσετε την ειδικότητα του πρωτογενούς αντισώματος IHC για επίδειξη του αντιγόνου στόχου και για παροχή ένδειξης ειδικής χρώσης υποβάθρου (ψευδώς θετική χρώση). Επίσης, η ποικιλία διαφορετικών τύπων κυττάρων που υπάρχουν στα περισσότερα τμήματα ιστού μπορεί να χρησιμοποιηθούν από τον εργαστήριο ως εσωτερικές θέσεις αρνητικού ελέγχου για την επαλήθευση της απόδοσης του IHC Προδιαγραφές. Οι τύποι και οι πηγές των δειγμάτων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για αρνητικό ιστό Τα στοιχεία ελέγχου παρατίθενται στην ενότητα Χαρακτηριστικά απόδοσης.

Εάν εμφανιστεί ειδική χρώση (ψευδώς θετική χρώση) στον αρνητικό μάρτυρα ιστού, τα αποτελέσματα με τα δείγματα ασθενών θα πρέπει να θεωρούνται άκυρα.

Μη ειδικός αρνητικός έλεγχος αντιδραστήριου:

Χρησιμοποιήστε έναν μη ειδικό μάρτυρα αρνητικού αντιδραστήριου στη θέση του πρωτογενούς αντισώματος με μια τομή από κάθε δείγμα ασθενούς για να αξιολογήσετε τη μη ειδική χρώση και επιτρέψουν την καλύτερη ερμηνεία της ειδικής χρώσης στη θέση του αντιγόνου. Στην ιδανική περίπτωση, ένας αρνητικός μάρτυρας αντιδραστήριου περιέχει ένα αντίσωμα PRAME IgG που παράγεται από υπερκείμενο υγρό ιστοκαλλιέργειας με τον ίδιο τρόπο όπως το πρωτογενές αντίσωμα αλλά δεν εμφανίζει ειδική αντιδραστικότητα με ανθρώπινους ιστούς στην ίδια μήτρα/διάλυμα με το αντίσωμα Biocare. Αραιώστε ένα αντίσωμα αρνητικού μάρτυρα στην ίδια συγκέντρωση ανοσοσφαιρίνης ή πρωτεΐνης με το αραιωμένο πρωτογενές αντίσωμα χρησιμοποιώντας το ίδιο αραιωτικό. Εάν ο εμβρυϊκός ορός μόσχου διατηρείται στο καθαρό αντίσωμα μετά την επεξεργασία, ο ορός εμβρύου μόσχου σε συγκέντρωση αρνητικής ισοδύναμη με την αραιωμένη Το πρωτογενές αντίσωμα στο ίδιο αραιωτικό είναι επίσης κατάλληλο για χρήση. (Ανατρέξτε στο παρεχόμενο αντιδραστήριο). Το αραιωτικό μόνο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως λιγότερο επιθυμητή εναλλακτική λύση στα προηγούμενα περιγραφέντα αρνητικά αντιδραστήρια ελέγχου. Η περίοδος επώασης για τον αρνητικό μάρτυρα αντιδραστήριου πρέπει να αντιστοιχεί σε αυτή του πρωτογενούς αντισώματος.

Όταν χρησιμοποιούνται πάνελ πολλών αντισωμάτων σε σειριακές τομές, οι αρνητικά χρωματισμένες περιοχές μιας αντικειμενοφόρου πλάκας μπορεί να χρησιμεύσουν ως έλεγχος υποβάθρου αρνητικής/μη ειδικής δέσμευσης για άλλα αντισώματα. Για να διαφοροποιηθεί η ενδογενής ενζυμική δραστηριότητα ή η μη ειδική δέσμευση ενζύμων από την ειδική ανοσοαντιδραστικότητα, επιπλέον ιστοί ασθενών μπορούν να χρωματιστούν αποκλειστικά με σύμπλοκα υποστρώματος-χρωμογόνου ή ενζύμου (PAP, αβιδίνη-βιοτίνη, στρεπταβιδίνη) και υπόστρωμα-χρωμογόνο, αντίστοιχα.

Επαλήθευση δοκιμασίας:

Πριν από την αρχική χρήση ενός αντισώματος ή ενός συστήματος χρώσης σε μια διαγνωστική διαδικασία, ο χρήστης θα πρέπει να επαληθεύσει την ειδικότητα του αντισώματος δοκιμάζοντας το σε μια σειρά διαφορετικών ιστών με γνωστά ανοσοϊστοχημικά χαρακτηριστικά απόδοσης που αντιπροσωπεύουν γνωστούς θετικούς και αρνητικούς ιστούς. Ανατρέξτε στις διαδικασίες ποιοτικού ελέγχου που περιγράφηκαν προηγουμένως σε αυτήν την ενότητα του ένθετου προϊόντος και στις συστάσεις ποιοτικού ελέγχου του Προγράμματος πιστοποίησης CAP⁹ για την ανοσοϊστοχημεία ή/και την κατευθυντήρια γραμμή NCCLS IHC¹⁰. Αυτές οι διαδικασίες ποιοτικού ελέγχου θα πρέπει να επαναλαμβάνονται για κάθε νέα παρτίδα αντισωμάτων ή όποτε υπάρχει αλλαγή στις παραμέτρους της ανάλυσης. Οι ιστοί που αναφέρονται στην Ενότητα Χαρακτηριστικά Απόδοσης είναι κατάλληλοι για επαλήθευση της ανάλυσης.

Αντιμετώπιση προβλημάτων:

Ακολουθήστε τις συστάσεις του ειδικού πρωτοκόλλου για τα αντισώματα σύμφωνα με το παρεχόμενο φύλλο δεδομένων. Εάν προκύψουν άτυπα αποτελέσματα, επικοινωνήστε με την Τεχνική Υποστήριξη της Biocare στο 1-800-542-2002.

Ερμηνεία της χρώσης:

Θετικός έλεγχος ιστού:

Ο θετικός μάρτυρας ιστού που έχει χρωματιστεί με ενδεικνυόμενο αντίσωμα θα πρέπει να εξεταστεί πρώτα για να διαπιστωθεί ότι όλα τα αντιδραστήρια λειτουργούν σωστά. Η κατάλληλη χρώση των κυττάρων-στόχων (όπως υποδεικνύεται παραπάνω) είναι ενδεικτική της θετικής αντιδραστικότητας. Εάν οι θετικοί μάρτυρες ιστού αποτύχουν να επιδείξουν θετική χρώση, ταχόν αποτελέσματα με τα δείγματα δοκιμής θα πρέπει να θεωρούνται άκυρα.



60 Berry Drive
Pacheco, CA 94553
USA

87/190



TP v3 (12/15/2021)

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080



Westervoortsedijk 60
6827 AT Arnhem
The Netherlands

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Greek

BIOCARE
M E D I C A L

Το χρώμα του προϊόντος αντίδρασης μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με τα χρωμογόνα του υποστρώματος που χρησιμοποιούνται. Ανατρέξτε στα ένθετα συσκευασίας του υποστρώματος για τις αναμενόμενες χρωματικές αντιδράσεις. Περαιτέρω, μεταχρωμασία μπορεί να παρατηρηθεί σε παραλλαγές της μεθόδου χρώσης.¹¹

Όταν χρησιμοποιείται αντιχρώση, ανάλογα με το μήκος επώασης και την ισχύ της αντιχρώσης που χρησιμοποιείται, η αντιχρώση θα οδηγήσει σε χρωματισμό των κυτταρικών πυρήνων. Η υπερβολική ή ατελής αντιχρώση μπορεί να θέσει σε κίνδυνο τη σωστή ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Ανατρέξτε στο(α) πρωτόκολλο(α) για προτεινόμενη αντιχρώση.

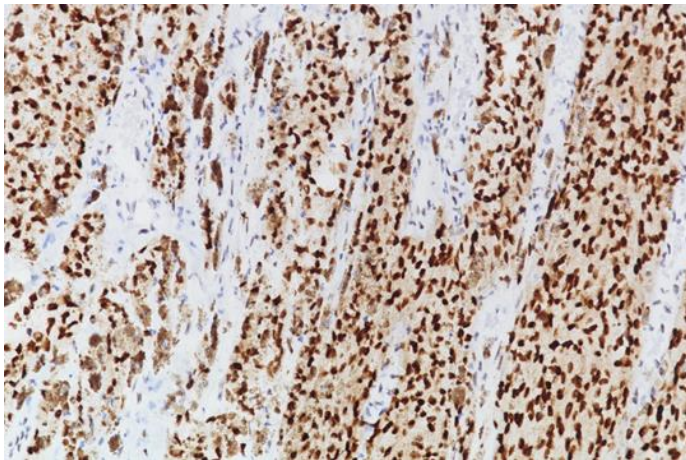
Αρνητικός έλεγχος ιστού :

Ο αρνητικός μάρτυρας ιστού θα πρέπει να εξετάζεται μετά τον θετικό μάρτυρα ιστού για να επαληθευτεί η ειδικότητα της επισήμανσης του αντιγόνου στόχου από το πρωτεΐον αντίσωμα. Η απουσία ειδικής χρώσης στον αρνητικό έλεγχο ιστού επιβεβαιώνει την έλλειψη διασταυρούμενης αντιδραστικότητας αντισωμάτων σε κύτταρα/κυτταρικά συστατικά . Εάν εμφανιστεί ειδική χρώση (ψευδώς θετική χρώση) στον αρνητικό εξωτερικό μάρτυρα ιστού, τα αποτελέσματα με το δείγμα ασθενούς θα πρέπει να θεωρηθούν άκυρα.

Η μη ειδική χρώση, εάν υπάρχει, έχει συνήθως διάχυτη εμφάνιση. Σποραδική χρώση του συνδετικού ιστού μπορεί επίσης να παρατηρηθεί σε τομές από υπερβολικά στερεωμένους με φορμαλίνη ιστούς. Χρησιμοποιήστε άθικτα κύτταρα για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων χρώσης. Τα νεκρωτικά ή εκφυλισμένα κύτταρα συχνά χρωματίζονται μη ειδικά.

Ιστός ασθενούς:

Εξετάστε δείγματα ασθενών που έχουν χρωματιστεί με ενδεικνυόμενο αντίσωμα τελευταίος. Η θετική ένταση χρώσης θα πρέπει να αξιολογείται στο πλαίσιο οποιασδήποτε μη ειδικής υποβάθρου του αρνητικού αντιδραστήριου ελέγχου. Όπως με κάθε ανοσοϊστοχημική δοκιμή, ένα αρνητικό αποτέλεσμα σημαίνει ότι το αντιγόνο δεν ανιχνεύθηκε, όχι ότι το αντιγόνο απουσίαζε στα κύτταρα/ιστό που προσδιορίστηκαν. Εάν είναι απαραίτητο, χρησιμοποιήστε μια ομάδα αντισωμάτων για τον εντοπισμό ψευδώς αρνητικών αντιδράσεων.



Μελάνωμα χρωματισμένο με αντίσωμα PRAME [EPR20330].

Ανατρέξτε στην Περίληψη και Επεξήγηση, στους Περιορισμούς και στα Χαρακτηριστικά Απόδοσης για συγκεκριμένες πληροφορίες σχετικά με την ενδεικνυόμενη ανοσοαντιδραστικότητα αντισωμάτων.

Περιορισμοί:

Γενικοί περιορισμοί:

1. Για *in vitro* διαγνωστική χρήση

2. Αυτό το προϊόν προορίζεται μόνο για επαγγελματική χρήση: Η ανοσοϊστοχημεία είναι μια διαγνωστική διαδικασία πολλαπλών σταδίων που αποτελείται από εξειδικευμένη εκπαίδευση στην επιλογή των κατάλληλων αντιδραστηρίων, επιλογή, στερέωση και επεξεργασία ιστού. προετοιμασία της διαφάνειας IHC, και ερμηνεία των αποτελεσμάτων χρώσης.
3. Η χρώση του ιστού εξαρτάται από τον χειρισμό και την επεξεργασία του ιστού πριν από τη χρώση. Η ακατάλληλη στερέωση, κατάψυξη, απόψυξη, πλύσιμο, στέγνωμα, θέρμανση, κοπή ή μόλυνση με άλλους ιστούς ή υγρά μπορεί να προκαλέσει τεχνουργήματα, παγιδωση αντισωμάτων ή ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Τα ασυνεπή αποτελέσματα μπορεί να οφείλονται σε παραλλαγές στις μεθόδους στερέωσης και ενσωμάτωσης ή σε εγγενείς ανωμαλίες εντός του ιστού.¹²
4. Η υπερβολική ή ατελής αντιχρώση μπορεί να θέσει σε κίνδυνο τη σωστή ερμηνεία των αποτελεσμάτων.
5. Η κλινική ερμηνεία οποιασδήποτε θετικής ή αρνητικής χρώσης θα πρέπει να αξιολογείται στο πλαίσιο της κλινικής εικόνας, της μορφολογίας και άλλων ιστοπαθολογικών κριτηρίων. Η κλινική ερμηνεία οποιασδήποτε θετικής ή αρνητικής χρώσης θα πρέπει να συμπληρώνεται από μορφολογικές μελέτες με χρήση κατάλληλων θετικών και αρνητικών εσωτερικών και εξωτερικών μαρτύρων καθώς και άλλων διαγνωστικών εξετάσεων. Η ερμηνεία όλων των τμήματος ιστού και το kit ανίχνευσης που χρησιμοποιείται. Λόγω της ανώτερης ευαισθησίας αυτών των μοναδικών αντιδραστηρίων, οι συνιστώμενοι χρόνοι επώασης και οι τίτλοι που αναφέρονται δεν ισχύουν για άλλα συστήματα ανίχνευσης, καθώς τα αποτελέσματα ενδέχεται να διαφέρουν. Οι συστάσεις και τα πρωτόκολλα του δελτίου δεδομένων βασίζονται στην αποκλειστική χρήση των προϊόντων Biocare . Τελικά, είναι ευθύνη του ερευνητή να καθορίσει τις βέλτιστες συνθήκες.
6. Η βέλτιστη αραιώση αντισωμάτων και τα πρωτόκολλα για μια συγκεκριμένη εφαρμογή μπορεί να διαφέρουν. Αυτά περιλαμβάνουν, ενδεικτικά τη στερέωση, τη μέθοδο ανάκτησης θερμότητας, τους χρόνους επώασης, το πάχος του τμήματος ιστού και το kit ανίχνευσης που χρησιμοποιείται. Λόγω της ανώτερης ευαισθησίας αυτών των μοναδικών αντιδραστηρίων, οι συνιστώμενοι χρόνοι επώασης και οι τίτλοι που αναφέρονται δεν ισχύουν για άλλα συστήματα ανίχνευσης, καθώς τα αποτελέσματα ενδέχεται να διαφέρουν. Οι συστάσεις και τα πρωτόκολλα του δελτίου δεδομένων βασίζονται στην αποκλειστική χρήση των προϊόντων Biocare . Τελικά, είναι ευθύνη του ερευνητή να καθορίσει τις βέλτιστες συνθήκες.
7. Αυτό το προϊόν δεν προορίζεται για χρήση στην κυτταρομετρία ροής. Τα χαρακτηριστικά απόδοσης δεν έχουν προσδιοριστεί για την κυτταρομετρία ροής.
8. Οι ιστοί από άτομα μολυσμένα με τον ιό της ηπατίτιδας Β και που περιέχουν επιφανειακό αντιγόνο ηπατίτιδας Β (HBsAg) μπορεί να εμφανίσουν μη ειδική χρώση με υπεροξειδάση χρένου.¹³
9. Τα αντιδραστήρια μπορεί να παρουσιάσουν απροσδόκητες αντιδράσεις σε ιστούς που δεν είχαν δοκιμαστεί προηγουμένως. Η πιθανότητα απροσδόκητων αντιδράσεων ακόμη και σε δοκιμασμένες ομάδες ιστών δεν μπορεί να εξαλειφθεί πλήρως λόγω της βιολογικής μεταβλητότητας της έκφρασης αντιγόνου σε νεοπλασμάτα ή άλλους παθολογικούς ιστούς.¹⁴ Επικοινωνήστε με την Τεχνική Υποστήριξη της Biocare στο 1-800-542-2002 ή μέσω των πληροφοριών τεχνικής υποστήριξης που παρέχονται στο biocare.net, με τεκμηριωμένες απροσδόκητες αντιδράσεις.
10. Φυσιολογικοί/μη-άνοσοι οροί από την ίδια ζωική πηγή με τους δευτερογενείς αντιορούς που χρησιμοποιούνται στα βήματα αποκλεισμού μπορεί να προκαλέσουν ψευδώς αρνητικά ή ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω αυτοαντισωμάτων ή φυσικών αντισωμάτων.
11. Εσφαλμένα θετικά αποτελέσματα μπορεί να παρατηρηθούν λόγω μη ανοσολογικής δέσμευσης πρωτεϊνών ή προϊόντων αντιδραστήριου υποστρώματος. Μπορεί επίσης να προκληθούν από δραστηριότητα ψευδο-υπεροξειδάσης (ερυθροκύτταρα), ενδογενή δραστηριότητα υπεροξειδάσης (κυτόχρωμα C) ή ενδογενή βιοτίνη (π.χ. ήπαρ, μαστός, εγκέφαλος, νεφρός) ανάλογα με τον τύπο της ανοσοχρήσης που χρησιμοποιείται.¹²

Ειδικοί περιορισμοί προϊόντος:

Δεν υπάρχουν πρόσθετοι περιορισμοί για το συγκεκριμένο προϊόν.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Greek

BIOCARE
M E D I C A L

Χαρακτηριστικά απόδοσης:

Αναπαραγωγιμότητα:

Η αναπαραγωγιμότητα της απόδοσης των αντισωμάτων επαληθεύτηκε με δοκιμή επιλεγμένου φυσιολογικού και όγκου ιστού σε διάφορες ημέρες και σε διάφορα όργανα με πολλούς χειριστές. Η χρώση των επιλεγμένων ιστών ήταν συνεπής και πραγματοποιήθηκε όπως αναμενόταν.

Ανοσοαντιδραστικότητα:

Οι ακόλουθες θετικές και αρνητικές ανοσοαντιδρασότητες έχουν καταδειχθεί στους Πίνακες 1 και 2 παρακάτω.

Ο κατάλογος που παρέχεται παρακάτω δεν είναι εξαντλητικός αλλά χαρακτηρίζει τους τύπους ανοσοαντιδραστικότητας που παρατηρούνται με το υποδεικνυόμενο αντίσωμα.

Δεν έχει παρατηρηθεί γνωστή μη ειδική αντιδραστικότητα αντισωμάτων σε αυτό το προϊόν.

Σύνοψη των αναμενόμενων αποτελεσμάτων:

Ο επιπολασμός του PRAME σε ιστούς φυσιολογικής κατάστασης και ασθένειας αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας Μικροσυστοιχίες Ιστών (TMAs).

Οι φυσιολογικοί ιστοί που δοκιμάστηκαν χρωματίστηκαν όπως αναμενόταν, με υψηλά επίπεδα χρώσης που παρατηρήθηκαν στους όρχεις και χωρίς χρώση σε άλλους ιστούς.

Η χρώση του PRAME παρατηρήθηκε σε υψηλό επίπεδο στο μελάνωμα όπως αναμενόταν και σε διαφορετικά επίπεδα σε άλλους καρκινικούς ιστούς όπως οι ωθήκες, ο πνεύμονας, ο προστάτης και ο μαστός.

Αναλυτική απόδοση:

Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές χρώσης για ευαισθησία και ειδικότητα και τα αποτελέσματα παρατίθενται παρακάτω.

Ευαισθησία και ειδικότητα:

Πίνακας 1: Η ευαισθησία και η ειδικότητα του αντισώματος προσδιορίστηκαν με εξέταση φυσιολογικών ιστών FFPE.

Ιστός	Θετικές περιπτώσεις	Σύνολο υποθέσεων
Εγκέφαλος	0	6
Παρεγκεφαλίτιδα	0	3
Επινεφρίδιος	0	3
Ωοθήκη	0	3
Παγκρέας	0	3
Τραχεία	0	3
Βλεννογόνας	0	3
Όρχις*	3	3
Θυροειδής	0	3
Στήθος	0	3
Σπλήνα	0	3
Παρωτίδα	0	3
Θύμος	0	3
Μυελός των οστών**	0	1
Πνεύμονας	0	3
Καρδιά	0	3
Οισοφάγος	0	3
Στομάχι	0	3
Το λεπτό έντερο	0	3
Ανω κάτω τελεία	0	3
Συκώτι	0	3
Σιελογόνας Αδένας	0	3
Νεφρό	0	3
Προστάτης	0	3
Μήτρα	0	3
Τράχηλος της μήτρας	0	3
Σκελετικός μυς	0	3
Δέρμα	0	3
Περιφερικό νεύρο	0	3
Επενδυτικά κύτταρα	0	3
Κεφάλι, λαιμός και σιελογόνας αδένας	0	6
Λεμφαδένας	0	3

* Πυρηνική χρώση 3-4 ισχύος

** Λείπουν δύο δείγματα

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Greek

BIOCARE
M E D I C A L

Πίνακας 2: Η ευαισθησία και η ειδικότητα του αντισώματος προσδιορίστηκαν με δοκιμή μιας ποικιλίας νεοπλασματικών ιστών FFPE.

Παθολογία	Θετικές περιπτώσεις	Σύνολο υποθέσεων
Μελάνωμα	29	39
Καρκίνος Ωοθηκών	9	44
Καρκίνος του μαστού	10	26
Καρκίνο του παχέος εντέρου	4	43
Καρκίνος του πνεύμονα	21	50
Καρκίνος του προστάτη	18	41
Καρκίνωμα επινεφριδικού φλοιού	0	1
Καρκίνο της ουροδόχου κύστης	0	2
Μηνιγγίωμα	0	2
Αστροκύτωμα	0	1
Ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα (οισοφαγός)	0	2
Αδενοκαρκίνωμα (στομάχου)	0	2
Αδενοκαρκίνωμα (λεπτό έντερο)	0	1
Αδενοκαρκίνωμα (παχέος εντέρου και ορθού)	0	6
Καρκίνος Νεφρού	0	2
Καρκίνος στο συκώτι	0	4
Λέμφωμα	0	3
Ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα (κεφαλής & λαιμού, στοματική κοιλότητα, γλώσσα)	0	1
Ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα	1	1
Αδενοκαρκίνωμα (πάγκρεας)	0	1
Αδενοκαρκίνωμα (προστάτη)	0	2
Αδενοειδής κυστικό καρκίνωμα (κεφαλής και τραχήλου, σιελογόνων αδένων)	0	1
Ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα (δέρμα)	0	1
Seminoma	0	2
Καρκίνος θυροειδούς	0	2
Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας	0	2
Καρκίνος του ενδομητρίου	1	2

Η έκφραση PRAME σε διάφορα νεοπλάσματα μπορεί να εμφανίζει μεταβλητό ποσοστό θετικότητας όγκου. Ανατρέξτε στον Πίνακα 3 για ποσοστά θετικής χρώσης καρκινικών κυττάρων (κατηγοριοποιημένα ανά τεταρτημόρια) που παρατηρούνται σε διάφορα νεοπλάσματα που βρίσκονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 3: Ποσοστό θετικής χρώσης καρκινικών κυττάρων σε διάφορα νεοπλάσματα FFPE.

Ιστοί	Ποσοστό χρώσης κυττάρων όγκου # περιπτώσεων που παρουσιάζουν χρώση Ποσοστό συνόλου # περιπτώσεων (%)				
	<1%	1-25%	26-50%	51-75%	> 75%
Καρκίνος Ωοθηκών	35/44 (79,5%)	2/44 (4,5%)	3/44 (6,8%)	3/44 (6,8%)	1/44 (2,3%)
Καρκίνος του μαστού	16/26 (61,5%)	7/26 (26,9%)	1/26 (3,8%)	2/26 (7,7%)	0 (0%)
Καρκίνο του παχέος εντέρου	39/43 (88,4%)	4/43 (11,6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Καρκίνος του πνεύμονα	29/50 (58,0%)	7/50 (14,0%)	4/50 (8,0%)	7/50 (14,0%)	3/50 (6,0%)
Καρκίνος του προστάτη	23/41 (56,1%)	9/41 (22,0%)	3/41 (7,3%)	2/41 (4,9%)	4/41 (9,8%)
Ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1/1 (100%)
Καρκίνος του ενδομητρίου	1/2 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	1/2 (50%)	0 (0%)
Μελάνωμα	10/39 (25,6%)	6/39 (15,4%)	5/39 (12,8%)	6/39 (15,4%)	12/39 (30,8%)

Ποσοστό χρώσης καρκινικών κυττάρων παρουσιάστηκε για όλες τις εντάσεις χρώσης.
Χρώση σε ιστούς που εμφανίζουν διαφορετικά επίπεδα έκφρασης πρωτεΐνης PRAME.

Τα αποτελέσματα της αναλυτικής δοκιμής απόδοσης έδειξαν ότι το αντίσωμα PRAME [EPR20330] μπορεί να ανιχνεύσει σωστά την πρωτεΐνη PRAME όταν χρησιμοποιεί το καθορισμένο πρωτόκολλο IHC. Τα αποτελέσματα της δοκιμής μη φυσιολογικού ιστού υποστηρίζουν το συμπέρασμα ότι το PRAME [EPR20330] είναι ευαίσθητο στην πρωτεΐνη PRAME όταν χρησιμοποιεί τα συνιστώμενα πρωτόκολλα IHC. Το αντίσωμα PRAME [EPR20330] είναι σε θέση να ανιχνεύσει χαμηλά έως υψηλά επίπεδα της πρωτεΐνης PRAME. Η εξέταση φυσιολογικού ιστού δεν έδειξε απροσδόκητη ανίχνευση PRAME σε 32 τύπους ιστών. Δεν υπήρξε απροσδόκητη διασταυρούμενη αντιδραστικότητα. Τα αποτελέσματα υποστηρίζουν τον ισχυρισμό ότι το αντίσωμα PRAME [EPR20330] είναι εξαιρετικά ειδικό (αναλυτική εξειδίκευση) στην πρωτεΐνη PRAME.

Κλινική απόδοση:

Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές χρώσης για διαγνωστική ευαισθησία και ειδικότητα και τα αποτελέσματα παρατίθενται παρακάτω. Η θετική και αρνητική ανοσοαντιδραστικότητα έχει καταγραφεί στον Πίνακα 4.

Τρεις αντικειμενοφόροι TMA μελανώματος χρωματίστηκαν στο Biocare και στάλθηκαν σε εξωτερικό παθολόγο για ανάγνωση και βαθμολόγηση. Οι ιστοί μελανώματος εμφάνισαν ποικιλία βαθμολογιών χρώσης που κυμαίνονταν από 0 (αρνητικό) έως ισχυρό (4). Οι περισσότεροι μελανοκυτταρικοί σπίλοι δεν έδειξαν αντιδραστικότητα PRAME, αλλά λίγοι είχαν ισχυρή αντιδραστικότητα.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Greek

BIOCARE
M E D I C A L

Πίνακας 4: Ποσοστό θετικής χρώσης καρκινικών κυττάρων σε διάφορα μελανοκυτταρικά νεοπλασμάτα και δέρμα FFPE.

Ιστοί	Ποσοστό χρώσης κυττάρων όγκου # περιπτώσεων που παρουσιάζουν χρώση Ποσοστό συνόλου # περιπτώσεων (%)				
	<1%	1-25%	26-50%	51-75%	> 75%
Μελάνωμα	28/133 (21,1%)	50/133 (37,6%)	10/133 (7,5%)	8/133 (6,0%)	37/133 (27,8%)
Μεταστατικό μελάνωμα	7/38 (18,4%)	10/38 (26,3%)	3/38 (7,9%)	2/38 (5,3%)	16/38 (42,1%)
Μελανοκυτταρικοί σπίλοι	14/12 (85,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2/12 (14,3%)
Δέρμα	10/10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Ποσοστό χρώσης καρκινικών κυττάρων παρουσιάστηκε για όλες τις εντάσεις χρώσης.

Χρώση σε ιστούς που εμφανίζουν διαφορετικά επίπεδα έκφρασης πρωτεΐνης PRAME.

Το πρωτεύον τελικό σημείο της δοκιμής ήταν η αξιολόγηση της διαγνωστικής ευαισθησίας του αντισώματος PRAME [EPR20330] στη διαδικασία IHC, που ορίστηκε ως ο θετικός ρυθμός ανίχνευσης μελανώματος των επιβεβαιωμένων θετικών δειγμάτων. [TP/(TP+FN)]

Ένα δευτερεύον τελικό σημείο ήταν η αξιολόγηση της διαγνωστικής εξειδίκευσης - του αρνητικού ποσοστού ανίχνευσης για επιβεβαιωμένα αρνητικά δείγματα μελανώματος. [TN/(TN+FP)]

Υπήρχαν 35 ψευδώς αρνητικές περιπτώσεις μελανώματος που είχαν λάβει την παθολογική αξιολόγηση του χρυσού προτύπου ως μελάνωμα αλλά ήταν αρνητικές για PRAME. 136 περιπτώσεις ήταν αληθινά θετικά στο ότι διαγνώστηκαν με μελάνωμα και έδειξαν σήμα για PRAME. Δύο ψευδώς θετικά ανιχνεύθηκαν στα 14 δείγματα μελανοκυτταρικών σπύλων που διαγνώστηκαν ως καλοήγη και έδειξαν σήμα για PRAME.

Από τα δεδομένα, η εκτιμώμενη διαγνωστική ευαισθησία = $136 / (136 + 35) = 79,5\%$

Από τα δεδομένα, η εκτιμώμενη διαγνωστική ειδικότητα = $22 / (22 + 2) = 91,7\%$

Με βάση τους υπολογισμούς μας, καταλήγουμε σε μια εκτιμώμενη διαγνωστική ευαισθησία 79,5% και μια εκτιμώμενη διαγνωστική ειδικότητα 91,7% για την ανίχνευση μελανώματος.

Από αυτό συμπεραίνουμε ότι το αντίσωμα PRAME [EPR20330], όπως ελέγχεται από την Biocare σε δείγματα μελανώματος και μελανοκυτταρικών σπύλων, είναι ευαίσθητο στο μελάνωμα και εξαιρετικά ειδικό στο μελάνωμα.

Αντιμετώπιση προβλημάτων: (Δώστε εξηγήσεις για καθένα από τα παρακάτω σημεία)

- Δεν υπάρχει χρώση οποιωνδήποτε πλακών – Ελέγξτε για να προσδιορίσετε ότι έχουν χρησιμοποιηθεί κατάλληλος ιστός θετικού μάρτυρα, αντίσωμα και προϊόντα ανίχνευσης.
- Ασθενής χρώση όλων των πλακών – Ελέγξτε για να προσδιορίσετε ότι έχουν χρησιμοποιηθεί κατάλληλοι ιστοί θετικού ελέγχου, αντισώματα και προϊόντα ανίχνευσης.
- Υπερβολικό υπόβαθρο όλων των διαφανειών – Μπορεί να υπάρχουν υψηλά επίπεδα ενδογενούς βιοτίνης (εάν χρησιμοποιούνται προϊόντα ανίχνευσης με βάση τη βιοτίνη), ενδογενής δραστηριότητα HRP που μετατρέπει το χρωμογόνο σε έγχρωμο τελικό προϊόν (χρήση μπλοκ υπεροξειδάσης) ή υπερβολική αλληλεπίδραση μη ειδικής πρωτεΐνης

(χρησιμοποιήστε πρωτεΐνη μπλοκ, όπως ανασταλτικό διάλυμα με βάση τον ορό ή την καζεΐνη).

- Τα τμήματα ιστού ξεπλένουν τις αντικειμενοφόρες πλάκες κατά τη διάρκεια της επώασης – Ελέγξτε τις αντικειμενοφόρες πλάκες για να βεβαιωθείτε ότι είναι θετικά φορτισμένες.
- Ειδική χρώση πολύ σκούρα – Ελέγξτε το πρωτόκολλο για να προσδιορίσετε εάν εφαρμόστηκε ο κατάλληλος τίτλος αντισωμάτων στην αντικειμενοφόρο πλάκα, καθώς και οι κατάλληλοι χρόνοι επώασης για όλα τα αντιδραστήρια. Επιπλέον, βεβαιωθείτε ότι το πρωτόκολλο έχει αρκετά βήματα πλύσης για την αφαίρεση της περισσεύσας αντιδραστηρίων μετά την ολοκλήρωση των βημάτων επώασης.

Βιβλιογραφικές αναφορές:

- Kiernan JA. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. New York: Pergamon Press 1981.
- Sheehan DC and Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
- Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
- Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. J Histotechnol. 1999 Sep;22(3):177-92.
- Taylor CR, et al. Biotech Histochem. 1996 Jan;71(5):263-70.
- Center for Disease Control Manual. Guide: Safety Management, NO. CDC-22, Atlanta, GA. April 30, 1976 "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts."
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
- CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011
- College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. <http://www.cap.org> (800) 323-4040.
- O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
- Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques. Histochemistry 1987; 86:471-478.
- Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Lab Med 1983;14:767.
- Omata M, Liew CT, Ashcavi M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradishperoxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. Am J Clin Path 1980;73:626.
- Herman GE and Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech & Histochem 1991;66:194.
- Zhang W, et al. PRAME expression and promoter hypermethylation in epithelial ovarian cancer. Oncotarget, 2016 Jul; 7(29):45352-69.
- Lezcano C, et al. PRAME expression in melanocytic tumors. Am J Surg Pathol. 2018 Nov; 42(11):1456-65.

Ultraline αναπτύσσονται αποκλειστικά από την Biocare Medical LLC και δεν συνεπάγονται έγκριση ή έγκριση των αντισωμάτων Biocare από την Ventana Medical Systems, Inc ή τη Roche. Η Biocare, η Ventana και η Roche δεν συνδέονται, δεν συνδέονται ή σχετίζονται με οποιονδήποτε τρόπο. Τα Ventana®, BenchMark®, ultraView και OptiView είναι εμπορικά σήματα της Roche.

Τα αντισώματα της σειράς Q αναπτύσσονται αποκλειστικά από την Biocare Medical LLC και δεν συνεπάγονται έγκριση ή έγκριση των αντισωμάτων Biocare από τη Leica Biosystems. Η Biocare και η Leica Biosystems δεν συνδέονται, δεν σχετίζονται ή σχετίζονται με κανέναν τρόπο. Τα Leica, Leica Biosystems, BOND-MAX και BOND-III είναι εμπορικά σήματα της Leica Biosystems.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Greek

BIOCARE
M E D I C A L

Η περίληψη της ασφάλειας και της απόδοσης βρίσκεται εδώ:
<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Hungarian

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats				
Format	Catalog Number	Description	Dilution	Diluent
Concentrate	ACI 3252 A, B	0.1, 0.5 mL	1:100	Van Gogh Yellow
Predilute	API 3252 AA, G20, H	6.0, 20, 25 mL	Ready-to-use	N/A
ONCORE Pro	OPAI 3252 T60	60 tests	Ready-to-use	N/A
Q Series-- For Leica BOND-III	ALI 3252 G7	7.0 mL	Ready-to-use	N/A
UltraLine -- For BenchMark	AVI 3252 G, G25	6.0, 25 mL	Ready-to-use	N/A

Rendeltetészerű használat:

In vitro diagnosztikai használatra

A PRAME [EPR20330] egy nyúl monoklonális antitest, amelyet laboratóriumi használatra szántak, miután a daganat kezdeti diagnózisát hagyományos kórszövetani vizsgálattal, nem immunológiai hisztokémiai festéssel, a PRAME fehérje kvalitatív azonosítására immunhisztokémiai (IHC) segítségével formalin fixált paraffinban végezték. beágyazott (FFPE) emberi szövetek. Bármely festődés vagy hiánya klinikai értelmezését megfelelő kontrollokat alkalmazó morfológiai vizsgálatokkal kell kiegészíteni, és azt a beteg klinikai anamnézisével és más diagnosztikai tesztekkel összefüggésben kell értékelnie egy szakképzett patológusnak, hogy segítsen bármilyen más klinikai meghatározásban.

Összegzés és magyarázat:

A PRAME a 22q11.22 kromoszómán található, és egy 509 aminosavból álló fehérjét kódol. A PRAME egy autoszomális rák-here antigén (CTA) gén, amelyről kimutatták, hogy kifejeződik melanómában, különböző nem melanocita rosszindulatú daganatokban, beleértve a nem-kissejtes tüdőrákot, emlőkarinómát, petefészekrákot és számos más idézett gént. A normál egészséges szövetekről ismert, hogy nem fejezik ki a PRAME-t, kivéve a herét, a petefészeket, a mellékveséket és néhány, az irodalomban idézett másikat. (15,16)

Eljárás elve:

Ez az antitesttermék elsődleges antitestként használható formalinnal rögzített, paraffinba ágyazott szövetmetszetek immunhisztokémiai vizsgálatában. Általában az immunhisztokémiai (IHC) A festési technikák lehetővé teszik az antigének láthatóvá tételét az a specifikus antitest az antigén ellen (elsődleges antitest), egy másodlagos antitest az elsődleges antitest ellen (opcionális link antitest/próba), egy enzimkomplex és egy kromogén szubsztrát, közbeiktatott mosási lépésekkel. A kromogén enzimaktiválása az antigén helyén látható reakcióterméket eredményez. A minta ezután ellenfesthető, és a fedél elcsúsztható. Az eredményeket fény segítségével értelmezzük mikroszkóppal és segítséget nyújt a kóreltani folyamatok differenciáldiagnózisában, amely lehet, ill nem kapcsolódhat egy adott antigénhez.

Anyagok és módszerek:

Mellékelt reagensek:

Gazdaforrás: Rabbit monoklonális

Faj Reaktivitás: Ember. Más fajokat nem vizsgáltak.

Klón: EPR20330

Izotípus: IgG

Fehérjekoncentráció: Specifikus IgG koncentráció: Lépjen kapcsolatba a Biocare műszaki támogatásával

Specifikusság: PRAME

Sejt lokalizáció: sejtmag és sejtmembrán

Módszer: Affinitástisztított monoklonális rekombináns nyúl.

Feloldás, keverés, hígítás, titrálás:

Az előhígított antitest reagens optimálisan hígított a fent felsorolt festőrendszerekhez. A további hígítás az antigénfestés elvesztését eredményezheti. A felhasználónak minden ilyen változtatást érvényesítenie kell. A felhasználó laboratóriumában a szövetfeldolgozás és a technikai eljárások közötti különbségek jelentős eltéréseket eredményezhetnek az

eredményekben, ami rendszeres házon belüli ellenőrzéseket tesz szükségessé (lásd a Minőségellenőrzés fejezetet).

A koncentrált reagenst a fenti táblázat szerint hígítani kell.

Ismert alkalmazások:

Immunhisztokémia (formalinnal rögzített paraffinba ágyazott szövetek)

Kíszerelés: Pufferolt sóoldat, pH 5,9-7,9, amely fehérjehordozót és kevesebb, mint 0,1% nátrium- azid tartósítószer tartalmaz. További részletekért lásd a biztonsági adatlapot.

Szükséges, de nem mellékelt anyagok és reagensek:

A mikroszkóp tárgylemezei pozitív töltésűek.

Pozitív és negatív szövetkontrollok

Desert Chamber (vagy hasonló szárító sütő)

Xilol vagy xilol helyettesítő

Etanol vagy reagens alkohol

Elzáró kamra (nagynyomású tűzhely)

Ionmentesített vagy desztillált víz

Mosó puffer

Előkezelő reagensek

Peroxidáz blokk

Fehérje blokk (opcionális)

Érzékelő sonda és polimer

Negatív kontroll reagensek

Kromogének

Hematoxin (ellenfestés)

Kékítő reagens

Szerelési közeg

Fedőüveg

Fénymikroszkóp (40-400X nagyítás)

Az antitest termék konfigurációi elérhetők a fenti táblázatban feltüntetett eszközökön való használatra.

Tárolás és stabilitás:

2°C és 8°C között tárolandó. A termék az injekciós üveg címkéjén feltüntetett lejárati időig stabil, ha ilyen körülmények között tárolják. Ne használja a lejárati idő után. A meghatározottaktól eltérő körülmények közötti tárolást ellenőrizni kell. A hígított reagenseket azonnal fel kell használni; a maradék reagenst 2°C és 8°C között tárolja. A felhasználó által hígított reagens stabilitását a Biocare nem állapította meg.

A pozitív és negatív kontrollokat egyidejűleg kell lefuttatni az összes betegmintával. Ha váratlan festődést észlel, amely nem magyarázható a laboratóriumi eljárások eltéréseivel, és az antitesttel kapcsolatban probléma gyanúja merül fel, lépjen kapcsolatba a Biocare műszaki támogatásával az 1-800-542-2002 telefonszámon vagy a biocare.net oldalon található műszaki támogatási információkon keresztül.

Minta előkészítés:

A formalinban rögzített szövetek alkalmasak a paraffin beágyazás előtti használatra. A csontszöveteket a szövetfeldolgozás előtt vízköteníteni kell a szövetvágás megkönnyítése és a mikrotom pengéi károsodásának elkerülése érdekében. ^{1,2}



60 Berry Drive
Pacheco, CA 94553
USA

93/190



TP v3 (12/15/2021)

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080



Westervoortsedijk 60
8627 AT Arnhem
The Netherlands

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Hungarian

A megfelelően rögzített és beágyazott, a meghatározott antigén célpontot expresszázó szöveteket hűvös helyen kell tárolni. Az 1988. évi Clinical Laboratory Improvement Act (CLIA) 42. cikkében a CFR 493.1259(b) bekezdése előírja, hogy „A laboratóriumnak legalább tíz évig meg kell őriznie a megfestett tárgylemezeket megvizsgálja és megőrzi a mintatömböket a vizsgálat időpontjától számított legalább két évig.”³

A szövetek kezelése festés előtt:

Hajtsa végre a hőindukált epitóp-visszakeresést (HIER) az alábbi javasolt protokoll szerint. Kimutatták, hogy a HIER rutinszerű használata az IHC előtt minimálisra csökkenti az inkonzisztenciát és szabványosítja a festődést.^{4,5}

Figyelmeztetések és óvintézkedések:

1. Ez az antitest kevesebb, mint 0,1% nátrium- azidot tartalmaz. A 0,1%-nál kisebb koncentrációk nem jelentendő veszélyes anyagok az US 29 CFR 1910.1200, az OSHA Hazard communication és a 91/155/EC EK irányelv szerint. A tartósítószerként használt nátrium- azid (NaN₃) lenyelve mérgező. A nátrium- azid reakcióba léphet az ólom- és rézvezetékekkel, és erősen robbanásveszélyes fém- azidokat képezhet. Ártalmatlanításkor öblítse le nagy mennyiségű vízzel, hogy megakadályozza az azidok felhalmozódását a vízvezetékben. (Betegségvédelmi Központ, 1976, Országos Munkavédelmi és Munkaügyi Intézet, 1976)⁶
2. A mintákat a rögzítés előtt és után, valamint az ezeknek kitett anyagokat úgy kell kezelni, mintha képesek lennének fertőzést továbbítani, és megfelelő óvintézkedésekkel kell ártalmatlanítani. Soha ne pipettázzon reagenseket szájon át, és kerülje a bőrrel és a nyálkahártyákkal való érintkezést a reagensekkel és a mintákkal. Ha a reagensek vagy a minták érzékeny területekkel érintkeznek, mossa le bő vízzel.⁷
3. A reagensek mikrobiális szennyeződése a nem specifikus festődés növekedését eredményezheti.
4. A megadottól eltérő inkubációs idők vagy hőmérsékletek hibás eredményeket adhatnak. A felhasználónak minden ilyen változtatást érvényesítenie kell.
5. Ne használja fel a reagenst az injekciós üvegre nyomtatott lejárati idő után.
6. Az előhígított antitest reagens a felhasználáshoz optimálisan hígított. A további hígítás az antigénfestés elvesztését eredményezheti.
7. A koncentrált antitest-reagens hígítását használat előtt validálni kell. Bármi a nem kifejezetten ajánlott hígítószer is ellenőrizni kell a kompatibilitás és a stabilitás szempontjából.
8. A fertőző vagy potenciálisan fertőző hulladékokra vonatkozó eljárásokat követően semmisítse meg az összes használt reagenst és minden egyéb szennyezett eldobható anyagot. Az egyes laboratóriumok felelőssége, hogy a szilárd és folyékony hulladékokat természetüknek és veszélyességüknek megfelelően kezeljék, és a vonatkozó előírásoknak megfelelően kezeljék és ártalmatlanítsák (vagy kezeltesék és ártalmatlanítsák).
9. A termék biztonságos ártalmatlanításának meghatározásához kövesse az Ön tartózkodási helyére vonatkozó helyi hulladékkezelési előírásokat, valamint a biztonsági adatlap ajánlásait.
10. Az SDS kérésre elérhető, és a <http://biocare.net> címen található.
11. Az eszközzel kapcsolatos feltételezett súlyos események bejelentéséhez forduljon a Biocare helyi képviselőjéhez és a felhasználó székelye szerinti tagállam vagy ország illetékes hatóságához.

Használati útmutató:

A PRAME ajánlott festési protokolljai [EPR20330]:

IntelliPATH FLX and manual use:

Az API3252 az IntelliPATH FLX és a kézi használatához szabványosítva lett a MACH 4 érzékelőrendszerrel. Használjon TBS-t a mosási lépésekhez.

Peroxide Block:	Blokkolja 5 percig Peroxidázed 1-gyel.
Pretreatment:	Hajtsa végre a hővisszanyerést a Borg Decloaker segítségével. A konkrét utasításokat a Borg Decloaker adatlapján találja.

BIOCARE
M E D I C A L

Protein Block (Optional):	Inkubálja 5-10 percig szobahőmérsékleten a Background Punisher segítségével.
Primary Antibody:	Inkubáljuk 30 percig szobahőmérsékleten.
Detection:	Szonda: N/A Polimer: Inkubáljuk 30 percig szobahőmérsékleten egy másodlagos konjugált polimerrel.
Chromogen:	Inkubáljon 5 percig szobahőmérsékleten Biocare DAB-val – VAGY – Inkubáljon 5-7 percig szobahőmérsékleten Warp Red segítségével.
Counterstain	Ellenfestés hematoxilinnel. Öblítse le ioncserélt vízzel. Alkalmazza a Tacha's Blueing Solution-t 1 percig. Öblítse le ioncserélt vízzel.

ONCORE Pro Automated Slide Staining System:

Az OPAI3252 az ONCORE Pro-val való használatra készült. Tekintse meg a Felhasználói kézikönyvet a konkrét használati utasításokért. A protokollparamétereket a Protokollszerkesztőben a következőképpen kell programozni:

Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	PRAME Rb	PRAME Rb AP
Protocol Template (Description):	Speciális sablon (ONCORE Protect Detection szükséges)	Rb AP sablon 1
Dewaxing (DS Buffer Option):	DS2-50	DS puffer
Antigen Retrieval (AR Option):	AR1, magas pH; 103 °C	AR1, magas pH; 103 °C
Block Option:	Puffer	Puffer
Reagent Name, Time, Temp.:	PRAME Rb, 45 perc, 25 °C	PRAME Rb, 30 perc, 25 °C

Ventana BenchMark ULTRA:

BenchMark ULTRA -val való használatra készült. Tekintse meg a Felhasználói kézikönyvet a konkrét használati utasításokért. Az ajánlott protokollparaméterek a következők:

Template/Detection:	OptiView DAB IHC
Pretreatment Protocol:	CC1 64 perc
Peroxidase:	Pre-primer peroxidáz gátló
Primary Antibody:	32 perc, 36 °C

Q Series – For Leica BOND-III:

Az ALI3252 a Leica BOND-III-mal való használatra készült. Tekintse meg a Felhasználói kézikönyvet a konkrét használati utasításokért. Az ajánlott protokollparaméterek a következők:

Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	IHC F protokoll	IHC J. protokoll
Detection:	Bond Polymer Refine	Bond Polymer Refine Red
HIER:	20 perc ER2-vel	20 perc ER2-vel
Peroxide Block:	5 perc	
Marker (Primary Antibody):	15 perc	15 perc
Post Primary:	8 perc	
Polymer:	8 perc	
Post Primary AP:		20 perc
Polymer AP:		30 perc

 Biocare Medical

60 Berry Drive
Pacheco, CA 94553

USA

94/190



TP v3 (12/15/2021)

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080

 EMERGO EUROPE

Westervoortsedijk 60

8627 AT Arnhem

The Netherlands

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Hungarian

BIOCARE
M E D I C A L

Mixed Chromogen Refine:	10 perc	10 perc + 5 perc
Hematoxylin:	5 perc	5 perc

Minőség ellenőrzés:

Lásd: CLSI minőségi szabványok az immunhisztokémiai vizsgálatok tervezésére és végrehajtására vonatkozóan; Jóváhagyott útmutató – Második kiadás (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011⁸

Pozitív szövetkontroll:

Melanoma, normál here
A külső pozitív kontrollanyagoknak friss mintáknak kell lenniük, rögzítve, feldolgozva és a lehető leghamarabb beágyazva, ugyanúgy, mint a betegminta(ka)t. A pozitív szövetkontroll a megfelelően előkészített szöveteket és a megfelelő festési technikákat jelzi. Minden egyes vizsgálati körülményhez egy pozitív külső szövetkontrollt kell bevonnival minden festési futtatásba.

A külső pozitív kontrollanyagokhoz használt szöveteket olyan betegmintákból kell kiválasztani, amelyekben a pozitív célaktivitás jól jellemezhető alacsony szintje, ami gyenge pozitív festést eredményez. A külső pozitív kontrollok alacsony pozitívítási szintjét úgy tervezték, hogy biztosítsa az elsődleges antitest-érzékenységben az instabilitásból vagy az IHC-módszerrel kapcsolatos problémákból eredő finom változásokat. A kereskedelemben kapható szövetkontroll tárgylemezek vagy a páciens mintáitól eltérően feldolgozott minták csak a reagens teljesítményét érvényesítik, és nem igazolják a szövet előkészítését.

Az ismert pozitív szövetkontrollokat csak a feldolgozott szövetek és tesztreagens megfelelő teljesítményének ellenőrzésére szabad használni, nem pedig a betegminták specifikus diagnózisának felállításához. Ha a pozitív szövetkontroll nem mutat pozitív festődést, a vizsgálati minták eredményeit érvénytelennek kell tekinteni.

Negatív szövetek kontrollja:

Használjon negatív szöveti kontrollt (ismerten PRAME negatív), amely a beteg mintáival azonos módon van rögzítve, feldolgozva és beágyazva minden festési futtatáskor, hogy ellenőrizze az IHC elsődleges antitest specifikitását a célantigén kimutatása, valamint a specifikus háttérfestődés jelzése (téves pozitív festés). Ezenkívül a legtöbb szövetmetszetben jelenlévő különféle sejttípusok sokfélesége képes a laboratórium belső negatív kontrollhelyként használni az IHC teljesítményének ellenőrzésére specifikációk. A negatív szövetekhez használható minták típusai és forrásai A vezérlőelemek a Teljesítményjellemzők részben található.

Ha specifikus festődés (álpozitív festődés) fordul elő a negatív szövetkontrollban, a betegminták eredményeit érvénytelennek kell tekinteni.

Nem specifikus negatív reagens kontroll:

Használjon nem specifikus negatív reagens kontrollt az elsődleges antitest helyett minden egyes betegminta egy metszetével, hogy értékelje a nem specifikus festődést és lehetővé teszi a specifikus festődés jobb értelmezését az antigén helyén. Ideális esetben a negatív reagens kontroll egy PRAME IgG antitestet tartalmaz, amelyet a szövettanész felülűsójából állítanak elő, ugyanúgy, mint az elsődleges ellenanyag, de nem mutat specifikus reaktivitást emberi szövetekkel ugyanabban a mátrixban/oldatban, mint a Biocare antitest. Hígítsa a negatív kontroll antitestet ugyanarra az immunglobulin- vagy fehérjekoncentrációra, mint a hígított primer antitest antitestet azonos antitestben, a hígított fehérjekoncentrációval egyenértékű borjúmagzatszérum primer antitest ugyanabban a hígítószerben is használható. (Lásd a mellékelt reagenst). A korábban leírt negatív reagens kontrollok kevésbé kívánatos alternatívájaként a hígító önmagában is használható. A negatív reagens kontroll inkubációs időszakának meg kell egyeznie az elsődleges antitest inkubációs időszakával.

Ha több antitestből álló paneleket használnak a sorozatmetszeteken, akkor az egyik tárgylemez negatívan festő területei negatív/nem specifikus kötődési háttérkontrollként szolgálhatnak más antitestekhez. Az endogén enzimaktivitás vagy az enzimek nem specifikus kötődésének megkülönböztetésére a specifikus immunreaktivitástól további betegszövetek festhetők kizárólag szubsztrát-kromogén vagy enzimkomplexekkel (PAP, avidin-biotin, streptavidin), illetve szubsztrát-kromogénnel.

A vizsgálat ellenőrzése:

Az antitest vagy festőrendszer diagnosztikai eljárásban történő első használata előtt a felhasználónak ellenőriznie kell az antitest specifikitását úgy, hogy egy sor házon belüli szöveten teszteli, amelyek ismert immunhisztokémiai teljesítményjellemzői ismertek, és amelyek ismert pozitív és negatív szöveteket képviselnek. Tekintse meg a termékismertető e szakaszában korábban felvázolt minőség-ellenőrzési eljárásokat, valamint a CAP Immunhisztokémiai Tanúsítási Program⁹ minőség-ellenőrzési ajánlásait és/vagy az NCCLS IHC irányelvét¹⁰). Ezeket a minőség-ellenőrzési eljárásokat meg kell ismételni minden új antitest-tételnél, vagy amikor a vizsgálati paraméterek megváltoznak. A Teljesítményjellemzők részben felsorolt szövetek alkalmasak a teszt ellenőrzésére.

Hibaelhárítás:

Kövesse az antitestspecifikus protokoll ajánlásait a mellékelt adatlap szerint. Ha atipikus eredményeket észlel, forduljon a Biocare műszaki támogatásához az 1-800-542-2002 telefonszámon.

A festés értelmezése:

Pozitív szövetkontroll:

A jelzett antitesttel megfestett pozitív szöveti kontrollt először meg kell vizsgálni, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy minden reagens megfelelően működik. A célsejtek megfelelő festése (amint azt fentebb jeleztük) pozitív reaktivitást jelez. Ha a pozitív szöveti kontrollok nem mutatnak pozitív festést, a vizsgálati minták minden eredményét érvénytelennek kell tekinteni.

A reakciótermék színe az alkalmazott szubsztrát kromogénektől függően változhat. A várható színreakciókért lásd az aljzat csomagolását. Ezenkívül a festési módszer változataiban metakromázia figyelhető meg.¹¹ Ha ellenfestést használunk, az alkalmazott ellenfestés inkubációs hosszától és hatósságától függően az ellenfestés a sejtmagok elszíneződését eredményezi. A túlzott vagy hiányos ellenfestés veszélyeztetheti az eredmények megfelelő értelmezését. Az ajánlott ellenfestéshez lásd a protokoll(oka)t.

Negatív szövetek kontrollja:

A negatív szöveti kontrollt a pozitív szöveti kontroll után meg kell vizsgálni, hogy ellenőrizzük a célantigén elsődleges antitest általi jelölésének specifikitását. A specifikus festődés hiánya a negatív szöveti kontrollban megerősíti az antitest sejtekkel/sejtkomponensekkel szembeni keresztreaktivitásának hiányát. Ha specifikus festődés (álpozitív festődés) fordul elő a negatív külső szövetkontrollban, a betegminta eredményeit érvénytelennek kell tekinteni.

A nem specifikus festődés, ha van, általában diffúz megjelenésű. A túlzottan formalinban rögzített szövetekből származó metszeteken a kötőszövet szórványos festődése is megfigyelhető. Használjon ép sejteket a festési eredmények értelmezéséhez. A nekrotikus vagy degenerált sejtek gyakran nem specifikusan festődnek.

Betegszövet:

Vizsgálja meg a jelzett antitesttel megfestett betegmintákat utolsón. A pozitív festődés intenzitását a negatív reagens kontroll bármely nem specifikus háttérfestésével összefüggésben kell értékelni. Mint minden immunhisztokémiai tesztnél, a negatív eredmény azt jelenti, hogy az antigén nem volt kimutatható, nem pedig azt, hogy az antigén hiányzik a vizsgált sejtekben/szövetekben. Ha szükséges, használja az antitestek paneljét az álnegatív reakciók azonosításához.



60 Berry Drive
Pacheco, CA 94553
USA

95/190



TP v3 (12/15/2021)

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080



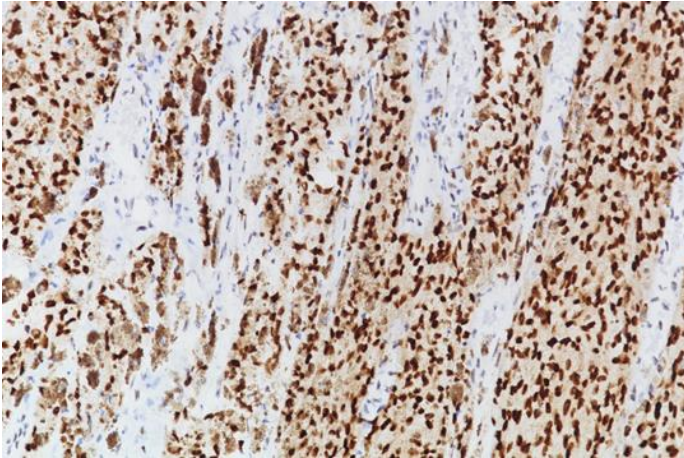
Westervoortsedijk 60
8627 AT Arnhem
The Netherlands

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Hungarian

BIOCARE
M E D I C A L



PRAME [EPR20330] antitesttel festett melanoma.

Tekintse meg az Összefoglalás és magyarázat, a Korlátozások és a Teljesítmény jellemzői című részt a jelzett antitest immunreaktivással kapcsolatos konkrét információkért.

Korlátozások:

Általános korlátozások:

1. *In vitro* diagnosztikai használatra
2. Ez a termék kizárólag professzionális használatra készült: Az immunhisztokémia egy többlépcsős diagnosztikai folyamat, amely a megfelelő reagensek kiválasztására vonatkozó speciális képzésből áll; szövetek kiválasztása, rögzítése és feldolgozása; az IHC tárgylemez elkészítése; és a festési eredmények értelmezése.
3. A szövetszövet festés a szövet festés előtti kezelésétől és feldolgozásától függ. A nem megfelelő rögzítés, fagyasztás, felolvasztás, mosás, szárítás, melegítés, metszés vagy más szövetekkel vagy folyadékokkal való szennyeződés műtermékeket, antitest-befogást vagy hamis negatív eredményeket eredményezhet. Az ellentmondásos eredmények oka lehet a rögzítési és beágyazási módszerek eltérése, vagy a szöveten belüli inherens szabálytalanságok.¹²
4. A túlzott vagy hiányos ellenfestés veszélyeztetheti az eredmények megfelelő értelmezését.
5. Bármely pozitív vagy negatív festődés klinikai értelmezését a klinikai megjelenés, a morfológia és egyéb kórszöveteti kritériumok összefüggésében kell értékelni. A pozitív vagy negatív festődés klinikai értelmezését megfelelő pozitív és negatív belső és külső kontrollokat, valamint egyéb diagnosztikai tesztek alkalmazó morfológiai vizsgálatokkal kell kiegészíteni. Az IHC antitestek, reagensek és módszerek megfelelő használatát ismerő, szakképzett patológus feladata, hogy értelmezze a végső IHC-készítmény elkészítéséhez és értelmezéséhez használt összes lépést.
6. Egy adott alkalmazáshoz az optimális antitesthígítás és protokollok változhatnak. Ezek közé tartozik többek között a rögzítés, a hóvísszanyerési módszer, az inkubációs idők, a szövetmetszet vastagsága és a használt kimutatási készlet. Ezen egyedi reagensek kiváló érzékenysége miatt a felsorolt ajánlott inkubációs idők és titerek nem alkalmazhatók más kimutatási rendszerekre, mivel az eredmények eltérőek lehetnek. Az adatlap ajánlásai és protokolljai a Biocare termékek kizárólagos felhasználásán alapulnak. Végső soron a vizsgáló feladata az optimális feltételek meghatározása.
7. Ezt a terméket nem áramlási citometriában való használatra tervezték. Az áramlási citometria teljesítményjellemzőit nem határozták meg.
8. A hepatitis B vírussal fertőzött és hepatitis B felületi antigént (HBsAg) tartalmazó személyek szövetei torma-peroxidázzal nem specifikus festődést mutathatnak.¹³

9. A reagensek váratlan reakciókat mutathatnak korábban nem tesztelt szövetekben. A nem várt reakciók lehetősége még a vizsgált szövetcsoportokban sem zárható ki teljesen az antigénexpresszió biológiai variabilitása miatt daganatokban vagy más patológiás szövetekben.¹⁴ Forduljon a Biocare műszaki ügyfélszolgálatához az 1-800-542-2002 telefonszámon vagy a biocare.net oldalon található műszaki támogatási információkon keresztül dokumentált váratlan reakciókkal.
10. A blokkoló lépésekben használt másodlagos antiszérumokkal azonos állati forrásból származó normál/nem immunszérum álnegatív vagy álpozitív eredményeket okozhat az autoantitestek vagy természetes antitestek miatt.
11. A fehérjék vagy szubsztrát reakciótermékek nem immunológiai kötődése miatt álpozitív eredményeket lehet látni. A pszeudo-peroxidáz aktivitás (eritrociták), az endogén peroxidáz aktivitás (citokrom C) vagy az endogén biotin (pl. máj, emlő, agy, vese) is okozhatja a használt immunfestés típusától függően.¹²

Termékspecifikus korlátozások:

Nincsenek további termékspecifikus korlátozások.

Teljesítmény jellemzők:

Reprodukálhatóság:

a kiválasztott normál és daganatos szövetek különböző napokon és különböző műszerekkel végzett tesztelésével igazoltuk több kezelővel. A kiválasztott szövetek festése konzisztens volt, és a várt módon történt.

Immunreaktivitás:

A következő pozitív és negatív immunreaktivásokat mutatjuk be az alábbi 1. és 2. táblázatban.

Az alábbi lista nem teljes, de jellemzi a jelzett antitesttel megfigyelt immunreaktivitás típusait.

Ebben a termékben nem figyeltek meg ismert nem specifikus antitest-reaktivitást.

A várt eredmények összefoglalása:

A PRAME prevalenciáját normál és kóros állapotú szövetekben Tissue Microarrays (TMA) segítségével értékelték.

A vizsgált normál szövetek a vártan megfelelően festettek, a herében magas festődést figyeltek meg, más szövetekben pedig nem. A PRAME festődését a vártan megfelelően magas szinten figyelték meg a melanomában, és eltérő mértékben más rákos szövetekben, például petefészekben, tüdőben, prosztatában és emlőben.

Analitikai teljesítmény:

Az érzékenységi és specifikációs festési tesztek elvégezték, és az eredményeket az alábbiakban soroljuk fel.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Hungarian

BIOCARE
M E D I C A L

Érzékenység és specifitás:

1. táblázat: Az antitest szenzitivitását és specifitását FFPE normál szövetek tesztelésével határoztuk meg.

Szövet	Pozitív esetek	Összes eset
Nagyagy	0	6
Kisagy	0	3
Mellékvese	0	3
Petefészek	0	3
Hasnyálmirigy	0	3
Légcső	0	3
Agyalapi	0	3
Herék*	3	3
Pajzsmirigy	0	3
Mell	0	3
Lép	0	3
Mandula	0	3
Thymus	0	3
Csontvelő**	0	1
Tüdő	0	3
Szív	0	3
Nyelőcső	0	3
Gyomor	0	3
Vékonybél	0	3
Kettőspont	0	3
Máj	0	3
Nyálmirigy	0	3
Vese	0	3
Prostata	0	3
Méh	0	3
Méhnyak	0	3
Vázizom	0	3
Bőr	0	3
Perifériás ideg	0	3
Béléssejtek	0	3
Fej, nyak és nyálmirigy	0	6
Nyirokcsomó	0	3

* 3-4 erősségű nukleáris festés

** Két minta hiányzik

2. táblázat: Az antitest szenzitivitását és specifitását különféle FFPE neoplasztikus szövetek tesztelésével határoztuk meg.

Patológia	Pozitív esetek	Összes eset
Melanóma	29	39
Petefészekrák	9	44
Mellrák	10	26
Vastagbél rák	4	43
Tüdőrák	21	50
Prostata rák	18	41
Mellékvesekéreg karcinóma	0	1
Húgyhólyagrák	0	2
Meningioma	0	2
Asztrocitóma	0	1
Laphámsejtes karcinóma (nyelőcső)	0	2
Adenokarcinóma (gyomor)	0	2
Adenokarcinóma (vékonybél)	0	1
Adenokarcinóma (vastag- és végbél)	0	6
Veserák	0	2
Májrák	0	4
Limfóma	0	3
Laphámrák (fej-nyak, szájüreg, nyelv)	0	1
Nasopharyngealis karcinóma	1	1
Adenokarcinóma (hasnyálmirigy)	0	1
Adenokarcinóma (prostata)	0	2
Adenoid cisztás karcinóma (fej és nyak, nyálmirigy)	0	1
Laphámsejtes karcinóma (bőr)	0	1
Seminoma	0	2
Pajzsmirigy rák	0	2
Méhnyakrák	0	2
Endometrium rák	1	2

A PRAME expressziója különböző neoplazmákban változó százalékos tumorpozitivitást mutathat. Tekintse meg a 3. táblázatot a 2. táblázatban található különböző daganatokban megfigyelt pozitív festődésű tumorsejtek százalékos arányához (kvartilisek szerint).

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Hungarian

BIOCARE
M E D I C A L

3. táblázat: Pozitív tumorsejtek százalékos festődése különböző FFPE neoplazmákban.

Szövetek	A festődést mutató daganatsejtek százalékos aránya az összes esethez viszonyítva (%)				
	<1%	1-25%	26-50%	51-75%	> 75%
Petefészekrák	35/44 (79,5%)	2/44 (4,5%)	3/44 (6,8%)	3/44 (6,8%)	1/44 (2,3%)
Mellrák	16/26 (61,5%)	7/26 (26,9%)	1/26 (3,8%)	2/26 (7,7%)	0 (0%)
Vastagbél rák	39/43 (88,4%)	4/43 (11,6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Tüdőrák	29/50 (58,0%)	7/50 (14,0%)	4/50 (8,0%)	7/50 (14,0%)	3/50 (6,0%)
Prostata rák	23/41 (56,1%)	9/41 (22,0%)	3/41 (7,3%)	2/41 (4,9%)	4/41 (9,8%)
Nasopharyngealis karcinóma	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1/1 (100%)
Endometrium rák	1/2 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	1/2 (50%)	0 (0%)
Melanóma	10/39 (25,6%)	6/39 (15,4%)	5/39 (12,8%)	6/39 (15,4%)	12/39 (30,8%)

A tumorsejtek százalékos festődése minden festési intenzitás esetén.
A PRAME fehérje expressziójának különböző szintjét mutató szövetek festése.

Az analitikai teljesítményteszt eredményei azt mutatták, hogy a PRAME [EPR20330] antitest megfelelően képes kimutatni a PRAME fehérjét, ha a meghatározott IHC protokollt használja. A kóros szövetvizsgálati eredmények alátámasztják azt a következtetést, hogy a PRAME [EPR20330] érzékeny a PRAME fehérjére, ha az ajánlott IHC protokollokat használják. A PRAME [EPR20330] antitest képes kimutatni a PRAME fehérje alacsony vagy magas szintjét. A normál szövetvizsgálat nem mutatott váratlan PRAME kimutatást 32 szövettípuson keresztül. Nem volt váratlan keresztreakció. Az eredmények alátámasztják azt az állítást, hogy a PRAME [EPR20330] antitest nagyon specifikus (analitikai specifikus) a PRAME fehérjére.

Klinikai teljesítmény:

A diagnosztikai szenzitivitásra és specifikusra vonatkozó festési tesztek végeztek, és az eredményeket az alábbiakban soroljuk fel. A pozitív és negatív immunreaktivitást a 4. táblázat tartalmazza.

Három melanoma TMA tárgylemez megfestettek a Biocare-ben, és elküldték egy külső patológusnak, hogy leolvassák és osztályozzák. A melanóma szövetekben a festési pontszámok változatossága 0-tól (negatív) az erősig (4) terjedt. A legtöbb melanocita nevi nem mutatott PRAME reaktivitást, de néhányuk erős reaktivitást mutatott.

4. táblázat: Pozitív tumorsejtek százalékos festődése különböző FFPE melanocita neoplazmákban és bőrben.

Szövetek	A festődést mutató daganatsejtek százalékos aránya az összes esethez viszonyítva (%)				
	<1%	1-25%	26-50%	51-75%	> 75%
Melanóma	28/133 (21,1%)	50/133 (37,6%)	10/133 (7,5%)	8/133 (6,0%)	37/133 (27,8%)
Áttétes melanoma	7/38 (18,4%)	10/38 (26,3%)	3/38 (7,9%)	2/38 (5,3%)	16/38 (42,1%)
Melanocitikus nevi	14/12 (85,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2/12 (14,3%)
Bőr	10/10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

A tumorsejtek százalékos festődése minden festési intenzitás esetén.
A PRAME fehérje expressziójának különböző szintjét mutató szövetek festése.

A teszt elsődleges végpontja a PRAME [EPR20330] antitest diagnosztikai érzékenységének értékelése volt az IHC eljárásban, amelyet a megerősített pozitív minták pozitív melanoma kimutatási arányaként határoztak meg. [TP/(TP+FN)]

Másodlagos végpont a diagnosztikai specifikus értékelése volt – a negatív kimutatási arány a megerősített melanoma negatív minták esetében. [TN/(TN+FP)]

35 álnegatív melanómás eset volt, amelyek melanomaként kapták meg az arany standard patológiai értékelést, de PRAME-ra negatívak voltak. 136 eset volt valóban pozitív, mivel melanómát diagnosztizáltak náluk, és jelet mutattak a PRAME-ra. Két hamis pozitív eredményt észleltünk a 14 jóindulatúnak diagnosztizált melanocita nevi mintában, amelyek PRAME jelet mutattak.

Az adatokból a becsült diagnosztikai érzékenység = $136 / (136 + 35) = 79,5\%$
Az adatokból a becsült diagnosztikai specifikus = $22 / (22 + 2) = 91,7\%$

Számításaink alapján 79,5%-os becsült diagnosztikai szenzitivitáshoz és 91,7%-os becsült diagnosztikus specifikitáshoz jutunk a melanoma kimutatására.

a Biocare tesztelt melanoma és melanocita nevi mintákon, érzékeny a melanómára és nagyon specifikus a melanómára.

Hibaelhárítás: (Az alábbi pontok mindegyikéhez adjon magyarázatot)

1. A tárgylemezek nem festődnek – Ellenőrizze, hogy megfelelő pozitív kontrollszövetet, antitestet és kimutatási termékeket használt-e.
2. Az összes tárgylemez gyengén festődött – Ellenőrizze, hogy megfelelő pozitív kontrollszövetet, antitestet és kimutatási termékeket használt-e.
3. Az összes tárgylemez túlzott háttere – Magas szintű endogén biotin (biotin alapú kimutatási termékek használata esetén), endogén HRP aktivitás, amely a kromogént színes végtermékké alakítja (használgon peroxidáz blokkot), vagy túl sok nem specifikus fehérje kölcsönhatás (fehérje használata) blokkoló, például szérum- vagy kazein alapú blokkoló oldat).
4. A szövetmetszetek lemosták a tárgylemezeket az inkubáció során – Ellenőrizze a lemezeket, hogy megbizonyosodjon arról, hogy pozitív töltésűek.
5. A specifikus festés túl sötét – Ellenőrizze a protokollt, hogy megállapítsa, megfelelő antitestitert alkalmaztak-e a tárgylemezen, valamint az összes reagens megfelelő inkubációs idejét. Ezenkívül győződjön meg arról, hogy a protokoll elegendő mosási lépést tartalmaz

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Hungarian

BIOCARE
M E D I C A L

a felesleges reagensek eltávolításához az inkubációs lépések befejezése után.

Referenciák:

1. Kiernan JA. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. *Theory and Practice of Histotechnology*. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. *Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule*, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. *J Histotechnol*. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. *Biotech Histochem*. 1996 Jan;71(5):263-70.
6. Center for Disease Control Manual. *Guide: Safety Management*, NO. CDC-22, Atlanta, GA. April 30, 1976 "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts."
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition* CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
8. CLSI *Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2)* CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011
9. College of American Pathologists (CAP) *Certification Program for Immunohistochemistry*. Northfield IL. [Http://www.cap.org](http://www.cap.org) (800) 323-4040.
10. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. *Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline*. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
11. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. *Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques*. *Histochemistry* 1987; 86:471-478.
12. Nadji M, Morales AR. *Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls*. *Lab Med*1983;14:767.
13. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. *Nonimmunologic binding of horseradishperoxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry*. *Am J Clin Path* 1980;73:626.
14. Herman GE and Elfont EA. *The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control*. *Biotech & Histochem* 1991;66:194.
15. Zhang W, *et al*. PRAME expression and promoter hypermethylation in epithelial ovarian cancer. *Oncotarget*, 2016 Jul; 7(29):45352-69.
16. Lezcano C, *et al*. PRAME expression in melanocytic tumors. *Am J Surg Pathol*. 2018 Nov; 42(11):1456-65.

Az Ultraline antitesteket kizárólag a Biocare Medical LLC fejlesztte, és nem jelenti azt, hogy a Ventana Medical Systems, Inc. vagy a Roche jóváhagyta vagy jóváhagyta a Biocare antitesteket. A Biocare, a Ventana és a Roche semmilyen módon nem kapcsolódnak egymáshoz, nem kapcsolódnak egymáshoz. A Ventana®, a BenchMark®, az ultraView és az OptiView a Roche védjegyei.

a Biocare Medical LLC fejlesztette ki, és ezek nem jelentik a Biocare antitestek Leica Biosystems általi jóváhagyását vagy jóváhagyását. A Biocare és a Leica Biosystems semmilyen módon nem kapcsolódnak egymáshoz, nem kapcsolódnak egymáshoz. A Leica, Leica Biosystems, BOND-MAX és BOND-III a Leica Biosystems védjegyei.

A biztonság és a teljesítmény összefoglalója itt található: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Italian

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats				
Format	Catalog Number	Description	Dilution	Diluent
Concentrate	ACI 3252 A, B	0.1, 0.5 mL	1:100	Van Gogh Yellow
Predilute	API 3252 AA, G20, H	6.0, 20, 25 mL	Ready-to-use	N/A
ONCORE Pro	OPAI 3252 T60	60 tests	Ready-to-use	N/A
Q Series-- For Leica BOND-III	ALI 3252 G7	7.0 mL	Ready-to-use	N/A
UltraLine -- For BenchMark	AVI 3252 G, G25	6.0, 25 mL	Ready-to-use	N/A

Destinazione d'uso:

Per uso diagnostico *in vitro*

PRAME [EPR20330] è un anticorpo monoclonale di coniglio destinato all'uso in laboratorio dopo che la diagnosi iniziale di tumore è stata effettuata mediante istopatologia convenzionale utilizzando colorazioni istochimiche non immunologiche, nell'identificazione qualitativa della proteina PRAME mediante immunistochemica (IHC) in paraffina fissata in formalina tessuti umani incorporati (FFPE). L'interpretazione clinica di qualsiasi colorazione o della sua assenza deve essere integrata da studi morfologici utilizzando controlli adeguati e deve essere valutata nel contesto dell'anamnesi clinica del paziente e di altri test diagnostici da un patologo qualificato come ausilio nell'effettuare qualsiasi altra determinazione clinica.

Riepilogo e spiegazione:

PRAME si trova sul cromosoma 22q11.22 e codifica per una proteina di 509 aminoacidi. PRAME è un gene autosomico dell'antigene del cancro-testicolo (CTA) che ha dimostrato di essere espresso nel melanoma, in varie neoplasie maligne non melanocitiche, incluso il cancro del polmone non a piccole cellule, il carcinoma mammario, il carcinoma ovarico e molti altri citati. Non è noto che i tessuti normali sani esprimano il PRAME ad eccezione dei testicoli, delle ovaie, delle ghiandole surrenali e di alcuni altri citati in letteratura. ^(15,16)

Principio della procedura:

Questo prodotto anticorpale può essere utilizzato come anticorpo primario nei test immunistochemici di sezioni di tessuto fissate in formalina e incluse in paraffina. In generale, immunistochemica (IHC) le tecniche di colorazione consentono la visualizzazione degli antigeni tramite l'applicazione sequenziale di a un anticorpo specifico verso l'antigene (anticorpo primario), un anticorpo secondario verso l'anticorpo primario (collegamento opzionale anticorpo/sonda), un complesso enzimatico ed un substrato cromogenico con interposte fasi di lavaggio. L'attivazione enzimatica del cromogeno determina un prodotto di reazione visibile nel sito dell'antigene. Il campione può quindi essere sottoposto a controcolorazione e coperto con vetrino. I risultati vengono interpretati utilizzando una luce microscopio e aiuto nella diagnosi differenziale dei processi patofisiologici, che possono o potrebbe non essere associato a un particolare antigene.

Materiali e metodi:

Reagenti forniti:

Origine ospite: coniglio monoclonale

Reattività della specie: umana. Altre specie non testate.

Clone: EPR20330

Isotipo: IgG

Concentrazione di proteine: Concentrazione di IgG specifiche: contattare il supporto tecnico di Biocare

Specificità: PRAME

Localizzazione cellulare: Nucleo e membrana cellulare

Metodo: monoclonale di coniglio ricombinante purificato per affinità.

Ricostituzione, miscelazione, diluizione, titolazione:

Il reagente anticorpale prediluito è diluito in modo ottimale per l'uso con i sistemi di colorazione sopra elencati. Un'ulteriore diluizione può comportare la perdita della colorazione dell'antigene. L'utente deve convalidare qualsiasi modifica di questo tipo. Le differenze nella lavorazione dei tessuti e nelle

procedure tecniche nel laboratorio dell'utente possono produrre una variabilità significativa nei risultati che richiedono l'esecuzione regolare di controlli interni (vedere la sezione Controllo qualità).

Il reagente concentrato richiede la diluizione come indicato nella tabella sopra.

Applicazioni conosciute:

Immunistochemica (tessuti inclusi in paraffina fissati in formalina)

Fornito come: soluzione salina tamponata, pH 5,9-7,9 contenente un trasportatore proteico e meno dello 0,1% di conservante azoturo di sodio. Consultare la scheda di sicurezza per ulteriori dettagli.

Materiali e reagenti necessari ma non forniti:

Vetrini del microscopio caricati positivamente.
Controlli tissutali positivi e negativi
Camera del deserto (o forno di essiccazione simile)
Xilene o sostituto dello xilene
Etanolo o alcool reagente
Camera di disoccultamento (pentola a pressione)
Acqua deionizzata o distillata
Tampone di lavaggio
Reagenti di pretrattamento
Blocco della perossidasi
Blocco proteico (opzionale)
Sonda di rilevamento e polimerio
Reagenti di controllo negativo
Cromogeni
Ematossilina (colorazione di contrasto)
Reagente azzurrante
Mezzo di montaggio
Vetro di copertura
Microscopio ottico (ingrandimento 40-400X)

Le configurazioni del prodotto anticorpale sono disponibili per l'uso sugli strumenti indicati nella tabella sopra.

Conservazione e stabilità:

Conservare a una temperatura compresa tra 2°C e 8°C. Il prodotto è stabile fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta del flacone, se conservato in queste condizioni. Non utilizzare dopo la data di scadenza. È necessario verificare la conservazione in condizioni diverse da quelle specificate. I reagenti diluiti devono essere utilizzati tempestivamente; conservare l'eventuale reagente rimanente a una temperatura compresa tra 2°C e 8°C. La stabilità del reagente diluito dall'utente non è stata stabilita da Biocare.

I controlli positivi e negativi devono essere analizzati contemporaneamente con tutti i campioni dei pazienti. Se si osserva una colorazione inaspettata che non può essere spiegata da variazioni nelle procedure di laboratorio e si sospetta un problema con l'anticorpo, contattare il supporto tecnico di Biocare al numero 1-800-542-2002 o tramite le informazioni del supporto tecnico fornite su biocare.net.



60 Berry Drive
Pacheco, CA 94553
USA

100/190



TP v3 (12/15/2021)

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080



Westervoortsedijk 60
6827 AT Arnhem
The Netherlands

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Italian

Preparazione del campione:

I tessuti fissati in formalina sono adatti per l'uso prima dell'inclusione in paraffina. I tessuti ossei devono essere decalcificati prima della lavorazione dei tessuti per facilitare il taglio dei tessuti e prevenire danni alle lame del microtomo. ^{1, 2}

I tessuti adeguatamente fissati e incorporati che esprimono il target antigenico specificato devono essere conservati in un luogo fresco. Il Clinical Laboratory Improvement Act (CLIA) del 1988 richiede nel 42 CFR § 493.1259(b) che "Il laboratorio deve conservare i vetrini colorati per almeno dieci anni dalla data di esame e conservare i blocchi campione per almeno due anni dalla data dell'esame." ³

Trattamento dei tessuti prima della colorazione:

Eseguire il recupero degli epitopi indotti dal calore (HIER) secondo il protocollo consigliato di seguito. È stato dimostrato che l'uso di routine di HIER prima dell'IHC riduce al minimo l'incoerenza e standardizza la colorazione. ^{4,5}

Avvertenze e precauzioni:

- Questo anticorpo contiene meno dello 0,1% di sodio azide. Concentrazioni inferiori allo 0,1% non sono materiali pericolosi segnalabili secondo US 29 CFR 1910.1200, OSHA Hazard Communication e Direttiva CE 91/155/CE. La sodio azide (NaN₃) utilizzata come conservante è tossica se ingerita. La sodio azide può reagire con le tubature in piombo e rame formando azidi metalliche altamente esplosive. Al momento dello smaltimento, sciacquare con grandi quantità di acqua per prevenire l'accumulo di azide nelle tubature. (Centro per il controllo delle malattie, 1976, Istituto nazionale per la sicurezza e la salute sul lavoro, 1976) ⁶
- I campioni, prima e dopo la fissazione, e tutti i materiali ad essi esposti devono essere maneggiati come se fossero in grado di trasmettere infezioni e smaltiti con le dovute precauzioni. Non pipettare mai i reagenti con la bocca ed evitare il contatto con la pelle e le mucose con reagenti e campioni. Se i reagenti o i campioni entrano in contatto con aree sensibili, lavare con abbondante acqua. ⁷
- La contaminazione microbica dei reagenti può comportare un aumento della colorazione aspecifica.
- Tempi o temperature di incubazione diversi da quelli specificati potrebbero dare risultati errati. L'utente deve convalidare qualsiasi modifica di questo tipo.
- Non utilizzare il reagente dopo la data di scadenza stampata sulla fiala.
- Il reagente anticorpale prediluito è diluito in modo ottimale per l'uso. Un'ulteriore diluizione può comportare la perdita della colorazione dell'antigene.
- La diluizione del reagente anticorpale concentrato deve essere convalidata prima dell'uso. Qualunque anche il diluente utilizzato che non è specificamente raccomandato deve essere convalidato per compatibilità e stabilità.
- Smaltire tutti i reagenti usati e qualsiasi altro materiale monouso contaminato seguendo le procedure per i rifiuti infetti o potenzialmente infetti. È responsabilità di ciascun laboratorio gestire i rifiuti solidi e liquidi in base alla loro natura e al grado di pericolosità e trattarli e smaltirli (o farli trattare e smaltire) in conformità con le normative applicabili.
- Seguire le normative locali sullo smaltimento della propria posizione insieme alle raccomandazioni nella Scheda dati di sicurezza per determinare lo smaltimento sicuro di questo prodotto
- La SDS è disponibile su richiesta e si trova all'indirizzo <http://biocare.net>.
- Per segnalare sospetti incidenti gravi legati a questo dispositivo, contattare il rappresentante Biocare locale e l'autorità competente dello Stato membro o del Paese in cui è stabilito l'utente.

Istruzioni per l'uso:

Protocolli di colorazione consigliati per PRAME [EPR20330]:

BIOCARE
M E D I C A L

IntelliPATH FLX and manual use:

API3252 per IntelliPATH FLX e uso manuale, è stato standardizzato con il sistema di rilevamento MACH 4. Utilizzare TBS per le fasi di lavaggio.	
Peroxide Block:	Bloccare per 5 minuti con Peroxidated 1.
Pretreatment:	Esegui il recupero del calore utilizzando Borg Decloaker. Fare riferimento alla scheda tecnica di Borg Decloaker per istruzioni specifiche.
Protein Block (Optional):	Incubare per 5-10 minuti a temperatura ambiente con Background Punisher.
Primary Antibody:	Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.
Detection:	Sonda: N/D Polimero: incubare per 30 minuti a temperatura ambiente con un polimero coniugato secondario.
Chromogen:	Incubare per 5 minuti a temperatura ambiente con DAB di Biocare – OPPURE – Incubare per 5-7 minuti a temperatura ambiente con Warp Red.
Counterstain	Controcolorare con ematossilina. Sciacquare con acqua deionizzata. Applicare la soluzione azzurrante di Tacha per 1 minuto. Sciacquare con acqua deionizzata.

ONCORE Pro Automated Slide Staining System:

OPAI3252 è destinato all'uso con ONCORE Pro. Fare riferimento al Manuale dell'utente per istruzioni specifiche sull'uso. I parametri del protocollo nell'editor del protocollo devono essere programmati come segue:		
Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	PRAME Rb	PRAME Rb AP
Protocol Template (Description):	Special Template (ONCORE Pro-Tect Detection Required)	Rb AP Template 1
Dewaxing (DS Buffer Option):	DS2-50	DS Buffer
Antigen Retrieval (AR Option):	AR1, high pH; 103°C	AR1, high pH; 103°C
Block Option:	Buffer	Buffer
Reagent Name, Time, Temp.:	PRAME Rb, 45 min., 25°C	PRAME Rb, 30 min., 25°C

Ventana BenchMark ULTRA:

AVI3252 è destinato all'uso con BenchMark ULTRA. Fare riferimento al Manuale dell'utente per istruzioni specifiche sull'uso. I parametri del protocollo consigliati sono i seguenti:	
Template/Detection:	OptiView DAB IHC
Pretreatment Protocol:	CC1 64 minutes
Peroxidase:	Pre-Primary Peroxidase Inhibitor
Primary Antibody:	32 minutes, 36°C

Serie Q – Per Leica BOND-III:

ALI3252 è destinato all'uso con Leica BOND-III. Fare riferimento al Manuale dell'utente per istruzioni specifiche sull'uso. I parametri del protocollo consigliati sono i seguenti:		
Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	IHC Protocol F	IHC Protocol J
Detection:	Bond Polymer Refine	Bond Polymer Refine Red
HIER:	20 min with ER2	20 min with ER2

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Italian

BIOCARE
M E D I C A L

Peroxide Block:	5 min	
Marker (Primary Antibody):	15 min	15 min
Post Primary:	8 min	
Polymer:	8 min	
Post Primary AP:		20 min
Polymer AP:		30 min
Mixed Chromogen Refine:	10 min	10 min + 5 min
Hematoxylin:	5 min	5 min

Controllo di qualità:

Fare riferimento agli standard di qualità CLSI per la progettazione e l'implementazione dei test immunostochimici; Linea guida approvata - Seconda edizione (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 20118 -

Controllo positivo del tessuto: Melanoma, testicolo normale

I materiali di controllo positivo esterno devono essere campioni freschi fissati, processati e incorporati il più presto possibile nello stesso modo dei campioni dei pazienti. I controlli positivi dei tessuti sono indicativi di tessuti preparati correttamente e di tecniche di colorazione adeguate. In ogni ciclo di colorazione deve essere incluso un controllo positivo del tessuto esterno per ciascuna serie di condizioni di test.

I tessuti utilizzati per i materiali di controllo positivo esterno devono essere selezionati da campioni di pazienti con bassi livelli ben caratterizzati dell'attività target positiva che dà una colorazione positiva debole. Il basso livello di positività per i controlli positivi esterni è progettato per garantire il rilevamento di sottili cambiamenti nella sensibilità dell'anticorpo primario dovuti a instabilità o problemi con la metodologia IHC. I vetrini di controllo dei tessuti disponibili in commercio o i campioni trattati in modo diverso dai campioni dei pazienti convalidano solo le prestazioni del reagente e non verificano la preparazione dei tessuti.

I controlli tissutali positivi noti devono essere utilizzati solo per monitorare la corretta prestazione dei tessuti trattati e dei reagenti del test, piuttosto che come ausilio nella formulazione di una diagnosi specifica dei campioni dei pazienti. Se i controlli positivi del tessuto non mostrano una colorazione positiva, i risultati con i campioni di test devono essere considerati non validi.

Controllo tissutale negativo:

Utilizzare un controllo tissutale negativo (noto per essere PRAME negativo) fissato, processato e incorporato in modo identico ai campioni del paziente con ogni ciclo di colorazione per verificare la specificità dell'anticorpo primario IHC per dimostrazione dell'antigene bersaglio e fornire un'indicazione della specifica colorazione di fondo (colorazione falsa positiva). Inoltre, la varietà di diversi tipi di cellule presenti nella maggior parte delle sezioni di tessuto può farlo essere utilizzati dal laboratorista come siti di controllo negativo interno per verificare le prestazioni dell'IHC specifiche. I tipi e le fonti dei campioni che possono essere utilizzati per il tessuto negativo i controlli sono elencati nella sezione Caratteristiche prestazionali.

Se si verifica una colorazione specifica (colorazione falsa positiva) nel controllo negativo del tessuto, i risultati con i campioni dei pazienti devono essere considerati non validi.

Controllo del reagente negativo non specifico:

Utilizzare un controllo reagente negativo non specifico al posto dell'anticorpo primario con una sezione di ciascun campione del paziente per valutare la colorazione non specifica e consentire una migliore interpretazione della colorazione specifica nel sito dell'antigene. Idealmente, un controllo del reagente negativo contiene un anticorpo IgG PRAME prodotto dal surnatante della coltura tissutale allo stesso modo del controllo primario anticorpo ma non mostra alcuna reattività specifica con i tessuti umani nella stessa matrice/soluzione dell'anticorpo Biocare. Diluire un anticorpo di controllo negativo alla stessa concentrazione

di immunoglobulina o proteina del primario diluito anticorpo utilizzando lo stesso diluente. Se il siero fetale di vitello viene trattenuto nell'anticorpo puro dopo la lavorazione, il siero fetale di vitello ad una concentrazione proteica equivalente all'anticorpo diluito è adatto all'uso anche l'anticorpo primario nello stesso diluente. (Fare riferimento al reagente fornito). Il diluente da solo può essere utilizzato come alternativa meno desiderabile ai controlli dei reagenti negativi precedentemente descritti. Il periodo di incubazione del controllo del reagente negativo deve corrispondere a quello dell'anticorpo primario.

Quando si utilizzano pannelli di diversi anticorpi su sezioni seriali, le aree a colorazione negativa di un vetrino possono fungere da controllo di fondo di legame negativo/non specifico per altri anticorpi. Per differenziare l'attività enzimatica endogena o il legame non specifico degli enzimi dall'immunoreattività specifica, ulteriori tessuti dei pazienti possono essere colorati esclusivamente rispettivamente con substrato-cromogeno o complessi enzimatici (PAP, avidina-biotina, streptavidina) e substrato-cromogeno.

Verifica del test:

Prima dell'uso iniziale di un anticorpo o di un sistema di colorazione in una procedura diagnostica, l'utente deve verificare la specificità dell'anticorpo testandolo su una serie di tessuti interni con caratteristiche di prestazione immunostochimica note che rappresentano tessuti positivi e negativi noti. Fare riferimento alle procedure di controllo qualità precedentemente delineate in questa sezione del foglietto illustrativo e alle raccomandazioni sul controllo qualità del Programma di certificazione CAP⁹ per immunostochimica e/o delle linee guida NCCLS IHC¹⁰). Queste procedure di controllo qualità devono essere ripetute per ogni nuovo lotto di anticorpi o ogni volta che si verifica una modifica nei parametri del test. I tessuti elencati nella sezione Caratteristiche prestazionali sono idonei per la verifica del test.

Risoluzione dei problemi:

Seguire le raccomandazioni del protocollo specifico per l'anticorpo secondo la scheda tecnica fornita. Se si verificano risultati atipici, contattare il supporto tecnico di Biocare al numero 1-800-542-2002.

Interpretazione della colorazione:

Controllo positivo del tessuto:

Il controllo positivo del tessuto colorato con l'anticorpo indicato deve essere esaminato innanzitutto per accertarsi che tutti i reagenti funzionino correttamente. La colorazione appropriata delle cellule bersaglio (come indicato sopra) è indicativa di reattività positiva. Se i controlli positivi del tessuto non mostrano una colorazione positiva, qualsiasi risultato con i campioni di test deve essere considerato non valido.

Il colore del prodotto di reazione può variare a seconda dei cromogeni del substrato utilizzati. Fare riferimento ai foglietti illustrativi del substrato per le reazioni cromatiche previste. Inoltre, la metacromasia può essere osservata in variazioni del metodo di colorazione.¹¹

Quando si utilizza una colorazione di contrasto, a seconda della durata di incubazione e della potenza della colorazione di contrasto utilizzata, la colorazione di contrasto risulterà in una colorazione dei nuclei cellulari. Una controcolorazione eccessiva o incompleta può compromettere la corretta interpretazione dei risultati. Fare riferimento ai protocolli per la colorazione di contrasto consigliata.

Controllo tissutale negativo :

Il controllo tissutale negativo deve essere esaminato dopo il controllo tissutale positivo per verificare la specificità della marcatura dell'antigene bersaglio da parte dell'anticorpo primario. L'assenza di colorazione specifica nel controllo negativo del tessuto conferma l'assenza di reattività crociata dell'anticorpo verso cellule/componenti cellulari. Se si verifica una colorazione specifica (colorazione falsa positiva) nel controllo negativo del tessuto esterno, i risultati con il campione del paziente devono essere considerati non validi.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

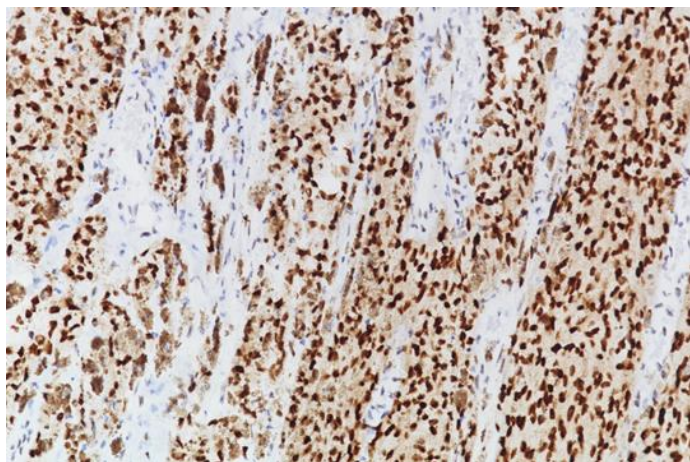
Italian

BIOCARE
M E D I C A L

La colorazione aspecifica, se presente, ha solitamente un aspetto diffuso. Colorazioni sporadiche del tessuto connettivo possono essere osservate anche in sezioni di tessuti fissati eccessivamente in formalina. Utilizzare cellule intatte per l'interpretazione dei risultati della colorazione. Le cellule necrotiche o degenerate spesso si colorano in modo aspecifico.

Tessuto del paziente:

Esaminare i campioni dei pazienti colorati con l'anticorpo indicato scorso. L'intensità della colorazione positiva deve essere valutata nel contesto di qualsiasi colorazione di fondo non specifica del controllo del reagente negativo. Come con qualsiasi test immunocitochimico, un risultato negativo significa che l'antigene non è stato rilevato e non che l'antigene era assente nelle cellule/tessuti analizzati. Se necessario, utilizzare un pannello di anticorpi per identificare le reazioni false negative.



Melanoma colorato con anticorpo PRAME [EPR20330].

Fare riferimento a Riepilogo e spiegazione, limitazioni e caratteristiche prestazionali per informazioni specifiche sull'immunoreattività dell'anticorpo indicata.

Limitazioni:

Limitazioni generali:

1. Per uso diagnostico *in vitro*
2. Questo prodotto è solo per uso professionale: l'immunocitochimica è un processo diagnostico in più fasi che consiste in una formazione specializzata nella selezione dei reagenti appropriati; selezione, fissazione ed elaborazione dei tessuti; preparazione del vetrino IHC; e interpretazione dei risultati della colorazione.
3. La colorazione dei tessuti dipende dalla manipolazione e dalla lavorazione del tessuto prima della colorazione. Fissazione, congelamento, scongelamento, lavaggio, asciugatura, riscaldamento, sezionamento o contaminazione impropri con altri tessuti o fluidi possono produrre artefatti, intrappolamento di anticorpi o risultati falsi negativi. Risultati incoerenti possono essere dovuti a variazioni nei metodi di fissazione e inclusione o a irregolarità intrinseche all'interno del tessuto.¹²
4. Una controcolorazione eccessiva o incompleta può compromettere la corretta interpretazione dei risultati.
5. L'interpretazione clinica di qualsiasi colorazione positiva o negativa deve essere valutata nel contesto della presentazione clinica, della morfologia e di altri criteri istopatologici. L'interpretazione clinica di qualsiasi colorazione positiva o negativa deve essere integrata da studi morfologici utilizzando adeguati controlli interni ed esterni positivi e negativi, nonché altri test diagnostici. È responsabilità di un patologo qualificato che abbia familiarità con l'uso corretto degli anticorpi, dei

reagenti e dei metodi IHC interpretare tutti i passaggi utilizzati per preparare e interpretare la preparazione IHC finale.

6. La diluizione ottimale dell'anticorpo e i protocolli per un'applicazione specifica possono variare. Questi includono, ma non sono limitati a, fissazione, metodo di recupero del calore, tempi di incubazione, spessore della sezione di tessuto e kit di rilevamento utilizzato. A causa della sensibilità superiore di questi reagenti unici, i tempi di incubazione consigliati e i titoli elencati non sono applicabili ad altri sistemi di rilevamento, poiché i risultati possono variare. Le raccomandazioni e i protocolli della scheda tecnica si basano sull'uso esclusivo di prodotti Biocare. In definitiva, è responsabilità del ricercatore determinare le condizioni ottimali.
7. Questo prodotto non è destinato all'uso nella citometria a flusso. Le caratteristiche prestazionali non sono state determinate per la citometria a flusso.
8. I tessuti di persone infette dal virus dell'epatite B e contenenti l'antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg) possono presentare una colorazione aspecifica con la perossidasi di rafano.¹³
9. I reagenti possono manifestare reazioni inaspettate in tessuti precedentemente non testati. La possibilità di reazioni inaspettate anche nei gruppi di tessuti testati non può essere completamente eliminata a causa della variabilità biologica dell'espressione dell'antigene nelle neoplasie o in altri tessuti patologici.¹⁴ Contattare il supporto tecnico di Biocare al numero 1-800-542-2002 o tramite le informazioni di supporto tecnico fornite su biocare.net, con reazioni impreviste documentate.
10. I sieri normali/non immuni provenienti dalla stessa fonte animale degli antisieri secondari utilizzati nelle fasi di blocco possono causare risultati falsi negativi o falsi positivi a causa di autoanticorpi o anticorpi naturali.
11. Si possono osservare risultati falsi positivi a causa del legame non immunologico delle proteine o dei prodotti della reazione del substrato. Possono anche essere causati dall'attività della pseudo perossidasi (eritrociti), dall'attività della perossidasi endogena (citocromo C) o dalla biotina endogena (p. es., fegato, mammella, cervello, rene) a seconda del tipo di immunocolorazione utilizzata.¹²

Limitazioni specifiche del prodotto:

Nessuna limitazione aggiuntiva specifica del prodotto.

Caratteristiche di performance:

Riproducibilità:

La riproducibilità delle prestazioni degli anticorpi è stata verificata testando tessuti normali e tumorali selezionati in giorni diversi e vari strumenti con più operatori. La colorazione dei tessuti selezionati è stata coerente ed eseguita come previsto.

Immunoreattività:

Le seguenti immunoreattività positive e negative sono state dimostrate nelle Tabelle 1 e 2 di seguito.

L'elenco fornito di seguito non è esaustivo ma caratterizza i tipi di immunoreattività osservati con l'anticorpo indicato.

Non è nota alcuna reattività anticorpale non specifica osservata in questo prodotto.

Riepilogo dei risultati attesi:

La prevalenza del PRAME nei tessuti normali e in quelli patologici è stata valutata utilizzando Tissue Microarrays (TMA).

I tessuti normali testati si sono colorati come previsto, con livelli elevati di colorazione osservati nei testicoli e nessuna colorazione negli altri tessuti. La colorazione del PRAME è stata osservata ad un livello elevato nel melanoma, come previsto, e a livelli variabili in altri tessuti tumorali come l'ovaio, il polmone, la prostata e il seno.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Italian

BIOCARE
M E D I C A L

Prestazioni analitiche:

Sono stati condotti test di colorazione per sensibilità e specificità ed i risultati sono elencati di seguito .

Sensibilità e specificità:

Tabella 1: La sensibilità e la specificità dell'anticorpo sono state determinate testando tessuti normali FFPE.

Tessuto	Casi positivi	Casi totali
Cervello	0	6
Cervelletto	0	3
Surrenale	0	3
Ovaia	0	3
Pancreas	0	3
Trachea	0	3
Pituitaria	0	3
Testicolo*	3	3
Tiroide	0	3
Seno	0	3
Milza	0	3
Tonsilla	0	3
Timo	0	3
Midollo osseo**	0	1
Polmone	0	3
Cuore	0	3
Esofago	0	3
Stomaco	0	3
Intestino tenue	0	3
Colon	0	3
Fegato	0	3
Ghiandola salivare	0	3
Rene	0	3
Prostata	0	3
Utero	0	3
Cervice	0	3
Muscolo scheletrico	0	3
Pelle	0	3
Nervo periferico	0	3
Rivestimento delle cellule	0	3
Testa, collo e ghiandole salivari	0	6
Linfonodo	0	3

* Colorazione nucleare con forza 3-4

** Mancano due campioni

Tabella 2: La sensibilità e la specificità dell'anticorpo sono state determinate testando una varietà di tessuti neoplastici FFPE.

Patologia	Casi positivi	Casi totali
Melanoma	29	39
Cancro alle ovaie	9	44
Tumore al seno	10	26
Cancro al colon	4	43
Cancro ai polmoni	21	50
Cancro alla prostata	18	41
Carcinoma surrenale	0	1
Cancro alla vescica	0	2
Meningioma	0	2
Astrocitoma	0	1
Carcinoma a cellule squamose (esofago)	0	2
Adenocarcinoma (stomaco)	0	2
Adenocarcinoma (intestino tenue)	0	1
Adenocarcinoma (colon e retto)	0	6
Cancro al rene	0	2
Cancro al fegato	0	4
Linfoma	0	3
Carcinoma a cellule squamose (testa e collo, cavità orale, lingua)	0	1
Carcinoma rinofaringeo	1	1
Adenocarcinoma (pancreas)	0	1
Adenocarcinoma (prostata)	0	2
Carcinoma adenoideo cistico (testa e collo, ghiandole salivari)	0	1
Carcinoma a cellule squamose (pelle)	0	1
Seminoma	0	2
Cancro alla tiroide	0	2
Cancro cervicale	0	2
Cancro dell'endometrio	1	2

L'espressione del PRAME in varie neoplasie può mostrare una percentuale variabile di positività al tumore. Fare riferimento alla Tabella 3 per le percentuali di cellule tumorali con colorazione positiva (classificate in quartili) osservate in varie neoplasie riportate nella Tabella 2.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Italian

BIOCARE
M E D I C A L

Tabella 3: Percentuale di colorazione positiva delle cellule tumorali in varie neoplasie FFPE.

Tessuti	Percentuale di cellule tumorali colorate N. casi che presentano colorazione Percentuale di N. totali casi (%)				
	<1%	1-25%	26-50%	51-75%	> 75%
Cancro alle ovaie	35/44 (79,5%)	2/44 (4,5%)	3/44 (6,8%)	3/44 (6,8%)	1/44 (2,3%)
Tumore al seno	16/26 (61,5%)	26/7 (26,9%)	1/26 (3,8%)	2/26 (7,7%)	0 (0%)
Cancro al colon	39/43 (88,4%)	4/43 (11,6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Cancro ai polmoni	29/50 (58,0%)	7/50 (14,0%)	4/50 (8,0%)	7/50 (14,0%)	3/50 (6,0%)
Cancro alla prostata	23/41 (56,1%)	9/41 (22,0%)	3/41 (7,3%)	2/41 (4,9%)	4/41 (9,8%)
Carcinoma rinofaringeo	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1/1 (100%)
Cancro dell'endometrio	1/2 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	1/2 (50%)	0 (0%)
Melanoma	10/39 (25,6%)	6/39 (15,4%)	5/39 (12,8%)	6/39 (15,4%)	12/39 (30,8%)

Colorazione percentuale delle cellule tumorali presentata per tutte le intensità di colorazione.

Colorazione sui tessuti che mostra diversi livelli di espressione della proteina PRAME.

I risultati dei test delle prestazioni analitiche hanno dimostrato che l'anticorpo PRAME [EPR20330] può rilevare correttamente la proteina PRAME quando si utilizza il protocollo IHC definito. I risultati anomali dei test sui tessuti supportano la conclusione che PRAME [EPR20330] è sensibile alla proteina PRAME quando si utilizzano i protocolli IHC raccomandati. L'anticorpo PRAME [EPR20330] è in grado di rilevare livelli da bassi ad alti della proteina PRAME. I test sui tessuti normali non hanno mostrato alcun rilevamento inaspettato di PRAME su 32 tipi di tessuto. Non si è verificata alcuna reattività crociata inaspettata. I risultati supportano l'affermazione che l'anticorpo PRAME [EPR20330] è altamente specifico (specificità analitica) per la proteina PRAME.

Prestazioni cliniche:

Sono stati condotti test di colorazione per sensibilità e specificità diagnostica e i risultati sono elencati di seguito. L'immunoreattività positiva e negativa è stata registrata nella Tabella 4.

Tre vetrini TMA per melanoma sono stati colorati presso Biocare e inviati a un patologo esterno per essere letti e classificati. I tessuti del melanoma hanno mostrato una diversità di punteggi di colorazione che vanno da 0 (negativo) a forte (4). La maggior parte dei nevi melanocitici non mostrava reattività PRAME, ma alcuni presentavano una forte reattività.

Tabella 4: Percentuale di colorazione positiva delle cellule tumorali in varie neoplasie melanocitiche e pelle FFPE.

Tessuti	Percentuale di cellule tumorali colorate N. casi che presentano colorazione Percentuale di N. totali casi (%)				
	<1%	1-25%	26-50%	51-75%	> 75%
Melanoma	28/133 (21,1%)	50/133 (37,6%)	10/133 (7,5%)	8/133 (6,0%)	37/133 (27,8%)
Melanoma metastatico	7/38 (18,4%)	10/38 (26,3%)	3/38 (7,9%)	2/38 (5,3%)	16/38 (42,1%)
Nevi melanocitici	12/14 (85,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2/12 (14,3%)
Pelle	10/10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Colorazione percentuale delle cellule tumorali presentata per tutte le intensità di colorazione.

Colorazione sui tessuti che mostra diversi livelli di espressione della proteina PRAME.

L'endpoint primario del test era valutare la sensibilità diagnostica dell'anticorpo PRAME [EPR20330] nella procedura IHC, definita come il tasso di rilevamento positivo del melanoma dei campioni positivi confermati. [TP/(TP+FN)]

Un endpoint secondario era valutare la specificità diagnostica, ovvero il tasso di rilevamento negativo per i campioni confermati negativi al melanoma. [TN/(TN+FP)]

Si sono verificati 35 casi di melanoma falsi negativi che avevano ricevuto la valutazione patologica gold standard come melanoma ma erano negativi per PRAME. 136 casi sono risultati veri positivi in quanto è stato loro diagnosticato un melanoma e hanno mostrato segnale per PRAME. Sono stati rilevati due falsi positivi nei 14 campioni di nevi melanocitici diagnosticati come benigni che mostravano segnali per PRAME.

Dai dati, la sensibilità diagnostica stimata = $136 / (136 + 35) = 79,5\%$

Dai dati, la specificità diagnostica stimata = $22 / (22 + 2) = 91,7\%$

Sulla base dei nostri calcoli, arriviamo ad una sensibilità diagnostica stimata del 79,5% e ad una specificità diagnostica stimata del 91,7% per il rilevamento del melanoma.

Da ciò concludiamo che l'anticorpo PRAME [EPR20330], testato da Biocare su campioni di melanoma e nevi melanocitici, è sensibile al melanoma e altamente specifico per il melanoma.

Risoluzione dei problemi: (fornire una spiegazione per ciascuno dei punti seguenti)

1. Nessuna colorazione dei vetrini – Verificare che siano stati utilizzati tessuto di controllo positivo, anticorpi e prodotti di rilevamento appropriati.
2. Colorazione debole di tutti i vetrini – Controllare per determinare se sono stati utilizzati tessuti di controllo positivo, anticorpi e prodotti di rilevamento adeguati.
3. Sfondo eccessivo di tutti i vetrini – Potrebbero essere presenti livelli elevati di biotina endogena (se si utilizzano prodotti di rilevamento a base di biotina), attività endogena dell'HRP che converte il cromogeno nel prodotto finale colorato (utilizzare il blocco della perossidasi) o un eccesso di interazione proteica non specifica (utilizzare una proteina blocco, come una soluzione bloccante a base di siero o caseina).

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Italian

BIOCARE
M E D I C A L

4. Le sezioni di tessuto vengono rimosse dai vetrini durante l'incubazione – Controllare i vetrini per assicurarsi che siano caricati positivamente.
5. Colorazione specifica troppo scura – Controllare il protocollo per determinare se al vetrino è stato applicato il titolo anticorpale corretto, nonché i tempi di incubazione corretti per tutti i reagenti. Inoltre, assicurarsi che il protocollo contenga fasi di lavaggio sufficienti per rimuovere i reagenti in eccesso una volta completate le fasi di incubazione.

Riferimenti:

1. Kiernan JA. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. *Theory and Practice of Histotechnology*. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. *Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule*, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. *J Histotechnol*. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. *Biotech Histochem*. 1996 Jan;71(5):263-70.
6. Center for Disease Control Manual. *Guide: Safety Management*, NO. CDC-22, Atlanta, GA. April 30, 1976 "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts."
7. *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition* CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
8. *CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2)* CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011
9. College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. [Http://www.cap.org](http://www.cap.org) (800) 323-4040.
10. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. *Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline*. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
11. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. *Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques*. *Histochemistry* 1987; 86:471-478.
12. Nadji M, Morales AR. *Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls*. *Lab Med*1983;14:767.
13. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. *Nonimmunologic binding of horseradishperoxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry*. *AmJ Clin Path* 1980;73:626.
14. Herman GE and Elfont EA. *The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control*. *Biotech & Histochem* 1991;66:194.
15. Zhang W, et al. *PRAME expression and promoter hypermethylation in epithelial ovarian cancer*. *Oncotarget*, 2016 Jul; 7(29):45352-69.
16. Lezcano C, et al. *PRAME expression in melanocytic tumors*. *Am J Surg Pathol*. 2018 Nov; 42(11):1456-65.

Ultraline sono sviluppati esclusivamente da Biocare Medical LLC e non implicano l'approvazione o il sostegno degli anticorpi Biocare da parte di Ventana Medical Systems, Inc o Roche. Biocare, Ventana e Roche non sono affiliati, associati o collegati in alcun modo. Ventana®, BenchMark®, ultraView e OptiView sono marchi di Roche.

Gli anticorpi della serie Q sono sviluppati esclusivamente da Biocare Medical LLC e non implicano l'approvazione o il sostegno degli anticorpi Biocare da parte di Leica Biosystems. Biocare e Leica Biosystems non sono affiliati, associati o correlati in alcun modo. Leica, Leica Biosystems, BOND-MAX e BOND-III sono marchi di Leica Biosystems.

Il riepilogo della sicurezza e delle prestazioni è disponibile qui: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Korean

BIOCARE

M E D I C A L

Available Product Formats				
Format	Catalog Number	Description	Dilution	Diluent
Concentrate	ACI 3252 A, B	0.1, 0.5 mL	1:100	Van Gogh Yellow
Predilute	API 3252 AA, G20, H	6.0, 20, 25 mL	Ready-to-use	N/A
ONCORE Pro	OPAI 3252 T60	60 tests	Ready-to-use	N/A
Q Series-- For Leica BOND-III	ALI 3252 G7	7.0 mL	Ready-to-use	N/A
UltraLine -- For BenchMark	AVI 3252 G, G25	6.0, 25 mL	Ready-to-use	N/A

사용 목적

체외진단용

PRAME [EPR20330]은 포르말린 고정 파라핀 조직에서 면역조직화학(IHC)을 통한 PRAME 단백질의 정성 동정에 있어서, 비면역학적 조직화학적 염색을 이용한 전통적인 조직병리학으로 종양의 초기 진단에 이루어진 후 실험실용으로 사용되는 토끼 단일클론 항체입니다. 임베디드(FFPE) 인장 조직. 염색 또는 염색 부재에 대한 임상적 해석은 적절한 대조군을 사용한 형태학적 연구로 보완되어야 하며, 다른 임상 결정을 내리는 데 도움이 되도록 자격을 갖춘 병리학자가 환자의 임상 병력 및 기타 진단 테스트의 맥락 내에서 평가해야 합니다.

요약 및 설명

PRAME 은 염색체 22q11.22에 위치하며 509개의 아미노산 단백질을 암호화합니다. PRAME 는 흑색종, 비소세포폐암, 유방암종, 난소암종 등을 비롯한 다양한 비멜라닌세포 악성 신생물에서 발현되는 것으로 밝혀진 상염색체 암-고환 항원(CTA) 유전자입니다. 정상적인 건강한 조직은 고환, 난소, 부신 및 문헌에 인용된 몇 가지 다른 조직을 제외하고 PRAME를 발현하는 것으로 알려져 있지 않습니다. (15,16)

절차 원칙

이 항체 제품은 포르말린 고정 파라핀 포매 조직 절편의 면역조직화학 검사에서 1차 항체로 사용될 수 있습니다. 일반적으로 면역조직화학(IHC) 염색 기술을 사용하면 순차적인 적용을 통해 항원을 사보할 수 있습니다. 항원에 대한 특정 항체(1차 항체), 1차 항체에 대한 2차 항체(선택적 링크 항체/프로브), 효소 복합체 및 중간 세척 단계가 있는 발색 기질 발색체의 효소적 활성화로 인해 항원 부위에서 눈에 보이는 반응 생성물이 생성됩니다. 그러면 표본이 대조염색되고 덮개가 미끄러질 수 있습니다. 결과는 빛을 사용하여 해석됩니다. 현미경을 사용하여 병리상학적 과정을 감별 진단하는 데 도움을 줄 수 있습니다. 특정 항원과 연관되지 않을 수도 있습니다.

재료 및 방법

제공되는 시약

호스트 소스 토끼 단일클론

종 반응성 인간 다른 종은 테스트되지 않았습니다.

클론: EPR20330

이소타입: IgG

단백질 농도: 특정 IgG 농도: Biocare 기술 지원팀에 문의하세요.

특이성: PRAME

세포 위치 파악: 핵과 세포막

방법: 친화성 정제된 재조합 토끼 단일클론

재구성, 혼합, 희석, 적정:

미리 희석된 항체 시약은 위에 나열된 염색 시스템과 함께 사용하기 위해 최초로 희석됩니다. 더 희석하면 항원 염색이 손실될 수 있습니다. 사용자는 그러한 변경 사항을 확인해야

합니다. 사용자 실험실의 조직 처리 및 기술 절차의 차이로 인해 장기적인 사내 관리가 필요한 결과 크게 달라질 수 있습니다(품질 관리 섹션 참조). 농축된 시약은 위 표에 표시된 대로 희석이 필요합니다.

일련된 응용 프로그램

면역조직화학(포르말린 고정 파라핀 포매 조직)

제공되는 제품: 완충 식염수 용액, pH 5.9-7.9, 단백질 담체 및 0.1% 미만의 아지드 화 나트륨 방부제 포함. 자세한 내용은 안전 보건 자료를 참조하십시오.

필요하지만 제공되지 않은 재료 및 시약

현미경 슬라이드는 안전하를 따고 있습니다.

양성 및 음성 조직 대조군

Desert Chamber (또는 유사한 건조 용)

자일렌 또는 자일렌 대체물

에탄올 또는 시약 알코올

디클로킹 챔버(압력솥)

탈이온수 또는 증류수

세척 완충액

전처리 시약

퍼옥시다아제 블록

단백질 블록(선택 사항)

검출 프로브 및 폴라머

음성 대조 시약

발색제

헤마톡실린(대조염색)

블루링 시약

장착 매체

커버글라스

광학현미경(40-400X 배율)

항체 제품의 구성은 위 표에 표시된 기기에서 사용할 수 있습니다.

보관 및 안정성

2°C~8°C에서 보관하세요. 제품은 이러한 조건에서 보관할 경우 바이알 라벨에 인쇄된 유효 기간까지 안정적입니다. 유효기간 이후에는 사용하지 마세요. 지정된 조건 이외의 조건에서의 보관을 확인해야 합니다. 희석된 시약은 즉시 사용해야 합니다. 남은 시약은 2°C~8°C에 보관하세요. 사용자 희석 시약의 안정성은 Biocare 에서 확립되지 않았습니다.

모든 환자 검체에 대해 양성 및 음성 대조를 동시에 실행해야 합니다. 실험실 절차의 변화로 설명할 수 없는 예상치 못한 염색이 관찰되고 항체 문제가

Biocare Medical

60 Berry Drive
Pacheco, CA 94553

USA

107/190



TP v3 (12/15/2021)

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080

EC REP EMERGO EUROPE

Westervoortsedijk 60

8627 AT Arnhem

The Netherlands

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Korean

의심되는 경우 1-800-542-2002로 전화하거나 biocare.net에서 제공하는 기술 지원 정보를 통해 Biocare 기술 지원에 문의하십시오.

표본 준비

포르말린으로 고정된 조직은 파라핀 포매 전에 사용하기에 적합합니다. 골조직은 조직 절단을 용이하게 하고 마이크로톰 블레이드의 손상을 방지하기 위해 조직 처리 전에 석회질을 제거해야 합니다.^{1, 2}

특정 항원 표적을 발현하는 적절하게 고정되고 매립된 조직은 서늘한 곳에 보관해야 합니다. 1988년 임상 검사실 개선법(CLIA)은 42 CFR § 493.1259(b)에서 다음과 같이 요구합니다. "검사실은 스테인드 슬라이드를 날짜로부터 최소 10년 동안 보관해야 합니다. 검사를 실시하고 검사일로부터 최소 2년 동안 표본 블록을 보관해야 합니다."³

염색 전 조직 처리

아래 권장 프로토콜에 따라 열 유도 항원결정부 검색(HIER)을 수행하십시오. IHC 이전에 HIER을 일괄적으로 사용하면 불일치를 최소화하고 염색을 표준화하는 것으로 나타났습니다.^{4, 5}

경고 및 예방 조치:

- 이 항체에는 0.1% 미만의 아 지드화나트륨이 함유되어 있습니다. 0.1% 미만의 농도는 US 29 CFR 1910.1200, OSHA 위험 통신 및 EC 지침 91/155/EC에 따라 보고할 수 있는 위험 물질이 아닙니다. 방부제로 사용되는 아지드 화나트륨 (NaN₃)은 섭취할 경우 독성이 있습니다. 아지드 화나트륨은 납 및 구리 배관과 반응하여 폭발성이 높은 금속 아 지드화물을 형성할 수 있습니다. 폐기 시 배관에 아지드가 축적되는 것을 방지하기 위해 다량의 물로 씻어내십시오. (질병통제센터, 1976, 국립산업안전보건원, 1976)⁶
- 고정 전후의 검체와 이에 노출된 모든 물질은 감염을 전파할 수 있는 것처럼 취급하고 적절한 예방 조치를 통해 폐기해야 합니다. 시약을 입으로 피펫팅하지 말고 시약 및 검체가 피부와 점막에 닿지 않도록 하십시오. 시약이나 검체가 민감한 부위 에 닿은 경우 다량의 물로 씻어내십시오.⁷
- 시약의 미생물 오염으로 인해 비특이적 염색이 증가할 수 있습니다.
- 지정된 것 이외의 배양 시간이나 온도는 잘못된 결과를 초래할 수 있습니다. 사용자는 그러한 변경 사항을 확인해야 합니다.
- 바이알에 표기된 사용기한이 지난 시약은 사용하지 마십시오.
- 사전 희석된 항체시약은 최초로 희석하여 사용합니다. 더 희석하면 항원 염색이 손실될 수 있습니다.
- 농축된 항체 시약의 희석 여부는 사용 전 반드시 검증되어야 합니다. 어느 특별히 권장되지 않는 희석제를 사용하는 경우에도 호환성과 안정성을 검증해야 합니다.
- 감염성 또는 감염 가능성이 있는 폐기물에 대한 절차에 따라 사용한 모든 시약 및 기타 오염된 일회용 재료를 폐기합니다. 유해성 특성과 정도에 따라 고체 및 액체 폐기물을 처리하고 해당 규정에 따라 처리 및 폐기(또는 처리 및 폐기하도록 하는 것)하는 것은 각 실험실의 책임입니다.
- 이 제품의 안전한 폐기 방법을 결정하려면 안전 보건 자료의 권장 사항과 함께 해당 지역의 현지 폐기 규정을 따르십시오.
- SDS는 요청 시 제공되며 <http://biocare.net>에 있습니다.
- 이 장치와 관련하여 의심되는 심각한 사고를 보고하려면 현지 Biocare 담당자 및 사용자가 거주하는 회원국 또는 국가의 관할 당국에 문의하십시오.

사용 지침

PRAME [EPR20330]에 권장되는 염색 프로토콜:

IntelliPATH FLX and manual use:

intelliPATH FLX 및 수동 사용을 위한 API3252 는 MACH 4 감지 시스템으로 표준화되었습니다. 세척 단계에는 TBS 를 사용하십시오.

Peroxide Block: Peroxidized 1 로 5 분간 차단합니다.

BIOCARE
M E D I C A L

Pretreatment:	Decloaker 를 사용하여 열 화수를 수행합니다. 구체적인 지침은 Borg Decloaker 데이터 시트를 참조하십시오.
Protein Block (Optional):	Background Punisher 를 사용하여 RT 에서 5~10 분 동안 배양합니다.
Primary Antibody:	RT 에서 30 분 동안 배양합니다.
Detection:	프록브 해당 없음 폴리머 2 차 공액 폴리머와 함께 실온에서 30 분 동안 배양합니다.
Chromogen:	Biocare 의 DAB 를 사용하여 실온에서 5 분간 인큐베이션합니다. 또는 Warp Red 를 사용하여 실온에서 5~7 분간 인큐베이션합니다.
Counterstain	헤마톡실린으로 대조염색합니다. 탈아인수로 행군니다. 타차 블루잉 솔루션을 1 분간 도포합니다. 탈아인수로 행군니다.

ONCORE Pro Automated Slide Staining System:

OPAI3252는 ONCORE Pro와 함께 사용하도록 고안되었습니다. 구체적인 사용 지침은 사용자 설명서를 참조하세요. 프로토콜 편집기의 프로토콜 매개변수는 다음과 같이 프로그래밍되어야 합니다.

Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	PRAME Rb	PRAME Rb AP
Protocol Template (Description):	Special Template (ONCORE Pro-Tect Detection Required)	Rb AP Template 1
Dewaxing (DS Buffer Option):	DS2-50	DS Buffer
Antigen Retrieval (AR Option):	AR1, high pH; 103°C	AR1, high pH; 103°C
Block Option:	Buffer	Buffer
Reagent Name, Time, Temp.:	PRAME Rb, 45 min., 25°C	PRAME Rb, 30 min., 25°C

Ventana BenchMark ULTRA:

BenchMark ULTRA 와 함께 사용하도록 고안되었습니다. 구체적인 사용 지침은 사용자 설명서를 참조하세요. 권장되는 프로토콜 매개변수는 다음과 같습니다.

Template/Detection:	OptiView DAB IHC
Pretreatment Protocol:	CC1 64 minutes
Peroxidase:	Pre-Primary Peroxidase Inhibitor
Primary Antibody:	32 minutes, 36°C

Q Series – For Leica BOND-III:

ALI3252 는 Leica BOND-III와 함께 사용하도록 고안되었습니다. 구체적인 사용 지침은 사용자 설명서를 참조하세요. 권장되는 프로토콜 매개변수는 다음과 같습니다.

Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	IHC Protocol F	IHC Protocol J
Detection:	Bond Polymer Refine	Bond Polymer Refine Red
HIER:	20 min with ER2	20 min with ER2
Peroxide Block:	5 분	
Marker (Primary Antibody):	15 분	15 분

Biocare Medical

60 Berry Drive
Pacheco, CA 94553

USA

108/190



TP v3 (12/15/2021)

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080

EC REP EMERGO EUROPE

Westervoortsedijk 60

8627 AT Arnhem

The Netherlands

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Korean

BIOCARE

M E D I C A L

Post Primary:	8 분	
Polymer:	8 분	
Post Primary AP:		20 분
Polymer AP:		30 분
Mixed Chromogen Refine:	10 분	10 분 + 5 분
Hematoxylin:	5 분	5 분

품질 관리

면역조직화학 분석의 설계 및 구현에 대한 CLSI 품질 표준을 참조하십시오. 승인된 지침-제2판(I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA(www.clsi.org). 2011년 8월

양성 조직 대조: 흑색종, 정상 고환

외부 양성 대조 물질은 환자 검체와 동일한 방식으로 가능한 한 빨리 고정, 처리 및 삽입된 새로운 검체이어야 합니다. 양성 조직 대조군은 올바르게 준비된 조직과 적절한 염색 기술을 나타내야 합니다. 각 염색 실행에는 각 테스트 조건 세트에 대한 하나의 양성 외부 조직 대조가 포함되어야 합니다.

외부 양성 대조 물질로 사용되는 조직은 약한 양성 염색을 제공하는 낮은 수준의 양성 표적 활성이 잘 특성화되어 있는 환자 검체에서 선택해야 합니다. 외부 양성 대조군에 대한 낮은 양성 수준은 IHC 방법론의 불안정성 또는 문제로 인한 1차 항체 민감도의 미묘한 변화를 감지하도록 설계되었습니다. 사중에서 판매되는 조직 대조 슬라이드 또는 환자 샘플과 다르게 처리된 표본은 사약 성능만 검증하고 조직 준비는 검증하지 않습니다.

알려진 양성 조직 대조군은 환자 샘플의 특정 진단을 공식화하는 데 도움이 되기보다는 처리된 조직 및 테스트 시약의 올바른 성능을 모니터링하는 데에만 활용되어야 합니다. 양성 조직 대조군이 양성 염색을 나타내지 못하는 경우, 테스트 검체의 결과는 유효하지 않은 것으로 간주되어야 합니다.

음성 조직 제어

각 염색 실행 시 환자 샘플과 동일한 방식으로 고정, 처리 및 내장된 음성 조직 대조(PRAME 음성으로 알려짐)를 사용하여 IHC 1차 항체의 특이성을 확인합니다. 표적 항원을 입증하고 특정 배경 염색의 지표를 제공합니다. (가장 양성 염색). 또한 대부분의 조직 절편에 존재하는 다양한 세포 유형이 IHC의 성능을 확인하기 위해 실험실 직원이 내부 음성 대조 사이트로 사용합니다. 명세서 음성조직에 사용될 수 있는 검체의 종류와 출처 컨트롤은 성능 특성 섹션에 나열되어 있습니다.

음성 조직 대조에서 특정 염색 위양성 염색이 발생하는 경우, 환자 검체의 결과는 유효하지 않은 것으로 간주되어야 합니다.

비특이적 음성 시약 대조

비특이적 염색 및

항원 부위의 특정 염색을 더 잘 해석할 수 있습니다. 이상적으로 음성 시약 대조군에는 1차 대조군과 동일한 방식으로 조직 배양 상층액에서 생성된 PRAME IgG 항체가 포함되어 있습니다. **항체이지만** Biocare 항체와 동일한 매트릭스 용액에서는 인간 조직과 특별한 반응성을 나타내지 않습니다. 음성 대조 항체를 희석된 1차 항체와 동일한 면역글로불린 또는 단백질 농도로 희석합니다. 동일한 희석제를 사용한 항체 처리 후 순수한 항체에 송이지 태아 혈청이 남아 있으면 희석된 단백질 농도와 동등한 단백질 농도의 송이지 태아 혈청 동일한 희석제에 들어 있는 1차 항체도 사용하기에 적합합니다. (제공된 시약 참조) 희석제 단독은 이전에 설명한 음성 시약 대조에 대한 덜 바람직한 대안으로 사용될 수 있습니다. 음성 시약 대조군의 배양 기간은 1차 항체의 배양 기간과 일치해야 합니다.

여러 항체 패널이 연속 섹션에 사용되는 경우 한 슬라이드의 음성 염색 영역은 다른 항체에 대한 음성 비특이적 결합 배경 제어 역할을 할 수 있습니다. 내인성 효소 활성 또는 효소의 비특이적 결합을 특정 면역반응성과 구별하기 위해 추가 환자 조직을 기질 발색제 또는 효소 복합체(PAP, 아비딘-비오틴, 스트렙타비딘) 및 기질 발색제로만 염색할 수 있습니다.

분석 검증

진단 절차에서 항체 또는 염색 시스템을 처음 사용하기 전에 사용자는 알려진 양성 및 음성 조직을 대표하는 면역조직화학적 성능 특성이 알려진 알려진 내부 조직에서 항체를 테스트하여 항체의 특이성을 확인해야 합니다. 이전에 제품 삽입물의 이 섹션에 설명된 품질 관리 절차와 면역조직화학에 대한 CAP 인증 프로그램⁹ 및/또는 NCCLS IHC 지침¹⁰의 품질 관리 권장 사항을 참조하십시오. 이러한 품질 관리 절차는 새로운 항체 로트마다 또는 분석 매개변수에 변경이 있을 때마다 반복되어야 합니다. 성능 특성 섹션에 나열된 조직은 분석 검증에 적합합니다.

문제 해결

제공된 데이터 시트에 따라 항체 특정 프로토콜 권장 사항을 따르십시오. 비정상 결과가 발생하면 1-800-542-2002번으로 Biocare 기술 지원부 에 문의하십시오.

염색의 해석

양성 조직 대조

표시된 항체로 염색된 양성 조직 대조군을 먼저 검사하여 모든 시약이 제대로 기능하는지 확인해야 합니다. (위에 표시된 대로) 표적 세포의 적절한 염색은 양성 반응성을 나타냅니다. 양성 조직 대조군이 양성 염색을 나타내지 못하는 경우, 테스트 검체의 모든 결과는 유효하지 않은 것으로 간주되어야 합니다.

반응 생성물의 색상은 사용된 기질 발색제에 따라 달라질 수 있습니다. 예상되는 색상은 인쇄물 패키지에 삽입물을 참조하십시오. 또한 염색 방법에 따라 변색증이 관찰될 수도 있습니다.¹¹ 대조염색을 사용하는 경우, 배양 기간과 사용된 대조염색의 효능에 따라 대조염색으로 인해 세포핵이 착색됩니다. 과도하거나 불완전한 대조염색은 결과의 올바른 해석을 손상시킬 수 있습니다. 권장되는 대조염색에 대해서는 프로토콜을 참조하십시오.

음성 조직 제어:

양성 조직 대조 후에는 음성 조직 대조를 검사하여 1차 항체에 의한 표적 항원 표지의 특이성을 확인해야 합니다. 음성 조직 대조군에서 특정 염색이 없다는 것은 세포 세포 성분에 대한 항체 교차 반응성이 부족하다는 것을 확인시켜 줍니다. 음성 외부 조직 대조에서 특정 염색 위양성 염색이 발생하는 경우, 환자 검체의 결과는 유효하지 않은 것으로 간주되어야 합니다.

비특이적 염색이 있는 경우 일반적으로 확산된 모습을 보입니다. 포르말린이 과도하게 고정된 조직의 절편에서도 결합 조직의 선별적인 염색이 관찰될 수도 있습니다. 염색 결과를 해석하려면 손상되지 않은 세포를 사용하십시오. 과사형 또는 퇴행성 세포는 종종 비특이적으로 염색됩니다.

환자 조직

표시된 항체로 염색된 환자 검체를 검사합니다. 마지막, 양성 염색 강도는 음성 시약 대조의 비특이적 배경 염색 맥락 내에서 평가되어야 합니다. 모든 면역조직화학적 검사 및 매트릭스로, 음성 결과는 항원이 검출되지 않았음을 의미하며 분석된 세포 조직에 항원이 없다는 것을 의미하지는 않습니다. 필요한 경우 항체 패널을 사용하여 위음성 반응을 식별합니다.

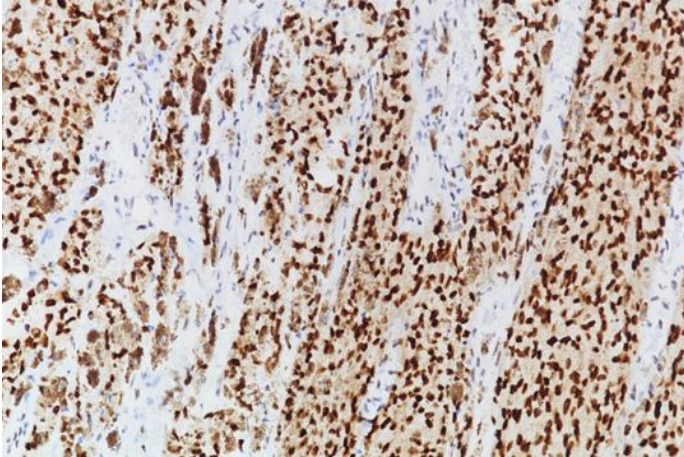
PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Korean

BIOCARE

M E D I C A L



PRAME [EPR20330] 항체로 염색된 흑색종

표시된 항체 면역반응성에 관한 특정 정보는 요약 및 설명, 제한사항 및 성능 특성을 참조하십시오

제한사항

일반 제한사항:

1. 체외 진단용
2. 이 제품은 전문가용입니다. 면역조직화학은 적절한 시약 선택에 대한 전문 교육으로 구성된 다단계 진단 과정입니다. 조직 선택, 고정 및 처리; IHC 슬라이드 준비; 염색 결과의 해석.
3. 조직 염색은 염색 전 조직의 취급 및 처리에 따라 달라집니다. 부적절한 고정, 냉동, 해동, 세척, 건조, 가열, 절개 또는 다른 조직이나 체액으로의 오염으로 인해 인공물, 항체 트래핑 또는 위음성 결과가 발생할 수 있습니다. 일관되지 않은 결과는 고정 및 삽입 방법의 차이 또는 조직 내의 고유한 불규칙성으로 인해 발생할 수 있습니다.¹²
4. 과도하거나 불완전한 대조염색은 결과의 올바른 해석을 손상시킬 수 있습니다.
5. 양성 또는 음성 염색에 대한 임상적 해석은 임상적 표현, 형태, 기타 조직병리학적 기준을 고려하여 평가해야 합니다. 양성 또는 음성 염색에 대한 임상적 해석은 적절한 양성 및 음성 내부 및 외부 대조와 기타 진단 테스트를 사용한 형태학적 연구를 통해 보완되어야 합니다. 최종 IHC 준비를 준비하고 해석하는 데 사용되는 모든 단계를 해석하는 것은 IHC 항체, 시약 및 방법의 적절한 사용에 익숙한 자격을 갖춘 병리학자의 책임입니다.
6. 특정 응용 분야에 대한 최적의 항체 희석 및 프로토콜은 다양할 수 있습니다. 여기에는 고정, 열 회수 방법, 배양 시간, 조직 단면 두께 및 사용된 검출 키트가 포함되지만 이에 국한되지는 않습니다. 이러한 고유한 시약의 뛰어난 감도로 인해 나열된 권장 배양 시간과 역가는 결과가 다를 수 있으므로 다른 검출 시스템에는 적용할 수 없습니다. 데이터 시트 권장 사항 및 프로토콜은 Biocare 제품의 독점적인 사용을 기반으로 합니다. 궁극적으로 최적의 조건을 결정하는 것은 조사자의 책임입니다.
7. 이 제품은 유세포 분석에 사용하기 위한 것이 아닙니다. 유세포분석에 대한 성능 특성은 결정되지 않았습니다.

8. B형 간염 바이러스에 감염되고 B형 간염 표면 항원(HBsAg)을 함유한 사람의 조직은 양 고추 냉이 퍼옥시다제에 의한 비특이적 염색을 나타낼 수 있습니다.¹³
9. 시약은 이전에 테스트되지 않은 조직에서 예상치 못한 반응을 나타낼 수 있습니다. 신생물이나 기타 병리학적 조직에서 항원 발현의 생물학적 다양성으로 인해 테스트된 조직 그룹에서도 예상치 못한 반응이 발생할 가능성을 완전히 제거 할 수는 없습니다.¹⁴ 1-800-542-2002로 전화하거나 biocare.net에서 제공되는 기술 지원 정보를 통해 Biocare의 기술 지원부에 문의하십시오.
10. 차단 단계에 사용되는 2차 항혈청과 동일한 동물 유래의 정상/비면역 혈청은 자가항체나 천연항체로 인해 위음성 또는 위양성 결과를 초래할 수 있습니다.
11. 단백질이나 기질 반응 생성물의 비면역학적 결합으로 인해 위양성 결과가 나타날 수 있습니다. 또한 사용된 면역염색제의 유형에 따라 가성 과산화효소 활성(적혈구), 내인성 과산화효소 활성(시토크롬 C) 또는 내인성 비오틴(예: 간, 유방, 뇌, 신장)으로 인해 발생할 수도 있습니다.¹²

제품별 제한 사항

추가적인 제품별 제한은 없습니다.

성능 특성

제한사항

선택된 정상 조직과 종양 조직을 테스트하고 여러 작업자가 다양한 장비를 사용하여 항체 성능의 재현성을 검증했습니다. 선택된 조직의 염색은 일관되었고 예상대로 수행되었습니다.

면역반응성

다음과 같은 양성 및 음성 면역반응이 아래 표 1 및 2에 입증되었습니다.

아래 제공된 목록은 완전한 것은 아니지만 표시된 항체에서 관찰된 면역반응의 유형을 특성화합니다.

이 제품에서는 알려진 비특이적 항체 반응성이 관찰되지 않습니다.

예상 결과 요약

정상 조직과 질병 상태 조직에서 PRAME의 유병률은 TMA(Tissue Microarrays)를 사용하여 평가되었습니다.

테스트된 정상 조직은 예상대로 염색되었으며, 고환에서는 높은 수준의 염색이 관찰되었고 다른 조직에서는 염색이 관찰되지 않았습니다.

PRAME의 염색은 예상대로 흑색종에서 높은 수준으로 관찰되었으며, 난소, 폐, 전립선 및 유방과 같은 다른 암 조직에서는 다양한 수준으로 관찰되었습니다.

분석 성능

민감도와 특이도에 대한 염색시험을 실시하였고 그 결과는 아래와 같습니다.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Korean

BIOCARE

M E D I C A L

민감도와 특이도:

표 1: 항체의 민감도 및 특이성은 FFPE 정상 조직을 테스트하여 결정되었습니다.

조직	긍정적인 사례	총 건수
뇌	0	6
소뇌	0	삼
부신	0	삼
난소	0	삼
콩팥	0	삼
기관	0	삼
노하수체	0	삼
고환*	삼	삼
갑상선	0	삼
기슴	0	삼
비장	0	삼
편도선	0	삼
흉선	0	삼
골수**	0	1
폐	0	삼
미음	0	삼
식도	0	삼
위	0	삼
소장	0	삼
클론	0	삼
간	0	삼
침샘	0	삼
신장	0	삼
전립선	0	삼
자궁	0	삼
자궁 경부	0	삼
골격근	0	삼
피부	0	삼
말초신경	0	삼
라이닝 세포	0	삼
머리 목 침샘	0	6
림프절	0	삼

* 3-4 강도 핵염색

** 샘플 2 개 누락

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Korean

BIOCARE
M E D I C A L

표 2: 다양한 FFPE 종양 조직을 테스트하여 항체의 민감도와 특이성을 결정했습니다.

병리학	긍정적인 사례	총 건수
흑색종	29	39
난소암	9	44
유방암	10	26
대장 암	4	43
폐암	21	50
전립선암	18	41
부신피질암종	0	1
방광암	0	2
수막종	0	2
성상세포종	0	1
편평 세포 암종(식도)	0	2
선암종(위)	0	2
선암종(소장)	0	1
선암종(결장 및 직장)	0	6
신장암	0	2
간 암	0	4
림프종	0	삼
편평세포암종(두경부, 구강, 혀)	0	1
비인두암종	1	1
선암종(췌장)	0	1
선암종(전립선)	0	2
선양낭성암종(두경부, 타액선)	0	1
편평 세포 암종(피부)	0	1
정상피종	0	2
갑상선 암	0	2
자궁 경부암	0	2
자궁내막암	1	2

다양한 신생물에서의 PRAME 발현은 다양한 비율의 종양 양성을 나타낼 수 있습니다. 표 2에서 발견된 다양한 신생물에서 관찰된 양성 염색 종양 세포 비율(사분위수로 분류)은 표 3을 참조하십시오.

표 3: 다양한 FFPE 종양에서 양성 종양 세포 염색 비율.

조직	종양 세포 염색 비율 (%) 염색을 보이는 사례 # 총 사례 수의 백분율(%)				
	<1%	1-25%	26-50%	51-75%	> 75%
난소암	35/44 (79.5%)	2/44 (4.5%)	3/44 (6.8%)	3/44 (6.8%)	1/44 (2.3%)
유방암	16/26 (61.5%)	7/26 (26.9%)	1/26 (3.8%)	2/26 (7.7%)	0 (0%)
대장 암	39/43 (88.4%)	4/43 (11.6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
폐암	29/50 (58.0%)	7/50 (14.0%)	4/50 (8.0%)	7/50 (14.0%)	3/50 (6.0%)
전립선암	23/41 (56.1%)	9/41 (22.0%)	3/41 (7.3%)	2/41 (4.9%)	4/41 (9.8%)
비인두암종	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1/1 (100%)
자궁내막암	1/2 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	1/2 (50%)	0 (0%)
흑색종	10/39 (25.6%)	6/39 (15.4%)	5/39 (12.8%)	6/39 (15.4%)	12/39 (30.8%)

모든 염색 강도에 대해 종양 세포 염색 비율이 제시되었습니다.

다양한 수준의 PRAME 단백질 발현을 보여주는 조직 염색

분석 성능 테스트 결과, PRAME [EPR20330] 항체는 정의된 IHC 프로토콜을 사용할 때 PRAME 단백질을 정확하게 검출할 수 있음이 입증되었습니다. 비정상적인 조직 테스트 결과는 권장 IHC 프로토콜을 사용할 때 PRAME [EPR20330]이 PRAME 단백질에 민감하다는 결론을 뒷받침합니다. PRAME [EPR20330] 항체는 낮은 수준에서 높은 수준의 PRAME 단백질을 검출 할 수 있습니다. 정상 조직 테스트에서는 32개 조직 유형에 걸쳐 PRAME가 예상치 않게 검출되지 않은 것으로 나타났습니다. 예상치 못한 교차 반응은 없었습니다. 결과는 PRAME [EPR20330] 항체가 PRAME 단백질에 매우 특이적(분석적 특이성)이라는 주장을 뒷받침합니다.

임상 성과:

진단 민감도와 특이도에 대한 염색 테스트를 실시하였고 그 결과는 아래와 같습니다. 양성 및 음성 면역반응성은 표 4에 기록되어 있습니다.

Biocare 에서 염색한 후 외부 병리학자에게 보내 판독 및 등급을 매겼습니다. 흑색종 조직은 0(음성)부터 4(강한) 범위의 다양한 염색 점수를 보여주었습니다. 대부분의 멜라닌 세포 모반은 PRAME 반응성을 나타내지 않았지만 일부는 강한 반응성을 보였습니다.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Korean

BIOCARE
M E D I C A L

표4: 다양한 FFPE 멜라닌세포 신생물 및 피부에서 양성 중앙 세포 염색 비율.

조직	중앙 세포 염색 비율 (%) 염색을 보이는 사례 # 총 사례 수의 백분율(%)				
	<1%	1-25%	26-50%	51-75%	> 75%
흑색종	28/133 (21.1%)	50/133 (37.6%)	10/133 (7.5%)	8/133 (6.0%)	37/133 (27.8%)
전이성 흑색종	7/38 (18.4%)	10/38 (26.3%)	3/38 (7.9%)	2/38 (5.3%)	16/38 (42.1%)
멜라닌 세포 모반	12/14 (85.7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2/12 (14.3%)
피부	10/10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

모든 염색 강도에 대해 중앙 세포 염색 비율이 제시되었습니다.

다양한 수준의 PRAME 단백질 발현을 보여주는 조직 염색

테스트의 1차 평가변수는 확인된 양성 샘플의 양성 흑색종 검출률로 정의되는 IHC 절차에서 PRAME [EPR20330] 항체의 진단 민감도를 평가하는 것이었습니다. [TP/(TP+FN)]

2차 평가변수는 진단 특이성 즉 확인된 흑색종 음성 샘플에 대한 음성 검출률을 평가하는 것이었습니다. [TN/(TN+FP)]

흑색종으로 최종 표준 병리학적 평가를 받았지만 PRAME에 대해서는 음성인 위음성 흑색종 사례가 35건 있었습니다. 흑색종으로 진단되어 PRAME 신호를 보인 경우는 136여가 진단되었습니다. PRAME에 대한 신호를 보인 양성으로 진단된 14개의 멜라닌 세포 모반 샘플에서 2개의 위양성이 검출되었습니다.

데이터로부터 추정된 진단 민감도 = 136 / (136+35) = 79.5%

데이터로부터 추정된 진단 특이도 = 22 / (22+2) = 91.7%

계산에 따르면 흑색종 검출에 대한 진단 민감도는 79.5%, 진단 특이도는 91.7%로 추정됩니다.

Biocare가 흑색종 및 멜라닌 세포 모반 샘플을 대상으로 테스트한 PRAME [EPR20330] 항체가 흑색종에 민감하고 흑색종에 매우 특이적이라는 결론을 내렸습니다.

문제 해결 (아래 각 사항에 대한 설명 제공)

- 슬라이드에 염색이 되지 않음 - 적절한 양성 대조 조직, 항체 및 검출 제품이 사용되었는지 확인하십시오.
- 모든 슬라이드의 약한 염색 - 적절한 양성 대조 조직, 항체 및 검출 제품이 사용되었는지 확인하십시오.
- 최종 생성물 로 전환하는 내인성 HRP 활성 (과산화효소 블록 사용) 또는 과도한 비특이적 단백질 상호작용(단백질 사용)이 있을 수 있습니다. 혈청 또는 카제인 기반 차단 용액과 같은 차단.
- 배양 중에 조직 섹션이 슬라이드를 씻어냅니다. 슬라이드가 양전하를 띠고 있는지 확인하십시오.

- 특정 염색이 너무 어두움 - 프로토콜을 확인하여 적절한 항체 역가가 슬라이드에 적용되었는지 확인하고 모든 시약에 대한 적절한 배양 시간을 확인하십시오. 또한 프로토콜에 인큐베이션 단계가 완료된 후 과잉 시약을 제거하기에 충분한 세척 단계가 있는지 확인하십시오.

참고자료:

- Kiernan JA. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. New York: Pergamon Press 1981.
- Sheehan DC and Hrapchak BB. *Theory and Practice of Histotechnology*. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
- Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
- Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. *J Histotechnol*. 1999 Sep;22(3):177-92.
- Taylor CR, et al. *Biotech Histochem*. 1996 Jan;71(5):263-70.
- Center for Disease Control Manual. Guide: Safety Management, NO. CDC-22, Atlanta, GA. April 30, 1976 "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts."
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition* CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
- CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011
- College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. <http://www.cap.org> (800) 323-4040.
- O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
- Koretz K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques. *Histochemistry* 1987; 86:471-478.
- Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. *Lab Med*1983;14:767.
- Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradishperoxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *Am J Clin Path* 1980;73:626.
- Herman GE and Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. *Biotech & Histochem* 1991;66:194.
- Zhang W, et al. PRAME expression and promoter hypermethylation in epithelial ovarian cancer. *Oncotarget*, 2016 Jul; 7(29):45352-69.
- Lezcano C, et al. PRAME expression in melanocytic tumors. *Am J Surg Pathol*. 2018 Nov; 42(11):1456-65.

UltraLine 항체는 Biocare Medical LLC 가 단독으로 개발했으며 Ventana Medical Systems, Inc 또는 Roche 의 Biocare 항체 승인 또는 보증을 의미하지 않습니다. Biocare , Ventana 및 Roche 는 어떤 방식으로든 제휴, 관련 또는 관련이 없습니다. Ventana®, BenchMark®, ultraView 및 OptiView 는 Roche 의 상표입니다.

Biocare Medical LLC 가 단독으로 개발했으며 Leica Biosystems 의 Biocare 항체 승인 또는 보증을 의미하지 않습니다. Biocare 와 Leica Biosystems 는 어떤 방식으로든 제휴, 관련 또는 관련이 없습니다. Leica, Leica Biosystems, BOND-MAX 및 BOND-III 는 Leica Biosystems 의 상표입니다.

안전 및 성능 요약은 <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>에서 확인할 수 있습니다.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Latvian

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats				
Format	Catalog Number	Description	Dilution	Diluent
Concentrate	ACI 3252 A, B	0.1, 0.5 mL	1:100	Van Gogh Yellow
Predilute	API 3252 AA, G20, H	6.0, 20, 25 mL	Ready-to-use	N/A
ONCORE Pro	OPAI 3252 T60	60 tests	Ready-to-use	N/A
Q Series-- For Leica BOND-III	ALI 3252 G7	7.0 mL	Ready-to-use	N/A
UltraLine -- For BenchMark	AVI 3252 G, G25	6.0, 25 mL	Ready-to-use	N/A

Paredzētais lietojums:

In *vitro* diagnostikai

PRAME [EPR20330] ir trušu monoklonāla antiķiela, kas paredzēta lietošanai laboratorijā pēc sākotnējās audzēja diagnozes noteikšanas ar parasto histopatoloģiju, izmantojot neimunoloģiskus histoloģiskus traipus, PRAME proteīna kvalitatīvai identificēšanai ar imūnhistokīmiju (IHC) formalinā fiksētā parafinā. Iegultie (FFPE) cilvēka audi. Jebkuras iekrāsošanās vai tās neesamības klīniskā interpretācija ir jāpapildina ar morfoloģiskiem pētījumiem, izmantojot atbilstošas kontroles, un tā ir jānovērtē pacienta klīniskās vēstures un citu diagnostisko testu kontekstā, ko veic kvalificēts patologs, lai palīdzētu veikt jebkādas citas klīniskas noteikšanas.

Kopsavilkums un skaidrojums:

PRAME atrodas 22q11.22 hromosomā un kodē 509 aminoskābju proteīnu. PRAME ir autosomāla vēža-sēklinieku antigēna (CTA) gēns, kas ir pierādīts, ka tas izpaužas melanomā, dažādos nemelanocītiskos ļaundabīgos audzējos, tostarp nesīkšūnu plaušu vēzē, krūts karcinomā, olnīcu karcinomā un vairākos citos citos gadījumos. Ir zināms, ka normāli veseli audi neizsaka PRAME, izņemot sēkliniekus, olnīcas, virsnieru dziedzeri un dažus citus, kas minēti literatūrā. ^(15,16)

Procedūras princips:

Šo antiķiela produktu var izmantot kā primāro antiķiela formalinā fiksētu, parafinā iestrādātu audu sekciju imūnhistokīmiskajā pārbaudē. Kopumā imūnhistokīmiskā (IHC) krāsošanas metodes ļauj vizualizēt antigēnus, secīgi pielietojot a specifiska antiķiela pret antigēnu (primārā antiķiela), sekundārā antiķiela pret primāro antiķiela (neobligāta saite antiķiela/zonde), enzīmu komplekss un hromogēns substrāts ar starplikām mazgāšanas soļiem. Hrogēna fermentatīvā aktivizēšana rada redzamu reakcijas produktu antiķiela vietā. Pēc tam paraugu var iekrāsot un noslidēt vāku. Rezultāti tiek interpretēti, izmantojot gaismu mikroskopu un palīglicēkli patofizioloģisko procesu diferencāldiagnozē, kas var vai var nebūt saistīts ar noteiktu antiķienu.

Materiāli un metodes:

Piedāvātie reaģenti:

Uzņēmēja avots: Trušu monoklonāls

Sugas reaģētspēja: cilvēks. Citas sugas nav pārbaudītas.

Klons: EPR20330

Izotips: IgG

Olbaltumvielu koncentrācija: specifiska IgG koncentrācija: sazinieties ar Biocare tehnisko atbalstu

Specifiskums: PRAME

Šūnu lokalizācija: kodols un šūnu membrāna

Metode: Afinitātes attīrīts rekombinants trušu monoklonāls.

Atšķaidīšana, sajaukšana, atšķaidīšana, tīrēšana:

Iepriekš atšķaidīts antiķiela reaģents ir optimāli atšķaidīts lietošanai ar iepriekš minētajām krāsošanas sistēmām. Turpmāka atšķaidīšana var izraisīt antiķiela krāsojuma zudumu. Lietotājam ir jāapstiprina visas šādas izmaiņas. Atšķirības audu apstrādē un tehniskajās procedūrās lietotāja laboratorijā var radīt ievērojamas atšķirības rezultātos, tādēļ ir nepieciešama regulāra iekšējā kontrole (skatiet sadaļu Kvalitātes kontrole).

Koncentrētais reaģents ir jāatšķaida, kā norādīts iepriekš tabulā.

Zināmās lietojumprogrammas:

Imūnhistokīmija (formalinā fiksēti parafinā iestrādāti audi)

Piegādāts kā: buferēts sāls šķīdums, pH 5,9-7,9, kas satur proteīna nesēju un mazāk par 0,1% nātrija azīda konservantu. Papildinformāciju skatiet drošības datu lapā.

Nepieciešamie materiāli un reaģenti, kas nav nodrošināti:

Mikroskopa priekšmetstikliņi ir pozitīvi uzlādēti.
Pozitīvās un negatīvās audu kontroles
Tuksneša kamera (vai līdzīga žāvēšanas krāsns)
Ksilols vai ksilola aizstājējs
Etanols vai reaģenta spirts
Apslāņošanas kamera (spiediena plīts)
Dejonizēts vai destilēts ūdens
Mazgāšanas buferis
Priekšapstrādes reaģenti
Peroksidāzes blokāde
Olbaltumvielu bloks (pēc izvēles)
Detekcijas zonde un polimērs
Negatīvie kontroles reaģenti
Hrogēni
Hematoksilīns (pretkrāsa)
Bluing reaģents
Montāžas vide
Vāka stikls
Gaismas mikroskops (40-400X palielinājums)

Antiķiela produkta konfigurācijas ir pieejamas lietošanai iepriekš tabulā norādītajos instrumentos.

Uzglabāšana un stabilitāte:

Uzglabāt temperatūrā no 2°C līdz 8°C. Uzglabājot šādos apstākļos, produkts ir stabils līdz derīguma termiņam, kas uzdrūkats uz flakona etiķetes. Nelietot pēc derīguma termiņa beigām. Uzglabāšana citos apstākļos, izņemot norādītos, ir jāpārbauda. Atšķaidīti reaģenti jāizlieto nekavējoties; uzglabājiet atlikušo reaģentu 2°C līdz 8°C temperatūrā. Biocare nav noteikusi lietotāja atšķaidītā reaģenta stabilitāti .

Pozitīvās un negatīvās kontroles jāveic vienlaikus ar visiem pacienta paraugiem. Ja tiek novērota neparedzēta iekrāsošanās, ko nevar izskaidrot ar atšķirībām laboratorijas procedūrās, un ir aizdomas par problēmu ar antiķienu, sazinieties ar Biocare tehnisko atbalstu pa tālruni 1-800-542-2002 vai izmantojot tehniskā atbalsta informāciju, kas sniegta vietnē biocare.net.

Parauga sagatavošana:

Formalinā fiksēti audi ir piemēroti lietošanai pirms parafinā iestrādāšanas. Kaulu audi pirms audu apstrādes ir jāatkalķo, lai atvieglotu audu griešanu un novērstu mikrotomu asmeņu bojājumus. ^{1, 2}

Pareizi fiksēti un iestrādāti audi, kas ekspresē norādīto antiķienu mērķi, jāuzglabā vēsā vietā. 1988. gada Klīniskās laboratorijas uzlabošanas likumā (CLIA) 42. CFR § 493.1259(b) ir noteikts, ka "laboratorijai ir jāsauglabā iekrāsotie priekšmetstikliņi vismaz desmit gadus no datuma, kad pārbauda un saglabā paraugu blokus vismaz divus gadus no pārbaudes datuma. ³

 Biocare Medical

60 Berry Drive
Pacheco, CA 94553

USA

114/190



TP v3 (12/15/2021)

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080

 EMERGO EUROPE

Westervoortsedijk 60

8627 AT Arnhem

The Netherlands

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Latvian

BIOCARE
M E D I C A L

Audu apstrāde pirms krāsošanas:

Veiciet siltuma izraisītu epitopu izgūšanu (HIER) saskaņā ar tālāk ieteikto protokolu. Ir pierādīts, ka regulāra HIER lietošana pirms IHC samazina nekoncekvenci un standartizē krāsošanu. ^{4,5}

Brīdinājumi un piesardzības pasākumi :

- Šī antiViela satur mazāk nekā 0,1% nātrija azīda . Koncentrācijas, kas ir mazākas par 0,1%, nav ziņojami bīstami materiāli saskaņā ar US 29 CFR 1910.1200, OSHA Hazard communication un EK Direktīvu 91/155/EK. Nātrija azīds (NaN₃), ko izmanto kā konservantu, ir toksisks, ja to norīt. Nātrija azīds var reaģēt ar svina un vara santehniku, veidojot ļoti sprādzienbīstamus metālu azīdus . Pēc likvidēšanas izskalojiet ar lielu ūdens daudzumu, lai novērstu azīda uzkrāšanos santehnikā. (Slimību kontroles centrs, 1976, Nacionālais Darba drošības un veselības institūts, 1976) ⁶
- Paraugi pirms un pēc fiksācijas un visi tiem pakļautie materiāli ir jārikojas tā, it kā tie varētu pārnēsāt infekciju, un tie jāiznīcina, ievērojot atbilstošus piesardzības pasākumus. Nekad nepieņēmetiet reagentus iekšīgi un izvairieties no saskares ar ādu un gļotādām ar reagentiem un paraugiem. Ja reāģenti vai paraugi nonāk saskarē ar jutīgām zonām, nomazgājiet ar lielu ūdens daudzumu. ⁷
- Reaģentu mikrobu piesārņojums var izraisīt nespecifiskas krāsošanās palielināšanos.
- Inkubācijas laiki vai temperatūras, kas atšķiras no norādītajām, var sniegt kļūdainus rezultātus. Lietotājam ir jāapstiprina visas šādas izmaiņas.
- Nelietot reaģentu pēc derīguma termiņa beigām, kas norādīts uz flakona.
- Iepriekš atšķaidīts antiVielu reaģents ir optimāli atšķaidīts lietošanai . Turpmāka atšķaidīšana var izraisīt antigēna krāsojuma zudumu.
- Koncentrēta antiVielu reaģenta atšķaidīšana ir jāvaldī pirms lietošanas. Jebkurš Arī izmantotajam šķīdinātājam, kas nav īpaši ieteicams, ir jābūt apstiprinātam savietojamībai un stabilitātei.
- Izmetiet visus izlietotos reaģentus un visus citus piesārņotos vienreizlietojamus materiālus, ievērojot procedūras attiecībā uz infekcioziem vai potenciāli infekcioziem atkritumiem. Katra laboratorija ir atbildīga par cieto un šķidro atkritumu apstrādi atbilstoši to veidam un bīstamības pakāpei, kā arī to apstrādi un apglabāšanu (vai apstrādi un apglabāšanu) saskaņā ar spēkā esošajiem noteikumiem.
- Ievērojiet jūsu atrašanās vietas vietējos atkritumu likvidēšanas noteikumus, kā arī ieteikumus drošības datu lapā, lai noteiktu šī produkta drošu iznīcināšanu.
- SDS ir pieejams pēc pieprasījuma un atrodas <http://biocare.net>.
- Lai ziņotu par iespējamām nopietnām incidentiem saistībā ar šo ierīci, sazinieties ar vietējo Biocare pārstāvi un tās dalībvalsts vai valsts kompetento iestādi, kurā lietotājs ir reģistrēts.

Lietošanas instrukcija:

Ieteicamie krāsošanas protokoli PRAME [EPR20330]:

IntelliPATH FLX and manual use:

API3252 IntelliPATH FLX un manuālai lietošanai ir standartizēts ar MACH 4 noteikšanas sistēmu. Mazgāšanas soļiem izmantojiet TBS.	
Peroxide Block:	Bloķējiet 5 minūtes ar peroksīdētu 1.
Pretreatment:	Veiciet siltuma izgūšanu, izmantojot Borg Decloaker . Konkrētus norādījumus skatiet Borg Decloaker datu lapā.
Protein Block (Optional):	Inkubējiet 5-10 minūtes istabas temperatūrā ar Background Punisher.
Primary Antibody:	Inkubē 30 minūtes RT.
Detection:	Zonde: N/A
	Polimērs: inkubēt 30 minūtes RT ar sekundāri konjugētu polimēru.

Chromogen:	Inkubējiet 5 minūtes RT ar Biocare DAB – VAI – Inkubējiet 5–7 minūtes RT ar Warp Red.
Counterstain	Pretrāsot ar hematoksilīnu. Noskalo ar dejonizētu ūdeni. Uzklājiet Tacha's Bluing Solution 1 minūti. Noskalo ar dejonizētu ūdeni.

ONCORE Pro Automated Slide Staining System:

OPI3252 ir paredzēts lietošanai ar ONCORE Pro. Konkrētus lietošanas norādījumus skatiet lietotāja rokasgrāmatā. Protokola parametri protokola redaktorā jāieprogramē šādi:		
Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	PRAME Rb	PRAME Rb AP
Protocol Template (Description):	Special Template (ONCORE Pro-Tect Detection Required)	Rb AP Template 1
Dewaxing (DS Buffer Option):	DS2-50	DS Buffer
Antigen Retrieval (AR Option):	AR1, high pH; 103°C	AR1, high pH; 103°C
Block Option:	Buffer	Buffer
Reagent Name, Time, Temp.:	PRAME Rb, 45 min., 25°C	PRAME Rb, 30 min., 25°C

Ventana BenchMark ULTRA:

AVI3252 ir paredzēts lietošanai ar BenchMark ULTRA. Konkrētus lietošanas norādījumus skatiet lietotāja rokasgrāmatā. Ieteicamie protokola parametri ir šādi:	
Template/Detection:	OptiView DAB IHC
Pretreatment Protocol:	CC1 64 minūtes
Peroxidase:	Pirms primārās peroksīdāzes inhibitor
Primary Antibody:	32 minūtes, 36°C

Q Series – For Leica BOND-III:

ALI3252 ir paredzēts lietošanai ar Leica BOND-III. Konkrētus lietošanas norādījumus skatiet lietotāja rokasgrāmatā. Ieteicamie protokola parametri ir šādi:		
Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	IHC Protocol F	IHC Protocol J
Detection:	Bond Polymer Refine	Bond Polymer Refine Red
HIER:	20 min with ER2	20 min with ER2
Peroxide Block:	5 min	
Marker (Primary Antibody):	15 min	15 min
Post Primary:	8 min	
Polymer:	8 min	
Post Primary AP:		20 min
Polymer AP:		30 min
Mixed Chromogen Refine:	10 min	10 min + 5 min
Hematoxylin:	5 min	5 min

Kvalitātes kontrole:

Skatiet CLSI kvalitātes standartus imūnhistokīmijas testu izstrādei un ieviešanai; Apstiprināts vadlīniju otrais izdevums (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011 ⁸

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Latvian

BIOCARE
M E D I C A L

Pozitīvā audu kontrole: Melanoma, normāls sēklinieks

Ārējiem pozitīvās kontroles materiāliem jābūt svaigiem paraugiem, kas fiksēti, apstrādāti un pēc iespējas ātrāk jāievieto tādā pašā veidā kā pacienta paraugs(-i). Pozitīva audu kontrole liecina par pareizi sagatavotiem audiem un pareizām krāsošanas metodēm. Katrā krāsošanas ciklā jāiekļauj viena pozitīva ārējā audu kontrole katrai testa apstākļu kopai.

Ārējiem pozitīvās kontroles materiāliem izmantotie audi jāizvēlas no pacientu paraugiem ar labi raksturotu zemu pozitīvās mērķa aktivitātes līmeni, kas rada vāju pozitīvu krāsojumu. Zemais pozitīvātes līmenis ārējiem pozitīvajām kontrolēm ir paredzēts, lai nodrošinātu smalku primāro antivielu jutības izmaiņu noteikšanu no nestabilitātes vai problēmām ar IHC metodoloģiju. Tirdzniecībā pieejamie audu kontroles priekšmetstikliņi vai paraugi, kas apstrādāti atšķirīgi no pacienta parauga(-iem), apstiprina tikai reaģenta darbību un nepārbauda audu sagatavošanu.

Zināmas pozitīvās audu kontroles ir jāizmanto tikai apstrādāto audu un testa reaģentu pareizas darbības uzraudzībai, nevis kā palīgizdevi konkrētas pacienta paraugu diagnozes formulēšanā. Ja pozitīvās audu kontroles neizdodas uzrādīt pozitīvu iekrāsošanos, testa paraugu rezultāti jāuzskata par nederīgiem.

Negatīvo audu kontrole:

Izmantojiet negatīvu audu kontroli (pazīstama kā PRAME negatīva), kas fiksēta, apstrādāta un iestrādāta identiski pacienta paraugam(-iem) katrā krāsošanas ciklā, lai pārbaudītu IHC primārās antivielas specifiskumu. Mērķa antigēna demonstrēšana un sniegt norādi par specifisku fona krāsojumu (viltus pozitīva krāsošana). Arī dažādu šūnu tipu dažādība, kas atrodas lielākajā daļā audu sekciju, var laboratorijā izmantos kā iekšējās negatīvās kontroles vietas, lai pārbaudītu IHC darbību specifiskācijas. Paraugu veidi un avoti, ko var izmantot negatīviem audiem vadīklas ir uzskaitītas sadaļā Veiktspējas raksturlielumi.

Ja negatīvajā audu kontrolē notiek specifiska iekrāsošanās (viltus pozitīva iekrāsošanās), pacienta paraugu rezultāti jāuzskata par nederīgiem.

Nespecifiskā negatīvā reaģenta kontrole:

Primārās antivielas vietā izmantojiet nespecifisku negatīvu reaģenta kontroli ar katru pacienta parauga daļu, lai novērtētu nespecifisko krāsošanos un ļauj labāk interpretēt specifisko krāsojumu antigēna vietā. Ideālā gadījumā negatīvā reaģenta kontrole satur PRAME IgG antivielu, kas ražota no audu kultūras supernatanta tādā pašā veidā kā primārā. antiviela, bet tai nav specifiskas reaktivitātes ar cilvēka audiem tajā pašā matricā/šķīdumā kā Biocare antiviela. Negatīvās kontroles antivielu atšķaida līdz tādai pašai imūnglobulīna vai proteīna koncentrācijai kā atšķaidītajai primārajai antivielai antivielu, izmantojot identisku šķīdinātāju. Ja teļa augļa serums pēc apstrādes saglabājas tīrā antivielā, teļa augļa serums ar proteīna koncentrāciju, kas līdzvērtīga atšķaidītajai lietošanai ir piemērota arī primārā antivielā tajā pašā šķīdinātājā. (Skatīt pievienoto reaģentu). Atšķaidītāju vienu pašu var izmantot kā mazāk vēlamu alternatīvu iepriekš aprakstītajām negatīvajām reaģentu kontrolēm. Negatīvā reaģenta kontroles inkubācijas periodam jāatbilst primārās antivielas inkubācijas periodam.

Ja sērījveida sekcijās tiek izmantoti vairāku antivielu paneli, viena priekšmetstikliņa negatīvi iekrāsotie apgabali var kalpot kā negatīva/nospecifiska saistīšanās fona kontrole citām antivielām. Lai atšķirtu endogēno enzīmu aktivitāti vai nespecifisku enzīmu saistīšanos no specifiskās imūnreaktivitātes, papildu pacienta audus var iekrāsot tikai ar substrāta-hromogēna vai enzīmu kompleksiem (PAP, avidīns-biotīns, streptavidīns) un substrāta-hromogēnu, attiecīgi.

Testa pārbaude:

Pirms antivielas vai krāsošanas sistēmas sākotnējās izmantošanas diagnostikas procedūrā, lietotājam jāpārbauda antivielas specifika, pārbaudot to uz vairākiem iekšējiem audiem ar zināmiem imūnhistoķīmiskās veiktspējas raksturlielumiem, kas atspoguļo zināmus pozitīvus un negatīvus audus. Skatiet kvalitātes kontroles procedūras, kas iepriekš izklāstītas šajā

produkta ievietošanas sadaļā, un kvalitātes kontroles ieteikumus CAP⁹-imūnhistoķīmijas sertifikācijas programmā un/vai NCCLS IHC vadlīnijās¹⁰). Šīs kvalitātes kontroles procedūras jāatkārto katrai jaunai antivielu partijai vai ikreiz, kad notiek izmaiņas testa parametros. Veiktspējas raksturlielumu sadaļā uzskaitītie audi ir piemēroti testa pārbaudei.

Problēmu novēršana:

Ievērojiet antivielu specifiskā protokola ieteikumus saskaņā ar sniegto datu lapu. Ja rodas netipiski rezultāti, sazinieties ar Biocare tehnisko atbalstu pa tālruni 1-800-542-2002.

Krāsošanas interpretācija:

Pozitīvā audu kontrole:

Vispirms ir jāpārbauda pozitīvā audu kontrole, kas iekrāsota ar norādīto antivielu, lai pārliecinātos, ka visi reaģenti darbojas pareizi. Atbilstoša mērķa šūnu krāsošana (kā norādīts iepriekš) liecina par pozitīvu reaktivitāti. Ja pozitīvās audu kontroles neizdodas uzrādīt pozitīvu iekrāsošanos, visi testa paraugu rezultāti jāuzskata par nederīgiem.

Reakcijas produkta krāsa var atšķirties atkarībā no izmantotajiem substrāta hromogēniem. Paredzamās krāsu reakcijas skatiet substrāta iepakojuma lappusēs. Turklāt metahromāziju var novērot krāsošanas metodes variācijās.¹¹

Ja tiek izmantots pretkrāsojums, atkarībā no inkubācijas ilguma un izmantotā pretkrāsojuma stipruma, pretkrāsošana izraisīs šūnu kodolu krāsojumu. Pārmērīga vai nepilnīga pretkrāsošana var apdraudēt pareizu rezultātu interpretāciju. Skatiet protokolu(-s), lai uzzinātu par ieteicamo pretkrāsošanu.

Negatīvo audu kontrole:

Negatīvā audu kontrole jāpārbauda pēc pozitīvās audu kontroles, lai pārbaudītu primārās antivielas mērķa antigēna marķēšanas specifiku. Specifiskas iekrāsošanās trūkums negatīvajā audu kontrolē apstiprina antivielu krusteniskās reaktivitātes trūkumu pret šūnām/šūnu komponentiem. Ja negatīvā ārējā audu kontrolē notiek specifiska iekrāsošanās (viltus pozitīva iekrāsošanās), pacienta parauga rezultāti jāuzskata par nederīgiem.

Nespecifiska krāsošana, ja tāda ir, parasti ir izklaidēta. Sporadisku saistaudu iekrāsošanos var novērot arī sekcijās no pārmērīgi formalīna fiksētiem audiem. Krāsošanas rezultātu interpretācijai izmantojiet neskartas šūnas. Nekrotiskas vai deģenerētas šūnas bieži krāsojas nespecifiski.

Pacienta audi:

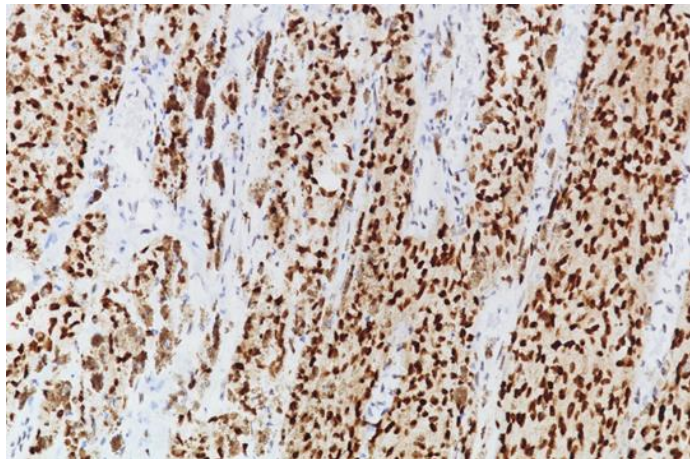
Pārbaudiet pacientu paraugus, kas iekrāsoti ar norādītajām antivielām Pēdējais. Pozitīvā krāsošanas intensitāte jānovērtē saistībā ar jebkuru nespecifisku negatīvā reaģenta kontroles fona krāsojumu. Tāpat kā ar jebkuru imūnhistoķīmisko testu, negatīvs rezultāts nozīmē, ka antigēns nav konstatēts, nevis antigēna nebija pārbaudītajās šūnās/audiem. Ja nepieciešams, izmantojiet antivielu paneli, lai identificētu viltus negatīvas reakcijas.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Latvian

BIOCARE
M E D I C A L



Melanoma iekrāsota ar PRAME [EPR20330] antivielu.

Lai iegūtu specifisku informāciju par norādīto antivielu imūnreaktivitāti, skatiet kopsavilkumu un skaidrojumu, ierobežojumus un veikspējas raksturielumus.

Ierobežojumi:

Vispārīgi ierobežojumi:

1. Lietošanai *in vitro* diagnostikai
2. Šis produkts ir paredzēts tikai profesionālai lietošanai: Imūnhistokīmija ir daudzpakāpju diagnostikas process, kas sastāv no specializētas apmācības atbilstošu reaģentu izvēlē; audu atlase, fiksācija un apstrāde; IHC priekšmetstikliņa sagatavošana; un krāsošanas rezultātu interpretācija.
3. Audu krāsošana ir atkarīga no audu apstrādes un apstrādes pirms krāsošanas. Nepareiza fiksācija, sasaldēšana, atkausēšana, mazgāšana, žāvēšana, karsēšana, sadalīšana vai piesārņošana ar citiem audiem vai šķidrumiem var radīt artefaktus, antivielu slazdošanu vai viltus negatīvus rezultātus. Nekonsekventi rezultāti var būt fiksācijas un iegulšanas metožu atšķirību dēļ vai audos raksturīgu nelīdzenumu dēļ.¹²
4. Pārmērīga vai nepilnīga pretkrāsošana var apdraudēt pareizu rezultātu interpretāciju.
5. Jebkuras pozitīvas vai negatīvas iekrāsošanās klīniskā interpretācija jānovērtē klīniskā attēla, morfoloģijas un citu histopatoloģisku kritēriju kontekstā. Jebkuras pozitīvas vai negatīvas iekrāsošanās klīniskā interpretācija jāpapildina ar morfoloģiskiem pētījumiem, izmantojot atbilstošus pozitīvus un negatīvus iekšējos un ārējos kontroles testus, kā arī citus diagnostikas testus. Kvalificēts patologs, kurš ir iepazinies ar pareizu IHC antivielu, reaģentu un metožu lietošanu, ir atbildīgs, lai interpretētu visas darbības, kas izmantotas, lai sagatavotu un interpretētu galīgo IHC preparātu.
6. Optimālais antivielu atšķaidījums un protokoli konkrētam lietojumam var atšķirties. Tie ietver (bet ne tikai) fiksāciju, siltuma iegūšanas metodi, inkubācijas laikus, audu sekcijas biežumu un izmantoto noteikšanas komplektu. Šo unikālo reaģentu augstākās jutības dēļ norādītie ieteicamie inkubācijas laiki un titri nav piemērojami citām noteikšanas sistēmām, jo rezultāti var atšķirties. Datu lapas ieteikumi un protokoli ir balstīti uz ekskluzīvu Biocare produktu izmantošanu. Galu galā pētnieka pienākums ir noteikt optimālos apstākļus.
7. Šis produkts nav paredzēts izmantošanai plūsmas citometrijā. Plūsmas citometrijas veikspējas raksturielumi nav noteikti.
8. Audos no personām, kas inficētas ar B hepatīta vīrusu un satur B hepatīta virsmas antigēnu (HBsAg), var būt nespecifiska iekrāsošanās ar mārrutku peroksidāzi.¹³
9. Reaģenti var parādīt negaidītas reakcijas iepriekš nepārbaudītos audos. Negaidītu reakciju iespējamību pat pārbaudītajās audu grupās nevar

pilnībā novērst antigēnu ekspresijas bioloģiskās variabilitātes dēļ jaunveidojumos vai citos patoloģiskos audos.¹⁴ Sazinieties ar Biocare tehnisko atbalstu pa tālruni 1-800-542-2002 vai izmantojot tehniskā atbalsta informāciju, kas sniegta vietnē biocare.net, norādot dokumentētu(-ām) negaidītu(-ām) reakciju(-ām).

10. Normāli/neimūnie serumi no tā paša dzīvnieku izcelsmes avota kā sekundārie antiserumi, ko izmanto bloķēšanas posmos, var izraisīt kļūdaini negatīvus vai kļūdaini pozitīvus rezultātus autoantivielu vai dabisko antivielu dēļ.
11. Kļūdaini pozitīvus rezultātus var redzēt proteīnu vai substrāta reakcijas produktu neimunoloģiskas saistīšanās dēļ. Tos var izraisīt arī pseidoperoksidāzes aktivitāte (eritrocīti), endogēna peroksidāzes aktivitāte (citohroms C) vai endogēns biotīns (piemēram, aknas, krūtis, smadzenes, nieres) atkarībā no izmantotā imūnkrāsas veida.¹²

Produkta specifiskie ierobežojumi:

Nav papildu produktu specifisku ierobežojumu.

Veikspējas raksturojums:

Reproducējamība:

Antivielu veikspējas reproducējamība tika pārbaudīta, testējot atlasītos normālos un audzēja audus dažādās dienās un dažādus instrumentus ar vairākiem operatoriem. Atlasīto audu krāsošana bija konsekventa un tika veikta, kā paredzēts.

Imūnreaktivitāte:

Tālāk 1. un 2. tabulā ir parādītas šādas pozitīvās un negatīvās imūnreaktivitātes.

Tālāk sniegtais saraksts nav pilnīgs, bet raksturo imūnreaktivitātes veidus, kas novēroti ar norādīto antivielu.

Šim produktam nav novērota zināma nespecifiska antivielu reaktivitāte.

Sagaidāmo rezultātu kopsavilkums:

PRAME izplatība normālos un slimības stāvokļa audos tika novērtēta, izmantojot audu mikroarrays (TMA).

Pārbaudītie normālie audi iekrāsājās, kā paredzēts, sēkliniekos tika novērots augsts iekrāsošanās līmenis, bet citos audos nebija iekrāsošanās.

PRAME krāsojums tika novērots augstā līmenī melanomas gadījumā, kā paredzēts, un dažādos līmeņos citos vēža audos, piemēram, olnīcās, plaušās, prostatā un krūtīs.

Analītiskā veikspēja:

Tika veikti krāsošanas testi jutīguma un specifiskuma noteikšanai, un rezultāti ir uzskaitīti zemāk.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Latvian

BIOCARE
M E D I C A L

Jutība un specifika:

1. tabula. Antivienu jutība un specifiskums tika noteikts, pārbaudot FFPE normālos audus.

Audu	Pozitīvi gadījumi	Kopējais lietu skaits
Smadzenes	0	6
Smadzenītes	0	3
Virsnieru dziedzeris	0	3
Olnīca	0	3
Aizkuņģa dziedzeris	0	3
Traheja	0	3
Hipofīze	0	3
Sēklinieks*	3	3
Vairogdziedzeris	0	3
Krūtis	0	3
Liesa	0	3
Mandeles	0	3
Thymus	0	3
Kaulu smadzenes**	0	1
Plaušu	0	3
Sirds	0	3
Barības vads	0	3
Vēders	0	3
Tievās zarnas	0	3
Kols	0	3
Aknas	0	3
Siekalu dziedzeris	0	3
Nieres	0	3
Prostata	0	3
Dzemde	0	3
Dzemes kakls	0	3
Skeleta muskulis	0	3
Āda	0	3
Perifērais nervs	0	3
Oderējuma šūnas	0	3
Galva, kakls un siekalu dziedzeri	0	6
Limfmezģis	0	3

* 3-4 stipruma kodolkrāsošana

** Trūkst divu paraugu

2. tabula. Antivienu jutīgums un specifiskums tika noteikts, pārbaudot dažādus FFPE neoplastiskus audus.

Patoloģija	Pozitīvi gadījumi	Kopējais lietu skaits
Melanoma	29	39
Olnīcu vēzis	9	44
Krūts vēzis	10	26
Resnās zarnas vēzis	4	43
Plaušu vēzis	21	50
Prostata vēzis	18	41
Virsnieru garozas karcinoma	0	1
Urīnpūšļa vēzis	0	2
Meningioma	0	2
Astrocitoma	0	1
Plakanšūnu karcinoma (barības vads)	0	2
Adenokarcinoma (kuņģis)	0	2
Adenokarcinoma (tievās zarnas)	0	1
Adenokarcinoma (resnās un taisnās zarnas)	0	6
Nieru vēzis	0	2
Aknu vēzis	0	4
Limfoma	0	3
Plakanšūnu karcinoma (galva un kakls, mutes dobums, mēle)	0	1
Nazofaringeālā karcinoma	1	1
Adenokarcinoma (aizkuņģa dziedzeris)	0	1
Adenokarcinoma (prostata)	0	2
Adenoīda cistiskā karcinoma (galva un kakls, siekalu dziedzeri)	0	1
Plakanšūnu karcinoma (āda)	0	1
Seminoma	0	2
Vairogdziedzera vēzis	0	2
Dzemes kakla vēzis	0	2
Endometrija vēzis	1	2

PRAME ekspresija dažādās neoplazmās var uzrādīt mainīgu procentuālo audzēja pozitivitāti. Skatiet 3. tabulu, lai uzzinātu pozitīvās iekrāsošanās audzēja šūnu procentuālo daudzumu (klasificēts pēc kvartilām), kas novērots dažādos audzējos, kas atrodami 2. tabulā.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody

901-3252-092023

Latvian

BIOCARE
M E D I C A L

3. tabula. Procentuāli pozitīvas audzēja šūnu iekrāsošanās dažādās FFPE neoplazmās.

Audus	Audzēja šūnu iekrāsošanās gadījumu procentuālā daļa, kas uzrāda iekrāsošanos, procentuālā daļa no kopējā gadījumu skaita (%)				
	<1%	1-25%	26-50%	51-75%	> 75%
Olnīcu vēzis	35/44 (79,5%)	2/44 (4,5%)	3/44 (6,8%)	3/44 (6,8%)	1/44 (2,3%)
Krūts vēzis	16/26 (61,5%)	26/26 (26,9%)	1/26 (3,8%)	26/26 (7,7%)	0 (0%)
Resnās zarnas vēzis	39/43 (88,4%)	4/43 (11,6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Plaušu vēzis	29/50 (58,0%)	7/50 (14,0%)	4/50 (8,0%)	7/50 (14,0%)	3/50 (6,0%)
Prostata vēzis	23/41 (56,1%)	9/41 (22,0%)	3/41 (7,3%)	2/41 (4,9%)	4/41 (9,8%)
Nazofaringeālā karcinoma	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1/1 (100%)
Endometrija vēzis	1/2 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	1/2 (50%)	0 (0%)
Melanoma	10/39 (25,6%)	6/39 (15,4%)	5/39 (12,8%)	6/39 (15,4%)	12/39 (30,8%)

Procentuālā audzēja šūnu iekrāsošanās, kas parādīta visām krāsošanas intensitātēm.

Krāsošana uz audiem, kas parāda dažādus PRAME proteīna ekspresijas līmeņus.

Analītiskās veiktspējas pārbaudes rezultāti parādīja, ka PRAME [EPR20330] antivēla var pareizi noteikt PRAME proteīnu, izmantojot definēto IHC protokolu. Patoloģiskie audi testa rezultāti apstiprina secinājumu, ka PRAME [EPR20330] ir jutīgs pret PRAME proteīnu, ja tiek izmantoti ieteiktie IHC protokoli. PRAME [EPR20330] antivēla spēj noteikt zemu vai augstu PRAME proteīna līmeni. Parastā audu pārbaude neliecināja par negaidītu PRAME noteikšanu 32 audu tipos. Nebija negaidītas savstarpējas reakcijas. Rezultāti apstiprina apgalvojumu, ka PRAME [EPR20330] antivēla ir ļoti specifiska (analītiskā specifika) pret PRAME proteīnu.

Klīniskā veiktspēja:

Tika veikti krāsošanas testi diagnostiskās jutības un specifiskuma noteikšanai, un rezultāti ir uzskaitīti zemāk. Pozitīva un negatīva imūnreaktivāte ir reģistrēta 4. tabulā.

Trīs melanomas TMA priekšmetstikliņi tika iekrāsoti Biocare un nosūtīti ārējam patoloģam, lai tos nolasītu un novērtētu. Melanomas audos bija dažādi krāsošanas rādītāji, sākot no 0 (negatīvs) līdz spēcīgam (4). Lielākajai daļai melanocītu nevus nebija PRAME reaktivitātes, bet dažiem bija spēcīga reaktivāte.

4. tabula. Procentuāli pozitīvas audzēja šūnu iekrāsošanās dažādās FFPE melanocītiskās neoplazmās un ādā.

Audus	Audzēja šūnu iekrāsošanās gadījumu procentuālā daļa, kas uzrāda iekrāsošanos, procentuālā daļa no kopējā gadījumu skaita (%)				
	<1%	1-25%	26-50%	51-75%	> 75%
Melanoma	28/133 (21,1%)	50/133 (37,6%)	10/133 (7,5%)	8/133 (6,0%)	37/133 (27,8%)
Metastātiska melanoma	7/38 (18,4%)	10/38 (26,3%)	3/38 (7,9%)	2/38 (5,3%)	16/38 (42,1%)
Melanocītu nevi	12/14 (85,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2/12 (14,3%)
Āda	10/10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Procentuālā audzēja šūnu iekrāsošanās, kas parādīta visām krāsošanas intensitātēm.

Krāsošana uz audiem, kas parāda dažādus PRAME proteīna ekspresijas līmeņus.

Testa primārais galapunkts bija PRAME [EPR20330] antivēlu diagnostiskās jutības novērtēšana IHC procedūrā, kas definēta kā apstiprināto pozitīvo paraugu pozitīvās melanomas noteikšanas ātrums. [TP/(TP+FN)]

Sekundārais galapunkts bija novērtēt diagnostikas specifiku — apstiprināto melanomas negatīvo paraugu negatīvo noteikšanas līmeni. [TN/(TN+FP)]

Bija 35 viltus negatīvi melanomas gadījumi, kas bija saņēmuši zelta standarta patoloģisko novērtējumu kā melanomu, bet bija negatīvi attiecībā uz PRAME. 136 gadījumi bija patiesi pozitīvi, jo viņiem tika diagnosticēta melanoma un tika parādīts signāls PRAME. 14 melanocītu nevi paraugos, kas tika diagnosticēti kā labdabīgi un kuri liecināja par PRAME, tika atklāti divi viltus pozitīvi rezultāti.

No datiem aprēķinātā diagnostiskā jutība = $136 / (136 + 35) = 79,5\%$

No datiem aplēstā diagnostikas specifika = $22 / (22 + 2) = 91,7\%$

Pamatojoties uz mūsu aprēķiniem, mēs iegūstam aptuveno diagnostisko jutību 79,5% un aplēsto diagnostisko specifiku 91,7% melanomas noteikšanai.

No tā mēs secinām, ka PRAME [EPR20330] antivēla, ko Biocare pārbaudīja uz melanomas un melanocītu nevi paraugiem, ir jutīga pret melanomu un ļoti specifiska melanomai.

Problēmu novēršana: (sniedziet skaidrojumu par katru no tālāk norādītajiem punktiem)

1. Priekšmetstikliņi nav iekrāsoti – pārbaudiet, lai noteiktu, vai ir izmantoti atbilstoši pozitīvās kontroles audi, antivēlas un noteikšanas produkti.
2. Vāja visu priekšmetstikliņu krāsošana – pārbaudiet, lai noteiktu, vai ir izmantoti atbilstoši pozitīvās kontroles audi, antivēlas un noteikšanas produkti.
3. Pārmērīgs visu priekšmetstikliņu fons — var būt augsts endogēnā biotīna līmenis (ja izmanto noteikšanas produktus uz biotīna bāzes), endogēna HRP aktivitāte, kas pārvērš hromogēnu krāsainā galaproduktā (izmantojiet peroksīdāzes bloku) vai pārmērīga nespecifiskā proteīna mijiedarbība (izmantojiet proteīnu). blokādi, piemēram, bloķējošs šķīdums uz seruma vai kazeīna bāzes).
4. Audu sekcijas nomazgā priekšmetstikliņus inkubācijas laikā – pārbaudiet priekšmetstikliņus, lai pārliecinātos, ka tie ir pozitīvi uzlādēti.
5. Īpaša krāsošanās ir pārāk tumša – pārbaudiet protokolu, lai noteiktu, vai priekšmetstikliņiem ir piemērots pareizs antivēlu tīrs, kā arī pareizu

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Latvian

BIOCARE
M E D I C A L

visu reaģentu inkubācijas laiku. Turklāt pārlicinieties, ka protokolā ir pietiekami daudz mazgāšanas soļu, lai pēc inkubācijas darbību pabeigšanas noņemtu liekos reaģentus.

Atsauces:

1. Kiernan JA. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. *Theory and Practice of Histotechnology*. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. *J Histotechnol*. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. *Biotech Histochem*. 1996 Jan;71(5):263-70.
6. Center for Disease Control Manual. Guide: Safety Management, NO. CDC-22, Atlanta, GA. April 30, 1976 "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts."
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition* CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
8. CLSI *Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2)* CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011
9. College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. [Http://www.cap.org](http://www.cap.org) (800) 323-4040.
10. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. *Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline*. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
11. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. *Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques*. *Histochemistry* 1987; 86:471-478.
12. Nadji M, Morales AR. *Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls*. *Lab Med*1983;14:767.
13. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. *Nonimmunologic binding of horseradishperoxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry*. *Am J Clin Path* 1980;73:626.
14. Herman GE and Elfont EA. *The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control*. *Biotech & Histochem* 1991;66:194.
15. Zhang W, et al. *PRAME expression and promoter hypermethylation in epithelial ovarian cancer*. *Oncotarget*, 2016 Jul; 7(29):45352-69.
16. Lezcano C, et al. *PRAME expression in melanocytic tumors*. *Am J Surg Pathol*. 2018 Nov; 42(11):1456-65.

Ultraline antivielas izstrādā tikai Biocare Medical LLC, un tas nenozīmē, ka Ventana Medical Systems, Inc vai Roche ir apstiprinājusi vai apstiprinājusi Biocare antivielas. Biocare, Ventana un Roche nav nekādā veidā saistīti, saistīti vai saistīti. Ventana®, BenchMark®, ultraView un OptiView ir Roche preču zīmes.

Q sērijas antivielas izstrādā tikai Biocare Medical LLC, un tas nenozīmē, ka Leica Biosystems ir apstiprinājusi vai apstiprinājusi Biocare antivielas. Biocare un Leica Biosystems nav nekādā veidā saistīti, saistīti vai saistīti. Leica, Leica Biosystems, BOND-MAX un BOND-III ir Leica Biosystems preču zīmes.

Kopsavilkums par drošību un veiktspēju ir atrodams šeit:
<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Lithuanian

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats				
Format	Catalog Number	Description	Dilution	Diluent
Concentrate	ACI 3252 A, B	0.1, 0.5 mL	1:100	Van Gogh Yellow
Predilute	API 3252 AA, G20, H	6.0, 20, 25 mL	Ready-to-use	N/A
ONCORE Pro	OPAI 3252 T60	60 tests	Ready-to-use	N/A
Q Series-- For Leica BOND-III	ALI 3252 G7	7.0 mL	Ready-to-use	N/A
UltraLine -- For BenchMark	AVI 3252 G, G25	6.0, 25 mL	Ready-to-use	N/A

Paskirtis:

In vitro diagnostikos naudojimui

PRAME [EPR20330] yra triušio monokloninis antikūnas, skirtas naudoti laboratorijoje po to, kai pradinė naviko diagnozė buvo atlikta įprastine histopatologija, naudojant neimunologines histochemines dėmes, kokybiniam PRAME baltymo identifikavimui imunohistochemijos (IHC) būdu formalinu fiksuotame parafine. Įterptųjų (FFPE) žmogaus audinių. Klinikinis bet kokio dažymo ar jo nebuvimo aiškinimas turėtų būti papildytas morfologiniais tyrimais, naudojant tinkamą kontrolę, ir turėtų būti įvertintas atsižvelgiant į paciento klinikinę istoriją ir kitus diagnostinius tyrimus, kuriuos atlieka kvalifikuotas patologas, kad būtų galima atlikti kitus klinikinius sprendimus.

Santrauka ir paaiškinimas:

PRAME yra 22q11.22 chromosomoje ir koduoja 509 aminorūgščių baltymą. PRAME yra autosominio vėžio ir sėklidžių antigeno (CTA) genas, kuris, kaip buvo įrodyta, gali būti išreikštas melanomos, įvairių nemelanocitinių piktybinių navikų, įskaitant nesmulkiąstelinį plaučių vėžį, krūties karcinomą, kiaušidžių karcinomą ir kai kuriuos kitus nurodytus atvejus. Nežinoma, kad normalūs sveiki audiniai išreiškia PRAME, išskyrus sėklides, kiaušides, antinksčius ir keletą kitų literatūroje nurodytų. ^(15,16)

Procedūros principas:

Šis antikūnų produktas gali būti naudojamas kaip pagrindinis antikūnas atliekant formalinu fiksuotų, parafinu įterptųjų audinių pjūvių imunohistocheminius tyrimus. Apskritai imunohistocheminis (IHC) dažymo metodai leidžia vizualizuoti antigenus nuosekliai taikant a specifinis antikūnas prieš antigeną (pirminis antikūnas), antrinis antikūnas prieš pirminį antikūną (neprivalomas antikūnas/zondas), fermentų kompleksas ir chromogeninis substratas su tarpinėmis plovimo etapais. Dėl fermentinio chromogeno aktyvavimo antigeno vietoje susidaro matomas reakcijos produktas. Tada mėginys gali būti nudažytas ir dangtis nuslysta. Rezultatai interpretuojami naudojant lemputę mikroskopu ir pagalba diferencinei patofiziologiniu procesų diagnostikai, kurie gali arba gali būti nesuję su konkrečiu antigenu.

Medžiagos ir metodai:

Pateikiami reagentai:

Šeimininkas Šaltinis: triušis monokloninis

Rūšių reaktyvumas: žmogus. Kitos rūšys netirtos.

Klonas: EPR20330

Izotipas: IgG

Baltymų koncentracija: specifinė IgG koncentracija: susisiekite su Biocare technine pagalba

Specifiškumas: PRAME

Laštelių lokalizacija: Branduolys ir laštelių membrana

Metodas: Afinitetu išgrynintas monokloninis rekombinantinis triušis.

Atskiedimas, maišymas, skiedimas, titravimas:

Iš anksto praskiestas antikūnų reagentas yra optimaliai atskiestas naudoti su aukščiau išvardytomis dažymo sistemomis. Tolesnis skiedimas gali sukelti antigeno dažymo praradimą. Vartotojas turi patvirtinti visus tokius pakeitimus. Dėl audinių apdorojimo ir techninių procedūrų skirtumų naudotojo laboratorijoje rezultatai gali labai skirtis, todėl reikia reguliariai atlikti vidaus kontrolę (žr. Kokybės kontrolės skyrių).

Koncentruotą reagentą reikia skiesti, kaip nurodyta aukščiau esančioje lentelėje.

Žinomos programos:

Imunohistochemija (formalinu fiksuoti audiniai, įterpti į parafiną)

Tiekiamas kaip: Buferinis druskos tirpalas, pH 5,9–7,9, kuriame yra baltymų nešiklio ir mažiau nei 0,1 % natrio azido konservanto. Daugiau informacijos rasite saugos duomenų lape.

Reikalingos, bet nepateiktos medžiagos ir reagentai:

Mikroskopo skaidrės įkrautos teigiamai.

Teigiama ir neigiama audinių kontrolė

Dykumos kamera (arba panaši džiovinimo krosnis)

Ksilenas arba ksileno pakaitalas

Etanolis arba alkoholio reagentas

Užblokavimo kamera (slėginė viryklė)

Dejonizuotas arba distiliuotas vanduo

Skalbimo buferis

Pirminio apdorojimo reagentai

Peroksidazės blokada

Baltymų blokas (neprivaloma)

Aptikimo zondas ir polimeras

Neigiami kontroliniai reagentai

Chromogenai

Hematoksilinas (priežastis)

Mėlynojo reagentas

Montavimo terpė

Dengiamasis stiklas

Šviesos mikroskopas (40-400X padidinimas)

Antikūnų produkto konfigūracijas galima naudoti aukščiau esančioje lentelėje nurodytais instrumentais.

Sandėliavimas ir stabilumas:

Laikyti 2°C – 8°C temperatūroje. Laikant tokiomis sąlygomis, produktas yra stabilus iki galiojimo datos, nurodytos ant buteliuko etiketės. Nenaudoti pasibaigus tinkamumo laikui. Turi būti patikrintas saugojimas bet kokiomis kitokiomis sąlygomis nei nurodytos. Praskiesti reagentai turi būti naudojami nedelsiant; likusį reagentą laikykite 2–8 °C temperatūroje. Biocare nenustatė vartotojo praskiesto reagento stabilumo .

Teigiamas ir neigiamas kontrolė turi būti atliekama vienu metu su visais paciento mėginiais. Jei pastebimas netikėtas dažymas, kurio negalima paaiškinti laboratorinių procedūrų skirtumais, ir įtariate antikūnų problemą, susisiekite su Biocare techninės pagalbos tarnyba telefonu 1-800-542-2002 arba per techninės pagalbos informaciją, pateiktą biocare.net.

Mėginio paruošimas:

Formalinu fiksuoti audiniai tinkami naudoti prieš įterpiant į parafiną. Kauliniai audiniai turi būti nukalkinti prieš audinių apdorojimą, kad būtų lengviau nupjauti audinį ir nepažeisti mikrotomo ašmenų. ^{1, 2}

Tinkamai fiksuoti ir įterpti audiniai, išreikšiantys nurodytą antigeno taikinį, turi būti laikomi vėsioje vietoje. 1988 m. Klinikinių laboratorijų tobulinimo

 Biocare Medical

60 Berry Drive

Pacheco, CA 94553

USA

121/190



TP v3 (12/15/2021)

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080

 EMERGO EUROPE

Westervoortsedijk 60

6827 AT Arnhem

The Netherlands

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Lithuanian

įstatymo (CLIA) 42 CFR § 493.1259(b) reikalaujama, kad „Laboratorija turi išlaikyti nudažytus stiklineis mažiausiai dešimt metų nuo iširti ir saugoti mėginių blokus mažiausiai dvejus metus nuo tyrimo datos.“³

Audinių gydymas prieš dažymą:

Atlikite šilumos sukeltą epitopų paiešką (HIER) pagal toliau pateiktą rekomenduojamą protokolą. Įrodyta, kad įprastas HIER naudojimas prieš IHC sumažina nenuoseklumą ir standartizuoja dažymą.^{4,5}

Įspėjimas ir atsargumo priemonės:

1. Šiame antikūne yra mažiau nei 0,1 % natrio azido. Pagal US 29 CFR 1910.1200, OSHA pranešimus apie pavojų ir EB direktyvą 91/155/EB, mažesnės nei 0,1 % koncentracijos nėra pavojingos medžiagos. Natrio azidas (NaN₃), naudojamas kaip konservantas, yra toksiškas prarijus. Natrio azidas gali reaguoti su švino ir vario vandentikiu ir sudaryti labai sprogius metalo azidus. Išmetus, nuplaukite dideliu kiekiu vandens, kad vandentikiyje nesikaupytų azidas. (Ligų kontrolės centras, 1976, Nacionalinis darbuotojų saugos ir sveikatos institutas, 1976)⁶
2. Mėginiai prieš ir po fiksavimo bei visos su jais paveiktos medžiagos turi būti tvarkomos taip, lyg galėtų perduoti infekciją, ir sunaikintos laikantis tinkamų atsargumo priemonių. Niekada nepilkite reagentų pipete per burną ir venkite reagentų bei mėginių sąlyčio su oda ir gleivinėmis. Jei reagentai ar mėginiai pateko į jautrias vietas, nuplaukite dideliu kiekiu vandens.⁷
3. Mikrobinis reagentų užterštumas gali padidinti nespecifinį dažymą.
4. Kitos nei nurodytos inkubacijos trukmės arba temperatūros rezultatai gali duoti klaidingus rezultatus. Vartotojas turi patvirtinti visus tokius pakeitimus.
5. Nenaudokite reagento pasibaigus tinkamumo laikui, nurodytam ant buteliuko.
6. Iš anksto praskiestas antikūnų reagentas yra optimaliai atskiestas naudojimui. Tolesnis skiedimas gali sukelti antigeno dažymo praradimą.
7. Koncentruoto antikūno reagento praskiedimas turi būti patvirtintas prieš naudojimą. Bet koks naudojamas skiediklis, kuris nėra specialiai rekomenduojamas, taip pat turi būti patvirtintas dėl suderinamumo ir stabilumo.
8. Išmeskite visus panaudotus reagentus ir visas kitas užterštas vienkartinės medžiagas laikydamiesi infekcinių arba potencialiai infekcinių atliekų pašalinimo. Kiekviena laboratorija yra atsakinga už kietųjų ir skystųjų atliekų tvarkymą pagal jų pobūdį ir pavojingumo laipsnį bei jų apdorojimą ir šalinimą (arba pasirūpinimą, kad jos būtų apdorotos ir pašalintos) pagal galiojančias taisykles.
9. Laikykities vietinių jūsų vietos atliekų šalinimo taisyklių ir saugos duomenų lapo rekomendacijų, kad nustatytumėte, kaip saugiai išmesti šį gaminį.
10. SDS galima gauti paprašius ir jis yra adresu <http://biocare.net>.
11. Norėdami pranešti apie įtariamus rimtus incidentus, susijusius su šiuo prietaisu, susisieki su vietiniu Biocare atstovu ir valstybės narės arba šalies, kurioje yra įsisteigęs naudotojas, kompetentinga institucija.

Naudojimo instrukcijos:

Rekomenduojami PRAME dažymo protokolai [EPR20330]:

IntelliPATH FLX and manual use:

API3252, skirtas IntelliPATH FLX ir rankiniam naudojimui, buvo standartizuotas su MACH 4 aptikimo sistema. Skalavimo etapams naudokite TBS.	
Peroxide Block:	Blokuokite 5 minutes su Peroxidized 1.
Pretreatment:	Atlikite šilumos paėmimą naudodami Borg Decloaker. Konkrečių instrukcijų ieškokite Borg Decloaker duomenų lape.
Protein Block (Optional):	Inkubuokite 5–10 minučių kambario temperatūroje su Background Punisher.
Primary Antibody:	Inkubuokite 30 minučių kambario temperatūroje.
Detection:	Zondas: N/A Polimeras: inkubuokite 30 minučių kambario temperatūroje su antriniu konjuguotu polimeru.

BIOCARE
M E D I C A L

Chromogen:	Inkubuokite 5 minutes kambario temperatūroje su Biocare DAB – ARBA – Inkubuokite 5–7 minutes kambario temperatūroje su Warp Red.
Counterstain	Priešgaisrinis dažymas hematoksilinu. Nuplaukite dejonizuotu vandeniu. Taikyti Tacha's Bluing tirpalą 1 minutę. Nuplaukite dejonizuotu vandeniu.

ONCORE Pro Automated Slide Staining System:

OPI3252 skirtas naudoti su ONCORE Pro. Konkrečių naudojimo instrukcijų ieškokite vartotojo vadove. Protokolo parametrai protokolų rengyklėje turi būti užprogramuoti taip:		
Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	PRAME Rb	PRAME Rb AP
Protocol Template (Description):	Special Template (ONCORE Pro-Tect Detection Required)	Rb AP Template 1
Dewaxing (DS Buffer Option):	DS2-50	DS Buffer
Antigen Retrieval (AR Option):	AR1, high pH; 103°C	AR1, high pH; 103°C
Block Option:	Buffer	Buffer
Reagent Name, Time, Temp.:	PRAME Rb, 45 min., 25°C	PRAME Rb, 30 min., 25°C

Ventana BenchMark ULTRA:

AVI3252 skirtas naudoti su BenchMark ULTRA. Konkrečių naudojimo instrukcijų ieškokite vartotojo vadove. Rekomenduojami protokolo parametrai yra tokie:	
Template/Detection:	OptiView DAB IHC
Pretreatment Protocol:	CC1 64 minutes
Peroxidase:	Pre-Primary Peroxidase Inhibitor
Primary Antibody:	32 minutes, 36°C

Q Series – For Leica BOND-III:

ALI3252 skirtas naudoti su Leica BOND-III. Konkrečių naudojimo instrukcijų ieškokite vartotojo vadove. Rekomenduojami protokolo parametrai yra tokie:		
Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	IHC Protocol F	IHC Protocol J
Detection:	Bond Polymer Refine	Bond Polymer Refine Red
HIER:	20 min with ER2	20 min with ER2
Peroxide Block:	5 min	
Marker (Primary Antibody):	15 min	15 min
Post Primary:	8 min	
Polymer:	8 min	
Post Primary AP:		20 min
Polymer AP:		30 min
Mixed Chromogen Refine:	10 min	10 min + 5 min
Hematoxylin:	5 min	5 min

Kokybės kontrolė:

Žr. CLSI Imunohistocheminių tyrimų projektavimo ir įgyvendinimo kokybės standartus; Patvirtintas gairių antrasis leidimas (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA JAV (www.clsi.org). 2011⁸

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Lithuanian

BIOCARE
M E D I C A L

Teigiama audinių kontrolė: Melanoma, normali sėklidė

Išorinės teigiamos kontrolės medžiagos turi būti švieži mėginiai, užfiksuoti, apdoroti ir įterpti kuo greičiau tokiu pačiu būdu, kaip ir paciento mėginys (-iai). Teigiamas audinių kontrolė rodo tinkamai paruoštus audinius ir tinkamus dažymo būdus. Į kiekvieną dažymo eigą turėtų būti įtraukta viena teigiama išorinio audinio kontrolė kiekvienam tyrimo sąlygų rinkiniui.

Audiniai, naudojami išorinėms teigiamoms kontrolinėms medžiagoms, turėtų būti parenkami iš pacientų mėginių, kurių teigiamas tikslinis aktyvumas yra žemas, o tai suteikia silpną teigiamą dažymą. Žemas teigiamumo lygis išorinėms teigiamoms kontrolėms skirtas užtikrinti subtilių pirminių antikūnų jautrumo pokyčių, atsirandančių dėl nestabilumo arba problemų, susijusių su IHC metodika, aptikimą. Parduodamos audinių kontrolinės skaidrės arba mėginiai, apdoroti kitaip nei paciento mėginys (-iai), patvirtina tik reagento veikimą ir netikrina audinių paruošimo.

Žinomos teigiamos audinių kontrolės priemonės turėtų būti naudojamos tik norint stebėti tinkamą apdorotų audinių ir tiriamųjų reagentų veikimą, o ne kaip pagalbiniė priemonė nustatant konkrečią paciento mėginių diagnozę. Jei teigiami audinių kontroliniai mėginiai neparodo teigiamo dažymosi, bandinių rezultatai turėtų būti laikomi negaliojančiais.

Neigiamų audinių kontrolė:

Naudokite neigiamą audinių kontrolę (žinoma, kad PRAME neigiama), fiksuotą, apdorotą ir įterptą tokiu pačiu būdu kaip paciento mėginys (-iai) kiekvieną dažymo ciklą, kad patikrintumėte IHC pirminio antikūno specifiškumą. tikslinio antigeno demonstravimas ir specifinio fono dažymo požymis (klaidingai teigiamas dažymas). Be to, daugumoje audinių sekcijų gali būti įvairių tipų ląstelių Laboratorijos gali naudoti kaip vidines neigiamos kontrolės vietas, kad patikrintų IHC veikimą specifikacijas. Mėginių, kurie gali būti naudojami neigiamiems audiniams, tipai ir šaltiniai valdikliai išvardyti skyriuje Veikimo charakteristikos.

Jei neigiamų audinių kontrolėje atsiranda specifinis dažymas (klaidingai teigiamas dažymas), paciento mėginių rezultatai turėtų būti laikomi negaliojančiais.

Nespecifinė neigiamo reagento kontrolė:

Vietoj pirminio antikūno naudokite nespecifinio neigiamo reagento kontrolę su kiekvieno paciento mėginio dalimi, kad įvertintumėte nespecifinį dažymąsi ir

leidžia geriau interpretuoti specifinį dažymąsi antigeno vietoje. Idealiu atveju neigiamo reagento kontrolėje yra PRAME IgG antikūnas, pagamintas iš audinių kultūros supernatanto taip pat, kaip ir pirminis antikūnas, bet neturi specifinio reaktyvumo su žmogaus audiniais toje pačioje matricoje / tirpale kaip ir Biocare antikūnas. Praskieskite neigiamą kontrolinį antikūną iki tokios pat imunoglobulino ar baltymo koncentracijos kaip ir praskiestas pirminis antikūnas naudojant identišką skiediklį. Jei po apdorojimo veršelio vaisiaus serumas lieka gryname antikūne, veršelio vaisiaus serume, kurio baltymų koncentracija lygi praskiestai Pirminis antikūnas tame pačiame skiediklyje taip pat tinkamas naudoti. (Žr. pateiktą reagentą). Vien tik skiediklis gali būti naudojamas kaip mažiau pageidautina anksčiau aprašytų neigiamų reagentų kontrolės alternatyva. Neigiamo reagento kontrolės inkubacinis laikotarpis turi atitikti pirminio antikūno inkubacinį laikotarpį.

Kai serijiniuose pjūviuose naudojamos kelių antikūnų plokštės, vieno stiklelio neigiamai nusidažiusios sritys gali būti neigiamos / nespecifinės kitų antikūnų surišimo fono kontrolė. Norint atskirti endogeninį fermentų aktyvumą arba nespecifinį fermentų prisijungimą nuo specifinio imunoreaktyvumo, papildomi paciento audiniai gali būti nudažyti tik atitinkamai substrato-chromogeno arba fermentų kompleksais (PAP, avidino-biotino, streptavidino) ir substrato-chromogenu.

Tyrimo patvirtinimas:

Prieš pradėdamas naudoti antikūną arba dažymo sistemą diagnostinėje procedūroje, vartotojas turėtų patikrinti antikūno specifiškumą, išbandydamas jį su keletu vidinių audinių su žinomomis

imunohistocheminėmis charakteristikomis, atitinkančiomis žinomus teigiamus ir neigiamus audinius. Žr. kokybės kontrolės procedūras, anksčiau aprašytas šiame gaminio informacinio lapelio skyriuje, ir BŽŪP⁹ imunohistochemijos sertifikavimo programos ir (arba) NCCLS IHC gairės¹⁰ kokybės kontrolės rekomendacijas. Šios kokybės kontrolės procedūros turi būti kartojamos kiekvienai naujai antikūnų partijai arba kiekvieną kartą, kai pasikeičia tyrimo parametrai. Veikimo charakteristikų skyriuje išvardyti audiniai yra tinkami tyrimo patikrinimui.

Problemų sprendimas:

Laikykites specifinių antikūnų protokolo rekomendacijų pagal pateiktą duomenų lapą. Jei atsiranda netipinių rezultatų, susisiekite su Biocare technine pagalba telefonu 1-800-542-2002.

Dažymo aiškinimas:

Teigiama audinių kontrolė:

Pirmiausia reikia iširti teigiamą audinių kontrolę, nudažytą nurodytu antikūnu, siekiant įsitikinti, kad visi reagentai veikia tinkamai. Tinkamas tikslinių ląstelių dažymas (kaip nurodyta aukščiau) rodo teigiamą reaktyvumą. Jei teigiami audinių kontroliniai mėginiai neparodo teigiamo dažymosi, visi bandinių rezultatai turėtų būti laikomi negaliojančiais.

Reakcijos produkto spalva gali skirtis priklausomai nuo naudojamų substrato chromogenų. Numatytas spalvų reakcijas žr. pagrindo pakuotės lapeliuose. Be to, metachromazija gali būti stebima dažymo metodo variantuose.¹¹ Kai naudojamas kontrastinis dažymas, priklausomai nuo inkubacijos trukmės ir naudojamo priešinio dažymo stiprumo, priešdažymas sukels ląstelių branduolių spalvą. Pernelyg didelis arba neišsamus dažymas gali pakenkti tinkamam rezultatų interpretavimui. Žr. protokolą (-us) dėl rekomenduojamo priešdažo.

Neigiamų audinių kontrolė :

Neigiama audinių kontrolė turėtų būti iširta po teigiamos audinių kontrolės, siekiant patikrinti tikslinio antigeno žymėjimo pirminiu antikūnu specifiškumą. Specifinio dažymo nebuvimas neigiamoje audinių kontrolėje patvirtina antikūnų kryžminio reaktyvumo su ląstelėmis / ląstelių komponentais nebuvimą. Jei neigiamo išorinio audinio kontrolėje atsiranda specifinis dažymas (klaidingai teigiamas dažymas), paciento mėginio rezultatai turėtų būti laikomi negaliojančiais.

Nespecifinis dažymas, jei yra, paprastai turi difuzinį vaizdą. Sporadinis jungiamojo audinio dažymas taip pat gali būti stebimas pjūviuose iš pernelyg formalino fiksuotų audinių. Dažymo rezultatams interpretuoti naudokite nepažeistas ląsteles. Nekrotinės arba išsigimusios ląstelės dažnai nusidažo nespecifiškai.

Paciento audiniai:

Ištirkite paciento mėginis, nudažytus nurodytais antikūnais paskutinis. Teigiamas dažymo intensyvumas turėtų būti vertinamas atsižvelgiant į bet kokį nespecifinį neigiamo reagento kontrolės foninį dažymą. Kaip ir bet kurio imunohistocheminio tyrimo atveju, neigiamas rezultatas reiškia, kad antigenas nebuvo aptiktas, o ne tai, kad antigeno nebuvo tiriamose ląstelėse / audiniuose. Jei reikia, naudokite antikūnų grupę, kad nustatytumėte klaidingai neigiamas reakcijas.



60 Berry Drive
Pacheco, CA 94553
USA

123/190



TP v3 (12/15/2021)

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080



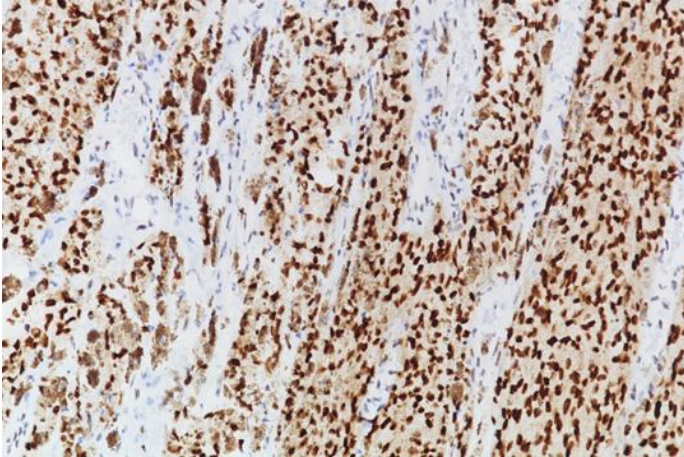
Westervoortsedijk 60
8627 AT Arnhem
The Netherlands

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Lithuanian

BIOCARE
M E D I C A L



Melanoma, nudažyta PRAME [EPR20330] antikūnu.

Konkrečios informacijos apie nurodytą antikūnų imunoreaktyvumą žr. Santrauka ir paaiškinimas, Apribojimai ir Veikimo charakteristikos.

Apribojimai:

Bendrieji apribojimai:

1. Naudoti *in vitro* diagnostikai
2. Šis gaminytis skirtas tik profesionaliam naudojimui: Imunohistochemija yra daugiapakopis diagnostikos procesas, kurį sudaro specializuoti mokymai parinkti tinkamus reagentus; audinių parinkimas, fiksavimas ir apdorojimas; IHC stiklelio paruošimas; ir dažymo rezultatų interpretavimas.
3. Audinių dažymas priklauso nuo audinio tvarkymo ir apdorojimo prieš dažymą. Netinkamas fiksavimas, užšaldymas, atšildymas, plovimas, džiovinimas, kaitinimas, pjaustymas arba užteršimas kitais audiniais ar skysčiais gali sukelti artefaktus, antikūnų įstrigimą arba klaidingai neigiamus rezultatus. Nenuoseklūs rezultatai gali atsirasti dėl fiksavimo ir įterpimo metodų skirtumų arba dėl įgimtų audinių nelygumų.¹²
4. Pernelyg didelis arba neišsamus dažymas gali pakenkti tinkamam rezultatų interpretavimui.
5. Klinikinis bet kokio teigiamo ar neigiamo dažymo aiškinimas turi būti įvertintas atsižvelgiant į klinikinį vaizdą, morfologiją ir kitus histopatologinius kriterijus. Klinikinis bet kokio teigiamo ar neigiamo dažymo aiškinimas turėtų būti papildytas morfologiniais tyrimais, naudojant tinkamą teigiamą ir neigiamą vidinę ir išorinę kontrolę, taip pat kitus diagnostinius tyrimus. Kvalifikuotas patologas, susipažinęs su tinkamu IHC antikūnų, reagentų ir metodų naudojimu, yra atsakingas už visus veiksmus, naudojamus ruošiant ir interpretuojant galutinį IHC preparatą.
6. Optimalus antikūnų skiedimas ir protokolai konkrečiam naudojimui gali skirtis. Tai apima, bet tuo neapsiribojant, fiksavimą, šilumos atgavimo metodą, inkubacijos laiką, audinio pjūvio storį ir naudojamą aptikimo rinkinį. Dėl didesnio šių unikalių reagentų jautrumo išvardyti rekomenduojami inkubavimo laikai ir titrai netaikomi kitoms aptikimo sistemoms, nes rezultatai gali skirtis. Duomenų lapo rekomendacijos ir protokolai yra pagrįsti išskirtiniu Biocare produktų naudojimu. Galiausiai tyrėjas turi nustatyti optimalias sąlygas.
7. Šis produktas nėra skirtas naudoti srauto citometrijoje. Srauto citometrijos veikimo charakteristikos nenustatytos.
8. Asmenų, užsikrėtusių hepatito B virusu ir turinčių hepatito B paviršiaus antigeno (HBsAg), audiniai gali būti nespecifiniai krienų peroksidaze.¹³
9. Reagentai gali parodyti netikėtas reakcijas anksčiau nepatikrintuose audiniuose. Netikėtų reakcijų galimybės net tirtose audinių grupėse negali būti visiškai pašalintos dėl biologinio antigeno ekspresijos neoplazmų ar kitų patologinių audinių kintamumo.¹⁴ Susisiekite su Biocare technine pagalba telefonu 1-800-542-2002 arba per techninės

pagalbos informaciją, pateiktą biocare.net, ir pateikite dokumentuotą (-as) netikėtą (-as) reakciją (-as).

10. Normalūs/neimuniniai serumai iš to paties gyvūninio šaltinio kaip ir antriniai antiserumai, naudojami blokavimo etapuose, dėl autoantikūnų arba natūralių antikūnų gali sukelti klaidingai neigiamus arba klaidingai teigiamus rezultatus.
11. Klaidingai teigiami rezultatai gali būti matomi dėl neimunologinio baltymų ar substrato reakcijos produktų prisijungimo. Juos taip pat gali sukelti pseudoperoksidazės aktyvumas (eritrocitai), endogeninis peroksidazės aktyvumas (citochromas C) arba endogeninis biotinas (pvz., kepenys, krūtys, smegenys, inkstai), priklausomai nuo naudojamos imuninės dažų rūšies.¹²

Specifiniai gaminio apribojimai:

Jokių papildomų specifinių gaminio apribojimų.

Veikimo charakteristikos:

Atkuriamumas:

Antikūnų veikimo atkuriamumas buvo patikrintas tiriant atrinktus normalius ir naviko audinius įvairiomis dienomis ir įvairiais instrumentais su keliais operatoriais. Pasirinktų audinių dažymas buvo nuoseklus ir atliktas taip, kaip tikėtasi.

Imunoreaktyvumas:

Toliau pateikiami teigiami ir neigiami imunoreaktyvumai parodyti 1 ir 2 lentelėse.

Toliau pateiktas sąrašas nėra baigtinis, bet apibūdina imunoreaktyvumo tipus, pastebėtus naudojant nurodytą antikūną.

Šio produkto nespecifinio antikūnų reaktyvumo nepastebėta.

Tikėtinų rezultatų suvestinė:

PRAME paplitimas normaliuose ir ligos būklės audiniuose buvo įvertintas naudojant audinių mikrogardelius (TMA).

Ištirti normalūs audiniai nusidažė taip, kaip tikėtasi, sėklidėse buvo pastebėtas didelis dažymas, o kituose audiniuose nesidažyta.

PRAME dažymas buvo pastebėtas aukštu lygiu melanomos atveju, kaip ir tikėtasi, ir skirtingu lygiu kituose vėžio audiniuose, tokiuose kaip kiaušidės, plaučiai, prostata ir krūtis.

Analitinis našumas:

Buvo atlikti dažymo jautrumo ir specifškumo testai, o rezultatai pateikti žemiau .

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Lithuanian

BIOCARE
M E D I C A L

Jautrumas ir specifiškumas:

1 lentelė. Antikūno jautrumas ir specifiškumas buvo nustatytas tiriant normalius FFPE audinius.

Audinis	Teigiami atvejai	Iš viso atvejų
Smegenėlės	0	6
Smegenėlės	0	3
Antinksčiai	0	3
Kiaušidės	0	3
Kasa	0	3
Trachėja	0	3
Hipofizė	0	3
Sėklidė*	3	3
Skydliaukė	0	3
Krūtinė	0	3
Blūžnis	0	3
Tonzilė	0	3
Užkrūčio liauka	0	3
Kaulų čiulpai**	0	1
Plaučiai	0	3
Širdis	0	3
Stemplė	0	3
Skrandis	0	3
Plonoji žarna	0	3
Dvitaškis	0	3
Kepenys	0	3
Seilių liauka	0	3
Inkstas	0	3
Prostata	0	3
Gimda	0	3
Gimdos kaklelis	0	3
Skeletinis raumuo	0	3
Oda	0	3
Periferinis nervas	0	3
Pamušalo ląstelės	0	3
Galva, kaklas ir seilių liaukos	0	6
Limfmazgis	0	3

* 3-4 stiprumo branduolinis dažymas

** Trūksta dviejų pavyzdžių

2 lentelė. Antikūno jautrumas ir specifiškumas buvo nustatytas tiriant įvairius FFPE neoplastinius audinius.

Patologija	Teigiami atvejai	Iš viso atvejų
Melanoma	29	39
Kiaušidžių vėžys	9	44
Krūties vėžys	10	26
Storosios žarnos vėžys	4	43
Plaučių vėžys	21	50
Prostatos vėžys	18	41
Antinksčių žievės karcinoma	0	1
Pūslės vėžys	0	2
Meningioma	0	2
Astrocitoma	0	1
Plokščialąstelinė karcinoma (stemplė)	0	2
Adenokarcinoma (skrandžio)	0	2
Adenokarcinoma (plonoji žarna)	0	1
Adenokarcinoma (storosios ir tiesiosios žarnos)	0	6
Inkstų vėžys	0	2
Kepenų vėžys	0	4
Limfoma	0	3
Plokščialąstelinė karcinoma (galvos ir kaklo, burnos ertmės, liežuvio)	0	1
Nosiaryklės karcinoma	1	1
Adenokarcinoma (kasa)	0	1
Adenokarcinoma (prostata)	0	2
Adenoidinė cistinė karcinoma (galvos ir kaklo, seilių liaukos)	0	1
Plokščialąstelinė karcinoma (odos)	0	1
Seminoma	0	2
Skydliaukės vėžys	0	2
Gimdos kaklelio vėžys	0	2
Endometriumo vėžys	1	2

PRAME ekspresija įvairiose neoplazmose gali turėti skirtingą auglio pozityvumo procentą. Žr. 3 lentelę, kurioje pateikiamas teigiamas dažymosi naviko ląstelių procentas (surūšiuotas pagal kvartilius), pastebėtas įvairiuose 2 lentelėje pateiktuose navikuose.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Lithuanian

BIOCARE
M E D I C A L

3 lentelė. Procentinis teigiamas naviko ląstelių dažymas įvairiose FFPE neoplazmose.

Audiniai	Procentas navikinių ląstelių dažymo atvejų, kai nudažytas, procentas iš viso # atvejų (%)				
	<1 %	1-25 %	26-50 proc.	51-75 proc.	> 75 proc.
Kiaušidžių vėžys	35/44 (79,5 %)	2/44 (4,5 %)	3/44 (6,8 %)	3/44 (6,8 %)	1/44 (2,3 %)
Krūties vėžys	16/26 (61,5 %)	7/26 (26,9 %)	1/26 (3,8 %)	2/26 (7,7 %)	0 (0 %)
Storosios žarnos vėžys	39/43 (88,4 %)	4/43 (11,6 %)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Plaučių vėžys	29/50 (58,0 %)	7/50 (14,0 %)	4/50 (8,0 %)	7/50 (14,0 %)	3/50 (6,0 %)
Prostatos vėžys	23/41 (56,1 %)	9/41 (22,0 %)	3/41 (7,3 %)	2/41 (4,9 %)	4/41 (9,8 %)
Nosiaryklės karcinoma	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1/1 (100 %)
Endometriumo vėžys	1/2 (50 %)	0 (0%)	0 (0%)	1/2 (50 %)	0 (0%)
Melanoma	10/39 (25,6 %)	6/39 (15,4 %)	5/39 (12,8 %)	6/39 (15,4 %)	12/39 (30,8 %)

Procentinis naviko ląstelių dažymas, pateiktas pagal visus dažymo intensyvumus.

Dažymas ant audinių, rodančių skirtingą PRAME baltymų ekspresijos lygį.

Analitinio veikimo testo rezultatai parodė, kad PRAME [EPR20330] antikūnas gali teisingai aptikti PRAME baltymą, kai naudojamas apibrėžtas IHC protokolai. Nenormalūs audinių tyrimo rezultatai patvirtina išvadą, kad naudojant rekomenduojamus IHC protokolus PRAME [EPR20330] yra jautrus PRAME baltymui. PRAME [EPR20330] antikūnas gali aptikti nuo mažo iki didelio PRAME baltymo kiekio. Normalus audinių tyrimas neparodė netikėto PRAME aptikimo 32 audinių tipuose. Nebuvo netikėto kryžminio reaktyvumo. Rezultatai patvirtina teiginį, kad PRAME [EPR20330] antikūnas yra labai specifinis (analitinis specifiskumas) PRAME baltymui.

Klinikinis efektyvumas:

Buvo atlikti dažymo testai diagnostiniam jautrumui ir specifiskumui nustatyti, o rezultatai pateikti žemiau. Teigiamas ir neigiamas imunoreaktyvumas užfiksuotas 4 lentelėje.

Trys melanomos TMA stikleliai buvo nudažyti Biocare ir išsiųsti išoriniam patologui, kad jis būtų perskaitytas ir įvertintas. Melanomos audinių dažymo balai svyravo nuo 0 (neigiamas) iki stipraus (4). Dauguma melanocitinių nevių neparodė PRAME reaktyvumo, tačiau kai kurie turėjo stiprų reaktyvumą.

4 lentelė. Procentinis teigiamas naviko ląstelių dažymas įvairiose FFPE melanocitinėse neoplazmose ir odoje.

Audiniai	Procentas navikinių ląstelių dažymo atvejų, kai nudažytas, procentas iš viso # atvejų (%)				
	<1 %	1-25 %	26-50 proc.	51-75 proc.	> 75 proc.
Melanoma	28/133 (21,1 %)	50/133 (37,6 %)	10/133 (7,5 %)	8/133 (6,0 %)	37/133 (27,8 %)
Metastazavusi melanoma	7/38 (18,4 %)	10/38 (26,3 %)	3/38 (7,9 %)	2/38 (5,3 %)	16/38 (42,1 %)
Melanocitinis nevi	12/14 (85,7 %)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2/12 (14,3 %)
Oda	10/10 (100 %)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Procentinis naviko ląstelių dažymas, pateiktas pagal visus dažymo intensyvumus.

Dažymas ant audinių, rodančių skirtingą PRAME baltymų ekspresijos lygį.

Pagrindinis testo tikslas buvo įvertinti PRAME [EPR20330] antikūno diagnostinį jautrumą IHC procedūroje, apibrėžiamą kaip teigiamą melanomos aptikimo dažnį patvirtintuose teigiamuose mėginiuose. [TP/(TP+FN)]

Antrinis tikslas buvo įvertinti diagnostinį specifiskumą – patvirtintų melanomos neigiamų mėginių neigiamą aptikimo dažnį. [TN/(TN+FP)]

Buvo 35 klaidingai neigiami melanomos atvejai, kuriems buvo suteiktas aukso standarto patologinis įvertinimas kaip melanoma, tačiau PRAME buvo neigiami. 136 atvejai buvo tikrai teigiami, nes jiems buvo diagnozuota melanoma ir buvo signalas PRAME. 14 melanocitinių nevi mėginių, kurie buvo diagnozuoti kaip gerybiniai, buvo aptikti du klaidingi teigiami rezultatai, kurie parodė PRAME signalą.

Iš duomenų įvertintas diagnostinis jautrumas = $136 / (136 + 35) = 79,5$ proc.
Iš duomenų įvertintas diagnostinis specifiskumas = $22 / (22 + 2) = 91,7$ proc.

Remiantis mūsų skaičiavimais, apytikslis diagnostinis jautrumas yra 79,5%, o melanomos aptikimo diagnostinis specifiskumas yra 91,7%.

Iš to darome išvadą, kad PRAME [EPR20330] antikūnas, kurį Biocare ištyrė su melanomos ir melanocitinių nevi mėginiais, yra jautrus melanomai ir labai specifinis melanomai.

Trikčių šalinimas: (Pateikite kiekvieno toliau pateikto punkto paaiškinimą)

- Jokių stiklelių nesidažyta – Patikrinkite, ar buvo naudojami tinkami teigiami kontroliniai audiniai, antikūnai ir aptikimo produktai.
- Silpnas visų stiklelių dažymas – Patikrinkite, ar buvo naudojami tinkami teigiami kontroliniai audiniai, antikūnai ir aptikimo produktai.
- Per didelis visų skaidrių fonas – gali būti didelis endogeninis biotino kiekis (jei naudojami biotino pagrindu pagaminti aptikimo produktai), endogeninis HRP aktyvumas, paverčiantis chromogeną spalvotu galutiniu produktu (naudokite peroksidazės bloką) arba perteklinė nespecificinė baltymų sąveika (naudokite baltymą). blokuoti, pvz., serumo arba kazeino pagrindu pagamintą blokuojantį tirpalą).
- Inkubacijos metu audinių sekcijos nuplaunamos nuo stiklelių – Patikrinkite stiklelius, kad įsitikintumėte, jog jie yra teigiamai įkrauti.
- Specifinis dažymas per tamsus – Patikrinkite protokolą, kad nustatytumėte, ar ant stiklelio buvo pritaikytas tinkamas antikūnų titras, taip pat tinkamas visų reagentų inkubacijos laikas. Be to, įsitinkite, kad protokole yra pakankamai plovimo etapų, kad pašalintumėte reagentų perteklių po inkubacijos etapų.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Lithuanian

BIOCARE
M E D I C A L

Nuorodos:

1. Kiernan JA. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. J Histotechnol. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. Biotech Histochem. 1996 Jan;71(5):263-70.
6. Center for Disease Control Manual. Guide: Safety Management, NO. CDC-22, Atlanta, GA. April 30, 1976 "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts."
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
8. CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011
9. College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. Http://www.cap.org (800) 323-4040.
10. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
11. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques. Histochemistry 1987; 86:471-478.
12. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Lab Med 1983;14:767.
13. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradishperoxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. Am J Clin Path 1980;73:626.
14. Herman GE and Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech & Histochem 1991;66:194.
15. Zhang W, et al. PRAME expression and promoter hypermethylation in epithelial ovarian cancer. Oncotarget, 2016 Jul; 7(29):45352-69.
16. Lezcano C, et al. PRAME expression in melanocytic tumors. Am J Surg Pathol. 2018 Nov; 42(11):1456-65.

Ultraline antikūnus kuria tik Biocare Medical LLC ir tai nereiškia, kad Ventana Medical Systems, Inc. ar Roche patvirtino ar patvirtino Biocare antikūnus. „Biocare“ , „Ventana“ ir „Roche“ nėra jokių būdu susijusios, nesusijusios ar susijusios. Ventana®, BenchMark® , ultraView ir OptiView yra Roche prekių ženklai.

Q serijos antikūnus sukūrė tik „ Biocare Medical LLC“ ir tai nereiškia, kad „ Leica Biosystems“ patvirtino ar patvirtino „ Biocare “ antikūnus. „Biocare“ ir „Leica Biosystems“ nėra jokių būdu susijusios, nesusijusios ar susijusios. Leica, Leica Biosystems, BOND-MAX ir BOND-III yra Leica Biosystems prekių ženklai.

Saugos ir veikimo santrauką rasite čia: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Norwegian

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats				
Format	Catalog Number	Description	Dilution	Diluent
Concentrate	ACI 3252 A, B	0.1, 0.5 mL	1:100	Van Gogh Yellow
Predilute	API 3252 AA, G20, H	6.0, 20, 25 mL	Ready-to-use	N/A
ONCORE Pro	OPAI 3252 T60	60 tests	Ready-to-use	N/A
Q Series-- For Leica BOND-III	ALI 3252 G7	7.0 mL	Ready-to-use	N/A
UltraLine -- For BenchMark	AVI 3252 G, G25	6.0, 25 mL	Ready-to-use	N/A

Tiltenkt bruk:

For *in vitro* diagnostisk bruk

PRAME [EPR20330] er et monoklonalt kaninantistoff som er beregnet for laboratoriebruk etter at den første diagnosen av svulsten er gjort ved konvensjonell histopatologi ved bruk av ikke-immunologiske histokjemiske farginger, i kvalitativ identifikasjon av PRAME- protein ved immunhistokjemi (IHC) i formalinfiksert parafin- innebygd (FFPE) menneskelig vev. Den kliniske tolkningen av enhver farging eller dens fravær bør kompletteres med morfologiske studier med bruk av riktige kontroller og bør evalueres i sammenheng med pasientens kliniske historie og andre diagnostiske tester av en kvalifisert patolog som en hjelp til å foreta andre kliniske avgjørelser.

Sammendrag og forklaring:

PRAME er lokalisert på kromosom 22q11.22 og koder for et protein på 509 aminosyrer. PRAME er et autosomalt kreft-testis-antigen (CTA)-gen som har vist seg å komme til uttrykk i melanom, ulike ikke-melanocytiske maligne neoplasmer, inkludert ikke-småcellet lungekreft, brystkarsinom, ovariekarsinom og flere andre som er nevnt. Normalt sunt vev er ikke kjent for å uttrykke PRAME bortsett fra testikler, eggstokker, binyrer og noen få andre som er nevnt i litteraturen. ^(15,16)

Prosedyreprinsipp:

Dette antistoffproduktet kan brukes som det primære antistoffet i immunhistokjemite testing av formalinfikserte, parafininnstøpte vevsnett. Generelt immunhistokjemisk (IHC) fargeteknikker tillater visualisering av antigener via sekvensiell påføring av en spesifikt antistoff mot antigenet (primært antistoff), et sekundært antistoff mot det primære antistoffet (valgfritt koblingsantistoff/probe), et enzymkompleks og et kromogent substrat med mellomliggende vasketrinn. Den enzymatiske aktiveringen av kromogenet resulterer i et synlig reaksjonsprodukt på antigenstedet. Prøven kan deretter motfarges og dekslet gli. Resultatene tolkes ved hjelp av et lys mikroskop og hjelp i differensialdiagnose av patofysiologiske prosesser, som kan eller kan ikke være assosiert med et bestemt antigen.

Materialer og metoder:

Reagenser som følger med:

Vertskilde: Kanin monoklonal

Artsreaktivitet: Menneske. Andre arter ikke testet.

Klon: EPR20330

Isotype: IgG

Proteinkonsentrasjon: Spesifikk IgG-konsentrasjon: Kontakt Biocares tekniske støtte

Spesifisitet: PRAME

Cellulær lokalisering: Kjerne og cellemembran

Metode: Affinitetsrenset rekombinant kanin monoklonal.

Rekonstituering, blanding, fortykning, titrering:

Forhåndsfortynnet antistoffreagens er optimalt fortynnet for bruk med fargesystemene ovenfor. Ytterligere fortykning kan føre til tap av antigenfarging. Brukeren må validere enhver slik endring. Forskjeller i vevsbehandling og tekniske prosedyrer i brukerens laboratorium kan gi betydelig variasjon i resultatene som krever regelmessig utførelse av interne kontroller (se avsnittet Kvalitetskontroll).

Konsentrert reagens krever fortykning som angitt i tabellen ovenfor.

Kjente applikasjoner:

Immunhistokjemi (formalinfiksert parafininnstøpt vev)

Leveres som: Bufret saltvannsløsning, pH 5,9-7,9 som inneholder en proteinbærer og mindre enn 0,1 % natriumazidkonserveringsmiddel. Se sikkerhetsdatabladet for ytterligere detaljer.

Materialer og reagenser som trengs, men følger ikke med:

Mikroskopobjektglass positivt ladet.
Positive og negative vevskontroller
Desert Chamber (eller lignende tørkeovn)
Xylen eller xylenstatning
Etanol eller reagens alkohol
Decloaking Chamber (trykkoker)
Avionisert eller destillert vann
Vaskebuffer
Forbehandlingsreagenser
Peroksidase blokk
Proteinblokk (valgfritt)
Deteksjonssonde og polymer
Negative kontrollreagenser
Kromogener
Hematoxylin (motfarging)
Blånende reagens
Monteringsmedium
Dekkglass
Lysmikroskop (40-400X forstørrelse)

Konfigurasjoner av antistoffproduktet er tilgjengelig for bruk på instrumentene som er angitt i tabellen ovenfor.

Lagring og stabilitet:

Oppbevares ved 2°C til 8°C. Produktet er stabilt til utløpsdatoen som er trykt på hetteglassetiketten, når det oppbevares under disse forholdene. Må ikke brukes etter utløpsdato. Oppbevaring under andre forhold enn de som er spesifisert, må verifiseres. Fortynnede reagenser bør brukes umiddelbart; oppbevar eventuelt gjenværende reagens ved 2°C til 8°C. Stabiliteten til brukerfortynnet reagens er ikke fastslått av Biocare.

Positive og negative kontroller bør kjøres samtidig med alle pasientprøver. Hvis det observeres uventet farging som ikke kan forklares av variasjoner i laboratorieprosedyrer og det er mistanke om et problem med antistoffet, kontakt Biocares tekniske støtte på 1-800-542-2002 eller via den tekniske støtteinformasjonen på biocare.net.

Prøveforberedelse:

Vev fikset i formalin er egnet for bruk før parafininnstøping. Ossøst vev bør avkalkes før vevsbehandling for å lette skjæring av vev og forhindre skade på mikrotombladene. ^{1, 2}

Riktig fiksert og innebygd vev som uttrykker det spesifiserte antigenmålet, bør oppbevares på et kjølig sted. The Clinical Laboratory Improvement Act (CLIA) av 1988 krever i 42 CFR § 493.1259(b) at "Laboratoriet må beholde fargede objektglass minst ti år fra datoen for undersøkelse og oppbevaringsprøveblokker i minst to år fra eksamensdatoen." ³

 Biocare Medical

60 Berry Drive
Pacheco, CA 94553

USA

128/190



TP v3 (12/15/2021)

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080

 EMERGO EUROPE

Westervoortsedijk 60

8627 AT Arnhem

The Netherlands

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Norwegian

BIOCARE
M E D I C A L

Behandling av vev før farging:

Utfør Heat Induced Epitope Retrieval (HIER) i henhold til anbefalt protokoll nedenfor. Rutinemessig bruk av HIER før IHC har vist seg å minimere inkonsekvens og standardisere farging. ^{4,5}

Advarsel og forholdsregler :

1. Dette antistoffet inneholder mindre enn 0,1 % natriumazid . Konsentrasjoner mindre enn 0,1 % er ikke rapporterbare farlige materialer i henhold til US 29 CFR 1910.1200, OSHA Hazard Communication og EC-direktiv 91/155/EC. Natriumazid (NaN₃) brukt som konserveringsmiddel er giftig ved inntak. Natriumazid kan reagere med bly- og kobberør og danne svært eksplosive metallazider . Ved avhending, skyll med store mengder vann for å forhindre oppbygging av azid i rørløpingsnett. (Center for Disease Control, 1976, National Institute of Occupational Safety and Health, 1976) ⁶
2. Prøver, før og etter fiksering, og alt materiale som eksponeres for dem, skal håndteres som om de er i stand til å overføre infeksjon og kastes med riktige forholdsregler. Pipetter aldri reagenser gjennom munnen og unngå kontakt med hud og slimhinner med reagenser og prøver. Hvis reagenser eller prøver kommer i kontakt med sensitive områder, vask med rikelige mengder vann. ⁷
3. Mikrobiell kontaminering av reagenser kan føre til en økning i uspesifikk farging.
4. Andre inkubasjonstider eller temperaturer enn de spesifiserte kan gi feilaktige resultater. Brukeren må validere enhver slik endring.
5. Ikke bruk reagens etter utløpsdatoen som er trykt på hetteglasset.
6. Forhåndsfortynnet antistoffreagens er optimalt fortynnet for bruk . Ytterligere fortykning kan føre til tap av antigenfarging.
7. Fortyning av konsentrert antistoffreagens må valideres før bruk. Noen fortykningsmiddel som ikke er spesifikt anbefalt, må også valideres for kompatibilitet og stabilitet.
8. Kast alle brukte reagenser og alle andre kontaminerte engangsmaterialer ved å følge prosedyrer for smittefarlig eller potensielt smittefarlig avfall. Det er hvert laboratoriums ansvar å håndtere fast og flytende avfall i henhold til deres natur og grad av farlighet og å behandle og deponere det (eller få det behandlet og deponert) i samsvar med gjeldende forskrifter.
9. Følg lokale forskrifter for avhending for ditt sted sammen med anbefalingene i sikkerhetsdatabladet for å fastslå sikker avhending av dette produktet
10. SDS er tilgjengelig på forespørsel og ligger på <http://biocare.net>.
11. For å rapportere mistenkte alvorlige hendelser relatert til denne enheten, kontakt den lokale Biocare- representanten og den kompetente myndigheten i medlemsstaten eller landet der brukeren er etablert.

Instruksjoner for bruk:

Anbefalte fargingsprotokoller for PRAME [EPR20330]:

IntelliPATH FLX and manual use:

API3252 for IntelliPATH FLX og manuell bruk, er standardisert med MACH 4 deteksjonssystem. Bruk TBS for vasketrikk.	
Peroksidblokk:	Blokker i 5 minutter med Peroxidized 1.
Forbehandling:	Utfør varmhenting med Borg Decloaker . Se Borg Decloaker- databladet for spesifikke instruksjoner.
Proteinblokk (valgfritt):	Inkuber i 5-10 minutter ved RT med Background Punisher.
Primært antistoff:	Inkuber i 30 minutter ved romtemperatur.
Gjenkjenning:	Sonde: N/A
	Polymer: Inkuber i 30 minutter ved romtemperatur med en sekundærkonjugert polymer.
Kromogen:	Inkuber i 5 minutter ved RT med Biocares DAB – ELLER – Inkuber i 5-7 minutter ved RT med Warp Red.

Motbeis	Motfarge med hematoxylin. Skyll med avionisert vann. Påfør Tacha's Blueing Solution i 1 minutt. Skyll med avionisert vann.
----------------	--

ONCORE Pro Automated Slide Staining System:

OPAI3252 er beregnet for bruk med ONCORE Pro. Se brukerhåndboken for spesifikke bruksanvisninger. Protokollparametere i Protocol Editor bør programmeres som følger:		
Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	PRAME Rb	PRAME Rb AP
Protocol Template (Description):	Special Template (ONCORE Pro-Tect Detection Required)	Rb AP Template 1
Dewaxing (DS Buffer Option):	DS2-50	DS Buffer
Antigen Retrieval (AR Option):	AR1, high pH; 103°C	AR1, high pH; 103°C
Block Option:	Buffer	Buffer
Reagent Name, Time, Temp.:	PRAME Rb, 45 min., 25°C	PRAME Rb, 30 min., 25°C

Ventana BenchMark ULTRA:

AVI3252 er beregnet for bruk med BenchMark ULTRA. Se brukerhåndboken for spesifikke bruksanvisninger. Anbefalte protokollparametere er som følger:	
Template/Detection:	OptiView DAB IHC
Pretreatment Protocol:	CC1 64 minutes
Peroxidase:	Pre-Primary Peroxidase Inhibitor
Primary Antibody:	32 minutes, 36°C

Q Series – For Leica BOND-III:

AL13252 er beregnet for bruk med Leica BOND-III. Se brukerhåndboken for spesifikke bruksanvisninger. Anbefalte protokollparametere er som følger:		
Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	IHC Protocol F	IHC Protocol J
Detection:	Bond Polymer Refine	Bond Polymer Refine Red
HIER:	20 min with ER2	20 min with ER2
Peroxide Block:	5 min	
Marker (Primary Antibody):	15 min	15 min
Post Primary:	8 min	
Polymer:	8 min	
Post Primary AP:		20 min
Polymer AP:		30 min
Mixed Chromogen Refine:	10 min	10 min + 5 min
Hematoxylin:	5 min	5 min

Kvalitetskontroll:

Se CLSI kvalitetsstandarder for design og implementering av immunhistokjemianalyser; Godkjent guideline-andre utgave (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011 ⁸

Positiv vevskontroll: Melanom, normal testis

Ekstern positivt kontrollmateriale bør være ferske prøver fiksert, behandlet og innebygd så snart som mulig på samme måte som pasientprøven(e). Positive vevskontroller er en indikasjon på korrekt forberedt vev og riktige

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Norwegian

BIOCARE
M E D I C A L

fargeteknikker. Én positiv ekstern vevskontroll for hvert sett med testbetingelser bør inkluderes i hver farging.

Vevene som brukes til de eksterne positive kontrollmaterialene bør velges fra pasientprøver med godt karakteriserte lave nivåer av den positive mållaktiviteten som gir svak positiv farging. Det lave nivået av positivitet for eksterne positive kontroller er designet for å sikre påvisning av subtile endringer i det primære antistofffølsomheten fra ustabilitet eller problemer med IHC-metodikken. Kommersielt tilgjengelige vevskontrollobjektglass eller prøver behandlet annerledes enn pasientprøven(e) validerer bare reagensytelsen og verifiserer ikke vevsforberedelse.

Kjente positive vevskontroller bør kun brukes for å overvåke korrekt ytelse av behandlet vev og testreagenser, i stedet for som en hjelp til å formulere en spesifikk diagnose av pasientprøver. Hvis de positive vevskontrollene ikke viser positiv farging, bør resultatene med testprøvene anses som ugyldige.

Negativ vevskontroll:

Bruk en negativ vevskontroll (kjent for å være PRAME-negativ) fiksert, behandlet og innebygd på en måte som er identisk med pasientprøven(e) med hver fargekjøring for å verifisere spesifisiteten til det primære IHC-antistoffet for demonstrasjon av målantigenet, og for å gi en indikasjon på spesifikk bakgrunnsfarging (falsk positiv farging). Også mangfoldet av forskjellige celletyper som finnes i de fleste vevssnitt kan brukes av laboratoriet som interne negative kontrollsteder for å verifisere IHCs ytelse spesifikasjoner. Typer og kilder til prøver som kan brukes for negativt vevskontrollene er oppført i delen Ytelseskaraktistikk.

Hvis spesifikk farging (falsk positiv farging) oppstår i den negative vevskontrollen, bør resultatene med pasientprøvene anses som ugyldige.

Uspesifikk negativ reagenskontroll:

Bruk en uspesifikk negativ reagenskontroll i stedet for det primære antistoffet med en del av hver pasientprøve for å evaluere uspesifikk farging og tillate bedre tolkning av spesifikk farging på antigenstedet. Ideelt sett inneholder en negativ reagenskontroll et PRAME IgG-antistoff produsert fra vevskultursupernatanten på samme måte som den primære antistoff, men viser ingen spesifikk reaktivitet med humant vev i samme matrise/løsning som Biocare antistoffet. Fortynn og negativt kontrollantistoff mot samme immunoglobulin- eller proteinkonsentrasjon som det fortynnede primære antistoff ved bruk av identisk fortynningsmiddel. Hvis føtalt kalveserum holdes tilbake i det rene antistoffet etter prosessering, føtalt kalveserum i en proteinkonsentrasjon som tilsvarer det fortynnede primært antistoff i samme fortynningsmiddel er også egnet for bruk. (Se medfølgende reagens). Fortyningssmiddel alene kan brukes som et mindre ønskelig alternativ til de tidligere beskrevne negative reagenskontrollene. Inkubasjonsperioden for den negative reagenskontrollen skal tilsvare inkubasjonsperioden for det primære antistoffet.

Når paneler med flere antistoffer brukes på seriesnitt, kan de negativt fargede områdene på ett objektglass tjene som en negativ/uspesifikk bindingsbakgrunnskontroll for andre antistoffer. For å skille endogen enzymaktivitet eller uspesifikk binding av enzymer fra spesifikk immunreaktivitet, kan ytterligere pasientvev farges utelukkende med henholdsvis substrat-kromogen eller enzymkomplekser (PAP, avidin-biotin, streptavidin) og substrat-kromogen.

Assaybekreftelse:

Før den første bruken av et antistoff eller fargesystem i en diagnostisk prosedyre, bør brukeren verifisere antistoffets spesifisitet ved å teste det på en serie internt vev med kjente immunhistokjemiske ytelsesegenskaper som representerer kjente positive og negative vev. Se kvalitetskontrollprosedyrene som er skissert tidligere i denne delen av produktvedlegget og til kvalitetskontrollanbefalingene i CAP Certification Program⁹ for Immunohistochemistry og/eller NCCLS IHC-retningslinjen¹⁰). Disse kvalitetskontrollprosedyrene bør gjentas for hvert nytt antistofflot, eller

når det er en endring i analyseparametere. Vev oppført i avsnittet Ytelsesegenskaper er egnet for analyseverifisering.

Feilsøking:

Følg de antistoffspesifikke protokollanbefalingene i henhold til databladet som følger med. Hvis det oppstår atypiske resultater, kontakt Biocares tekniske støtte på 1-800-542-2002.

Tolkning av farging:

Positiv vevskontroll:

Den positive vevskontrollen farget med indikert antistoff bør undersøkes først for å sikre at alle reagenser fungerer som de skal. Den passende farging av målceller (som angitt ovenfor) indikerer positiv reaktivitet. Hvis de positive vevskontrollene ikke viser positiv farging, bør alle resultater med testprøvene anses som ugyldige.

Fargen på reaksjonsproduktet kan variere avhengig av substratkromogener som brukes. Se pakningsvedlegget til substratet for forventede fargereaksjoner. Videre kan metakromasi observeres i variasjoner av metoden for farging.¹¹

Når en motfarging brukes, avhengig av inkubasjonslengden og styrken til motfargen som brukes, vil motfarging resultere i en farging av cellekjernene. Overdreven eller ufullstendig motfarging kan kompromittere riktig tolkning av resultatene. Se protokoll(er) for anbefalt motbeis.

Negativ vevskontroll:

Den negative vevskontrollen bør undersøkes etter den positive vevskontrollen for å verifisere spesifisiteten til merkingen av målantigenet med det primære antistoffet. Fraværet av spesifikk farging i den negative vevskontrollen bekrefter mangelen på antistoffkryssreaktivitet til celler/cellulære komponenter. Hvis spesifikk farging (falsk positiv farging) oppstår i den negative eksterne vevskontrollen, bør resultatene med pasientprøven anses som ugyldige.

Uspesifikk farging, hvis tilstede, har vanligvis et diffust utseende. Sporadisk farging av bindevev kan også observeres i snitt fra formalinfiksert vev. Bruk intakte celler for tolkning av fargerresultater. Nekrotiske eller degenererte celler farger ofte uspesifikt.

Pasientvev:

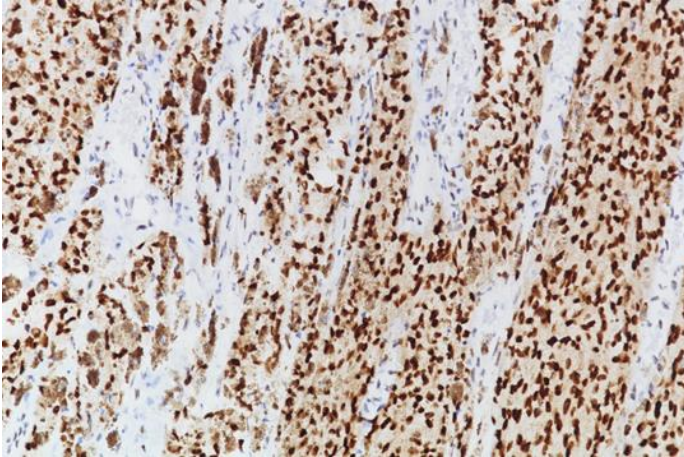
Undersøk pasientprøver farget med indikert antistoff siste. Positiv fargingsintensitet bør vurderes i sammenheng med enhver uspesifikk bakgrunnsfarging av den negative reagenskontrollen. Som med enhver immunhistokjemisk test betyr et negativt resultat at antigenet ikke ble påvist, ikke at antigenet var fraværende i cellene/vevet som ble analysert. Om nødvendig, bruk et panel med antistoffer for å identifisere falske negative reaksjoner.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Norwegian

BIOCARE
M E D I C A L



Melanom farget med PRAME [EPR20330] antistoff.

Se sammendrag og forklaring, begrensninger og ytelsesegenskaper for spesifikk informasjon om indikert antistoffimmunreaktivitet.

Begrensninger:

Generelle begrensninger:

1. For *in vitro* diagnostisk bruk
2. Dette produktet er kun for profesjonell bruk: Immunhistokjemi er en flertrinns diagnostisk prosess som består av spesialisert opplæring i valg av passende reagenser; vevseleksjon, fiksering og prosessering; klargjøring av IHC-sliden; og tolkning av fargeresultatene.
3. Vevsfarging er avhengig av håndtering og bearbeiding av vevet før farging. Feil fiksering, frysing, tining, vasking, tørking, oppvarming, seksjonering eller kontaminering med andre vev eller væsker kan produsere artefakter, antistofffanger eller falske negative resultater. Inkonsekvente resultater kan skyldes variasjoner i fikserings- og innstøpingsmetoder, eller iboende uregelmessigheter i vevet.¹²
4. Overdreven eller ufullstendig motfarging kan kompromittere riktig tolkning av resultatene.
5. Den kliniske tolkningen av enhver positiv eller negativ farging bør evalueres i sammenheng med klinisk presentasjon, morfologi og andre histopatologiske kriterier. Den kliniske tolkningen av enhver positiv eller negativ farging bør kompletteres med morfologiske studier som bruker riktige positive og negative interne og eksterne kontroller samt andre diagnostiske tester. Det er ansvaret til en kvalifisert patolog som er kjent med riktig bruk av IHC-antistoffer, reagenser og metoder for å tolke alle trinnene som brukes til å forberede og tolke det endelige IHC-preparatet.
6. Den optimale antistofffortynningen og protokollene for en spesifikk applikasjon kan variere. Disse inkluderer, men er ikke begrenset til, fiksering, varmehentingsmetode, inkubasjonstider, vevssnittykkelse og deteksjonssett som brukes. På grunn av den overlegne sensitiviteten til disse unike reagensene, er de anbefalte inkubasjonstidene og titrene som er oppført ikke gjeldende for andre deteksjonssystemer, da resultatene kan variere. Databladanbefalingene og protokollene er basert på eksklusiv bruk av Biocare- produkter. Til syvende og sist er det etterforskerens ansvar å bestemme optimale forhold.
7. Dette produktet er ikke beregnet for bruk i flowcytometri. Ytelsesegenskaper er ikke bestemt for flowcytometri.
8. Vev fra personer infisert med hepatitt B-virus og som inneholder hepatitt B-overflateantigen (HBsAg) kan vise uspesifikk farging med pepperrotperoksidase.^{1,3}
9. Reagenser kan vise uventede reaksjoner i tidligere ikke-testet vev. Muligheten for uventede reaksjoner selv i testede vevsgrupper kan ikke elimineres fullstendig på grunn av biologisk variasjon av antigenekspresjon i neoplasmer eller annet patologisk vev.¹⁴ Kontakt

Biocares tekniske støtte på 1-800-542-2002, eller via den tekniske støtteinformasjonen gitt på biocare.net, med dokumenterte uventede reaksjon(er).

10. Normale/ikke-immune sera fra samme dyrekilde som sekundære antisera brukt i blokkeringstrinn kan forårsake falskt negative eller falskt positive resultater på grunn av autoantistoffer eller naturlige antistoffer.
11. Falsk-positive resultater kan sees på grunn av ikke-immunologisk binding av proteiner eller substratreaksjonsprodukter. De kan også være forårsaket av pseudoperoxidaseaktivitet (erytrocytter), endogen peroksidaseaktivitet (cytokrom C) eller endogent biotin (f.eks. lever, bryst, hjerne, nyre) avhengig av hvilken type immunfarging som brukes.¹²

Produktspesifikke begrensninger:

Ingen ytterligere produktspesifikke begrensninger.

Ytelsesegenskaper:

Reproduserbarhet:

Reproduserbarheten av antistoffytelse ble verifisert ved å teste utvalgt normalt vev og tumorvev på forskjellige dager og forskjellige instrumenter med flere operatører. Farging av det utvalgte vevet var konsistent og utført som forventet.

Immunreaktivitet:

Følgende positive og negative immunreaktiviteter er vist i tabell 1 og 2 nedenfor.

Listen nedenfor er ikke uttømmende, men karakteriserer typene immunreaktiviteter observert med det angitte antistoffet.

Det er ingen kjent ikke-spesifikk antistoffreaktivitet observert i dette produktet.

Sammendrag av forventede resultater:

Prevalensen av PRAME i normalt vev og vev i sykdomstilstand ble evaluert ved bruk av Tissue Microarrays (TMA).

Det normale vevet som ble testet ble farget som forventet, med høye nivåer av farging observert i testiklene og ingen farging i annet vev.

Farging av PRAME ble observert på et høyt nivå ved melanom som forventet, og ved varierende nivåer i annet kreftvev som eggstokk, lunge, prostata og bryst.

Analytisk ytelse:

Fargetester for sensitivitet og spesifisitet ble utført, og resultatene er oppført nedenfor .

 Biocare Medical

60 Berry Drive
Pacheco, CA 94553

USA

131/190



TP v3 (12/15/2021)

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080

 EMERGO EUROPE

Westervoortsedijk 60

6827 AT Arnhem

The Netherlands

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Norwegian

BIOCARE
M E D I C A L

Sensitivitet og spesifisitet:

Tabell 1: Sensitivitet og spesifisitet til antistoffet ble bestemt ved å teste FFPE normalt vev.

Vev	Positive tilfeller	Totalt antall saker
Cerebrum	0	6
Lillehjernen	0	3
Binyrene	0	3
Eggstokk	0	3
Bukspyttkjertelen	0	3
Luftrør	0	3
Hypofysen	0	3
Testis*	3	3
Skjoldbruskkjertelen	0	3
Bryst	0	3
Milt	0	3
Mandel	0	3
Thymus	0	3
Beinmarg**	0	1
Lunge	0	3
Hjerte	0	3
Spiserøret	0	3
Mage	0	3
Tynntarm	0	3
Kolon	0	3
Lever	0	3
Spyttkjertel	0	3
Nyre	0	3
Prostata	0	3
Livmor	0	3
Livmorhalsen	0	3
Skjelettmuskulatur	0	3
Hud	0	3
Perifer nerve	0	3
Fôr celler	0	3
Hode, nakke og spyttkjertel	0	6
Lymfeknute	0	3

* 3-4 styrker kjernefysisk farging

** To prøver mangler

Tabell 2: Sensitivitet og spesifisitet til antistoffet ble bestemt ved å teste en rekke FFPE neoplastiske vev.

Patologi	Positive tilfeller	Totalt antall saker
Melanom	29	39
Eggstokkreft	9	44
Brystkreft	10	26
Tykkarmskreft	4	43
Lungekreft	21	50
Prostatakreft	18	41
Binyrebarkkarsinom	0	1
Blærekreft	0	2
Meningioma	0	2
Astrocytom	0	1
Plateepitelkarsinom (øsofagus)	0	2
Adenokarsinom (mage)	0	2
Adenokarsinom (tynntarm)	0	1
Adenokarsinom (tykktarm og rektum)	0	6
Nyrekreft	0	2
Leverkreft	0	4
Lymfom	0	3
Plateepitelkarsinom (hode og nakke, munnhule, tunge)	0	1
Nasofaryngeal karsinom	1	1
Adenokarsinom (bukspyttkjertelen)	0	1
Adenokarsinom (prostata)	0	2
Adenoid cystisk karsinom (hode og nakke, spyttkjertel)	0	1
Plateepitelkarsinom (hud)	0	1
Seminom	0	2
Kreft i skjoldbruskkjertelen	0	2
Livmorhalskreft	0	2
Endometrium kreft	1	2

PRAME-ekspresjon i forskjellige neoplasmer kan vise variabel prosent tumorpositivitet. Se tabell 3 for positiv farging av tumorcelleprosenter (kategorisert etter kvartiler) observert i forskjellige neoplasmer funnet i tabell 2.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Norwegian

BIOCARE
M E D I C A L

Tabell 3: Prosentvis positiv tumorcellefarging i ulike FFPE-neoplasmer.

Vev	Prosent Tumorceller Farging # Tilfeller Utviser Farging Prosent av totalt # Tilfeller (%)				
	<1 %	1–25 %	26–50 %	51–75 %	> 75 %
Eggstokkrekft	35/44 (79,5 %)	2/44 (4,5 %)	3/44 (6,8 %)	3/44 (6,8 %)	1/44 (2,3 %)
Brystkrefst	16/26 (61,5 %)	26/7 (26,9 %)	1/26 (3,8 %)	26/2 (7,7 %)	0 (0 %)
Tykkarmskrefst	39/43 (88,4 %)	4/43 (11,6 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Lungekrefst	29/50 (58,0 %)	7/50 (14,0 %)	4/50 (8,0 %)	7/50 (14,0 %)	3/50 (6,0 %)
Prostatakrefst	23/41 (56,1 %)	9/41 (22,0 %)	3/41 (7,3 %)	2/41 (4,9 %)	4/41 (9,8 %)
Nasofaryngeal karsinom	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	1/1 (100 %)
Endometrium krefst	1/2 (50 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	1/2 (50 %)	0 (0 %)
Melanom	10/39 (25,6 %)	6/39 (15,4 %)	5/39 (12,8 %)	6/39 (15,4 %)	39/12 (30,8 %)

Prosent tumorcellefarging presentert for alle fargeintensiteter.

Farging på vev som viser varierende nivåer av PRAME-proteinuttrykk.

Resultatene av den analytiske ytelsestesten viste at PRAME [EPR20330]-antistoffet kan detektere PRAME-proteinet korrekt ved bruk av den definerte IHC-protokollen. Resultatene av unormale vevsprøver støtter konklusjonen om at PRAME [EPR20330] er følsom for PRAME-proteinet ved bruk av de anbefalte IHC-protokollene. PRAME [EPR20330]-antistoffet er i stand til å oppdage lave til høye nivåer av PRAME-proteinet. Den normale vevstesting viste ingen uventet påvisning av PRAME over 32 vevstyper. Det var ingen uventet kryssreaktivitet. Resultatene støtter påstanden PRAME [EPR20330] antistoff er svært spesifikt (analytisk spesifisitet) for PRAME-proteinet.

Klinisk ytelse:

Fargetester for diagnostisk sensitivitet og spesifisitet ble utført, og resultatene er oppført nedenfor. Positiv og negativ immunreaktivitet er registrert i tabell 4.

Tre melanom TMA-objektglass ble farget på Biocare og sendt til en ekstern patolog for å bli lest og gradert. Melanomvev viste et mangfold av fargingskårer fra 0 (negativ) til sterk (4). De fleste melanocytiske nevi viste ingen PRAME-reaktivitet, men noen få hadde sterk reaktivitet.

Tabell 4: Prosentvis positiv tumorcellefarging i ulike FFPE melanocytiske neoplasmer og hud.

Vev	Prosent Tumorceller Farging # Tilfeller Utviser Farging Prosent av totalt # Tilfeller (%)				
	<1 %	1–25 %	26–50 %	51–75 %	> 75 %
Melanom	28/133 (21,1 %)	50/133 (37,6 %)	10/133 (7,5 %)	8/133 (6,0 %)	37/133 (27,8 %)
Metastatisk melanom	7/38 (18,4 %)	38/10 (26,3 %)	3/38 (7,9 %)	2/38 (5,3 %)	16/38 (42,1 %)
Melanocytisk nevi	14/12 (85,7 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	2/12 (14,3 %)
Hud	10/10 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)

Prosent tumorcellefarging presentert for alle fargeintensiteter.

Farging på vev som viser varierende nivåer av PRAME-proteinuttrykk.

Det primære endepunktet for testen var å evaluere den diagnostiske sensitiviteten til PRAME [EPR20330]-antistoffet i IHC-prosedyren, definert som den positive melanomdeteksjonshastigheten til de bekreftede positive prøvene. [TP/(TP+FN)]

Et sekundært endepunkt var å evaluere den diagnostiske spesifisiteten - den negative deteksjonsraten for bekreftede melanomnegative prøver. [TN/(TN+FP)]

Det var 35 falske negative melanomtilfeller som hadde fått gullstandarden patologisk vurdering som melanom, men som var negative for PRAME. 136 tilfeller var sanne positive ved at de ble diagnostisert med melanom og viste signal for PRAME. To falske positive ble påvist i de 14 melanocytiske nevi-prøvene som ble diagnostisert som benigne som viste signal for PRAME.

Fra dataene er estimert diagnostisk sensitivitet = $136 / (136 + 35) = 79,5 \%$
Fra dataene er estimert diagnostisk spesifisitet = $22 / (22 + 2) = 91,7 \%$

Basert på våre beregninger kommer vi frem til en estimert diagnostisk sensitivitet på 79,5 % og en estimert diagnostisk spesifisitet på 91,7 % for påvisning av melanom.

Fra dette konkluderer vi med at PRAME [EPR20330]-antistoffet, som testet av Biocare på melanom og melanocytiske nevi-prøver, er følsomt for melanom og svært spesifikt for melanom.

Feilsøking: (Gi forklaring for hvert av punktene nedenfor)

1. Ingen farging av noen objektglass – Kontroller for å fastslå at det er brukt passende positivt kontrollvev, antistoff og deteksjonsprodukter.
2. Svak farging av alle objektglass – Kontroller for å fastslå at det er brukt passende positivt kontrollvev, antistoff og deteksjonsprodukter.
3. Overdreven bakgrunn av alle lysbildene - Det kan være høye nivåer av endogen biotin (hvis du bruker biotinbaserte deteksjonsprodukter), endogen HRP-aktivitet som konverterer kromogen til farget sluttprodukt (bruk peroksidaseblokk), eller overflødig ikke-spesifikk proteininteraksjon (bruk et protein blokk, for eksempel serum- eller kaseinbasert blokkeringsløsning).
4. Vevsseksjoner vasker av objektglass under inkubering – Sjekk objektglassene for å sikre at de er positivt ladet.
5. Spesifikk farging for mørk – Sjekk protokollen for å finne ut om riktig antistofftiter ble brukt på objektglasset, samt riktige inkubasjonstider for alle reagenser. Sørg i tillegg for at protokollen har nok vasketrinn til å fjerne overflødig reagens etter at inkubasjonstrinnene er fullført.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Norwegian

BIOCARE
M E D I C A L

Referanser:

1. Kiernan JA. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. J Histotechnol. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. Biotech Histochem. 1996 Jan;71(5):263-70.
6. Center for Disease Control Manual. Guide: Safety Management, NO. CDC-22, Atlanta, GA. April 30, 1976 "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts."
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
8. CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011
9. College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. Http://www.cap.org (800) 323-4040.
10. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
11. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques. Histochemistry 1987; 86:471-478.
12. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Lab Med 1983;14:767.
13. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradishperoxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. Am J Clin Path 1980;73:626.
14. Herman GE and Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech & Histochem 1991;66:194.
15. Zhang W, et al. PRAME expression and promoter hypermethylation in epithelial ovarian cancer. Oncotarget, 2016 Jul; 7(29):45352-69.
16. Lezcano C, et al. PRAME expression in melanocytic tumors. Am J Surg Pathol. 2018 Nov; 42(11):1456-65.

Ultraline- antistoffer utvikles utelukkende av Biocare Medical LLC og innebærer ikke godkjenning eller godkjenning av Biocare- antistoffer av Ventana Medical Systems, Inc eller Roche. Biocare , Ventana og Roche er ikke tilknyttet, assosiert eller relatert på noen måte. Ventana®, BenchMark®, ultraView og OptiView er varemerker for Roche.

Antistoffer i Q-serien er utviklet utelukkende av Biocare Medical LLC og innebærer ikke godkjenning eller godkjenning av Biocare- antistoffer fra Leica Biosystems. Biocare og Leica Biosystems er ikke tilknyttet, assosiert eller relatert på noen måte. Leica, Leica Biosystems, BOND-MAX og BOND-III er varemerker for Leica Biosystems.

Sammendraget av sikkerhet og ytelse finner du her:
<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Polish

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats				
Format	Catalog Number	Description	Dilution	Diluent
Concentrate	ACI 3252 A, B	0.1, 0.5 mL	1:100	Van Gogh Yellow
Predilute	API 3252 AA, G20, H	6.0, 20, 25 mL	Ready-to-use	N/A
ONCORE Pro	OPAI 3252 T60	60 tests	Ready-to-use	N/A
Q Series-- For Leica BOND-III	ALI 3252 G7	7.0 mL	Ready-to-use	N/A
UltraLine -- For BenchMark	AVI 3252 G, G25	6.0, 25 mL	Ready-to-use	N/A

Przeznaczenie:

Do użytku diagnostycznego *in vitro*

PRAME [EPR20330] to królicze przeciwciało monoklonalne przeznaczone do użytku laboratoryjnego po postawieniu wstępnej diagnozy nowotworu za pomocą konwencjonalnej histopatologii przy użyciu nieimmunologicznych barwień histochemicznych, w jakościowej identyfikacji białka PRAME metodą immunohistochemiczną (IHC) w parafinie utrwalonej w formalinie osadzone (FFPE) tkanki ludzkie. Kliniczną interpretację jakiegokolwiek zabarwienia lub jego braku należy uzupełnić badaniami morfologicznymi z zastosowaniem odpowiednich kontroli i należy ją ocenić w kontekście historii klinicznej pacjenta i innych badań diagnostycznych przez wykwalifikowanego patologa, jako pomoc w dokonaniu wszelkich innych ustaleń klinicznych.

Podsumowanie i wyjaśnienie:

PRAME znajduje się na chromosomie 22q11.22 i koduje białko o długości 509 aminokwasów. PRAME jest autosomalnym genem antygeny nowotworu jądra (CTA), który, jak wykazano, ulega ekspresji w czerniaku, różnych niemelanoctyowych nowotworach złośliwych, w tym niedrobnokomórkowym raku płuc, raku piersi, raku jajnika i kilku innych cytowanych. Nie wiadomo, czy normalne zdrowe tkanki wykazują ekspresję PRAME, z wyjątkiem jąder, jajników, nadnerczy i kilku innych cytowanych w literaturze. ^(15,16)

Zasada postępowania:

Ten produkt będący przeciwciałem może być stosowany jako przeciwciało pierwotne w badaniach immunohistochemicznych skrawków tkankowych utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie. Ogólnie rzecz biorąc, immunohistochemiczne (IHC) techniki barwienia pozwalają na wizualizację antygenów poprzez sekwencyjne nakładanie a swoiste przeciwciało przeciwko antygenowi (przeciwciało pierwotne), przeciwciało wtórne przeciwko przeciwciału pierwotnemu (opcjonalnie przeciwciało łączące/sonda), kompleks enzymatyczny i substrat chromogenny z nałożonymi na siebie etapami przemycania. Enzymatyczna aktywacja chromogenu powoduje powstanie widocznego produktu reakcji w miejscu antygeny. Próbkę można następnie wybarwić kontrastowo i nałożyć nakładkę. Wyniki interpretuje się za pomocą światła mikroskopu i pomoc w diagnostyce różnicowej procesów patofizjologicznych, które mogą lub mogą nie być powiązane z konkretnym antygenem.

Materiały i metody:

Dostarczone odczynniki:

Źródło gospodarza: Królik monoklonalny

Gatunek Reaktywność: Człowiek. Inne gatunki nie testowane.

Klon: EPR20330

Izotyp: IgG

Stężenie białka: Specyficzne stężenie IgG: Skontaktuj się z pomocą techniczną firmy Biocare

Specyfika: PRAME

Lokalizacja komórkowa: jądro i błona komórkowa

Metoda: Oczyszczony przez powinowactwo rekombinowany królik monoklonalny.

Rekonstrukcja, mieszanie, rozcieńczanie, miareczkowanie:

Wstępnie rozcieńczony odczynnik przeciwciał jest optymalnie rozcieńczony do stosowania z wyżej wymienionymi systemami barwienia. Dalsze rozcieńczanie może spowodować utratę barwienia antygeny. Użytkownik

musi zatwierdzić każdą taką zmianę. Różnice w przetwarzaniu tkanek i procedurach technicznych w laboratorium użytkownika mogą powodować znaczną zmienność wyników, wymagającą regularnego przeprowadzania wewnętrznych kontroli (patrz sekcja Kontrola jakości). Skoncentrowany odczynnik wymaga rozcieńczenia zgodnie z tabelą powyżej.

Znane zastosowania:

Immunohistochemia (tkanki utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie)

Dostarczany jako: Buforowany roztwór soli fizjologicznej o pH 5,9–7,9 zawierający nośnik białkowy i mniej niż 0,1% azydki sodu jako środek konserwujący. Dodatkowe szczegóły znajdują się w Karcie Charakterystyki.

Materiały i odczynniki potrzebne, ale niedostarczane:

Szkiełka mikroskopowe naładowane dodatnio.

Pozytywne i negatywne kontrole tkanek

Komora pustynna (lub podobna Suszarka)

Ksylen lub substytut ksylenu

Etanol lub alkohol odczynnikowy

Komora odkrywania (szybwar)

Woda dejonizowana lub destylowana

Bufor płuczący

Odczynniki do obróbki wstępnej

Blok peroksydazy

Blok białkowy (opcjonalnie)

Sonda detekcyjna i polimer

Odczynniki do kontroli negatywnej

Chromogeny

Hematoksylina (kontrabarwnik)

Odczynnik niebieszcący

Środek montażowy

Szklana pokrywa

Mikroskop świetlny (powiększenie 40-400X)

Dostępne są konfiguracje produktu będącego przeciwciałem do stosowania w instrumentach wskazanych w powyższej tabeli.

Przechowywanie i stabilność:

Przechowywać w temperaturze od 2°C do 8°C. Produkt jest stabilny do daty ważności podanej na etykiecie fiołki, jeśli jest przechowywany w tych warunkach. Nie stosować po upływie terminu ważności. Należy zweryfikować przechowywanie w warunkach innych niż określone. Rozcieńczone odczynniki należy natychmiast zużyć; przechowywać pozostały odczynnik w temperaturze od 2°C do 8°C. Stabilność odczynnika rozcieńczonego przez użytkownika nie została ustalona przez firmę Biocare .

Kontrole dodatnie i ujemne należy oznaczyć jednocześnie ze wszystkimi próbkami od pacjentów. W przypadku zaobserwowania nieoczekiwane go zabarwienia, którego nie można wytłumaczyć różnicami w procedurach laboratoryjnych i jeśli podejrzewa się problem z przeciwciałem, należy skontaktować się z działem pomocy technicznej firmy Biocare pod numerem 1-800-542-2002 lub za pośrednictwem informacji pomocy technicznej dostępnych na stronie biocare.net.



60 Berry Drive
Pacheco, CA 94553
USA

135/190



TP v3 (12/15/2021)

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080



Westervoortsedijk 60
8627 AT Arnhem
The Netherlands

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Polish

Przygotowanie próbki:

Chusteczki utrwalone w formalinie nadają się do użycia przed zatopieniem w parafinie. Tkanki kostne należy odwapnić przed obróbką tkanki, aby ułatwić przecięcie tkanki i zapobiec uszkodzeniu ostrzy mikrotomu. ^{1, 2}

Prawidłowo utrwalone i zatopione tkanki wyrażające określony docelowy antygen należy przechowywać w chłodnym miejscu. Ustawa o doskonaleniu laboratoriów klinicznych (CLIA) z 1988 r. wymaga w 42 CFR § 493.1259(b), że „laboratorium musi przechowywać wybarwione preparaty przez co najmniej dziesięć lat od daty badania i przechowywać bloki próbek przez co najmniej dwa lata od daty badania.” ³

Obróbka tkanek przed barwieniem:

Wykonaj indukowane ciepłem pobieranie epitopów (HIER) zgodnie z zalecanym protokołem poniżej. Wykazano, że rutynowe stosowanie HIER przed IHC minimalizuje niespójności i standaryzuje barwienie. ^{4, 5}

Ostrzeżenia i środki ostrożności :

1. To przeciwciężko zawiera mniej niż 0,1% azotku sodu . Stężenia mniejsze niż 0,1% nie są materiałami niebezpiecznymi podlegającymi zgłoszeniu zgodnie z US 29 CFR 1910.1200, komunikatem OSHA dotyczącym zagrożeń i dyrektywą WE 91/155/WE. Azotek sodu (NaN₃) stosowany jako środek konserwujący jest toksyczny w przypadku spożycia. Azotek sodu może reagować z ołowiem i miedzią, tworząc wysoce wybuchowe azydki metali . Po usunięciu przepłukać dużą ilością wody, aby zapobiec gromadzeniu się azotku w instalacjach wodno-kanalizacyjnych. (Centrum Kontroli Chorób, 1976, Państwowy Instytut Bezpieczeństwa i Higieny Pracy, 1976) ⁶

2. Z próbkami przed i po utrwaleniu oraz ze wszystkimi materiałami, które miały z nimi kontakt, należy postępować tak, jakby mogły przenosić infekcję, i usuwać je z zachowaniem odpowiednich środków ostrożności. Nigdy nie pipetować odczynników ustami i unikać kontaktu odczynników i próbek ze skórą i błonami śluzowymi. Jeżeli odczynnik lub próbki wejdą w kontakt z wrażliwymi miejscami, należy je przemyć dużą ilością wody. ⁷

3. Zanieczyszczenie mikrobiologiczne odczynników może skutkować zwiększeniem nieswoistego barwienia.

4. Czasy inkubacji lub temperatury inne niż podane mogą dawać błędne wyniki. Użytkownik musi zatwierdzić każdą taką zmianę.

5. Nie używać odczynnika po upływie daty ważności wydrukowanej na fiolce. 6. Wstępnie rozcieńczony odczynnik przeciwciężko jest optymalnie rozcieńczony do użycia . Dalsze rozcieńczanie może spowodować utratę barwienia antygeny.

Przed użyciem należy sprawdzić rozcieńczenie stężonego odczynnika zawierającego przeciwciężko. Każdy zastosowany rozcieńczalnik, który nie jest szczególnie zalecany, również musi zostać zweryfikowany pod kątem kompatybilności i stabilności.

8. Wszystkie zużyte odczynniki i inne zanieczyszczone materiały jednorazowe należy utylizować zgodnie z procedurami postępowania z odpadami zakaźnymi lub potencjalnie zakaźnymi. Każde laboratorium ma obowiązek postępować z odpadami stałymi i płynnymi zgodnie z ich charakterem i stopniem niebezpieczeństwa oraz za ich przetwarzanie i utylizację (lub zlecenie ich przetworzenia i utylizacji) zgodnie z obowiązującymi przepisami. 9. Postępuj zgodnie z lokalnymi przepisami dotyczącymi utylizacji obowiązującymi w Twojej lokalizacji oraz zaleceniami zawartymi w Karcie Charakterystyki, aby określić bezpieczną utylizację tego produktu

10. Karta charakterystyki jest dostępna na żądanie i znajduje się pod adresem <http://biocare.net>.

11. Aby zgłosić podejrzenie poważnych incydentów związanych z tym urządzeniem, należy skontaktować się z lokalnym przedstawicielem firmy Biocare oraz właściwym organem Państwa członkowskiego lub kraju, w którym użytkownik ma siedzibę.

Instrukcja użycia:

Zalecane protokoły barwienia preparatu PRAME [EPR20330]:

BIOCARE
M E D I C A L

IntelliPATH FLX and manual use:

API3252 do użytku IntelliPATH FLX i ręcznego zostało ujednolicone z systemem detekcji MACH 4. Do mycia należy używać TBS.	
Peroxide Block:	Zablokuj na 5 minut za pomocą Peroksydowanego 1.
Pretreatment:	Wykonaj odzyskiwanie ciepła za pomocą Borg Decloaker . Szczegółowe instrukcje można znaleźć w arkuszu danych Borg Decloaker .
Protein Block (Optional):	Inkubować przez 5-10 minut w temperaturze pokojowej z programem T10 Punisher.
Primary Antibody:	Inkubować przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Sonda: nie dotyczy
Detection:	Polimer: Inkubować przez 30 minut w temperaturze pokojowej z polimerem wtórnie sprzężonym.
Chromogen:	Inkubować przez 5 minut w temperaturze pokojowej z DAB firmy Biocare – LUB – Inkubować przez 5-7 minut w temperaturze pokojowej z Warp Red.
Counterstain	Barwienie kontrastowe hematoksyliną. Spłucz wodą dejonizowaną. Zastosuj roztwór Bluing Solution firmy Tacha na 1 minutę. Spłucz wodą dejonizowaną.

ONCORE Pro Automated Slide Staining System:

OPAI3252 jest przeznaczony do użytku z ONCORE Pro. Szczegółowe instrukcje dotyczące użytkowania można znaleźć w instrukcji obsługi. Parametry protokołu w Edytorze protokołów należy zaprogramować w następujący sposób:		
Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	PRAME Rb	PRAME Rb AP
Protocol Template (Description):	Special Template (ONCORE Pro-Tect Detection Required)	Rb AP Template 1
Dewaxing (DS Buffer Option):	DS2-50	DS Buffer
Antigen Retrieval (AR Option):	AR1, high pH; 103°C	AR1, high pH; 103°C
Block Option:	Buffer	Buffer
Reagent Name, Time, Temp.:	PRAME Rb, 45 min., 25°C	PRAME Rb, 30 min., 25°C

Ventana BenchMark ULTRA:

AVI3252 jest przeznaczony do użytku z BenchMark ULTRA. Szczegółowe instrukcje dotyczące użytkowania można znaleźć w instrukcji obsługi. Zalecane parametry protokołu są następujące:	
Template/Detection:	OptiView DAB IHC
Pretreatment Protocol:	CC1 64 minutes
Peroxidase:	Pre-Primary Peroxidase Inhibitor
Primary Antibody:	32 minutes, 36°C

Q Series – For Leica BOND-III:

ALI3252 jest przeznaczony do użytku z Leica BOND-III. Szczegółowe instrukcje dotyczące użytkowania można znaleźć w instrukcji obsługi. Zalecane parametry protokołu są następujące:		
Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	IHC Protocol F	IHC Protocol J
Detection:	Bond Polymer Refine	Bond Polymer Refine Red

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Polish

BIOCARE
M E D I C A L

HIER:	20 min with ER2	20 min with ER2
Peroxide Block:	5 min	
Marker (Primary Antibody):	15 min	15 min
Post Primary:	8 min	
Polymer:	8 min	
Post Primary AP:		20 min
Polymer AP:		30 min
Mixed Chromogen Refine:	10 min	10 min + 5 min
Hematoxylin:	5 min	5 min

Kontrola jakości:

Patrz Standardy jakości CLSI dotyczące projektowania i wdrażania testów immunohistochemicznych; Zatwierdzone wytyczne – wydanie drugie (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA, USA (www.clsi.org). 2011⁸

pozytywna kontrola tkanek: Czerniak, normalne jądro

Zewnętrzne materiały kontroli dodatniej powinny składać się ze świeżych próbek, utrwalonych, przetworzonych i osadzonych tak szybko, jak to możliwe, w taki sam sposób, jak próbki pacjenta. Pozytywne kontrole tkanek wskazują na prawidłowo przygotowane tkanki i odpowiednie techniki barwienia. Do każdego cyklu barwienia należy włączyć jedną pozytywną zewnętrzną kontrolę tkanek dla każdego zestawu warunków testowych.

Tkanki stosowane w materiałach zewnętrznej kontroli pozytywnej należy wybierać spośród próbek pacjentów o dobrze scharakteryzowanym niskim poziomie dodatniej aktywności docelowej, która powoduje słabe dodatnie barwienie. Niski poziom dodatniości zewnętrznych kontroli pozytywnych ma na celu zapewnienie wykrycia subtelnych zmian we wrażliwości przeciwciał pierwotnych wynikających z niestabilności lub problemów z metodologią IHC. Dostępne w handlu szkiełka do kontroli tkanek lub próbki przetworzone inaczej niż próbki pacjenta potwierdzają jedynie działanie odczynnika i nie weryfikują przygotowania tkanki.

Znane pozytywne kontrole tkankowe należy wykorzystywać wyłącznie do monitorowania prawidłowego działania przetworzonych tkanek i odczynników testowych, a nie jako pomoc w formułowaniu konkretnej diagnozy próbek od pacjentów. Jeżeli dodatnie kontrole tkankowe nie wykażą dodatniego barwienia, wyniki uzyskane dla próbek testowych należy uznać za nieważne.

Negatywna kontrola tkankowa:

Użyj negatywnej kontroli tkankowej (o której wiadomo, że jest ujemna pod względem PRAME) utrwalonej, przetworzonej i zatopionej w sposób identyczny z próbką(-ami) pacjenta przy każdym barwieniu, aby zweryfikować specyficzność przeciwciała pierwotnego IHC dla demonstracji docelowego antygenu i dostarczenia wskazania specyficznego barwienia tła (barwienie fałszywie dodatnie). Również różnorodność różnych typów komórek obecnych w większości skrawków tkanek może powodować być wykorzystywane przez laboratorium jako wewnętrzne miejsca kontroli negatywnej w celu sprawdzenia działania IHC specyfikacji. Rodzaje i źródła próbek, które można wykorzystać do badania tkanek ujemnych elementy sterujące są wymienione w sekcji Charakterystyka wydajności.

Jeżeli w negatywnej kontroli tkankowej wystąpi specyficzne zabarwienie (fałszywie dodatnie zabarwienie), wyniki uzyskane na próbkach pacjentów należy uznać za nieważne.

Nieswoista kontrola ujemna odczynnika:

Do wycinka każdej próbki pacjenta należy zastosować nieswoistą kontrolę ujemną z odczynnikiem zamiast przeciwciała pierwotnego w celu oceny nieswoistego barwienia i pozwalają na lepszą interpretację specyficznego barwienia w miejscu antygenu. W idealnym przypadku kontrola ujemna odczynnika zawiera przeciwciała PRAME IgG wytworzone z supernatantu hodowli tkankowej w

taki sam sposób jak kontrola pierwotna przeciwciała, ale nie wykazuje specyficznej reaktywności z tkankami ludzkimi w tej samej matrycy/roztworze co przeciwciała Biocare. Rozcieńczony przeciwciała stanowiące kontrolę ujemną do takiego samego stężenia immunoglobuliny lub białka jak rozcieńczone przeciwciała pierwotne przeciwciała przy użyciu identycznego rozcieńczalnika. Jeżeli po przetworzeniu w czystym przeciwciele pozostaje płodowa surowica cieleca, płodowa surowica cieleca o stężeniu białka równoważnym rozcieńczeniu Odpowiednie do użycia jest również przeciwciała pierwszorzędowe w tym samym rozcieńczalniku. (Patrz dostarczony odczynnik). Można zastosować sam rozcieńczalnik jako mniej pożądaną alternatywę dla opisanych wcześniej kontroli ujemnych z odczynnikami. Okres inkubacji kontroli ujemnej odczynnika powinien odpowiadać okresowi inkubacji przeciwciała pierwszorzędowego.

Jeżeli w skrawkach seryjnych stosuje się panele kilku przeciwciał, obszary jednego szkiełka barwiące się negatywnie mogą służyć jako ujemna/nieswoiście wiążąca kontrola tła dla innych przeciwciał. Aby odróżnić endogenną aktywność enzymatyczną lub nieswoiste wiązanie enzymów od swoistej immunoreaktywności, dodatkowe tkanki pacjenta można wybarwić wyłącznie odpowiednio substratem-chromogenem lub kompleksami enzymatycznymi (PAP, awidyna-biotyna, streptawidyna) i substrat-chromogen.

Weryfikacja testu:

Przed pierwszym użyciem przeciwciała lub systemu barwienia w procedurze diagnostycznej użytkownik powinien zweryfikować specyficzność przeciwciała, testując je na szeregu własnych tkanek o znanej charakterystyce działania immunohistochemicznego, reprezentujących znane tkanki dodatnie i ujemne. Należy zapoznać się z procedurami kontroli jakości opisanymi wcześniej w tej części ulotki produktu oraz z zaleceniami dotyczącymi kontroli jakości Programu certyfikacji CAP⁹ w zakresie immunohistochemii i/lub wytycznych NCCLS IHC¹⁰). Te procedury kontroli jakości należy powtarzać dla każdej nowej partii przeciwciał lub za każdym razem, gdy nastąpi zmiana parametrów testu. Tkanki wymienione w sekcji Charakterystyka działania nadają się do weryfikacji testu.

Rozwiązywanie problemów:

Postępuj zgodnie z zaleceniami protokołu dotyczącymi specyficznych przeciwciał, zgodnie z dostarczoną kartą charakterystyki. W przypadku wystąpienia nietypowych wyników należy skontaktować się z pomocą techniczną firmy Biocare pod numerem 1-800-542-2002.

Interpretacja barwienia:

pozytywna kontrola tkanek:

Najpierw należy zbadać pozytywną kontrolę tkankową barwioną wskazanym przeciwciałem, aby upewnić się, że wszystkie odczynniki działają prawidłowo. Odpowiednie barwienie komórek docelowych (jak wskazano powyżej) wskazuje na dodatnią reaktywność. Jeżeli dodatnie kontrole tkanek nie wykażą dodatniego barwienia, wszelkie wyniki uzyskane dla próbek testowych należy uznać za nieważne.

Kolor produktu reakcji może się różnić w zależności od użytego chromogenu substratu. Informacje na temat oczekiwanych reakcji kolorystycznych można znaleźć w ulotkach dołączonych do podłoża. Ponadto metachromazję można zaobserwować w odmianach metody barwienia.¹¹

W przypadku stosowania barwnika kontrastowego, w zależności od długości inkubacji i siły użytego barwnika kontrastowego, barwienie kontrastowe spowoduje zabarwienie jąder komórkowych. Nadmierne lub niepełne barwienie kontrastowe może zakłócić prawidłową interpretację wyników. Zalecane barwienie kontrastowe znajduje się w protokołach.

Negatywna kontrola tkankowa :

Negatywną kontrolę tkankową należy zbadać po pozytywnej kontroli tkankowej, aby zweryfikować specyficzność znakowania docelowego antygenu przez przeciwciała pierwszorzędowe. Brak swoistego barwienia w negatywnej kontroli tkankowej potwierdza brak reaktywności krzyżowej

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Polish

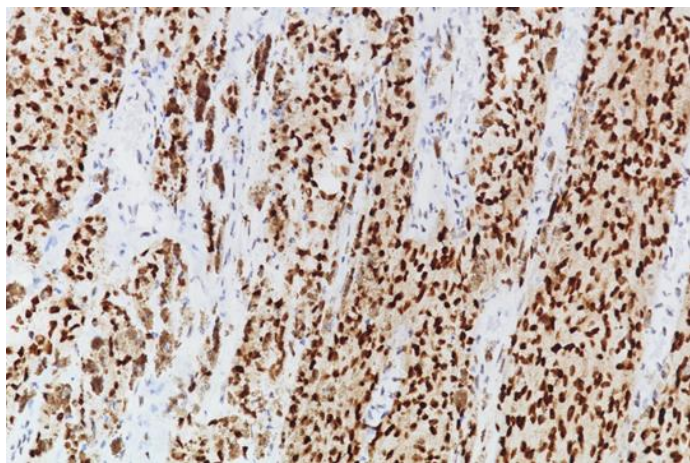
BIOCARE
M E D I C A L

przeciwciał w stosunku do komórek/składników komórkowych. Jeżeli w ujemnej zewnętrznej kontroli tkanek wystąpi specyficzne zabarwienie (fałszywie dodatnie zabarwienie), wyniki uzyskane dla próbki pacjenta należy uznać za nieważne.

Niespecyficzne zabarwienie, jeśli występuje, zwykle ma rozproszony wygląd. Sporadyczne zabarwienie tkanki łącznej można również zaobserwować w skrawkach tkanek nadmiernie utrwalonych w formalinie. Do interpretacji wyników barwienia należy używać nienaruszonych komórek. Komórki martwicze lub zdegenerowane często barwią się nieswoiście.

Tkanka pacjenta:

Zbadaj próbki pacjentów wybarwione wskazanymi przeciwciałami ostatni. Intensywność barwienia dodatniego należy ocenić w kontekście wszelkich nieswoistych barwień tła kontroli negatywnej z odczynnikami. Podobnie jak w przypadku każdego testu immunohistochemicznego, wynik ujemny oznacza, że antygen nie został wykryty, a nie, że antygen był nieobecny w testowanych komórkach/tkance. Jeśli to konieczne, użyj panelu przeciwciał w celu zidentyfikowania reakcji fałszywie ujemnych.



Czerniak barwiony przeciwciałem PRAME [EPR20330].

Aby uzyskać szczegółowe informacje dotyczące wskazanej immunoreaktywności przeciwciał, patrz Podsumowanie i wyjaśnienia, ograniczenia i charakterystyka działania.

Ograniczenia:

Ogólne ograniczenia:

1. Do diagnostyki *in vitro*
2. Ten produkt jest przeznaczony wyłącznie do użytku profesjonalnego: Immunohistochemia to wieloetapowy proces diagnostyczny, który obejmuje specjalistyczne szkolenie w zakresie doboru odpowiednich odczynników; wybór tkanki, utrwalanie i przetwarzanie; przygotowanie szkiełka IHC; i interpretację wyników barwienia.
3. Barwienie tkanek zależy od sposobu postępowania z tkanką i jej obróbki przed barwieniem. Niewłaściwe utrwalanie, zamrażanie, rozmrażanie, mycie, suszenie, podgrzewanie, dzielenie na skrawki lub zanieczyszczenie innymi tkankami lub płynami może spowodować artefakty, uwięzienie przeciwciał lub wyniki fałszywie ujemne. Niespójne wyniki mogą wynikać z różnic w metodach utrwalania i osadzania lub z nieodłącznych nieprawidłowości w tkance.¹²
4. Nadmierne lub niepełne barwienie kontrastowe może zakłócić prawidłową interpretację wyników.
5. Kliniczną interpretację każdego dodatniego lub ujemnego zabarwienia należy ocenić w kontekście obrazu klinicznego, morfologii i innych kryteriów histopatologicznych. Kliniczną interpretację każdego dodatniego lub ujemnego zabarwienia należy uzupełnić badaniami

morfologicznymi z zastosowaniem odpowiednich dodatnich i ujemnych kontroli wewnętrznych i zewnętrznych, a także innych testów diagnostycznych. Za interpretację wszystkich etapów przygotowania i interpretacji końcowego preparatu IHC odpowiada wykwalifikowany patolog, który jest zaznajomiony z właściwym użyciem przeciwciał IHC, odczynników i metod.

6. Optymalne rozcieńczenie przeciwciał i protokoły dla konkretnego zastosowania mogą się różnić. Należą do nich między innymi utrwalanie, metoda odzyskiwania ciepła, czasy inkubacji, grubość skrawków tkanki i zastosowany zestaw do detekcji. Ze względu na wyjątkową czułość tych unikalnych odczynników, podane zalecane czasy inkubacji i miana nie mają zastosowania do innych systemów detekcji, ponieważ wyniki mogą się różnić. Zalecenia i protokoły zawarte w arkuszach danych opierają się na wyłącznym stosowaniu produktów Biocare. Ostatecznie zadaniem badacza jest określenie optymalnych warunków.
7. Ten produkt nie jest przeznaczony do stosowania w cytometrii przepływowej. Charakterystyki działania nie zostały określone dla cytometrii przepływowej.
8. Tkanki osób zakażonych wirusem zapalenia wątroby typu B i zawierające antygen powierzchniowy wirusa zapalenia wątroby typu B (HBsAg) mogą wykazywać niespecyficzne barwienie peroksydazą chrzanową.¹³
9. Odczynniki mogą wykazywać nieoczekiwane reakcje w wcześniej nietestowanych tkankach. Nie można całkowicie wyeliminować możliwości wystąpienia nieoczekiwanych reakcji nawet w badanych grupach tkanek ze względu na biologiczną zmienność ekspresji antygenów w nowotworach lub innych tkankach patologicznych.¹⁴ Skontaktuj się z pomocą techniczną firmy Biocare pod numerem 1-800-542-2002 lub za pośrednictwem informacji pomocy technicznej dostępnych na stronie biocare.net, z udokumentowanymi nieoczekiwanymi reakcjami.
10. Surowice normalne/nieimmunologiczne pochodzące z tego samego źródła zwierzęcego, co surowice wtórne stosowane na etapach blokowania, mogą dawać wyniki fałszywie ujemne lub fałszywie dodatnie ze względu na obecność autoprzeciwciał lub przeciwciał naturalnych.
11. Wyniki fałszywie dodatnie mogą wystąpić w wyniku nieimmunologicznego wiązania białek lub produktów reakcji substratu. Mogą być również spowodowane aktywnością pseudoperoxydazy (erytrocyty), endogenną aktywnością peroxydazy (cytochrom C) lub endogenną biotyną (np. wątroba, piers, mózg, nerki), w zależności od rodzaju użytego barwnika immunologicznego.¹²

Ograniczenia specyficzne dla produktu:

Brak dodatkowych ograniczeń specyficznych dla produktu.

Charakterystyka wydajności:

Powtarzalność:

Powtarzalność działania przeciwciał sprawdzono poprzez badanie wybranych tkanek prawidłowych i nowotworowych w różnych dniach i przy użyciu różnych instrumentów, przy udziale wielu operatorów. Barwienie wybranych tkanek było spójne i przeprowadzone zgodnie z oczekiwaniami.

Immunoreaktywność:

W Tabelach 1 i 2 poniżej wykazano następujące dodatnie i ujemne immunoreaktywności.

Poniższa lista nie jest wyczerpująca, ale charakteryzuje rodzaje reakcji immunologicznych obserwowanych w przypadku wskazanego przeciwciała.

W tym produkcie nie zaobserwowano żadnej nieswoistej reaktywności przeciwciał.

Podsumowanie oczekiwanych wyników:

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Polish

Częstość występowania PRAME w tkankach prawidłowych i w stanie chorobowym oceniano za pomocą mikromacierzy tkankowych (TMA).

Badane prawidłowe tkanki wybarwiły się zgodnie z oczekiwaniami, przy czym zaobserwowano wysoki poziom wybarwienia w jądrach i brak zabarwienia w innych tkankach.

Zgodnie z oczekiwaniami zaobserwowano wysokie zabarwienie preparatu PRAME w przypadku czerniaka oraz różne poziomy w innych tkankach nowotworowych, takich jak jajnik, płuca, prostata i sutek.

Wydajność analityczna:

Przeprowadzono testy barwienia pod kątem czułości i swoistości, a wyniki przedstawiono poniżej.

BIOCARE
M E D I C A L

Czułość i swoistość:

Tabela 1: Czułość i swoistość przeciwciała określono poprzez badanie prawidłowych tkanek FFPE.

Tkanka	Pozytywne przypadki	Całkowita liczba przypadków
Mózg	0	6
Mózdzek	0	3
Nadnerkowy	0	3
Jajnik	0	3
Trzustka	0	3
Tchawica	0	3
Przysadka mózgowa	0	3
Jądro*	3	3
Tarczyca	0	3
Pierś	0	3
Śledziona	0	3
Migdałek	0	3
Grasica	0	3
Szpig kostny**	0	1
Płuco	0	3
Serce	0	3
Przełyk	0	3
Żołądek	0	3
Jelito cienkie	0	3
Okrężnica	0	3
Wątroba	0	3
Gruczoł ślinowy	0	3
Nerka	0	3
Prostata	0	3
Macica	0	3
Szyjka macicy	0	3
Mięśnie szkieletowe	0	3
Skóra	0	3
Nerw obwodowy	0	3
Komórki wyściółkowe	0	3
Głowa, szyja i gruczoły ślinowe	0	6
Węzeł limfatyczny	0	3

* Barwienie jądrowe o sile 3-4

** Brak dwóch próbek

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Polish

BIOCARE
M E D I C A L

Tabela 2: Czulość i swoistość przeciwciała określono poprzez badanie różnych tkanek nowotworowych FFPE.

Patologia	Pozytywne przypadki	Całkowita liczba przypadków
Czerniak	29	39
Rak jajnika	9	44
Rak piersi	10	26
Rak jelita grubego	4	43
Rak płuc	21	50
Rak prostaty	18	41
Rak kory nadnerczy	0	1
Rak pęcherza	0	2
Oponiak	0	2
Gwiaździatek	0	1
Rak płaskonabłonkowy (przełyk)	0	2
Gruzołakorak (żołądek)	0	2
Gruzołakorak (jelito cienkie)	0	1
Gruzołakorak (okreźnicy i odbytnicy)	0	6
Rak nerki	0	2
Rak wątroby	0	4
Chłoniak	0	3
Rak płaskonabłonkowy (głowa i szyja, jama ustna, język)	0	1
Rak jamy nosowo-gardłowej	1	1
Gruzołakorak (trzustka)	0	1
Gruzołakorak (prostaty)	0	2
Rak migdałkowo-torbielowaty (głowy i szyi, gruczołów ślinowych)	0	1
Rak płaskonabłonkowy (skóra)	0	1
Nasieniak	0	2
Rak tarczycy	0	2
Rak szyjki macicy	0	2
Rak endometrium	1	2

Ekspresja PRAME w różnych nowotworach może wykazywać zmienny procent dodatniego wyniku nowotworu. W Tabeli 3 podano procent komórek nowotworowych o dodatnim wybarwieniu (w podziale na kwartyle) obserwowany w różnych nowotworach podanych w Tabeli 2.

Tabela 3: Procent dodatniego barwienia komórek nowotworowych w różnych nowotworach FFPE.

Tkanki	Procent wybarwienia komórek nowotworowych Liczba przypadków wykazujących barwienie Procent całkowitej liczby przypadków (%)				
	<1%	1-25%	26-50%	51-75%	> 75%
Rak jajnika	35/44 (79,5%)	2/44 (4,5%)	3/44 (6,8%)	3/44 (6,8%)	1/44 (2,3%)
Rak piersi	16/26 (61,5%)	7/26 (26,9%)	1/26 (3,8%)	2/26 (7,7%)	0 (0%)
Rak jelita grubego	39/43 (88,4%)	4/43 (11,6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Rak płuc	29/50 (58,0%)	7/50 (14,0%)	4/50 (8,0%)	7/50 (14,0%)	3/50 (6,0%)
Rak prostaty	23/41 (56,1%)	9/41 (22,0%)	3/41 (7,3%)	2/41 (4,9%)	4/41 (9,8%)
Rak jamy nosowo-gardłowej	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1/1 (100%)
Rak endometrium	1/2 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	1/2 (50%)	0 (0%)
Czerniak	10/39 (25,6%)	6/39 (15,4%)	5/39 (12,8%)	6/39 (15,4%)	12/39 (30,8%)

Procentowe barwienie komórek nowotworowych przedstawiono dla wszystkich intensywności barwienia.

Barwienie tkanek wykazujące różne poziomy ekspresji białka PRAME.

Wyniki testów wydajności analitycznej wykazały, że przeciwciało PRAME [EPR20330] może poprawnie wykryć białko PRAME przy zastosowaniu zdefiniowanego protokołu IHC. Nieprawidłowe wyniki badań tkanek potwierdzają wniosek, że PRAME [EPR20330] jest wrażliwy na białko PRAME przy stosowaniu zalecanych protokołów IHC. Przeciwciało PRAME [EPR20330] jest w stanie wykryć niski do wysokiego poziomu białka PRAME. Badanie normalnych tkanek nie wykazało nieoczekiwane wykrycia PRAME w 32 typach tkanek. Nie wystąpiła nieoczekiwana reakcja krzyżowa. Wyniki potwierdzają twierdzenie, że przeciwciało PRAME [EPR20330] jest wysoce swoiste (swoistość analityczna) wobec białka PRAME.

Wydajność kliniczna:

Przeprowadzono testy barwiące pod kątem czulości i swoistości diagnostycznej, a wyniki wymieniono poniżej. Dodatnią i ujemną immunoreaktywność odnotowano w Tabeli 4.

Trzy preparaty TMA dotyczące czerniaka wybarwiono w firmie Biocare i wysłano do zewnętrznego patologa w celu odczytania i oceny. Tkanki czerniaka wykazywały zróżnicowaną punktację barwienia w zakresie od 0 (ujemny) do silnego (4). Większość znamion melanocytowych nie wykazywała reaktywności PRAME, ale kilka wykazywało silną reaktywność.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Polish

BIOCARE
M E D I C A L

Tabela 4: Procent dodatniego barwienia komórek nowotworowych w różnych nowotworach melanocytowych FFPE i skórze.

Tkanki	Procent wybarwienia komórek nowotworowych Liczba przypadków wykazujących barwienie Procent całkowitej liczby przypadków (%)				
	<1%	1-25%	26-50%	51-75%	> 75%
Czerniak	28/133 (21,1%)	50/133 (37,6%)	10/133 (7,5%)	8/133 (6,0%)	37/133 (27,8%)
Czerniak z przerzutami	7/38 (18,4%)	10/38 (26,3%)	3/38 (7,9%)	2/38 (5,3%)	16/38 (42,1%)
Znamiona melanocytowe	12/14 (85,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2/12 (14,3%)
Skóra	10/10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Procentowe barwienie komórek nowotworowych przedstawiono dla wszystkich intensywności barwienia.

Barwienie tkanek wykazujące różne poziomy ekspresji białka PRAME.

Pierwszorzędownym punktem końcowym testu była ocena czułości diagnostycznej przeciwciała PRAME [EPR20330] w procedurze IHC, zdefiniowanej jako wskaźnik wykrywalności czerniaka w potwierdzonych próbkach pozytywnych. [TP/(TP+FN)]

Drugorzędowym punktem końcowym była ocena specyficzności diagnostycznej – współczynnika wykrywalności ujemnych próbek z potwierdzonym czerniakiem. [TN/(TN+FP)]

Było 35 fałszywie ujemnych przypadków czerniaka, które uzyskały złoty standard oceny patologicznej jako czerniak, ale dały wynik negatywny w teście PRAME. 136 przypadków dało wynik prawdziwie pozytywny, ponieważ zdiagnozowano u nich czerniaka i wykazano sygnał dla PRAME. W 14 próbkach znamion melanocytowych, które uznano za łagodne i wykazywały sygnał dla PRAME, wykryto dwa wyniki fałszywie dodatnie.

Z danych wynika, że szacowana czułość diagnostyczna = $136 / (136 + 35) = 79,5\%$

Z danych oszacowano swoistość diagnostyczną = $22 / (22 + 2) = 91,7\%$

Na podstawie naszych obliczeń szacujemy czułość diagnostyczną na poziomie 79,5% i swoistość diagnostyczną na poziomie 91,7% w wykrywaniu czerniaka.

Z tego wnioskujemy, że przeciwciała PRAME [EPR20330], testowane przez firmę Biocare na próbkach czerniaka i znamion melanocytowych, jest wrażliwe na czerniaka i wysoce swoiste dla czerniaka.

Rozwiązywanie problemów: (podaj wyjaśnienie każdego z poniższych punktów)

1. Brak barwienia jakichkolwiek szkiełek – sprawdzić, czy użyto odpowiedniej tkanki kontroli pozytywnej, przeciwciała i produktów do wykrywania.
2. Słabe barwienie wszystkich preparatów – sprawdzić, czy użyto odpowiedniej tkanki kontroli pozytywnej, przeciwciała i produktów do wykrywania.
3. Nadmierne tło wszystkich preparatów – Może występować wysoki poziom endogennej biotyny (w przypadku stosowania produktów do wykrywania na bazie biotyny), endogenna aktywność HRP przekształcająca chromogen w kolorowy produkt końcowy (użyj bloku peroksydazy) lub nadmierne niespecyficzne interakcje białek (użyj białka bloker, taki jak roztwór blokujący na bazie surowicy lub kazeiny).

4. Skrawki tkanek zmywają szkiełka podczas inkubacji – Sprawdź szkiełka, aby upewnić się, że są naładowane dodatnio.
5. Specyficzne barwienie jest zbyt ciemne – Sprawdź protokół, aby ustalić, czy do szkiełka nałożono właściwe miano przeciwciała, a także czy określono właściwy czas inkubacji dla wszystkich odczynników. Ponadto należy upewnić się, że protokół zawiera wystarczającą liczbę etapów płukania, aby usunąć nadmiar odczynników po zakończeniu etapów inkubacji.

Bibliografia:

1. Kiernan JA. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. J Histotechnol. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. Biotech Histochem. 1996 Jan;71(5):263-70.
6. Center for Disease Control Manual. Guide: Safety Management, NO. CDC-22, Atlanta, GA. April 30, 1976 "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts."
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
8. CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011
9. College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. <http://www.cap.org> (800) 323-4040.
10. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
11. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques. Histochemistry 1987; 86:471-478.
12. Nadjji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Lab Med 1983;14:767.
13. Omata M, Liew CT, Ashcavi M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradishperoxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. Am J Clin Path 1980;73:626.
14. Herman GE and Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech & Histochem 1991;66:194.
15. Zhang W, et al. PRAME expression and promoter hypermethylation in epithelial ovarian cancer. Oncotarget, 2016 Jul; 7(29):45352-69.
16. Lezcano C, et al. PRAME expression in melanocytic tumors. Am J Surg Pathol. 2018 Nov; 42(11):1456-65.

Ultraline są opracowywane wyłącznie przez Biocare Medical LLC i nie oznaczają zatwierdzenia ani poparcia przeciwciała Biocare przez Ventana Medical Systems, Inc lub Roche. Biocare, Ventana i Roche nie są w żaden sposób powiązane, stowarzyszone ani powiązane. Ventana®, BenchMark®, ultraView i OptiView są znakami towarowymi firmy Roche.

Przeciwciała serii Q zostały opracowane wyłącznie przez Biocare Medical LLC i nie oznaczają zatwierdzenia ani poparcia przeciwciała Biocare przez Leica Biosystems. Firmy Biocare i Leica Biosystems nie są w żaden sposób powiązane, stowarzyszone ani powiązane. Leica, Leica Biosystems, BOND-MAX i BOND-III są znakami towarowymi firmy Leica Biosystems.

Podsumowanie bezpieczeństwa i działania można znaleźć tutaj: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Portuguese

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats				
Format	Catalog Number	Description	Dilution	Diluent
Concentrate	ACI 3252 A, B	0.1, 0.5 mL	1:100	Van Gogh Yellow
Predilute	API 3252 AA, G20, H	6.0, 20, 25 mL	Ready-to-use	N/A
ONCORE Pro	OPAI 3252 T60	60 tests	Ready-to-use	N/A
Q Series-- For Leica BOND-III	ALI 3252 G7	7.0 mL	Ready-to-use	N/A
UltraLine -- For BenchMark	AVI 3252 G, G25	6.0, 25 mL	Ready-to-use	N/A

Uso pretendido:

Para uso diagnóstico *in vitro*

PRAME [EPR20330] é um anticorpo monoclonal de coelho destinado ao uso laboratorial após o diagnóstico inicial do tumor ter sido feito por histopatologia convencional usando colorações histoquímicas não imunológicas, na identificação qualitativa da proteína PRAME por imunohistoquímica (IHC) em parafina fixada em formalina. tecidos humanos incorporados (FFPE). A interpretação clínica de qualquer coloração ou da sua ausência deve ser complementada por estudos morfológicos utilizando controlos adequados e deve ser avaliada no contexto da história clínica do paciente e de outros testes de diagnóstico por um patologista qualificado como auxílio na realização de quaisquer outras determinações clínicas.

Resumo e explicação:

PRAME está localizado no cromossomo 22q11.22 e codifica uma proteína de 509 aminoácidos. PRAME é um gene autossômico de antígeno testicular de câncer (CTA) que demonstrou ser expresso em melanoma, várias neoplasias malignas não melanocíticas, incluindo câncer de pulmão de células não pequenas, carcinoma de mama, carcinoma de ovário e vários outros citados. Não se sabe que tecidos saudáveis normais expressam PRAME, exceto testículos, ovários, supra-renais e alguns outros citados na literatura. ^(15,16)

Princípio do Procedimento:

Este produto de anticorpo pode ser usado como anticorpo primário em testes imunohistoquímicos de secções de tecido fixadas em formalina e embebidas em parafina. Em geral, imunohistoquímica (IHQ) técnicas de coloração permitem a visualização de antígenos através da aplicação sequencial de um anticorpo específico para o antígeno (anticorpo primário), um anticorpo secundário para o anticorpo primário (ligação anticorpo/sonda opcional), um complexo enzimático e um substrato cromogénico com etapas de lavagem interpostas. A ativação enzimática do cromogénio resulta em um produto de reação visível no local do antígeno. A amostra pode então ser contrastada e laminada. Os resultados são interpretados usando uma luz microscópio e auxiliar no diagnóstico diferencial de processos fisiopatológicos, que podem ou não estar associado a um antígeno específico.

Materiais e métodos:

Reagentes fornecidos:

Fonte hospedeira: Coelho monoclonal

Reatividade da espécie: Humana. Outras espécies não testadas.

Clone: EPR20330

Isótipo: IgG

Concentração Proteica: Concentração Específica de IgG: Contate o Suporte Técnico da Biocare

Especificidade: PRAME

Localização Celular: Núcleo e membrana celular

Método: Monoclonal de coelho recombinante purificado por afinidade.

Reconstituição, mistura, diluição, titulação:

O reagente de anticorpo pré-diluído é diluído de forma ideal para utilização com os sistemas de coloração listados acima. Uma diluição adicional pode resultar na perda da coloração do antígeno. O usuário deve validar qualquer alteração desse tipo. As diferenças no processamento de tecidos e nos procedimentos técnicos no laboratório do utilizador podem produzir uma

variabilidade significativa nos resultados, necessitando da realização regular de controlos internos (ver secção Controlo de Qualidade).

O reagente concentrado requer diluição conforme indicado na tabela acima.

Aplicações conhecidas:

Imunohistoquímica (tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina)

Fornecido como: Solução salina tamponada, pH 5,9-7,9 contendo um transportador de proteína e menos de 0,1% de conservante azida de sódio. Consulte a Ficha de Dados de Segurança para obter detalhes adicionais.

Materiais e reagentes necessários, mas não fornecidos:

Lâminas de microscópio carregadas positivamente.

Controlos de tecido positivos e negativos

Câmara do Deserto (ou forno de secagem semelhante)

Xileno ou substituto de xileno

Etanol ou álcool reagente

Câmara de descamufagem (painel de pressão)

Água deionizada ou destilada

Tampão de lavagem

Reagentes de pré-tratamento

Bloqueio de peroxidase

Bloco de proteína (opcional)

Sonda de detecção e polímero

Reagentes de controle negativo

Cromógenos

Hematoxilina (contracorante)

Reagente azul

Meio de montagem

Tampa de vidro

Microscópio óptico (ampliação de 40-400X)

As configurações do produto de anticorpo estão disponíveis para utilização nos instrumentos indicados na tabela acima.

Armazenamento e estabilidade:

Conservar entre 2°C a 8°C. O produto é estável até o prazo de validade impresso no rótulo do frasco, quando armazenado nessas condições. Não use após a data de validade. O armazenamento sob qualquer condição diferente das especificadas deve ser verificado. Os reagentes diluídos devem ser usados imediatamente; armazenar qualquer reagente restante entre 2°C e 8°C. A estabilidade do reagente diluído pelo utilizador não foi estabelecida pela Biocare.

Os controlos positivos e negativos devem ser analisados simultaneamente com todas as amostras dos pacientes. Se for observada coloração inesperada que não pode ser explicada por variações nos procedimentos laboratoriais e houver suspeita de um problema com o anticorpo, entre em contato com o Suporte Técnico da Biocare pelo telefone 1-800-542-2002 ou através das informações de suporte técnico fornecidas em biocare.net.

Preparação de amostras:

Os tecidos fixados em formalina são adequados para utilização antes da inclusão em parafina. Os tecidos ósseos devem ser descalcificados antes do



60 Berry Drive
Pacheco, CA 94553
USA

142/190



TP v3 (12/15/2021)

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080



Westervoortsedijk 60
8627 AT Arnhem
The Netherlands

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Portuguese

BIOCARE
M E D I C A L

processamento do tecido para facilitar o corte do tecido e evitar danos às lâminas do micrótomo. ^{1, 2}

Os tecidos devidamente fixados e embebidos que expressam o antígeno alvo especificado devem ser armazenados em local fresco. A Lei de Melhoria de Laboratórios Clínicos (CLIA) de 1988 exige em 42 CFR § 493.1259(b) que "O laboratório deve reter as lâminas coradas por pelo menos dez anos a partir da data de exame e reter blocos de amostras por pelo menos dois anos a partir da data do exame."³

Tratamento de tecidos antes da coloração:

Execute a recuperação de epítomos induzida por calor (HIER) de acordo com o protocolo recomendado abaixo. Foi demonstrado que o uso rotineiro de HIER antes da IHC minimiza a inconsistência e padroniza a coloração. ^{4,5}

Aviso e Precauções :

1. Este anticorpo contém menos de 0,1% de azida de sódio . Concentrações inferiores a 0,1% não são materiais perigosos reportáveis de acordo com US 29 CFR 1910.1200, comunicação de perigo OSHA e diretiva CE 91/155/EC. A azida sódica (NaN₃) usada como conservante é tóxica se ingerida. A azida de sódio pode reagir com encanamentos de chumbo e cobre formando azidas metálicas altamente explosivas . Após o descarte, lave com grandes volumes de água para evitar o acúmulo de azida no encanamento. (Centro de Controle de Doenças, 1976, Instituto Nacional de Segurança e Saúde Ocupacional, 1976) ⁶
2. As amostras, antes e depois da fixação, e todos os materiais a elas expostos devem ser manuseados como se fossem capazes de transmitir infecções e eliminados com as devidas precauções. Nunca pipete reagentes com a boca e evite o contacto da pele e das membranas mucosas com reagentes e amostras. Se os reagentes ou as amostras entrarem em contacto com áreas sensíveis, lave com água em abundância. ⁷
3. A contaminação microbiana dos reagentes pode resultar num aumento de coloração inespecífica.
4. Tempos de incubação ou temperaturas diferentes dos especificados podem dar resultados errados. O usuário deve validar qualquer alteração desse tipo.
5. Não utilize o reagente após o prazo de validade impresso no frasco.
6. O reagente de anticorpo pré-diluído é diluído de forma ideal para utilização . Uma diluição adicional pode resultar na perda da coloração do antígeno.
7. A diluição do reagente de anticorpo concentrado deve ser validada antes da utilização. Qualquer o diluente usado que não seja especificamente recomendado também deve ser validado quanto à compatibilidade e estabilidade.
8. Descarte todos os reagentes usados e quaisquer outros materiais descartáveis contaminados seguindo os procedimentos para resíduos infecciosos ou potencialmente infecciosos. É responsabilidade de cada laboratório manusear os resíduos sólidos e líquidos de acordo com a sua natureza e grau de perigosidade e tratá-los e descartá-los (ou fazer com que sejam tratados e eliminados) de acordo com quaisquer regulamentos aplicáveis.
9. Siga os regulamentos de descarte locais de sua localidade, juntamente com as recomendações da Ficha de Dados de Segurança, para determinar o descarte seguro deste produto.
10. A FDS está disponível mediante solicitação e está localizada em <http://biocare.net>.
11. Para comunicar suspeitas de incidentes graves relacionados com este dispositivo, contacte o representante local da Biocare e a autoridade competente do Estado-Membro ou país onde o utilizador está estabelecido.

Instruções de uso:

Protocolos de coloração recomendados para PRAME [EPR20330]:

IntelliPATH FLX and manual use:

API3252 para IntelliPATH FLX e uso manual, foi padronizado com sistema de detecção MACH 4. Use TBS para etapas de lavagem.

Peroxide Block:	Bloquear por 5 minutos com Peroxidized 1.
Pretreatment:	Execute a recuperação de calor usando Borg Decloaker . Consulte a folha de dados do Borg Decloaker para obter instruções específicas.
Protein Block (Optional):	Incubar por 5-10 minutos em temperatura ambiente com Punisher de fundo.
Primary Antibody:	Incubar por 30 minutos em temperatura ambiente.
Detection:	Sonda: N/A
	Polímero: Incubar durante 30 minutos à temperatura ambiente com um polímero conjugado secundário.
Chromogen:	Incubar durante 5 minutos à temperatura ambiente com DAB da Biocare – OU – Incubar durante 5-7 minutos à temperatura ambiente com Warp Red.
Counterstain	Contracoloração com hematoxilina. Enxágüe com água deionizada. Aplique a solução Bluing da Tacha por 1 minuto. Enxágüe com água deionizada.

ONCORE Pro Automated Slide Staining System:

OPAI3252 deve ser usado com o ONCORE Pro. Consulte o Manual do Usuário para obter instruções específicas de uso. Os parâmetros do protocolo no Editor de protocolo devem ser programados da seguinte forma:		
Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	PRAME Rb	PRAME Rb AP
Protocol Template (Description):	Special Template (ONCORE Pro-Tect Detection Required)	Rb AP Template 1
Dewaxing (DS Buffer Option):	DS2-50	DS Buffer
Antigen Retrieval (AR Option):	AR1, high pH; 103°C	AR1, high pH; 103°C
Block Option:	Buffer	Buffer
Reagent Name, Time, Temp.:	PRAME Rb, 45 min., 25°C	PRAME Rb, 30 min., 25°C

Ventana BenchMark ULTRA:

AVI3252 deve ser usado com o BenchMark ULTRA. Consulte o Manual do Usuário para obter instruções específicas de uso. Os parâmetros de protocolo recomendados são os seguintes:	
Template/Detection:	OptiView DAB IHC
Pretreatment Protocol:	CC1 64 minutes
Peroxidase:	Pre-Primary Peroxidase Inhibitor
Primary Antibody:	32 minutes, 36°C

Q Series – For Leica BOND-III:

ALI3252 deve ser usado com o Leica BOND-III. Consulte o Manual do Usuário para obter instruções específicas de uso. Os parâmetros de protocolo recomendados são os seguintes:		
Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	IHC Protocol F	IHC Protocol J
Detection:	Bond Polymer Refine	Bond Polymer Refine Red
HIER:	20 min with ER2	20 min with ER2
Peroxide Block:	5 min	
Marker (Primary Antibody):	15 min	15 min

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody

901-3252-092023

Portuguese

BIOCARE
M E D I C A L

Post Primary:	8 min	
Polymer:	8 min	
Post Primary AP:		20 min
Polymer AP:		30 min
Mixed Chromogen Refine:	10 min	10 min + 5 min
Hematoxylin:	5 min	5 min

Controle de qualidade:

Consulte os Padrões de Qualidade CLSI para Projeto e Implementação de Ensaio Imunohistoquímicos; Diretriz Aprovada – Segunda edição (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA EUA (www.clsi.org). 2011 ⁸

Controle Positivo de Tecidos: Melanoma, testículo normal

Os materiais de controle positivo externo devem ser amostras frescas fixadas, processadas e incorporadas o mais rápido possível, da mesma maneira que a(s) amostra(s) do paciente. Os controles teciduais positivos são indicativos de tecidos correctamente preparados e de técnicas de coloração adequadas. Deve ser incluído em cada execução de coloração um controle tecidual externo positivo para cada conjunto de condições de teste.

Os tecidos utilizados para os materiais de controle positivo externo devem ser seleccionados a partir de amostras de pacientes com níveis baixos bem caracterizados da actividade alvo positiva que proporcionam uma coloração positiva fraca. O baixo nível de positividade para controles positivos externos foi projetado para garantir a detecção de alterações sutis na sensibilidade do anticorpo primário devido à instabilidade ou problemas com a metodologia IHC. As lâminas de controle de tecidos disponíveis comercialmente ou as amostras processadas de forma diferente da(s) amostra(s) do paciente validam apenas o desempenho dos reagentes e não verificam a preparação do tecido.

Os controles teciduais positivos conhecidos só devem ser utilizados para monitorizar o desempenho correcto dos tecidos processados e dos reagentes de teste, e não como auxílio na formulação de um diagnóstico específico de amostras de pacientes. Se os controles teciduais positivos não demonstrarem coloração positiva, os resultados com as amostras de teste deverão ser considerados inválidos.

Controle Negativo de Tecidos:

Use um controle de tecido negativo (conhecido como negativo para PRAME) fixado, processado e incorporado de maneira idêntica à(s) amostra(s) do paciente em cada execução de coloração para verificar a especificidade do anticorpo primário IHC para demonstração do antígeno alvo e para fornecer uma indicação de coloração de fundo específica (coloração falso positivo). Além disso, a variedade de diferentes tipos de células presentes na maioria das secções de tecido pode ser usados pelo laboratório como locais de controle negativo interno para verificar o desempenho do IHC especificações. Os tipos e fontes de amostras que podem ser usadas para tecido negativo os controles estão listados na seção Características de desempenho.

Se ocorrer coloração específica (coloração falsa positiva) no controle negativo do tecido, os resultados com as amostras do paciente deverão ser considerados inválidos.

Controle de reagente negativo inespecífico:

Use um controle de reagente negativo inespecífico no lugar do anticorpo primário com uma seção de cada amostra do paciente para avaliar coloração inespecífica e

permitem uma melhor interpretação da coloração específica no local do antígeno. Idealmente, um controle de reagente negativo contém um anticorpo PRAME IgG produzido a partir do sobrenadante da cultura de tecidos da mesma forma que o primário. anticorpo, mas não apresenta reatividade específica com tecidos humanos na mesma matriz/solução que o anticorpo Biocare . Diluir um anticorpo de controle negativo na mesma concentração de imunoglobulina ou proteína que o primário diluído anticorpo

usando o diluente idêntico. Se o soro fetal de vitelo for retido no anticorpo puro após o processamento, o soro fetal de vitelo numa concentração de proteína equivalente ao diluído anticorpo primário no mesmo diluente também é adequado para uso. (Consulte o reagente fornecido). O diluente sozinho pode ser utilizado como uma alternativa menos desejável aos controles de reagentes negativos descritos anteriormente. O período de incubação do reagente de controle negativo deve corresponder ao do anticorpo primário.

Quando são utilizados painéis de vários anticorpos em secções em série, as áreas de coloração negativa de uma lâmina podem servir como controle de fundo de ligação negativo/inespecífico para outros anticorpos. Para diferenciar a atividade enzimática endógena ou a ligação inespecífica de enzimas da imunorreatividade específica, tecidos adicionais do paciente podem ser corados exclusivamente com substrato-cromógeno ou complexos enzimáticos (PAP, avidina-biotina, estreptavidina) e substrato-cromógeno, respectivamente.

Verificação do ensaio:

Antes da utilização inicial de um anticorpo ou sistema de coloração num procedimento de diagnóstico, o utilizador deve verificar a especificidade do anticorpo testando-o numa série de tecidos internos com características de desempenho imuno-histoquímica conhecidas, representando tecidos positivos e negativos conhecidos. Consulte os procedimentos de controle de qualidade previamente descritos nesta seção da bula do produto e as recomendações de controle de qualidade do Programa de Certificação CAP ⁹ para Imunohistoquímica e/ou a diretriz NCCLS IHC ¹⁰). Estes procedimentos de controle de qualidade devem ser repetidos para cada novo lote de anticorpos ou sempre que houver alteração nos parâmetros do ensaio. Os tecidos listados na Seção de Características de Desempenho são adequados para verificação de ensaio.

Solução de problemas:

Siga as recomendações do protocolo específico do anticorpo de acordo com a ficha técnica fornecida. Se ocorrerem resultados atípicos, entre em contato com o Suporte Técnico da Biocare pelo telefone 1-800-542-2002.

Interpretação da coloração:

Controle Positivo de Tecidos:

O controle tecidular positivo corado com o anticorpo indicado deve ser examinado primeiro para verificar se todos os reagentes estão a funcionar correctamente. A coloração apropriada das células alvo (como indicado acima) é indicativa de reatividade positiva. Se os controles teciduais positivos não demonstrarem coloração positiva, quaisquer resultados com as amostras de teste deverão ser considerados inválidos.

A cor do produto da reação pode variar dependendo dos cromógenos do substrato utilizados. Consulte as bulas do substrato para obter as reações de cor esperadas. Além disso, a metacromasia pode ser observada em variações do método de coloração. ¹¹

Quando é utilizado um contracorante, dependendo da duração da incubação e da potência do contracorante utilizado, o contracorante resultará numa coloração dos núcleos das células. A contrastação excessiva ou incompleta pode comprometer a interpretação adequada dos resultados. Consulte o(s) protocolo(s) para obter a contracoloração recomendada.

Controle Negativo de Tecidos :

O controle tecidular negativo deve ser examinado após o controle tecidular positivo para verificar a especificidade da marcação do antígeno alvo pelo anticorpo primário. A ausência de coloração específica no controle tecidular negativo confirma a falta de reatividade cruzada do anticorpo às células/componentes celulares . Se ocorrer coloração específica (coloração falsa positiva) no controle tecidular externo negativo, os resultados com a amostra do paciente deverão ser considerados inválidos.



60 Berry Drive
Pacheco, CA 94553
USA

144/190



TP v3 (12/15/2021)

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080



Westervoortsedijk 60
6827 AT Arnhem
The Netherlands

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

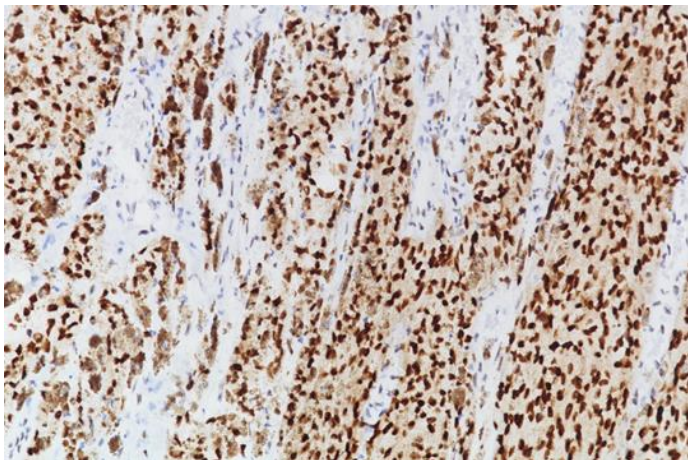
Portuguese

BIOCARE
M E D I C A L

A coloração inespecífica, se presente, geralmente tem aparência difusa. A coloração esporádica do tecido conjuntivo também pode ser observada em secções de tecidos excessivamente fixados em formalina. Use células intactas para interpretação dos resultados de coloração. Células necróticas ou degeneradas geralmente apresentam coloração inespecífica.

Tecido do Paciente:

Examinar amostras de pacientes coradas com o anticorpo indicado durar. A intensidade da coloração positiva deve ser avaliada no contexto de qualquer coloração de fundo inespecífica do controlo de reagente negativo. Tal como acontece com qualquer teste imuno-histoquímico, um resultado negativo significa que o antígeno não foi detectado, e não que o antígeno estava ausente nas células/tecidos analisados. Se necessário, utilize um painel de anticorpos para identificar reações falso-negativas.



Melanoma corado com anticorpo PRAME [EPR20330].

Consulte Resumo e Explicação, Limitações e Características de Desempenho para obter informações específicas sobre a imunorreatividade de anticorpos indicada.

Limitações:

Limitações Gerais:

1. Para uso diagnóstico *in vitro*
2. Este produto é apenas para uso profissional: A imunohistoquímica é um processo de diagnóstico em múltiplas etapas que consiste em treinamento especializado na seleção dos reagentes adequados; seleção, fixação e processamento de tecidos; preparação da lâmina IHC; e interpretação dos resultados da coloração.
3. A coloração do tecido depende do manuseio e processamento do tecido antes da coloração. Fixação, congelamento, descongelamento, lavagem, secagem, aquecimento, seccionamento ou contaminação inadequados com outros tecidos ou fluidos podem produzir artefatos, aprisionamento de anticorpos ou resultados falsos negativos. Resultados inconsistentes podem ser devidos a variações nos métodos de fixação e inclusão, ou a irregularidades inerentes ao tecido.¹²
4. A contrastação excessiva ou incompleta pode comprometer a interpretação adequada dos resultados.
5. A interpretação clínica de qualquer coloração positiva ou negativa deve ser avaliada dentro do contexto da apresentação clínica, morfologia e outros critérios histopatológicos. A interpretação clínica de qualquer coloração positiva ou negativa deve ser complementada por estudos morfológicos utilizando controlos internos e externos positivos e negativos adequados, bem como outros testes de diagnóstico. É responsabilidade de um patologista qualificado que esteja familiarizado com o uso adequado de anticorpos, reagentes e métodos de IHC

interpretar todas as etapas usadas para preparar e interpretar a preparação final de IHC.

6. A diluição ideal de anticorpos e os protocolos para uma aplicação específica podem variar. Estes incluem, mas não estão limitados a fixação, método de recuperação de calor, tempos de incubação, espessura da secção de tecido e kit de detecção utilizado. Devido à sensibilidade superior destes reagentes exclusivos, os tempos de incubação recomendados e os títulos listados não são aplicáveis a outros sistemas de detecção, pois os resultados podem variar. As recomendações e protocolos da ficha técnica são baseados no uso exclusivo de produtos Biocare. Em última análise, é responsabilidade do investigador determinar as condições ideais.
7. Este produto não se destina ao uso em citometria de fluxo. As características de desempenho não foram determinadas para citometria de fluxo.
8. Os tecidos de pessoas infectadas com o vírus da hepatite B e contendo antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) podem apresentar coloração inespecífica com peroxidase de rábano.¹³
9. Os reagentes podem demonstrar reações inesperadas em tecidos não testados anteriormente. A possibilidade de reações inesperadas mesmo em grupos de tecidos testados não pode ser completamente eliminada devido à variabilidade biológica da expressão do antígeno em neoplasias ou outros tecidos patológicos.¹⁴ Entre em contato com o suporte técnico da Biocare pelo telefone 1-800-542-2002, ou por meio das informações de suporte técnico fornecidas em biocare.net, com reação(ões) inesperada(s) documentada(s).
10. Os soros normais/não imunes da mesma origem animal que os anticorpos secundários utilizados nas etapas de bloqueio podem causar resultados falso-negativos ou falso-positivos devido a autoanticorpos ou anticorpos naturais.
11. Resultados falso-positivos podem ser observados devido à ligação não imunológica de proteínas ou produtos de reação de substrato. Eles também podem ser causados por atividade de pseudo peroxidase (eritrócitos), atividade de peroxidase endógena (citocromo C) ou biotina endógena (por exemplo, fígado, mama, cérebro, rim), dependendo do tipo de imunocoloração utilizada.¹²

Limitações Específicas do Produto:

Sem limitações adicionais específicas do produto.

Características de desempenho:

Reprodutibilidade:

A reprodutibilidade do desempenho dos anticorpos foi verificada testando tecidos normais e tumorais selecionados em vários dias e vários instrumentos com vários operadores. A coloração dos tecidos selecionados foi consistente e realizada conforme esperado.

Imunoreatividade:

As seguintes imunorreatividades positivas e negativas foram demonstradas nas Tabelas 1 e 2 abaixo.

A lista fornecida abaixo não é exaustiva, mas caracteriza os tipos de imunorreatividades observadas com o anticorpo indicado.

Não há reatividade conhecida de anticorpos inespecíficos observada neste produto.

Resumo dos resultados esperados:

A prevalência de PRAME em tecidos normais e em estado de doença foi avaliada usando Tissue Microarrays (TMAs).

Os tecidos normais testados coraram conforme esperado, com níveis elevados de coloração observados nos testículos e nenhuma coloração em outros tecidos.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Portuguese

A coloração de PRAME foi observada em níveis elevados no melanoma, como esperado, e em níveis variados em outros tecidos cancerígenos, como ovário, pulmão, próstata e mama.

Desempenho Analítico:

Foram realizados testes de coloração para sensibilidade e especificidade e os resultados estão listados abaixo .

BIOCARE
M E D I C A L

Sensibilidade e Especificidade:

Tabela 1: A sensibilidade e especificidade do anticorpo foram determinadas testando tecidos normais FFPE.

Tecido	Casos Positivos	Total de casos
Cérebro	0	6
Cerebelo	0	3
Ad-renal	0	3
Ovário	0	3
Pâncreas	0	3
Traquéia	0	3
Hipófise	0	3
Testículo*	3	3
Tireoide	0	3
Seios	0	3
Baço	0	3
Amígdala	0	3
Timo	0	3
Medula óssea**	0	1
Pulmão	0	3
Coração	0	3
Esôfago	0	3
Estômago	0	3
Intestino delgado	0	3
Cólon	0	3
Fígado	0	3
Glândula salivar	0	3
Rim	0	3
Próstata	0	3
Útero	0	3
Colo do útero	0	3
Músculo esquelético	0	3
Pele	0	3
Nervo Periférico	0	3
Células de Revestimento	0	3
Cabeça, pescoço e glândula salivar	0	6
Linfonodo	0	3

* Coloração nuclear de força 3-4

** Faltam duas amostras

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Portuguese

BIOCARE
M E D I C A L

Tabela 2: A sensibilidade e a especificidade do anticorpo foram determinadas testando uma variedade de tecidos neoplásicos FFPE.

Patologia	Casos Positivos	Total de casos
Melanoma	29	39
Câncer de ovário	9	44
Câncer de mama	10	26
Cancer de colo	4	43
Câncer de pulmão	21	50
Câncer de próstata	18	41
Carcinoma adrenocortical	0	1
Câncer de bexiga	0	2
Meningioma	0	2
Astrocitoma	0	1
Carcinoma de células escamosas (esôfago)	0	2
Adenocarcinoma (estômago)	0	2
Adenocarcinoma (intestino delgado)	0	1
Adenocarcinoma (cólon e reto)	0	6
Cancêr de rins	0	2
Câncer de fígado	0	4
Linfoma	0	3
Carcinoma de células escamosas (cabeça e pescoço, cavidade oral, língua)	0	1
Carcinoma nasofaríngeal	1	1
Adenocarcinoma (pâncreas)	0	1
Adenocarcinoma (próstata)	0	2
Carcinoma adenóide cístico (cabeça e pescoço, glândula salivar)	0	1
Carcinoma de células escamosas (pele)	0	1
Seminoma	0	2
Câncer de tireoide	0	2
Câncer cervical	0	2
Câncer de endométrio	1	2

A expressão de PRAME em várias neoplasias pode exibir uma percentagem variável de positividade tumoral. Consulte a Tabela 3 para obter percentagens de células tumorais com coloração positiva (categorizadas por quartis) observadas em várias neoplasias encontradas na Tabela 2.

Tabela 3: Percentagem de coloração positiva de células tumorais em várias neoplasias FFPE.

Lenços	Percentagem de coloração de células tumorais # casos exibindo coloração Percentagem do total de # casos (%)				
	<1%	1-25%	26-50%	51-75%	> 75%
Câncer de ovário	35/44 (79,5%)	2/44 (4,5%)	3/44 (6,8%)	3/44 (6,8%)	1/44 (2,3%)
Câncer de mama	16/26 (61,5%)	26/07 (26,9%)	26/01 (3,8%)	26/02 (7,7%)	0 (0%)
Cancer de colo	39/43 (88,4%)	4/43 (11,6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Câncer de pulmão	29/50 (58,0%)	7/50 (14,0%)	4/50 (8,0%)	7/50 (14,0%)	3/50 (6,0%)
Câncer de próstata	23/41 (56,1%)	41/09 (22,0%)	41/03 (7,3%)	41/02 (4,9%)	4/4 (9,8%)
Carcinoma nasofaríngeal	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1/1 (100%)
Câncer de endométrio	1/2 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	1/2 (50%)	0 (0%)
Melanoma	39/10 (25,6%)	39/06 (15,4%)	39/05 (12,8%)	39/06 (15,4%)	39/12 (30,8%)

Percentagem de coloração de células tumorais apresentada para todas as intensidades de coloração.

Coloração em tecidos mostrando níveis variados de expressão da proteína PRAME.

Os resultados dos testes de desempenho analítico demonstraram que o anticorpo PRAME [EPR20330] pode detectar corretamente a proteína PRAME ao usar o protocolo IHC definido. Os resultados anormais dos testes teciduais apoiam a conclusão de que o PRAME [EPR20330] é sensível à proteína PRAME ao usar os protocolos IHC recomendados. O anticorpo PRAME [EPR20330] é capaz de detectar níveis baixos a altos da proteína PRAME. O teste de tecido normal não mostrou detecção inesperada de PRME em 32 tipos de tecido. Não houve reatividade cruzada inesperada. Os resultados apoiam a afirmação de que o anticorpo PRAME [EPR20330] é altamente específico (especificidade analítica) para a proteína PRAME.

Desempenho Clínico:

Foram realizados testes de coloração para sensibilidade e especificidade diagnóstica e os resultados estão listados abaixo. A imunorreatividade positiva e negativa foi registrada na Tabela 4.

Três lâminas de melanoma TMA foram coradas na Biocare e enviadas a um patologista externo para leitura e classificação. Os tecidos do melanoma mostraram uma diversidade de pontuações de coloração variando de 0 (negativo) a forte (4). A maioria dos nevos melanocíticos não apresentou reatividade ao PRAME, mas alguns apresentaram forte reatividade.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Portuguese

BIOCARE
M E D I C A L

Tabela 4: Porcentagem de coloração positiva de células tumorais em várias neoplasias melanocíticas FFPE e pele.

Lenços	Porcentagem de coloração de células tumorais # casos exibindo coloração Porcentagem do total de # casos (%)				
	<1%	1-25%	26-50%	51-75%	> 75%
Melanoma	28/133 (21,1%)	50/133 (37,6%)	10/133 (7,5%)	8/133 (6,0%)	37/133 (27,8%)
Melanoma metastático	38/07 (18,4%)	38/10 (26,3%)	38/03 (7,9%)	38/02 (5,3%)	16/38 (42,1%)
Nevos melanocíticos	14/12 (85,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	12/02 (14,3%)
Pele	10/10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Porcentagem de coloração de células tumorais apresentada para todas as intensidades de coloração.

Coloração em tecidos mostrando níveis variados de expressão da proteína PRAME.

O objetivo primário do teste foi avaliar a sensibilidade diagnóstica do anticorpo PRAME [EPR20330] no procedimento IHC, definida como a taxa de detecção de melanoma positivo das amostras positivas confirmadas. [TP/(TP+FN)]

Um objetivo secundário foi avaliar a especificidade diagnóstica – a taxa de detecção negativa para amostras negativas confirmadas para melanoma. [TN/(TN+FP)]

Houve 35 casos de melanoma falso negativo que receberam a avaliação patológica padrão-ouro como melanoma, mas foram negativos para PRAME. 136 casos foram verdadeiros positivos porque foram diagnosticados com melanoma e mostraram sinal para PRAME. Dois falsos positivos foram detectados nas 14 amostras de nevos melanocíticos que foram diagnosticadas como benignas e que apresentaram sinal para PRAME.

A partir dos dados, a sensibilidade diagnóstica estimada = $136 / (136 + 35) = 79,5\%$

A partir dos dados, a especificidade diagnóstica estimada = $22 / (22 + 2) = 91,7\%$

Com base em nossos cálculos, chegamos a uma sensibilidade diagnóstica estimada de 79,5% e uma especificidade diagnóstica estimada de 91,7% para detecção de melanoma.

Disto concluímos que o anticorpo PRAME [EPR20330], testado pela Biocare em amostras de melanoma e nevos melanocíticos, é sensível ao melanoma e altamente específico para o melanoma.

Solução de problemas: (Forneça explicação para cada um dos pontos abaixo)

1. Nenhuma coloração em nenhuma lâmina – Verifique para determinar se foram utilizados tecidos de controle positivo, anticorpos e produtos de detecção apropriados.
2. Coloração fraca de todas as lâminas – Verifique para determinar se foram utilizados tecidos de controle positivo apropriados, anticorpos e produtos de detecção.
3. Fundo excessivo de todas as lâminas – Pode haver altos níveis de biotina endógena (se estiver usando produtos de detecção à base de biotina), atividade endógena de HRP convertendo cromogênio em produto final colorido (use bloco de peroxidase) ou excesso de

interação proteica não específica (use uma proteína bloqueio, como solução de bloqueio à base de soro ou caseína).

4. As secções de tecido são removidas das lâminas durante a incubação – Verifique as lâminas para garantir que estão carregadas positivamente.
5. Coloração específica demasiado escura – Verifique o protocolo para determinar se o título de anticorpos adequado foi aplicado à lâmina, bem como os tempos de incubação adequados para todos os reagentes. Além disso, certifique-se de que o protocolo tenha etapas de lavagem suficientes para remover o excesso de reagentes após a conclusão das etapas de incubação.

Referências:

1. Kiernan JA. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. J Histotechnol. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. Biotech Histochem. 1996 Jan;71(5):263-70.
6. Center for Disease Control Manual. Guide: Safety Management, NO. CDC-22, Atlanta, GA. April 30, 1976 "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts."
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
8. CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011
9. College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. <http://www.cap.org> (800) 323-4040.
10. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
11. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques. Histochemistry 1987; 86:471-478.
12. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Lab Med 1983;14:767.
13. Omata M, Liew CT, Ashcavi M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradishperoxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. Am J Clin Path 1980;73:626.
14. Herman GE and Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech & Histochem 1991;66:194.
15. Zhang W, et al. PRAME expression and promoter hypermethylation in epithelial ovarian cancer. Oncotarget, 2016 Jul; 7(29):45352-69.
16. Lezcano C, et al. PRAME expression in melanocytic tumors. Am J Surg Pathol. 2018 Nov; 42(11):1456-65.

Ultraline são desenvolvidos exclusivamente pela Biocare Medical LLC e não implicam aprovação ou endosso de anticorpos Biocare pela Ventana Medical Systems, Inc ou Roche. Biocare, Ventana e Roche não são afiliadas, associadas ou relacionadas de forma alguma. Ventana®, BenchMark®, ultraView e OptiView são marcas registradas da Roche.

Os anticorpos da Série Q são desenvolvidos exclusivamente pela Biocare Medical LLC e não implicam aprovação ou endosso de anticorpos Biocare pela Leica Biosystems. A Biocare e a Leica Biosystems não são afiliadas, associadas ou relacionadas de forma alguma. Leica, Leica Biosystems, BOND-MAX e BOND-III são marcas registradas da Leica Biosystems.

O resumo de segurança e desempenho pode ser encontrado aqui: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Romanian

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats				
Format	Catalog Number	Description	Dilution	Diluent
Concentrate	ACI 3252 A, B	0.1, 0.5 mL	1:100	Van Gogh Yellow
Predilute	API 3252 AA, G20, H	6.0, 20, 25 mL	Ready-to-use	N/A
ONCORE Pro	OPAI 3252 T60	60 tests	Ready-to-use	N/A
Q Series-- For Leica BOND-III	ALI 3252 G7	7.0 mL	Ready-to-use	N/A
UltraLine -- For BenchMark	AVI 3252 G, G25	6.0, 25 mL	Ready-to-use	N/A

Utilizarea prevăzută:

Pentru uz diagnostic *in vitro*

PRAME [EPR20330] este un anticorp monoclonal de iepure care este destinat utilizării în laborator după ce diagnosticul inițial al tumorii a fost făcut prin histopatologie convențională folosind colorări histochimice neimunologice, în identificarea calitativă a proteinei PRAME prin imunohistochimie (IHC) în parafină fixată cu formol. Țesuturi umane încorporate (FFPE). Interpretarea clinică a oricărei colorări sau absența acesteia ar trebui completată de studii morfologice care utilizează controale adecvate și ar trebui evaluată în contextul istoricului clinic al pacientului și al altor teste de diagnostic de către un patolog calificat, ca ajutor în efectuarea oricăror alte determinări clinice.

Rezumat și explicație:

PRAME este localizat pe cromozomul 22q11.22 și codifică o proteină de 509 aminoacizi. PRAME este o genă autozomală a antigenului testiculului (CTA) care s-a dovedit a fi exprimată în melanom, diferite neoplasme maligne nemelanocitare, inclusiv cancer pulmonar fără celule mici, carcinom mamar, carcinom ovarian și multe altele citate. Nu se știe că țesuturile normale sănătoase exprimă PRAME, cu excepția testiculelor, ovarelor, suprarenalelor și a altor câteva citate în literatură.^(15,16)

Principiul procedurii:

Acest produs anticorp poate fi utilizat ca anticorp primar în testarea imunohistochimică a secțiunilor de țesut fixate cu formol, încorporate în parafină. În general, imunohistochimie (IHC) tehnicile de colorare permit vizualizarea antigenelor prin aplicarea secvențială a a anticorp specific la antigen (anticorp primar), un anticorp secundar la anticorpul primar (anticorp/sondă opțional link), un complex enzimatic și un substrat cromogen cu etape de spălare interpusă. Activarea enzimatică a cromogenului are ca rezultat un produs de reacție vizibil la locul antigenului. Eșantionul poate fi apoi contracolorat și capacul poate fi plasat. Rezultatele sunt interpretate folosind o lumină microscop și ajută la diagnosticul diferențial al proceselor fiziopatologice, care pot sau poate să nu fie asociat cu un anumit antigen.

Materiale și metode:

Reactivi furnizați:

Sursa gazdă: iepure monoclonal

Reactivitatea speciei: uman. Alte specii nu au fost testate.

Clona: EPR20330

Izotip: IgG

Concentrație de proteine: Concentrație specifică de IgG: Contactați asistența tehnică Biocare

Specificitate: PRAME

Localizare celulară: nucleu și membrana celulară

Metodă: monoclonal de iepure recombinant purificat prin afinitate.

Reconstituire, amestecare, diluare, titrare:

Reactivul anticorp prediluat este diluat optim pentru utilizare cu sistemele de colorare enumerate mai sus. O diluare ulterioară poate duce la pierderea colorării cu antigen. Utilizatorul trebuie să valideze orice astfel de modificare. Diferențele de procesare a țesuturilor și procedurile tehnice din laboratorul utilizatorului pot produce o variabilitate semnificativă a rezultatelor care necesită efectuarea regulată a controalelor interne (vezi secțiunea Controlul calității).

Reactivul concentrat necesită diluare așa cum este indicat în tabelul de mai sus.

Aplicații cunoscute:

Imunohistochimie (țesuturi încorporate în parafină fixate în formol)

Furnizat ca: Soluție salină tamponată, pH 5,9-7,9 care conține un purtător proteic și mai puțin de 0,1% conservant de azidă de sodiu. Consultați Fișa cu date de securitate pentru detalii suplimentare.

Materiale și reactivi necesari, dar nefurnizați:

Lamele de microscop încărcate pozitiv.
Controale tisulare pozitive și negative
Camera deșertului (sau cuptor de uscare similar)
Xilen sau înlocuitor de xilen
Etanol sau alcool reactiv
Camera de deocloaking (oala sub presiune)
Apă deionizată sau distilată
Tampon de spălare
Reactivi de pretratare
Bloc de peroxidază
Bloc de proteine (opțional)
Sondă de detectare și polimer
Reactivi de control negativ
Cromogene
Hematoxilină (contracolor)
Reactiv de albastru
Mediu de montaj
Sticlă de acoperire
Microscop cu lumină (mărire 40-400X)

Configurațiile produsului cu anticorpi sunt disponibile pentru utilizare pe instrumentele indicate în tabelul de mai sus.

Depozitare și stabilitate:

A se păstra la 2°C până la 8°C. Produsul este stabil până la data de expirare imprimată pe eticheta flaconului, atunci când este păstrat în aceste condiții. Nu utilizați după data de expirare. Depozitarea în orice alte condiții decât cele specificate trebuie verificată. Reactivii diluați trebuie utilizați prompt; depozitați orice reactiv rămas la 2°C până la 8°C. Stabilitatea reactivului diluat de utilizator nu a fost stabilită de Biocare.

Controalele pozitive și negative trebuie efectuate simultan cu toate probele pacientului. Dacă se observă o colorare neașteptată care nu poate fi explicată prin variații ale procedurilor de laborator și se suspectează o problemă cu anticorpul, contactați Asistența Tehnică Biocare la 1-800-542-2002 sau prin intermediul informațiilor de asistență tehnică furnizate pe biocare.net.

Pregătirea probei:

Țesuturile fixate în formol sunt adecvate pentru utilizare înainte de încorporarea parafinei. Țesuturile osoase trebuie decalcificate înainte de prelucrarea țesuturilor pentru a facilita tăierea țesuturilor și pentru a preveni deteriorarea lamelor microtomului.^{1,2}

 Biocare Medical

60 Berry Drive
Pacheco, CA 94553

USA

149/190



TP v3 (12/15/2021)

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080

 EMERGO EUROPE

Westervoortsedijk 60

6827 AT Arnhem

The Netherlands

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Romanian

BIOCARE
M E D I C A L

Țesuturile fixate și încorporate în mod corespunzător care exprimă antigenul țintă specificat trebuie păstrate într-un loc răcoros. Actul Clinical Laboratory Improvement Act (CLIA) din 1988 prevede în 42 CFR § 493.1259(b) că „laboratorul trebuie să păstreze lamele colorate cel puțin zece ani de la data examinării și păstrarea blocurilor de specimene cel puțin doi ani de la data examinării.”³

Tratamentul țesuturilor înainte de colorare:

Efectuați recuperarea epitopului indusă de căldură (HIER) conform protocolului recomandat de mai jos. S-a demonstrat că utilizarea de rutină a HIER înainte de IHC reduce la minimum inconsistența și standardizează colorarea.^{4,5}

Avertismente și precauții :

1. Acest anticorp conține mai puțin de 0,1% azidă de sodiu . Concentrațiile mai mici de 0,1% nu sunt materiale periculoase raportabile conform US 29 CFR 1910.1200, OSHA Hazard Communication și Directivei CE 91/155/EC. Azida de sodiu (NaN₃) folosită ca conservant este toxică dacă este ingerată. Azida de sodiu poate reacționa cu plumbul și cuprul pentru a forma azide metalice extrem de explozive . La eliminare, clătiți cu cantități mari de apă pentru a preveni acumularea de azidă în instalații sanitare. (Centrul pentru Controlul Bolilor, 1976, Institutul Național de Securitate și Sănătate în Muncă, 1976)⁶
2. Specimenele, înainte și după fixare, și toate materialele expuse acestora trebuie manipulate ca și cum ar fi capabile să transmită infecția și eliminate cu măsurile de precauție corespunzătoare. Nu pipetați niciodată reactivii pe gură și evitați contactul pielii și mucoaselor cu reactivii și mostrele. Dacă reactivii sau mostrele vin în contact cu zone sensibile, spălați-vă cu cantități mari de apă.⁷
3. Contaminarea microbiană a reactivilor poate duce la o creștere a colorației nespecifice.
4. Timpii de incubare sau alte temperaturi decât cele specificate pot da rezultate eronate. Utilizatorul trebuie să valideze orice astfel de modificare.
5. Nu utilizați reactiv după data de expirare imprimată pe flacon.
6. Reactivul anticorp prediluat este diluat optim pentru utilizare . O diluare ulterioară poate duce la pierderea colorării cu antigen.
7. Diluția reactivului anticorp concentrat trebuie validată înainte de utilizare. Orice diluant utilizat care nu este recomandat în mod specific trebuie, de asemenea, validat pentru compatibilitate și stabilitate.
8. Aruncați toți reactivii utilizați și orice alte materiale contaminate de unică folosință urmând procedurile pentru deșeurile infecțioase sau potențial infecțioase. Este responsabilitatea fiecărui laborator să manipuleze deșeurile solide și lichide în funcție de natura și gradul lor de pericolozitate și să le trateze și să le elimine (sau să le facă tratate și eliminate) în conformitate cu orice reglementări aplicabile.
9. Urmați reglementările locale de eliminare pentru locația dvs., împreună cu recomandările din Fișa cu date de securitate pentru a determina eliminarea în siguranță a acestui produs
10. FDS este disponibilă la cerere și se află la <http://biocare.net>.
11. Pentru a raporta incidente grave suspectate legate de acest dispozitiv, contactați reprezentantul local Biocare și autoritatea competentă din statul membru sau țara în care este stabilit utilizatorul.

Instrucțiuni de folosire:

Protocoloale de colorare recomandate pentru PRAME [EPR20330]:

IntelliPATH FLX and manual use:

API3252 pentru IntelliPATH FLX și utilizare manuală, a fost standardizat cu sistemul de detectare MACH 4. Utilizați TBS pentru etapele de spălare.

Peroxide Block:	Blocați timp de 5 minute cu Peroxidized 1.
Pretreatment:	Efectuați recuperarea căldurii folosind Borg Decloaker . Consultați fișa de date Borg Decloaker pentru instrucțiuni specifice.

Protein Block (Optional):	Incubați timp de 5-10 minute la RT cu Background Punisher.
Primary Antibody:	Se incubează timp de 30 de minute la temperatura camerei.
Detection:	Sondă: N/A Polimer: Se incubează timp de 30 de minute la temperatura camerei cu un polimer conjugat secundar.
Chromogen:	Incubați timp de 5 minute la RT cu DAB Biocare – SAU – Incubați timp de 5-7 minute la RT cu Warp Red.
Counterstain	Contracolorarea cu hematoxilina. Clătiți cu apă deionizată. Aplicați soluția de albastru Tacha timp de 1 minut. Clătiți cu apă deionizată.

ONCORE Pro Automated Slide Staining System:

OPAI3252 este destinat utilizării cu ONCORE Pro. Consultați manualul de utilizare pentru instrucțiuni specifice de utilizare. Parametrii protocolului din Editorul de protocol trebuie programați după cum urmează:

Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	PRAME Rb	PRAME Rb AP
Protocol Template (Description):	Special Template (ONCORE Pro-Tect Detection Required)	Rb AP Template 1
Dewaxing (DS Buffer Option):	DS2-50	DS Buffer
Antigen Retrieval (AR Option):	AR1, high pH; 103°C	AR1, high pH; 103°C
Block Option:	Buffer	Buffer
Reagent Name, Time, Temp.:	PRAME Rb, 45 min., 25°C	PRAME Rb, 30 min., 25°C

Ventana BenchMark ULTRA:

AVI3252 este destinat utilizării cu BenchMark ULTRA. Consultați manualul de utilizare pentru instrucțiuni specifice de utilizare. Parametrii de protocol recomandați sunt următorii:

Template/Detection:	OptiView DAB IHC
Pretreatment Protocol:	CC1 64 minutes
Peroxidase:	Pre-Primary Peroxidase Inhibitor
Primary Antibody:	32 minutes, 36°C

Q Series – For Leica BOND-III:

ALI3252 este destinat utilizării cu Leica BOND-III. Consultați manualul de utilizare pentru instrucțiuni specifice de utilizare. Parametrii de protocol recomandați sunt următorii:

Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	IHC Protocol F	IHC Protocol J
Detection:	Bond Polymer Refine	Bond Polymer Refine Red
HIER:	20 min with ER2	20 min with ER2
Peroxide Block:	5 min	
Marker (Primary Antibody):	15 min	15 min
Post Primary:	8 min	
Polymer:	8 min	
Post Primary AP:		20 min
Polymer AP:		30 min

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Romanian

BIOCARE
M E D I C A L

Mixed Chromogen Refine:	10 min	10 min + 5 min
Hematoxylin:	5 min	5 min

Control de calitate:

Consultați Standardele de calitate CLSI pentru proiectarea și implementarea testelor imunohistochemice; Ghid aprobat-A doua ediție (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA SUA (www.clsi.org). 2011⁸

Control pozitiv al țesuturilor:

Melanom, testicul normal
Materialele de control pozitiv extern trebuie să fie probe proaspete fixate, procesate și încorporate cât mai curând posibil, în același mod ca probele pacientului. Controalele pozitive ale țesuturilor indică țesuturile pregătite corect și tehnicile adecvate de colorare. Un control de țesut extern pozitiv pentru fiecare set de condiții de testare ar trebui să fie inclus în fiecare cursă de colorare.

Țesuturile utilizate pentru materialele de control pozitiv extern trebuie selectate din mostre de pacient cu niveluri scăzute bine caracterizate ale activității țintei pozitive care dă colorare pozitivă slabă. Nivelul scăzut de pozitivitate pentru controalele pozitive externe este conceput pentru a asigura detectarea modificărilor subtile ale sensibilității anticorpilor primari din instabilitate sau probleme ca metodologia IHC. Lamelele de control al țesuturilor disponibile comercial sau mostrele procesate diferit de eşantioanele pacientului validează doar performanța reactivului și nu verifică pregătirea țesuturilor.

Controalele de țesut pozitive cunoscute ar trebui utilizate numai pentru monitorizarea performanței corecte a țesuturilor procesate și a reactivilor de testare, mai degrabă decât ca ajutor în formularea unui diagnostic specific al probelor de pacienți. Dacă controalele pozitive ale țesuturilor nu reușesc să demonstreze o colorare pozitivă, rezultatele cu probele de testat trebuie considerate nevalide.

Controlul negativ al țesuturilor:

Utilizați un control de țesut negativ (cunoscut ca fiind negativ PRAME) fixat, procesat și încorporat într-un mod identic cu eşantionul(e) pacientului cu fiecare colorare pentru a verifica specificitatea anticorpului primar IHC pentru demonstrarea antigenului țintă și pentru a oferi o indicație a colorării specifice de fond (colorare fals pozitivă). De asemenea, varietatea diferitelor tipuri de celule prezente în majoritatea secțiunilor de țesut poate să fie utilizate de către laborator ca locuri de control negativ intern pentru a verifica performanța IHC specifică. Tipurile și sursele de specimene care pot fi utilizate pentru țesutul negativ controalele sunt listate în secțiunea Caracteristici de performanță.

Dacă apare o colorare specifică (colorare fals pozitivă) în controlul negativ al țesutului, rezultatele cu mostrele pacientului trebuie considerate nevalide.

Controlul reactiv negativ nespecific:

Utilizați un control reactiv negativ nespecific în locul anticorpului primar cu o secțiune din fiecare specimen de pacient pentru a evalua colorarea nespecifică și permit o mai bună interpretare a colorării specifice la locul antigenului. În mod ideal, un control reactiv negativ conține un anticorp PRAME IgG produs din supernatantul culturii de țesut, în același mod ca și primul anticorp, dar nu prezintă reactivitate specifică cu țesuturile umane în aceeași matrice/soluție ca și anticorpul Biocare. Se diluează un anticorp de control negativ la aceeași concentrație de imunoglobulină sau proteină ca și primarul diluat anticorp folosind diluant identic. Dacă serul fetal de vițel este reținut în anticorpul curat după procesare, serul fetal de vițel la o concentrație de proteine echivalentă cu cea diluată. anticorpul primar din același diluant este de asemenea adecvat pentru utilizare. (Consultați reactivul furnizat). Numai diluantul poate fi utilizat ca o alternativă mai puțin dorită față de controalele negative descrise anterior. Perioada de incubare pentru controlul reactiv negativ trebuie să corespundă cu cea a anticorpului primar.

Când sunt utilizate panouri de mai mulți anticorpi pe secțiuni în serie, zonele cu colorare negativă ale unei lame pot servi ca un control de fond negativ/nescpecific de legare pentru alți anticorpi. Pentru a diferenția activitatea enzimatică endogenă sau legarea nespecifică a enzimelor de imunoreactivitatea specifică, țesuturile suplimentare ale pacientului pot fi colorate exclusiv cu substrat-cromogen sau complexe enzimatic (PAP, avidină-biotină, streptavidină) și respectiv substrat-cromogen.

Verificarea testului:

Înainte de utilizarea inițială a unui anticorp sau a unui sistem de colorare într-o procedură de diagnosticare, utilizatorul trebuie să verifice specificitatea anticorpului testându-l pe o serie de țesuturi interne cu caracteristici de performanță imunohistochemice cunoscute reprezentând țesuturi pozitive și negative cunoscute. Consultați procedurile de control al calității prezentate anterior în această secțiune a prospectului produsului și recomandările de control al calității din Programul de certificare CAP⁹ pentru imunohistochimie și/sau ghidul NCCLS IHC¹⁰). Aceste proceduri de control al calității trebuie repetate pentru fiecare lot nou de anticorpi sau ori de câte ori există o modificare a parametrilor de analiză. Țesuturile enumerate în secțiunea Caracteristici de performanță sunt potrivite pentru verificarea testului.

Depanare:

Urmați recomandările protocolului specific anticorpilor conform fișei de date furnizate. Dacă apar rezultate atipice, contactați asistența tehnică Biocare la 1-800-542-2002.

Interpretarea colorării:

Control pozitiv al țesuturilor:

Controlul pozitiv al țesutului colorat cu anticorpul indicat trebuie examinat mai întâi pentru a se asigura că toți reactivii funcționează corect. Colorarea adecvată a celulelor țintă (așa cum s-a indicat mai sus) indică reactivitate pozitivă. Dacă controalele pozitive ale țesuturilor nu reușesc să demonstreze o colorare pozitivă, orice rezultat cu probele de testat trebuie considerat nevalid.

Culoarea produsului de reacție poate varia în funcție de cromogenii substratului utilizați. Consultați prospectele de ambalaj pentru substrat pentru reacțiile de culoare așteptate. Mai mult, metacromazia poate fi observată în variațiile metodei de colorare.¹¹ Când se folosește o contracolorare, în funcție de durata de incubare și de potența contracolorului utilizat, contracolorarea va avea ca rezultat o colorare a nucleilor celulari. Contracolorarea excesivă sau incompletă poate compromite interpretarea corectă a rezultatelor. Consultați protocoalele pentru contracolorarea recomandată.

Controlul negativ al țesuturilor :

Controlul negativ al țesuturilor trebuie examinat după controlul pozitiv al țesutului pentru a verifica specificitatea etichetării antigenului țintă de către anticorpul primar. Absența colorației specifice în controlul negativ al țesutului confirmă lipsa reactivității încrucișate a anticorpilor la celule/componentele celulare. Dacă apare o colorare specifică (colorare fals pozitivă) în controlul extern negativ al țesutului, rezultatele cu specimenul pacientului trebuie considerate nevalide.

Colorația nespecifică, dacă este prezentă, are de obicei un aspect difuz. Colorarea sporadică a țesutului conjunctiv poate fi observată și în secțiuni din țesuturi fixate în exces de formol. Utilizați celule intacte pentru interpretarea rezultatelor colorării. Celulele necrotice sau degenerate se colorează adesea nespecific.

Țesutul pacientului:

Examinați mostrele pacientului colorate cu anticorpul indicat ultimul. Intensitatea colorării pozitive trebuie evaluată în contextul oricărei colorări de fond nespecifice a controlului reactiv negativ. Ca și în cazul oricărui test imunohistochimic, un rezultat negativ înseamnă că antigenul nu a fost detectat, nu că antigenul a fost absent în celulele/țesutul testat. Dacă este



60 Berry Drive
Pacheco, CA 94553
USA

151/190



TP v3 (12/15/2021)

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080



Westervoortsedijk 60
8627 AT Arnhem
The Netherlands

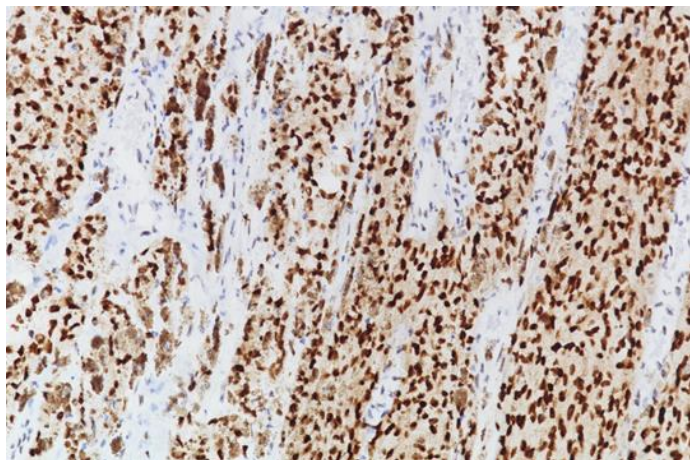
PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Romanian

BIOCARE
M E D I C A L

necesar, utilizați un panou de anticorpi pentru a identifica reacțiile fals-negative.



Melanomul colorat cu anticorp PRAME [EPR20330].

Consultați Rezumatul și Explicația, Limitările și Caracteristicile de performanță pentru informații specifice privind imunoreactivitatea indicată a anticorpilor.

Limitări:

Limitări generale:

1. Pentru diagnostic *in vitro*
2. Acest produs este doar pentru uz profesional: Imunohistochimia este un proces de diagnosticare în mai multe etape care constă în pregătire specializată în selectarea reactivilor corespunzători; selecția, fixarea și prelucrarea țesuturilor; prepararea lamei IHC; și interpretarea rezultatelor colorării.
3. Colorarea țesuturilor depinde de manipularea și prelucrarea țesutului înainte de colorare. Fixarea necorespunzătoare, înghețarea, dezghețarea, spălarea, uscarea, încălzirea, secționarea sau contaminarea cu alte țesuturi sau fluide pot produce artefacte, captarea anticorpilor sau rezultate fals negative. Rezultatele inconsecvente se pot datora variațiilor în metodele de fixare și incorporare sau neregularităților inerente în țesut.¹²
4. Contracolorarea excesivă sau incompletă poate compromite interpretarea corectă a rezultatelor.
5. Interpretarea clinică a oricărei colorații pozitive sau negative trebuie evaluată în contextul prezentării clinice, al morfologiei și al altor criterii histopatologice. Interpretarea clinică a oricărei colorări pozitive sau negative ar trebui să fie completată de studii morfologice care utilizează controale interne și externe pozitive și negative adecvate, precum și alte teste de diagnosticare. Este responsabilitatea unui patolog calificat care este familiarizat cu utilizarea corectă a anticorpilor, reactivilor și metodelor IHC să interpreteze toți pașii utilizați pentru pregătirea și interpretarea preparatului final IHC.
6. Diluția optimă a anticorpilor și protocoalele pentru o anumită aplicație pot varia. Acestea includ, dar nu se limitează la fixarea, metoda de recuperare a căldurii, timpii de incubare, grosimea secțiunii de țesut și trusa de detectare utilizată. Datorită sensibilității superioare a acestor reactivi unici, timpii și titrurile de incubare recomandate enumerate nu sunt aplicabile altor sisteme de detectare, deoarece rezultatele pot varia. Recomandările și protocoalele din fișa de date se bazează pe utilizarea exclusivă a produselor Biocare. În cele din urmă, este responsabilitatea investigatorului să determine condițiile optime.
7. Acest produs nu este destinat utilizării în citometria în flux. Caracteristicile de performanță nu au fost determinate pentru citometria în flux.

8. Țesuturile de la persoane infectate cu virusul hepatitei B și care conțin antigenul de suprafață al hepatitei B (HBsAg) pot prezenta colorare nespecifică cu peroxidază de hrean.¹³
9. Reactivii pot demonstra reacții neașteptate în țesuturile netestate anterior. Posibilitatea unor reacții neașteptate chiar și în grupurile de țesuturi testate nu poate fi eliminată complet din cauza variabilității biologice a exprimării antigenului în neoplasme sau în alte țesuturi patologice.¹⁴ Contactați asistența tehnică Biocare la 1-800-542-2002 sau prin intermediul informațiilor de asistență tehnică furnizate pe biocare.net, cu reacții neașteptate documentate.
10. Serurile normale/neimune din aceeași sursă animală ca și antiserurile secundare utilizate în etapele de blocare pot provoca rezultate fals negative sau fals pozitive din cauza autoanticorpilor sau a anticorpilor naturali.
11. Rezultate fals pozitive pot fi observate din cauza legării neimunologice a proteinelor sau a produselor de reacție substrat. Ele pot fi, de asemenea, cauzate de activitatea pseudo-peroxidazei (eritrocite), activitatea peroxidazei endogene (citocromul C) sau biotina endogenă (de exemplu, ficat, sân, creier, rinichi), în funcție de tipul de imunocolor utilizat.¹²

Limitări specifice produsului:

Fără limitări suplimentare specifice produsului.

Caracteristici de performanță:

Reproductibilitate:

Reproductibilitatea performanței anticorpilor a fost verificată prin testarea țesutului normal și tumoral selectat în diferite zile și diferite instrumente cu operatori multipli. Colorarea țesuturilor selectate a fost consecventă și a fost efectuată conform așteptărilor.

Imunoreactivitate:

Următoarele imunoreactivități pozitive și negative au fost demonstrate în tabelele 1 și 2 de mai jos.

Lista furnizată mai jos nu este exhaustivă, dar caracterizează tipurile de imunoreactivități observate cu anticorpul indicat.

Nu s-a observat o reactivitate nespecifică a anticorpilor la acest produs.

Rezumatul rezultatelor așteptate:

Prevalența PRAME în țesuturile normale și în starea de boală a fost evaluată folosind Tissue Microarrays (TMA).

Țesuturile normale testate s-au colorat conform așteptărilor, cu niveluri ridicate de colorare observate în testicul și fără colorare în alte țesuturi. Colorarea PRAME a fost observată la un nivel ridicat în melanom, așa cum era de așteptat, și la niveluri diferite în alte țesuturi canceroase, cum ar fi ovar, plămân, prostată și sân.

Performanță analitică:

Au fost efectuate teste de colorare pentru sensibilitate și specificitate, iar rezultatele sunt enumerate mai jos.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Romanian

BIOCARE
M E D I C A L

Sensibilitate și specificitate:

Tabelul 1: Sensibilitatea și specificitatea anticorpului au fost determinate prin testarea țesuturilor normale FFPE.

Țesut	Cazuri pozitive	Total de cazuri
Creierul	0	6
Cerebel	0	3
suprarenale	0	3
Ovar	0	3
Pancreas	0	3
Trahee	0	3
Pituitară	0	3
Testicul*	3	3
Glanda tiroida	0	3
Sânul	0	3
Splină	0	3
amigdale	0	3
Timusul	0	3
Măduvă osoasă**	0	1
Plămân	0	3
inima	0	3
Esofag	0	3
Stomac	0	3
Intestinul subtire	0	3
Colon	0	3
Ficat	0	3
Glanda salivara	0	3
Rinichi	0	3
Prostata	0	3
Uter	0	3
Colul uterin	0	3
Mușchi scheletic	0	3
Piele	0	3
Nervul periferic	0	3
Căptușirea celulelor	0	3
Cap, gât și glanda salivară	0	6
Ganglionilor limfatici	0	3

* Colorare nucleară de 3-4 rezistențe

** Două mostre lipsesc

Tabelul 2: Sensibilitatea și specificitatea anticorpului au fost determinate prin testarea unei varietăți de țesuturi neoplazice FFPE.

Patologie	Cazuri pozitive	Total de cazuri
Melanomul	29	39
Cancerul ovarului	9	44
Cancer mamar	10	26
Cancer de colon	4	43
Cancer de plamani	21	50
Cancer de prostată	18	41
Carcinom corticosuprarenal	0	1
Cancerul vezicii urinare	0	2
Meningiom	0	2
Astrocitom	0	1
Carcinom cu celule scuamoase (esofag)	0	2
Adenocarcinom (stomac)	0	2
Adenocarcinom (intestinul subtire)	0	1
Adenocarcinom (colon și rect)	0	6
Cancer de rinichi	0	2
Cancer de ficat	0	4
Limfom	0	3
Carcinom cu celule scuamoase (cap și gât, cavitatea bucală, limbă)	0	1
Carcinom nazofaringian	1	1
Adenocarcinom (pancreas)	0	1
Adenocarcinom (prostată)	0	2
Carcinom adenoid chistic (cap și gât, glanda salivară)	0	1
Carcinom cu celule scuamoase (piele)	0	1
Seminom	0	2
Cancer tiroidian	0	2
Cancer cervical	0	2
Cancer de endometru	1	2

Expresia PRAME în diferite neoplasme poate prezenta pozitivitate tumorală procentuală variabilă. Consultați Tabelul 3 pentru procentele de celule tumorale cu colorare pozitivă (clasificate pe quartile) observate în diferite neoplasme găsite în Tabelul 2.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Romanian

BIOCARE
M E D I C A L

Tabelul 3: Procentul de colorare pozitivă a celulelor tumorale în diferite neoplasme FFPE.

Șervețele	Procent de colorare a celulelor tumorale # de cazuri care prezintă colorare Procent din numărul total de cazuri (%)				
	<1%	1-25%	26-50%	51-75%	> 75%
Cancerul ovarului	35/44 (79,5%)	2/44 (4,5%)	3/44 (6,8%)	3/44 (6,8%)	1/44 (2,3%)
Cancer mamar	16/26 (61,5%)	7/26 (26,9%)	1/26 (3,8%)	2/26 (7,7%)	0 (0%)
Cancer de colon	39/43 (88,4%)	4/43 (11,6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Cancer de plamani	29/50 (58,0%)	7/50 (14,0%)	4/50 (8,0%)	7/50 (14,0%)	3/50 (6,0%)
Cancer de prostată	23/41 (56,1%)	9/41 (22,0%)	3/41 (7,3%)	2/41 (4,9%)	4/41 (9,8%)
Carcinom nazofaringian	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1/1 (100%)
Cancer de endometru	1/2 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	1/2 (50%)	0 (0%)
Melanomul	10/39 (25,6%)	6/39 (15,4%)	5/39 (12,8%)	6/39 (15,4%)	12/39 (30,8%)

Procentul de colorare a celulelor tumorale prezentate pentru toate intensitățile de colorare.

Colorarea pe țesuturi care prezintă niveluri diferite de expresie a proteinei PRAME.

Rezultatele testării performanței analitice au demonstrat că anticorpul PRAME [EPR20330] poate detecta corect proteina PRAME atunci când se utilizează protocolul definit IHC. Rezultatele anormale ale testelor de țesut susțin concluzia că PRAME [EPR20330] este sensibil la proteina PRAME atunci când se utilizează protocoalele IHC recomandate. Anticorpul PRAME [EPR20330] este capabil să detecteze niveluri scăzute până la ridicate ale proteinei PRAME. Testarea normală a țesuturilor nu a arătat nicio detectare neașteptată a PRAME peste 32 de tipuri de țesut. Nu a existat o reactivitate încrucișată neașteptată. Rezultatele susțin afirmația că anticorpul PRAME [EPR20330] este foarte specific (specificitate analitică) pentru proteina PRAME.

Performanța clinică:

Au fost efectuate teste de colorare pentru sensibilitatea și specificitatea diagnosticului, iar rezultatele sunt enumerate mai jos. Imunoreactivitatea pozitivă și negativă a fost înregistrată în Tabelul 4.

Trei lame de melanom TMA au fost colorate la Biocare și trimise unui patologic extern pentru a fi citite și evaluate. Țesuturile melanomului au arătat o diversitate de scoruri de colorare variind de la 0 (negativ) la puternic (4). Majoritatea nevi melanocitari nu au prezentat reactivitate PRAME, dar câțiva au avut o reactivitate puternică.

Tabelul 4: Procentul de colorare pozitivă a celulelor tumorale în diferite neoplasme melanocitare FFPE și piele.

Șervețele	Procent de colorare a celulelor tumorale # de cazuri care prezintă colorare Procent din numărul total de cazuri (%)				
	<1%	1-25%	26-50%	51-75%	> 75%
Melanomul	28/133 (21,1%)	50/133 (37,6%)	10/133 (7,5%)	8/133 (6,0%)	37/133 (27,8%)
Melanomul metastatic	7/38 (18,4%)	10/38 (26,3%)	3/38 (7,9%)	2/38 (5,3%)	16/38 (42,1%)
Nevi melanocitari	12/14 (85,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2/12 (14,3%)
Piele	10/10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Procentul de colorare a celulelor tumorale prezentate pentru toate intensitățile de colorare.

Colorarea pe țesuturi care prezintă niveluri diferite de expresie a proteinei PRAME.

Obiectivul principal al testului a fost evaluarea sensibilității de diagnosticare a anticorpului PRAME [EPR20330] în procedura IHC, definită ca rata de detecție pozitivă a melanomului a probelor pozitive confirmate. $[TP/(TP+FN)]$

Un obiectiv secundar a fost evaluarea specificității diagnosticului - rata de detecție negativă pentru probele negative confirmate de melanom. $[TN/(TN+FP)]$

Au existat 35 de cazuri de melanom fals negativ care au primit evaluarea patologică standard de aur ca melanom, dar au fost negative pentru PRAME. 136 de cazuri au fost adevărate pozitive, deoarece au fost diagnosticate cu melanom și au prezentat semnal pentru PRAME. Două fals pozitive au fost detectate în cele 14 probe de nevi melanocitari care au fost diagnosticate ca fiind benigne, care au arătat semnal pentru PRAME.

Din date, sensibilitatea diagnostică estimată = $136 / (136+35) = 79,5\%$

Din date, specificitatea diagnostică estimată = $22 / (22+2) = 91,7\%$

Pe baza calculului nostru, ajungem la o sensibilitate diagnostică estimată de 79,5% și o specificitate diagnostică estimată de 91,7% pentru detectarea melanomului.

Din aceasta concluzionăm că anticorpul PRAME [EPR20330], așa cum a fost testat de Biocare pe probe de melanom și nevi melanocitari, este sensibil la melanom și foarte specific pentru melanom.

Depanare: (Oferiți explicații pentru fiecare dintre punctele de mai jos)

1. Nicio colorare a niciunei lame – Verificați pentru a determina dacă au fost utilizate țesuturi de control pozitiv adecvate, anticorpi și produse de detectare.
2. Colorare slabă a tuturor lamelor – Verificați pentru a determina dacă au fost utilizate țesuturi de control pozitiv adecvate, anticorpi și produse de detectare.
3. Fundal excesiv al tuturor diapozitivelor – Pot exista niveluri ridicate de biotină endogenă (dacă se utilizează produse de detecție pe bază de biotină), activitate HRP endogenă de conversie a cromogenului în produs final colorat (utilizați bloc de peroxidază) sau interacțiune proteică nespecifică în exces (utilizați o proteină). bloc, cum ar fi soluția de blocare pe bază de ser sau caseină).
4. Secțiunile de țesut spăla lamelele în timpul incubăției – Verificați lamele pentru a vă asigura că sunt încărcate pozitiv.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Romanian

BIOCARE
M E D I C A L

5. Colorare specifică prea întunecată – Verificați protocolul pentru a determina dacă pe lame a fost aplicat titrul adecvat de anticorpi, precum și timpii de incubare corespunzători pentru toți reactivii. În plus, asigurați-vă că protocolul are suficienți pași de spălare pentru a elimina excesul de reactivi după finalizarea etapelor de incubare.

Referinte:

1. Kiernan JA. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. *Theory and Practice of Histotechnology*. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. *Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule*, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. *J Histotechnol*. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. *Biotech Histochem*. 1996 Jan;71(5):263-70.
6. Center for Disease Control Manual. *Guide: Safety Management*, NO. CDC-22, Atlanta, GA. April 30, 1976 "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts."
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition* CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
8. CLSI *Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2)* CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011
9. College of American Pathologists (CAP) *Certification Program for Immunohistochemistry*. Northfield IL. [Http://www.cap.org](http://www.cap.org) (800) 323-4040.
10. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. *Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline*. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
11. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. *Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques*. *Histochemistry* 1987; 86:471-478.
12. Nadji M, Morales AR. *Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls*. *Lab Med*1983;14:767.
13. Omata M, Liew CT, Ashcavi M, Peters RL. *Nonimmunologic binding of horseradishperoxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry*. *Am J Clin Path* 1980;73:626.
14. Herman GE and Elfont EA. *The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control*. *Biotech & Histochem* 1991;66:194.
15. Zhang W, *et al*. PRAME expression and promoter hypermethylation in epithelial ovarian cancer. *Oncotarget*, 2016 Jul; 7(29):45352-69.
16. Lezcano C, *et al*. PRAME expression in melanocytic tumors. *Am J Surg Pathol*. 2018 Nov; 42(11):1456-65.

Ultraline sunt dezvoltate exclusiv de Biocare Medical LLC și nu implică aprobarea sau aprobarea anticorpilor Biocare de către Ventana Medical Systems, Inc sau Roche. Biocare, Ventana și Roche nu sunt afiliate, asociate sau legate în niciun fel. Ventana®, BenchMark®, ultraView și OptiView sunt mărci comerciale ale Roche.

Anticorpii din seria Q sunt dezvoltate exclusiv de Biocare Medical LLC și nu implică aprobarea sau aprobarea anticorpilor Biocare de către Leica Biosystems. Biocare și Leica Biosystems nu sunt afiliate, asociate sau legate în niciun fel. Leica, Leica Biosystems, BOND-MAX și BOND-III sunt mărci comerciale ale Leica Biosystems.

Rezumatul siguranței și performanței poate fi găsit aici:
<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Slovak

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats				
Format	Catalog Number	Description	Dilution	Diluent
Concentrate	ACI 3252 A, B	0.1, 0.5 mL	1:100	Van Gogh Yellow
Predilute	API 3252 AA, G20, H	6.0, 20, 25 mL	Ready-to-use	N/A
ONCORE Pro	OPAI 3252 T60	60 tests	Ready-to-use	N/A
Q Series-- For Leica BOND-III	ALI 3252 G7	7.0 mL	Ready-to-use	N/A
UltraLine -- For BenchMark	AVI 3252 G, G25	6.0, 25 mL	Ready-to-use	N/A

Zamýšľané použitie:

Na diagnostické použitie *in vitro*

PRAME [EPR20330] je králičia monoklonálna protilátka, ktorá je určená na laboratórne použitie po počiatkovej diagnóze nádoru konvenčnou histopatológiou s použitím neimunologických histochemických farbení, pri kvalitatívnej identifikácii proteínu PRAME imunohistochemiou (IHC) vo formalíne fixovanom parafíne. embedded (FFPE) ľudských tkanív. Klinická interpretácia akéhokoľvek zafarbenia alebo jeho neprítomnosti by mala byť doplnená morfológickými štúdiami s použitím vhodných kontrol a mala by byť vyhodnotená v kontexte pacientovej klinickej anamnézy a iných diagnostických testov kvalifikovaným patológom ako pomôcka pri vykonávaní akýchkoľvek iných klinických stanovení.

Zhrnutie a vysvetlenie:

PRAME sa nachádza na chromozóme 22q11.22 a kóduje proteín s 509 aminokyselinami. PRAME je autozomálny gén pre antigén semenníkov (CTA), u ktorého sa ukázalo, že je exprimovaný v melanóme, rôznych nemelanocytových malígnych novotvaroch, vrátane nemalobunkového karcinómu pľúc, karcinómu prsníka, karcinómu vaječníkov a niekoľkých ďalších citovaných. Nie je známe, že by normálne zdravé tkanivá exprimovali PRAME, s výnimkou semenníkov, vaječníkov, nadobličiek a niekoľkých ďalších uvedených v literatúre. (15,16)

Princíp postupu:

Tento protilátkový produkt sa môže použiť ako primárna protilátka pri imunohistochemickom testovaní vo formalíne fixovaných, v parafíne zaliatých tkanivových rezov. Vo všeobecnosti imunohistochemické (IHC) techniky farbenia umožňujú vizualizáciu antigénov prostredníctvom sekvenčnej aplikácie a špecifická protilátka k antigénu (primárna protilátka), sekundárna protilátka k primárnej protilátke (voliteľná väzba protilátka/sonda), enzýmový komplex a chromogénny substrát s vloženými krokmi premývania. Enzymatická aktivácia chromogénu vedie k viditeľnému reakčnému produktu v mieste antigénu. Vzorka sa potom môže kontrastne zafarbiť a kryt sa nasunie. Výsledky sa interpretujú pomocou svetla mikroskop a pomôcka pri diferenciálnej diagnostike patofyziologických procesov, ktoré môžu resp nemusia byť spojené s konkrétnym antigénom.

Materiály a metódy:

Dodávané činidlá:

Zdroj hostiteľa: Králik monoklonálny

Druhá reaktivita: Človek. Ostatné druhy netestované.

Klon: EPR20330

Izotyp: IgG

Koncentrácia proteínov: Špecifická koncentrácia IgG: Kontaktujte technickú podporu spoločnosti Biocare

Špecifikum: PRAME

Bunková lokalizácia: Jadro a bunková membrána

Metóda: Afinitne purifikovaný rekombinantný králičí monoklonálny.

Rekonštitúcia, miešanie, riedenie, titrácia:

Predriedené protilátkové činidlo je optimálne nariadené na použitie s vyššie uvedenými farbiacimi systémami. Ďalšie riedenie môže viesť k strate zafarbenia antigénu. Používateľ musí každú takúto zmenu potvrdiť. Rozdiely v spracovaní tkaniva a technických postupoch v laboratóriu používateľa môžu

spôsobiť značnú variabilitu výsledkov, čo si vyžaduje pravidelné vykonávanie interných kontrol (pozri časť Kontrola kvality).

Koncentrované činidlo vyžaduje riedenie, ako je uvedené v tabuľke vyššie.

Známe aplikácie:

Imunohistochemia (tkanivá fixované v parafíne fixované vo formalíne)

Dodáva sa ako: Pufrovaný fyziologický roztok, pH 5,9-7,9 obsahujúci proteínový nosič a menej ako 0,1 % konzervačnej látky azidu sodného. Ďalšie podrobnosti nájdete v karte bezpečnostných údajov.

Potrebné materiály a činidlá, ktoré nie sú súčasťou dodávky:

Mikroskopické sklíčka sú kladne nabité.
Pozitívne a negatívne kontroly tkaniva
Púštna komora (alebo podobná sušiareň)
Xylén alebo náhrada xylénu
Etanol alebo reagenčný alkohol
Odmasťovacia komora (tlakový hrniec)
Deionizovaná alebo destilovaná voda
Premývací pufo
Činidlá na predúpravu
Peroxidázový blok
Proteínový blok (voliteľné)
Detekčná sonda a polymér
Negatívne kontrolné činidlá
Chromogény
Hematoxylin (kontrafarba)
Blueingovo činidlo
Montážne médium
Krycie sklo
Svetelný mikroskop (40-400x zväčšenie)

Konfigurácie protilátkového produktu sú dostupné na použitie s nástrojmi uvedenými v tabuľke vyššie.

Skladovanie a stabilita:

Skladujte pri teplote 2°C až 8°C. Produkt je stabilný do dátumu expirácie vytlačeného na štítku injekčnej liekovky, ak sa uchováva za týchto podmienok. Nepoužívajte po dátume expirácie. Skladovanie za akýchkoľvek iných podmienok, ako sú uvedené, musí byť overené. Zriedené činidlá by sa mali použiť okamžite; akékoľvek zostávajúce činidlo skladujte pri teplote 2°C až 8°C. Stabilita užívateľom zriedeného činidla nebola stanovená spoločnosťou Biocare.

Pozitívne a negatívne kontroly by sa mali vykonávať súčasne so všetkými vzorkami pacienta. Ak spozorujete neočakávané zafarbenie, ktoré nemožno vysvetliť odchýlkami v laboratórnych postupoch a máte podozrenie na problém s protilátkou, kontaktujte technickú podporu spoločnosti Biocare na čísle 1-800-542-2002 alebo prostredníctvom informácií o technickej podpore poskytovaných na biocare.net.

Príprava vzorky:

Tkanivá fixované vo formalíne sú vhodné na použitie pred zaliatím do parafínu. Kostné tkanivá by sa mali pred spracovaním tkaniva odvápniť, aby

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Slovak

BIOCARE
M E D I C A L

sa uľahčilo rezanie tkaniva a zabránilo sa poškodeniu čepielok mikrotómu. ^{1, 2}

Správne fixované a zaliate tkanivá exprimujúce špecifikovaný cieľový antigén by sa mali skladovať na chladnom mieste. Zákon o zlepšovaní klinických laboratórií (CLIA) z roku 1988 vyžaduje v 42 CFR § 493.1259(b), že „Laboratórium musí uchovávať zafarbené sklíčka najmenej desať rokov od dátumu vyšetrenia a uchovávať bloky vzoriek najmenej dva roky od dátumu vyšetrenia.“ ³

Ošetrenie tkanív pred farbením:

Vykonajte teplom indukované vyhľadávanie epitopu (HIER) podľa odporúčaného protokolu uvedeného nižšie. Ukázalo sa, že rutinné používanie HIER pred IHC minimalizuje nekonzistentnosť a štandardizuje farbenie. ^{4,5}

Varovanie a bezpečnostné opatrenia :

1. Táto protilátka obsahuje menej ako 0,1 % azidu sodného . Koncentrácie nižšie ako 0,1 % nie sú podľa US 29 CFR 1910.1200, oznámenia o nebezpečenstve OSHA a smernice EC 91/155/EC nebezpečnými materiálmi, ktoré by sa mali hlásiť. Azid sodný (NaN₃) používaný ako konzervačná látka je pri požití toxický. Azid sodný môže reagovať s olovom a medeným potrubím za vzniku vysoko výbušných azidov kovov . Po likvidácii opláchnite veľkým množstvom vody, aby ste zabránili hromadeniu azidov vo vodovodnom potrubí. (Centrum pre kontrolu chorôb, 1976, Národný inštitút bezpečnosti a ochrany zdravia pri práci, 1976) ⁶
2. So vzorkami pred a po fixácii a so všetkými materiálmi, ktoré sú im vystavené, by sa malo zaobchádzať tak, ako keby boli schopné prenášať infekciu, a mali by sa likvidovať podľa náležitých opatrení. Nikdy nepipetujte reagentie ústami a vyhýbajte sa kontaktu kože a slizníc s číidlami a vzorkami. Ak sa reagentie alebo vzorky dostanú do kontaktu s citlivými oblasťami, umyte ich veľkým množstvom vody. ⁷
3. Mikrobiálna kontaminácia číidiel môže viesť k zvýšeniu nešpecifického zafarbenia.
4. Inkubačné časy alebo teploty iné, ako sú uvedené, môžu viesť k chybným výsledkom. Používateľ musí každú takúto zmenu potvrdiť.
5. Nepoužívajte číidlo po dátume expirácie vytlačenom na injekčnej liekovke.
6. Predriedené protilátkové číidlo je optimálne nariadené na použitie . Ďalšie riedenie môže viesť k strate zafarbenia antigénu.
7. Zriedenie koncentrovaného protilátkového číidla musí byť pred použitím validované. akýkoľvek použité riedidlo, ktoré sa špecificky neodporúča, musí byť tiež overené z hľadiska kompatibility a stability.
8. Všetky použité reagentie a všetky ostatné kontaminované jednorazové materiály zlikvidujte podľa postupov pre infekčný alebo potenciálne infekčný odpad. Zodpovednosťou každého laboratória je nakladať s pevným a tekutým odpadom podľa ich povahy a stupňa nebezpečnosti a zaobchádzať s ním a zneškodňovať ho (alebo nechať ho spracovať a zneškodniť) v súlade s akýmkoľvek platnými predpismi.
9. Dodržiavajte miestne predpisy o likvidácii vo vašej lokalite spolu s odporúčaniami v karte bezpečnostných údajov, aby ste určili bezpečnú likvidáciu tohto produktu
10. KBÚ je k dispozícii na požiadanie a nachádza sa na <http://biocare.net>.
11. Ak chcete nahlásiť podozrenie na vážne incidenty súvisiace s týmto zariadením, kontaktujte miestneho zástupcu spoločnosti Biocare a príslušný orgán členského štátu alebo krajiny, v ktorej má používateľ sídlo.

Inštrukcie na používanie:

Odporúčané protokoly farbenia pre PRAME [EPR20330]:

IntelliPATH FLX and manual use:

API3252 pre IntelliPATH FLX a manuálne použitie, bol štandardizovaný s detekčným systémom MACH 4. Na premývanie použite TBS.

Peroxide Block:	Blokujte 5 minút peroxidom 1.
------------------------	-------------------------------

Pretreatment:	Vykonajte získanie tepla pomocou Borg Decloaker . Konkrétne pokyny nájdete v údajovom liste Borg Decloaker .
Protein Block (Optional):	Inkubujte 5-10 minút pri teplote miestnosti pomocou zariadenia Background Punisher.
Primary Antibody:	Inkubujte 30 minút pri teplote miestnosti.
Detection:	Sonda: N/A Polymér: Inkubujte 30 minút pri teplote miestnosti so sekundárne konjugovaným polymérom.
Chromogen:	Inkubujte 5 minút pri RT s Biocare DAB – OR – Inkubujte 5-7 minút pri RT s Warp Red.
Counterstain	Kontrafarba s hematoxylinom. Opláchnite deionizovanou vodou. Aplikujte Tacha's Blueing Solution na 1 minútu. Opláchnite deionizovanou vodou.

ONCORE Pro Automated Slide Staining System:

OPAI3252 je určený na použitie s ONCORE Pro. Konkrétne pokyny na použitie nájdete v používateľskej príručke. Parametre protokolu v editore protokolov by sa mali naprogramovať nasledovne:

Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	PRAME Rb	PRAME Rb AP
Protocol Template (Description):	Special Template (ONCORE Pro-Tect Detection Required)	Rb AP Template 1
Dewaxing (DS Buffer Option):	DS2-50	DS Buffer
Antigen Retrieval (AR Option):	AR1, high pH; 103°C	AR1, high pH; 103°C
Block Option:	Buffer	Buffer
Reagent Name, Time, Temp.:	PRAME Rb, 45 min., 25°C	PRAME Rb, 30 min., 25°C

BenchMark Ventana ULTRA:

AVI3252 je určený na použitie s BenchMark ULTRA. Konkrétne pokyny na použitie nájdete v používateľskej príručke. Odporúčané parametre protokolu sú nasledovné:

Template/Detection:	OptiView DAB IHC
Pretreatment Protocol:	CC1 64 minutes
Peroxidase:	Pre-Primary Peroxidase Inhibitor
Primary Antibody:	32 minutes, 36°C

Q Series – For Leica BOND-III:

ALI3252 je určený na použitie s Leica BOND-III. Konkrétne pokyny na použitie nájdete v používateľskej príručke. Odporúčané parametre protokolu sú nasledovné:

Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	IHC Protocol F	IHC Protocol J
Detection:	Bond Polymer Refine	Bond Polymer Refine Red
HIER:	20 min with ER2	20 min with ER2
Peroxide Block:	5 min	
Marker (Primary Antibody):	15 min	15 min
Post Primary:	8 min	
Polymer:	8 min	
Post Primary AP:		20 min

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Slovak

BIOCARE
M E D I C A L

Polymer AP:		30 min
Mixed Chromogen Refine:	10 min	10 min + 5 min
Hematoxylin:	5 min	5 min

Kontrola kvality:

Pozrite si štandardy kvality CLSI pre návrh a implementáciu imunohistochemických testov; Schválená smernica – druhé vydanie (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011⁸

Pozitívna kontrola tkaniva: Melanóm, normálne semenníky

Materiály pre externú pozitívnu kontrolu by mali byť čerstvé vzorky fixované, spracované a vložené čo najskôr rovnakým spôsobom ako vzorka (vzorky) pacienta. Pozitívne kontroly tkaniva naznačujú správne pripravené tkanivá a správne techniky farbenia. Do každého cyklu farbenia by mala byť zahrnutá jedna pozitívna externá tkanivová kontrola pre každý súbor testovacích podmienok.

Tkanivá použité pre externé materiály pre pozitívnu kontrolu by sa mali vyberať zo vzoriek pacientov s dobre charakterizovanými nízkymi hladinami pozitívnej cieľovej aktivity, ktorá poskytuje slabé pozitívne zafarbenie. Nízka úroveň pozitivity pre externé pozitívne kontroly je navrhnutá tak, aby zabezpečila detekciu jemných zmien citlivosti primárnej protilátky z nestability alebo problémov s metódou IHC. Komerčne dostupné tkanivové kontrolné sklíčka alebo vzorky spracované inak ako vzorka (vzorky) pacienta iba overujú účinnosť činidla a neoverujú prípravu tkaniva.

Známe pozitívne kontroly tkaniva by sa mali používať len na monitorovanie správneho výkonu spracovaných tkanív a testovacích činidiel, a nie ako pomôcka pri formulovaní špecifickej diagnózy vzoriek pacientov. Ak pozitívne kontroly tkaniva nepreukážu pozitívne zafarbenie, výsledky s testovanými vzorkami by sa mali považovať za neplatné.

Negatívna kontrola tkaniva:

Na overenie špecificity primárnej protilátky IHC použite negatívnu tkanivovú kontrolu (známe, že je PRAME negatívna), fixovanú, spracovanú a zapustenú rovnakým spôsobom ako vzorka (vzorky) pacienta pri každom cykle farbenia. preukázanie cieľového antigénu a poskytnutie indikácie špecifického zafarbenia pozadia (falošne pozitívne farbenie). Môže to byť aj množstvo rôznych typov buniek prítomných vo väčšine tkanivových rezov byť použité laboratóriom ako interné negatívne kontrolné miesta na overenie výkonu IHC technické údaje. Typy a zdroje vzoriek, ktoré možno použiť na negatívne tkanivo ovládacie prvky sú uvedené v časti Výkonnosť charakteristiky.

Ak sa v negatívnej kontrole tkaniva vyskytne špecifické zafarbenie (falošne pozitívne zafarbenie), výsledky so vzorkami pacienta by sa mali považovať za neplatné.

Nešpecifická negatívna kontrola reagenčii:

Použite nešpecifickú negatívnu kontrolu činidla namiesto primárnej protilátky s rezom každej vzorky pacienta na vyhodnotenie nešpecifického zafarbenia a umožňujú lepšiu interpretáciu špecifického zafarbenia v mieste antigénu. V ideálnom prípade negatívna kontrola činidla obsahuje protilátku PRAME IgG produkovanú zo supernatantu tkanivovej kultúry rovnakým spôsobom ako primárna protilátka, ale nevykazuje žiadnu špecifickú reaktivitu s ľudskými tkanivami v rovnakej matrici/roztoku ako protilátka Biocare. Nariedte negatívnu kontrolnú protilátku na rovnakú koncentráciu imunoglobulínu alebo proteínu ako zriedená primárna protilátka protilátka s použitím rovnakého riedidla. Ak sa fetálne teľacie sérum po spracovaní zachová v čistej protilátke, fetálne teľacie sérum s koncentráciou proteínu ekvivalentnou zriedenému primárna protilátka v rovnakom riedidle je tiež vhodná na použitie. (Pozrite si dodané činidlo). Samotné riedidlo sa môže použiť ako menej žiaduca alternatíva k predtým opísaným negatívnym kontrolným činidlám. Inkubačná doba pre negatívnu reagenčnú kontrolu by mala zodpovedať dobe primárnej protilátky.

Keď sa na sériových rezoch použijú panely niekoľkých protilátok, negatívne zafarbené oblasti jedného sklíčka môžu slúžiť ako negatívna/nešpecifická väzbová kontrola pozadia pre iné protilátky. Na odlíšenie endogénnej enzýmovej aktivity alebo nešpecifickej väzby enzýmov od špecifickej imunoreaktivity môžu byť ďalšie tkanivá pacienta zafarbené výlučne substrát-chromogén alebo enzýmovými komplexmi (PAP, avidín-biotín, streptavidín) a substrát-chromogén.

Overenie testu:

Pre prvým použitím protilátky alebo farbiaceho systému v diagnostickom postupe by si mal používateľ overiť špecifickosť protilátky jej testovaním na sérii vlastných tkanív so známymi imunohistochemickými charakteristikami, ktoré predstavujú známe pozitívne a negatívne tkanivá. Pozrite si postupy kontroly kvality vyššie uvedené v tejto časti príbalového letáku k produktu a odporúčania kontroly kvality certifikačného programu CAP⁹ pre imunohistochémiu a/alebo usmernenie NCCLS IHC¹⁰). Tieto postupy kontroly kvality by sa mali opakovať pre každú novú šaržu protilátok alebo vždy, keď dôjde k zmene parametrov testu. Na overenie testu sú vhodné tkanivá uvedené v časti Výkonnosť charakteristiky.

Riešenie problémov:

Postupujte podľa odporúčaní protokolu špecifického pre protilátky podľa príloženého údajového listu. Ak sa vyskytnú atypické výsledky, kontaktujte technickú podporu spoločnosti Biocare na čísle 1-800-542-2002.

Interpretácia farbenia:

Pozitívna kontrola tkaniva:

Pozitívna tkanivová kontrola zafarbená indikovanou protilátkou by sa mala najskôr vyšetriť, aby sa zistilo, že všetky činidlá fungujú správne. Príslušné farbenie cieľových buniek (ako je uvedené vyššie) svedčí o pozitívnej reaktivite. Ak pozitívne kontroly tkaniva nepreukážu pozitívne zafarbenie, akékoľvek výsledky s testovanými vzorkami by sa mali považovať za neplatné.

Farba reakčného produktu sa môže meniť v závislosti od použitých substrátových chromogénov. Očakávané farebné reakcie nájdete v príbalových letákok substrátu. Ďalej je možné pozorovať metachromáziu vo variantoch spôsobu farbenia.¹¹

Keď sa použije kontrastné farbenie, v závislosti od dĺžky inkubácie a účinnosti použitého kontrastného farbenia, kontrastné farbenie povedie k zafarbeniu bunkových jadier. Nadmerné alebo neúplné kontrastné farbenie môže ohroziť správnu interpretáciu výsledkov. Odporúčané kontrastné farbenie nájdete v protokole(och).

Negatívna kontrola tkaniva :

Negatívna tkanivová kontrola by sa mala vyšetriť po pozitívnej kontrole tkaniva, aby sa overila špecifickosť označenia cieľového antigénu primárnou protilátkou. Nepřítomnosť špecifického zafarbenia v negatívnej kontrole tkaniva potvrdzuje nedostatok krížovej reaktivity protilátky s bunkami/bunkovými zložkami. Ak sa v negatívnej vonkajšej kontrole tkaniva vyskytne špecifické zafarbenie (falošne pozitívne zafarbenie), výsledky so vzorkou pacienta by sa mali považovať za neplatné.

Nešpecifické sfarbenie, ak je prítomné, má zvyčajne difúzny vzhľad. Sporadické zafarbenie spojivového tkaniva možno pozorovať aj na rezoch z tkanív nadmerne fixovaných formalínom. Na interpretáciu výsledkov farbenia použite neporušené bunky. Nekrotické alebo degenerované bunky sa často farbja nešpecificky.

Tkanivo pacienta:

Preskúmajte vzorky pacientov zafarbené indikovanou protilátkou posledný. Intenzita pozitívneho zafarbenia by sa mala posúdiť v kontexte akéhokoľvek nešpecifického zafarbenia pozadia negatívnej kontroly s činidlom. Ako pri akomkoľvek imunohistochemickom teste, negatívny výsledok znamená, že antigén nebol detegovaný, nie že antigén chýbal v testovaných

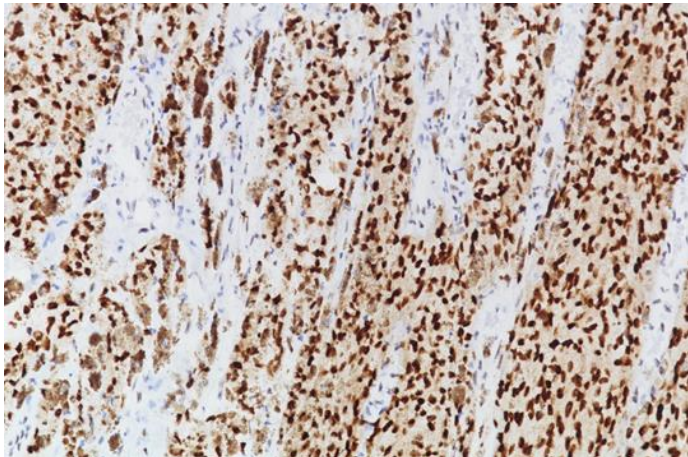
PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Slovak

BIOCARE
M E D I C A L

bunkách/tkanive. V prípade potreby použite panel protilátok na identifikáciu falošne negatívnych reakcií.



Melanóm zafarbený protilátkou PRAME [EPR20330].

Špecifické informácie týkajúce sa indikovanej imunoreaktivity protilátok nájdete v časti Súhrn a vysvetlenie, obmedzenia a výkonnostné charakteristiky.

Obmedzenia:

Všeobecné obmedzenia:

1. Na diagnostické použitie *in vitro*
2. Tento produkt je určený len na profesionálne použitie: Imunohistochémia je viackrokový diagnostický proces, ktorý pozostáva zo špecializovaného školenia vo výbere vhodných činidiel; výber tkaniva, fixácia a spracovanie; príprava podložného sklíčka IHC; a interpretácia výsledkov farbenia.
3. Farbenie tkaniva závisí od manipulácie a spracovania tkaniva pred farbením. Nesprávna fixácia, zmrazovanie, rozmrazovanie, umývanie, sušenie, zahrievanie, rezanie alebo kontaminácia inými tkanivami alebo tekutinami môže spôsobiť artefakty, zachytávanie protilátok alebo falošne negatívne výsledky. Nekonzistentné výsledky môžu byť spôsobené odchýlkami v metódach fixácie a zapustenia alebo prirodzenými nepravidelnosťami v tkanive.¹²
4. Nadmerné alebo neúplné kontrastné farbenie môže ohroziť správnu interpretáciu výsledkov.
5. Klinická interpretácia akéhokoľvek pozitívneho alebo negatívneho zafarbenia by sa mala hodnotiť v kontexte klinického obrazu, morfológie a iných histopatologických kritérií. Klinická interpretácia akéhokoľvek pozitívneho alebo negatívneho zafarbenia by mala byť doplnená morfológickými štúdiami s použitím správnych pozitívnych a negatívnych vnútorných a vonkajších kontrol, ako aj iných diagnostických testov. Je zodpovednosťou kvalifikovaného patológa, ktorý je oboznámený so správnym používaním IHC protilátok, činidiel a metód, interpretovať všetky kroky použité na prípravu a interpretáciu konečného IHC preparátu.
6. Optimálne riedenie protilátky a protokoly pre špecifickú aplikáciu sa môžu líšiť. Tieto zahŕňajú, ale nie sú obmedzené na fixáciu, metódu získavania tepla, inkubačné časy, hrúbku tkanivového rezu a použitú detekčnú súpravu. Z dôvodu vyššej citlivosti týchto jedinečných činidiel nie je možné odporúčané inkubačné časy a uvedené titry aplikovať na iné detekčné systémy, pretože výsledky sa môžu líšiť. Odporúčania a protokoly údajových listov sú založené na výhradnom používaní produktov Biocare. V konečnom dôsledku je zodpovednosťou vyšetrovateľa určiť optimálne podmienky.

7. Tento produkt nie je určený na použitie v prietokovej cytometrii. Výkonnostné charakteristiky neboli stanovené pre prietokovú cytometriu.
8. Tkanivá od osôb infikovaných vírusom hepatitídy B a obsahujúce povrchový antigén hepatitídy B (HBsAg) môžu vykazovať nešpecifické zafarbenie chrenovou peroxidázou.¹³
9. Reagencie môžu vykazovať neočakávané reakcie v predtým netestovaných tkanivách. Možnosť neočakávaných reakcií ani v testovaných skupinách tkanív nie je možné úplne eliminovať z dôvodu biologickej variability expresie antigénu v novotvaroch alebo iných patologických tkanivách.¹⁴ Kontaktujte technickú podporu spoločnosti Biocare na čísle 1-800-542-2002 alebo prostredníctvom informácií technickej podpory poskytovaných na biocare.net so zdokumentovanými neočakávanými reakciami.
10. Normálne/neimunitné séra z rovnakého zvieracieho zdroja ako sekundárne antiséra použité v blokovacích krokoch môžu spôsobiť falošne negatívne alebo falošne pozitívne výsledky v dôsledku autoprotilátok alebo prirodzených protilátok.
11. Falošne pozitívne výsledky môžu byť pozorované v dôsledku neimunologickej väzby proteínov alebo produktov reakcie substrátu. Môžu byť spôsobené aj pseudoperoxidázovou aktivitou (erytrocyty), endogénnou peroxidázovou aktivitou (cytochróm C) alebo endogénnym biotínom (napr. pečeň, prsia, mozog, obličky) v závislosti od typu použitého imunofarbiva.¹²

Špecifické obmedzenia produktu:

Žiadne ďalšie špecifické obmedzenia produktu.

Výkonnostné charakteristiky:

Reprodukovateľnosť:

Reprodukovateľnosť účinnosti protilátok bola overená testovaním vybraného normálneho a nádorového tkaniva v rôznych dňoch a rôznych prístrojoch s viacerými operátormi. Farbenie vybraných tkanív bolo konzistentné a uskutočnilo sa podľa očakávania.

Imunoreaktivita:

Nasledujúce pozitívne a negatívne imunoreaktivity boli demonštrované v tabuľkách 1 a 2 nižšie.

Nižšie uvedený zoznam nie je vyčerpávajúci, ale charakterizuje typy imunoreaktivít pozorovaných pri uvedenej protilátke.

V tomto produkte nie je pozorovaná žiadna známa nešpecifická protilátková reaktivita.

Zhrnutie očakávaných výsledkov:

Prevalencia PRAME v tkanivách normálneho a chorobného stavu bola hodnotená pomocou Tissue Microarrays (TMAs).

Normálne testované tkanivá sa zafarbili podľa očakávania, pričom v semenníkoch sa pozorovali vysoké úrovne zafarbenia a v iných tkanivách sa nezafarbilo.

Farbenie PRAME bolo pozorované na vysokej úrovni pri melanóme, ako sa očakávalo, a na rôznych úrovniach v iných rakovinových tkanivách, ako sú vaječníky, pľúca, prostata a prsia.

Analytický výkon:

Uskutočnili sa farbivé testy na citlivosť a špecifickosť a výsledky sú uvedené nižšie.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Slovak

BIOCARE
M E D I C A L

Citlivosť a špecifickosť:

Tabuľka 1: Citlivosť a špecifickosť protilátky bola stanovená testovaním FFPE normálnych tkanív.

Tkanivo	Pozitívne prípady	Celkový počet prípadov
Cerebrum	0	6
Cerebellum	0	3
Nadobličky	0	3
Vaječník	0	3
Pankreas	0	3
Trachea	0	3
Hypofýza	0	3
semenník*	3	3
Štítna žľaza	0	3
Prsník	0	3
Slezina	0	3
Tonsil	0	3
Thymus	0	3
Kostná dreň**	0	1
Lung	0	3
Srdce	0	3
Pažerák	0	3
Žalúdok	0	3
Tenké črevo	0	3
Dvojbodka	0	3
Pečeň	0	3
Slinná žľaza	0	3
obličky	0	3
Prostata	0	3
Uterus	0	3
Cervix	0	3
Kostrový sval	0	3
Koža	0	3
Periférny nerv	0	3
Obloženie buniek	0	3
Hlava, krk a slinná žľaza	0	6
Lymfatická uzlina	0	3

* 3-4 silné jadrové farbenie

** Chýbajú dve vzorky

Tabuľka 2: Citlivosť a špecifickosť protilátky bola stanovená testovaním rôznych FFPE neoplastických tkanív.

Patológia	Pozitívne prípady	Celkový počet prípadov
Melanóm	29	39
Rakovina vaječníkov	9	44
Rakovina prsníka	10	26
Rakovina hrubého čreva	4	43
Rakovina pľúc	21	50
Rakovina prostaty	18	41
Adrenokortikálny karcinóm	0	1
Rakovina močového mechúra	0	2
Meningióm	0	2
Astrocytóm	0	1
Spinocelulárny karcinóm (pažerák)	0	2
Adenokarcinóm (žalúdok)	0	2
Adenokarcinóm (tenké črevo)	0	1
Adenokarcinóm (hrubého čreva a konečníka)	0	6
Rakovina obličiek	0	2
Rakovina pečene	0	4
Lymfóm	0	3
Spinocelulárny karcinóm (hlava a krk, ústna dutina, jazyk)	0	1
Karcinóm nosohltanu	1	1
Adenokarcinóm (pankreas)	0	1
Adenokarcinóm (prostata)	0	2
Adenoidný cystický karcinóm (hlava a krk, slinná žľaza)	0	1
Spinocelulárny karcinóm (koža)	0	1
Seminoma	0	2
Rakovina štítnej žľazy	0	2
Rakovina krčka maternice	0	2
Rakovina endometria	1	2

Expresia PRAME v rôznych novotvaroch môže vykazovať variabilné percento nádorovej pozitivity. V tabuľke 3 sú uvedené percentá pozitívne zafarbených nádorových buniek (kategorizované podľa kvartilov) pozorované u rôznych novotvarov nachádzajúcich sa v tabuľke 2.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Slovak

BIOCARE
M E D I C A L

Tabuľka 3: Percento pozitívneho zafarbenia nádorových buniek v rôznych novotvaroch FFPE.

Tkanivá	Percento zafarbených nádorových buniek # prípadov vykazujúcich zafarbenie Percento z celkového počtu # prípadov (%)				
	<1 %	1 – 25 %	26 – 50 %	51 – 75 %	> 75 %
Rakovina vaječníkov	35/44 (79,5 %)	2/44 (4,5 %)	3/44 (6,8 %)	3/44 (6,8 %)	1/44 (2,3 %)
Rakovina prsníka	16/26 (61,5 %)	26. 7 (26,9 %)	1/26 (3,8 %)	26. 2 (7,7 %)	0 (0 %)
Rakovina hrubého čreva	39/43 (88,4 %)	4/43 (11,6 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Rakovina pľúc	29/50 (58,0 %)	7/50 (14,0 %)	4/50 (8,0 %)	7/50 (14,0 %)	3/50 (6,0 %)
Rakovina prostaty	23/41 (56,1 %)	9/41 (22,0 %)	3/41 (7,3 %)	2/41 (4,9 %)	4/41 (9,8 %)
Karcinóm nosohltanu	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	1/1 (100 %)
Rakovina endometria	1/2 (50 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	1/2 (50 %)	0 (0 %)
Melanóm	10/39 (25,6 %)	6/39 (15,4 %)	39.5 (12,8 %)	6/39 (15,4 %)	39. 12 (30,8 %)

Percento zafarbenia nádorových buniek prezentované pre všetky intenzity farbenia.

Farbenie na tkanivách ukazujúce rôzne úrovne expresie proteínu PRAME.

Výsledky testovania analytickej výkonnosti ukázali, že protilátka PRAME [EPR20330] dokáže správne detegovať proteín PRAME pri použití definovaného protokolu IHC. Abnormálne výsledky tkanivového testu podporujú záver, že PRAME [EPR20330] je citlivý na proteín PRAME pri použití odporúčaných IHC protokolov. Protilátka PRAME [EPR20330] je schopná detegovať nízke až vysoké hladiny proteínu PRAME. Testovanie normálneho tkaniva neukázalo žiadnu neočakávanú detekciu PRAME na 32 typoch tkanív. Nevyskytla sa žiadna neočakávaná krížová reaktivita. Výsledky podporujú tvrdenie, že protilátka PRAME [EPR20330] je vysoko špecifická (analytická špecifickosť) k proteínu PRAME.

Klinický výkon:

Uskutočnili sa farbiace testy na diagnostickú citlivosť a špecifickosť a výsledky sú uvedené nižšie. Pozitívna a negatívna imunoreaktivita bola zaznamenaná v tabuľke 4.

Tri sklíčka TMA s melanómom boli zafarbené v Biocare a odoslané externému patológovi na prečítanie a hodnotenie. Melanómové tkanivá vykazovali rôznorodosť skóre farbenia v rozsahu od 0 (negatívne) po silné (4). Väčšina melanocytových névov nevykazovala žiadnu reaktivitu PRAME, ale niekoľko malo silnú reaktivitu.

Tabuľka 4: Percento pozitívneho zafarbenia nádorových buniek v rôznych FFPE melanocytových novotvaroch a koži.

Tkanivá	Percento zafarbených nádorových buniek # prípadov vykazujúcich zafarbenie Percento z celkového počtu # prípadov (%)				
	<1 %	1 – 25 %	26 – 50 %	51 – 75 %	> 75 %
Melanóm	28/133 (21,1 %)	50/133 (37,6 %)	10/133 (7,5 %)	8/133 (6,0 %)	37/133 (27,8 %)
Metastatický melanóm	7/38 (18,4 %)	38. 10 (26,3 %)	3/38 (7,9 %)	2/38 (5,3 %)	16/38 (42,1 %)
Melanocytové névy	14/12 (85,7 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	2/12 (14,3 %)
Koža	10/10 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)

Percento zafarbenia nádorových buniek prezentované pre všetky intenzity farbenia.

Farbenie na tkanivách ukazujúce rôzne úrovne expresie proteínu PRAME.

Primárnym koncovým bodom testu bolo vyhodnotenie diagnostickej citlivosti protilátky PRAME [EPR20330] v IHC procedúre, definovanej ako miera pozitívnej detekcie melanómu v potvrdených pozitívnych vzorkách. [TP/(TP+FN)]

Sekundárnym koncovým bodom bolo vyhodnotenie diagnostickej špecificity - miera negatívnej detekcie pre potvrdené vzorky negatívnych na melanóm. [TN/(TN+FP)]

Vyskytlo sa 35 falošne negatívnych prípadov melanómu, ktoré dostali zlaté štandardné patologické hodnotenie ako melanóm, ale boli negatívne na PRAME. 136 prípadov bolo skutočne pozitívnych v tom, že im bol diagnostikovaný melanóm a vykazovali signál pre PRAME. Dva falošne pozitívne výsledky boli zistené v 14 vzorkách melanocytových névov, ktoré boli diagnostikované ako benigne, ktoré vykazovali signál pre PRAME.

Z údajov je odhadovaná diagnostická citlivosť = $136 / (136 + 35) = 79,5 \%$

Z údajov odhadovaná diagnostická špecificita = $22 / (22 + 2) = 91,7 \%$

Na základe našich výpočtov sme dospeli k odhadovanej diagnostickej senzitivite 79,5 % a odhadovanej diagnostickej špecificite 91,7 % na detekciu melanómu.

Z toho sme usúdili, že protilátka PRAME [EPR20330] testovaná spoločnosťou Biocare na vzorkách melanómu a melanocytových névov je citlivá na melanóm a vysoko špecifická pre melanóm.

Riešenie problémov: (Poskytnite vysvetlenie pre každý z bodov nižšie)

1. Žiadne zafarbenie na sklíčkach – Skontrolujte, či sa použilo vhodné tkanivo pozitívnej kontroly, protilátka a detekčné produkty.
2. Slabé zafarbenie všetkých sklíčok – Skontrolujte, či sa použilo vhodné tkanivo pozitívnej kontroly, protilátka a detekčné produkty.
3. Nadmerné pozadie všetkých sklíčok – Môžu existovať vysoké hladiny endogénneho biotínu (ak používate detekčné produkty na báze biotínu), endogénna aktivita HRP premieňajúca chromogén na farebný konečný produkt (použite peroxidázový blok) alebo nadmerná nešpecifická proteínová interakcia (použite proteín blok, ako je blokovací roztok na báze séra alebo kazeínu).
4. Tkanivové rezy zmyjú sklíčka počas inkubácie – Skontrolujte sklíčka, aby ste sa uistili, že sú pozitívne nabité.
5. Špecifické zafarbenie je príliš tmavé – Skontrolujte protokol a zistite, či bol na sklíčko aplikovaný správny titer protilátok, ako aj správne

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Slovak

BIOCARE
M E D I C A L

inkubačné časy pre všetky činidlá. Okrem toho sa uistite, že protokol obsahuje dostatok premyvacích krokov na odstránenie nadbytočných činidiel po dokončení inkubačných krokov.

Referencie:

1. Kiernan JA. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. *Theory and Practice of Histotechnology*. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. *J Histotechnol*. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. *Biotech Histochem*. 1996 Jan;71(5):263-70.
6. Center for Disease Control Manual. Guide: Safety Management, NO. CDC-22, Atlanta, GA. April 30, 1976 "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts."
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition* CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
8. CLSI *Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2)* CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011
9. College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. [Http://www.cap.org](http://www.cap.org) (800) 323-4040.
10. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. *Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline*. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
11. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. *Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques*. *Histochemistry* 1987; 86:471-478.
12. Nadji M, Morales AR. *Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls*. *Lab Med*1983;14:767.
13. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. *Nonimmunologic binding of horseradishperoxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry*. *Am J Clin Path* 1980;73:626.
14. Herman GE and Elfont EA. *The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control*. *Biotech & Histochem* 1991;66:194.
15. Zhang W, et al. *PRAME expression and promoter hypermethylation in epithelial ovarian cancer*. *Oncotarget*, 2016 Jul; 7(29):45352-69.
16. Lezcano C, et al. *PRAME expression in melanocytic tumors*. *Am J Surg Pathol*. 2018 Nov; 42(11):1456-65.

Ultraline sú vyvinuté výhradne spoločnosťou Biocare Medical LLC a neznamenujú schválenie alebo schválenie protilátok Biocare spoločnosťou Ventana Medical Systems, Inc alebo Roche. Biocare, Ventana a Roche nie sú žiadnym spôsobom pridružené, spojené ani prepojené. Ventana®, BenchMark®, ultraView a OptiView sú ochranné známky spoločnosti Roche.

Protilátky série Q sú vyvinuté výhradne spoločnosťou Biocare Medical LLC a neznamenujú schválenie alebo schválenie protilátok Biocare spoločnosťou Leica Biosystems. Biocare a Leica Biosystems nie sú nijakým spôsobom prepojené, spojené ani prepojené. Leica, Leica Biosystems, BOND-MAX a BOND-III sú ochranné známky spoločnosti Leica Biosystems.

Súhrn bezpečnosti a výkonu možno nájsť tu: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Slovenian

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats				
Format	Catalog Number	Description	Dilution	Diluent
Concentrate	ACI 3252 A, B	0.1, 0.5 mL	1:100	Van Gogh Yellow
Predilute	API 3252 AA, G20, H	6.0, 20, 25 mL	Ready-to-use	N/A
ONCORE Pro	OPAI 3252 T60	60 tests	Ready-to-use	N/A
Q Series-- For Leica BOND-III	ALI 3252 G7	7.0 mL	Ready-to-use	N/A
UltraLine -- For BenchMark	AVI 3252 G, G25	6.0, 25 mL	Ready-to-use	N/A

Predvidena uporaba:

Za *in vitro* diagnostično uporabo

PRAME [EPR20330] je kunčje monoklonsko protitelo, ki je namenjeno za laboratorijsko uporabo po začetni diagnozi tumorja s konvencionalno histopatologijo z uporabo neimunoloških histokemičnih barvanj pri kvalitativni identifikaciji proteina PRAME z imunohistokemijo (IHC) v parafinu, fiksiranem s formalinom. vgrajena (FFPE) človeška tkiva. Klinično razlago kakršnega koli obarvanja ali njegove odsotnosti je treba dopolniti z morfološki študijami z uporabo ustreznih kontrol in jo mora ovrednotiti kvalificirani patolog v okviru bolnikove klinične anamneze in drugih diagnostičnih testov kot pomoč pri drugih kliničnih ugotovitvah.

Povzetek in razlaga:

PRAME se nahaja na kromosomu 22q11.22 in kodira protein s 509 aminokislinami. PRAME je avtosomni gen za antigen raka testisa (CTA), za katerega je bilo dokazano, da se izraža v melanomu, različnih nemelanocitnih malignih novotvorbah, vključno z nedrobnoceličnim pljučnim rakom, karcinomom dojke, karcinomom jajčnikov in številnimi drugimi navedenimi. Ni znano, da normalna zdrava tkiva izražajo PRAME, razen za moda, jajčnike, nadledvične žleze in nekaj drugih, navedenih v literaturi. ^(15,16)

Načelo postopka:

Ta izdelek s protitelesi se lahko uporablja kot primarno protitelo pri imunohistokemijskem testiranju s formalinom fiksiranih in v parafin vgrajenih tkivnih odsekov. Na splošno imunohistokemični (IHC) tehnike barvanja omogočajo vizualizacijo antigenov z zaporedno uporabo a specifično protitelo proti antigenu (primarno protitelo), sekundarno protitelo proti primarnemu protitelesu (neobvezno povezovalno protitelo/sonda), encimski kompleks in kromogeni substrat z vmesnimi koraki pranja. Posledica encimske aktivacije kromogena je viden reakcijski produkt na mestu antigena. Vzorec se nato lahko nasprotno obarva in prekrije. Rezultati se interpretirajo z uporabo luči mikroskopom in pomoč pri diferencialni diagnostiki patofizioloških procesov, ki lahko oz morda ni povezan z določenim antigenom.

Materiali in metode:

Priloženi reagenti:

Vir gostitelja: Monoklonski kunec

Reaktivnost vrste: človek. Druge vrste niso testirane.

Klon: EPR20330

Izotip: IgG

Koncentracija beljakovin: Specifična koncentracija IgG: Obrnite se na tehnično podporo podjetja Biocare

Specifičnost: PRAME

Celična lokalizacija: jedro in celična membrana

Metoda: afinitetno prečiščen rekombinantni zajčji monoklon.

Rekonstitucija, mešanje, redčenje, titracija:

Predhodno razredčen reagent protiteles je optimalno razredčen za uporabo z zgoraj navedenimi sistemi za barvanje. Nadaljnje redčenje lahko povzroči izgubo obarvanja antigena. Uporabnik mora vsako takšno spremembo potrditi. Razlike v obdelavi tkiv in tehničnih postopkih v uporabnikovem laboratoriju lahko povzročijo znatne razlike v rezultatih, zaradi katerih je potrebno redno izvajanje internih kontrol (glejte poglavje Nadzor kakovosti). Koncentrirani reagent je treba razredčiti, kot je navedeno v zgornji tabeli.

Znane aplikacije:

Imunohistokemija (tkiva, fiksirana s formalinom in parafinom)

Dobavljeno kot: puferska fiziološka raztopina, pH 5,9-7,9, ki vsebuje beljakovinski nosilec in manj kot 0,1 % konzervansa natrijevega azida . Za dodatne podrobnosti glejte varnostni list.

Potrebni materiali in reagenti, ki niso priloženi:

Mikroskopska stekelca pozitivno nabita.

Pozitivne in negativne kontrole tkiva

Puščavska komora (ali podobna sušilna peč)

Ksilen ali nadomestek ksilena

Etanol ali reagentni alkohol

Komora za razkrivanje (lonc pod pritiskom)

Deionizirana ali destilirana voda

Pufer za pranje

Reagenti za predobdelavo

Blok peroksidaze

Beljakovinski blok (neobvezno)

Sonda za odkrivanje in polimer

Reagenti negativne kontrole

Kromogeni

Hematoksilin (protibarvanje)

Reagent za pomodrelo

Montažni medij

Pokrívno steklo

Svetlobni mikroskop (40-400-kratna povečava)

Konfiguracije produkta protiteles so na voljo za uporabo na instrumentih, navedenih v zgornji tabeli.

Shranjevanje in stabilnost:

Shranjujte pri 2°C do 8°C. Pri shranjevanju pod temi pogoji je izdelek stabilen do datuma izteka roka uporabnosti, ki je natisnjen na nalepki vial. Ne uporabljajte po preteku roka uporabnosti. Preveriti je treba shranjevanje pod kakršnimi koli pogoji, razen navedenih. Razredčene reagente je treba uporabiti takoj; preostali reagent shranite pri 2°C do 8°C. Biocare ni ugotovil stabilnosti uporabniško razredčenega reagenta .

Pozitivne in negativne kontrole je treba opraviti hkrati z vsemi vzorci bolnikov. Če opazite nepričakovano obarvanje, ki ga ni mogoče razložiti z variacijami v laboratorijskih postopkih, in obstaja sum na težavo s protitelesi, se obrnite na tehnično podporo Biocare na 1-800-542-2002 ali prek informacij o tehnični podpori na biocare.net.

Priprava vzorca:

Robčki, fiksirani v formalinu, so primerni za uporabo pred vgradnjo v parafin. Kostna tkiva je treba pred obdelavo tkiva dekalificirati, da olajšamo rezanje tkiva in preprečimo poškodbe rezil mikrotoma. ^{1, 2}

Pravilno fiksirana in vdzelana tkiva, ki izražajo določeno tarčo antigena, morajo biti shranjena na hladnem. Zakon o izboljšanju kliničnega laboratorija (CLIA) iz leta 1988 v 42 CFR § 493.1259(b) zahteva, da mora laboratorij hraniti obarvana stekelca vsaj deset let od datuma pregledati in hraniti bloke vzorcev vsaj dve leti od datuma pregleda. ³

 Biocare Medical

60 Berry Drive

Pacheco, CA 94553

USA

163/190



TP v3 (12/15/2021)

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080

 EMERGO EUROPE

Westervoortsedijk 60

8627 AT Arnhem

The Netherlands

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Slovenian

BIOCARE
M E D I C A L

Obdelava tkiv pred barvanjem:

Izvedite toplotno povzročeno pridobivanje epitopov (HIER) po priporočenem protokolu spodaj. Pokazalo se je, da rutinska uporaba HIER pred IHC zmanjšuje nedoslednost in standardizira barvanje. ^{4,5}

Opozorilo in previdnostni ukrepi:

1. To protitelo vsebuje manj kot 0,1 % natrijevega azida. Koncentracije, nižje od 0,1 %, niso nevarni materiali, ki jih je treba prijaviti v skladu z US 29 CFR 1910.1200, obvestilom o nevarnosti OSHA in direktivo ES 91/155/ES. Natrijev azid (NaN₃), ki se uporablja kot konzervans, je strupen, če ga zaužijemo. Natrijev azid lahko reagira s svinčnimi in bakrenimi vodovodnimi napeljavami ter tvori zelo eksplozivne kovinske azide. Po odlaganju sperite z veliko količino vode, da preprečite kopičenje azida v vodovodnih napeljavah. (Center za nadzor bolezni, 1976, Nacionalni inštitut za varnost in zdravje pri delu, 1976) ⁶

2. Z vzorci pred in po fiksaciji ter z vsemi materiali, ki so jim izpostavljeni, je treba ravnati, kot da bi lahko prenašali okužbo, in jih odstraniti z ustreznimi varnostnimi ukrepi. Reagentov nikoli ne pipetirajte z usti in se izogibajte stiku reagentov in vzorcev s kožo in sluznicami. Če pridejo reagenti ali vzorci v stik z občutljivimi območji, jih sperite z veliko vode. ⁷

3. Mikrobna kontaminacija reagentov lahko povzroči povečanje nespecifičnega obarvanja.

4. Časi inkubacije ali temperature, ki niso navedene, lahko dajo napačne rezultate. Uporabnik mora vsako takšno spremembo potrditi.

5. Reagenta ne uporabljajte po datumu izteka roka uporabnosti, ki je natisnjen na viali.

6. Predhodno razredčen reagent protiteles je optimalno razredčen za uporabo. Nadaljnje redčenje lahko povzroči izgubo obarvanja antigena.

Pred uporabo je treba potrditi razredčitev koncentriranega reagenta protiteles. Kaj uporabljeno razredčilo, ki ni izrecno priporočeno, mora biti prav tako potrjeno glede združljivosti in stabilnosti.

8. Odstranite vse uporabljene reagente in vse druge kontaminirane materiale za enkratno uporabo po postopkih za infektivne ali potencialno infektivne odpadke. Odgovornost vsakega laboratorija je, da ravna s trdnimi in tekočimi odpadki glede na njihovo naravo in stopnjo nevarnosti ter da jih obdela in odstrani (ali da jih obdelati in odstraniti) v skladu z veljavnimi predpisi.

9. Upoštevajte lokalne predpise o odstranjevanju za vašo lokacijo skupaj s priporočili v varnostnem listu, da določite varno odstranjevanje tega izdelka.

10. Varnostni list je na voljo na zahtevo in se nahaja na <http://biocare.net>.

11. Če želite prijaviti domnevne resne incidente, povezane s to napravo, se obrnite na lokalnega predstavnika družbe Biocare in pristojni organ države članice ali države, v kateri ima uporabnik sedež.

Navodila za uporabo:

Priporočeni protokoli barvanja za PRAME [EPR20330]:

IntelliPATH FLX and manual use:

API3252 za IntelliPATH FLX in ročno uporabo je bil standardiziran s sistemom zaznavanja MACH 4. Uporabite TBS za korake pranja.

Peroxide Block:	Blokirajte 5 minut s Peroxidazed 1.
Pretreatment:	Izvedite pridobivanje toplote z Borg Decloakerjem. Za posebna navodila glejte podatkovni list Borg Decloaker.
Protein Block (Optional):	Inkubirajte 5-10 minut pri sobni temperaturi z Background Punisher.
Primary Antibody:	Inkubirajte 30 minut pri sobni temperaturi.
Detection:	Sonda: N/A Polimer: Inkubirajte 30 minut pri sobni temperaturi s sekundarno konjugiranim polimerom.
Chromogen:	Inkubirajte 5 minut pri sobni temperaturi z Biocare DAB – ALI – inkubirajte 5-7 minut pri sobni temperaturi z Warp Red.

Counterstain	Kontrabarvanje s hematoksilinom. Izperite z deionizirano vodo. Nanesite raztopino Tacha's Bluing Solution za 1 minuto. Izperite z deionizirano vodo.
---------------------	--

ONCORE Pro Automated Slide Staining System:

OPAI3252 je namenjen za uporabo z ONCORE Pro. Za posebna navodila za uporabo glejte uporabniški priročnik. Parametri protokola v urejevalniku protokolov morajo biti programirani na naslednji način:

Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	PRAME Rb	PRAME Rb AP
Protocol Template (Description):	Special Template (ONCORE Pro-Tect Detection Required)	Rb AP Template 1
Dewaxing (DS Buffer Option):	DS2-50	DS Buffer
Antigen Retrieval (AR Option):	AR1, high pH; 103°C	AR1, high pH; 103°C
Block Option:	Buffer	Buffer
Reagent Name, Time, Temp.:	PRAME Rb, 45 min., 25°C	PRAME Rb, 30 min., 25°C

Ventana BenchMark ULTRA:

AVI3252 je namenjen uporabi z BenchMark ULTRA. Za posebna navodila za uporabo glejte uporabniški priročnik. Priporočeni parametri protokola so naslednji:

Template/Detection:	OptiView DAB IHC
Pretreatment Protocol:	CC1 64 minutes
Peroxidase:	Pre-Primary Peroxidase Inhibitor
Primary Antibody:	32 minutes, 36°C

Q Series – For Leica BOND-III:

ALI3252 je namenjen uporabi z Leica BOND-III. Za posebna navodila za uporabo glejte uporabniški priročnik. Priporočeni parametri protokola so naslednji:

Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	IHC Protocol F	IHC Protocol J
Detection:	Bond Polymer Refine	Bond Polymer Refine Red
HIER:	20 min with ER2	20 min with ER2
Peroxide Block:	5 min	
Marker (Primary Antibody):	15 min	15 min
Post Primary:	8 min	
Polymer:	8 min	
Post Primary AP:		20 min
Polymer AP:		30 min
Mixed Chromogen Refine:	10 min	10 min + 5 min
Hematoxylin:	5 min	5 min

Nadzor kakovosti:

Glejte standarde kakovosti CLSI za načrtovanje in izvajanje imunohistokemijskih testov; Odobrene smernice – druga izdaja (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA ZDA (www.clsi.org). 2011 ⁸

Pozitivna kontrola tkiva: Melanom, normalen testis

Zunanji materiali za pozitivno kontrolo morajo biti sveži vzorci, fiksirani, obdelani in vdelani čim prej na enak način kot vzorec(-e) bolnika. Pozitivne kontrole tkiva kažejo na pravilno pripravljena tkiva in pravilne tehnike

 Biocare Medical

60 Berry Drive
Pacheco, CA 94553

USA

164/190



TP v3 (12/15/2021)

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080

 EMERGO EUROPE

Westervoortsedijk 60

8627 AT Arnhem

The Netherlands

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Slovenian

BIOCARE
M E D I C A L

barvanja. V vsak postopek barvanja je treba vključiti eno pozitivno zunanjo kontrolo tkiva za vsak niz testnih pogojev.

Tkiva, uporabljena za materiale za zunanjo pozitivno kontrolo, je treba izbrati iz bolnikovih vzorcev z dobro označenimi nizkimi ravnmi pozitivne ciljne aktivnosti, ki daje šibko pozitivno obarvanje. Nizka raven pozitivnosti za zunanje pozitivne kontrole je zasnovana tako, da zagotavlja odkrivanje subtilnih sprememb v občutljivosti primarnega protitelesa zaradi nestabilnosti ali težav z metodologijo IHC. Komercialno dostopna stekelca za kontrolo tkiva ali vzorci, obdelani drugače kot vzorec(-i) bolnika, potrjujejo samo učinkovitost reagenta in ne preverjajo priprave tkiva.

Znane pozitivne kontrole tkiv je treba uporabiti samo za spremljanje pravilnega delovanja obdelanih tkiv in testnih reagentov, ne pa kot pomoč pri oblikovanju specifične diagnoze bolnikovih vzorcev. Če pozitivne kontrole tkiva ne pokažejo pozitivnega obarvanja, je treba rezultate s preskusnimi vzorci šteti za neveljavne.

Negativna kontrola tkiva:

Za preverjanje specifičnosti primarnega protitelesa IHC za prikaz tarčnega antigena in podatek o specifičnem obarvanju ozadja (lažno pozitivno obarvanje). Tudi različne vrste celic, ki so prisotne v večini delov tkiva, lahko laboratorij uporablja kot notranja negativna kontrolna mesta za preverjanje delovanja IHC specifikacije. Vrste in viri vzorcev, ki se lahko uporabijo za negativno tkivo kontrolniki so navedeni v razdelku Performance Characteristics.

Če se pri negativni kontroli tkiva pojavi specifično obarvanje (lažno pozitivno obarvanje), je treba rezultate bolnikovih vzorcev obravnavati kot neveljavne.

Nespecifična negativna kontrola reagenta:

Uporabite nespecifično negativno kontrolo reagenta namesto primarnega protitelesa z odsekom vsakega bolnikovega vzorca, da ocenite nespecifično obarvanje in omogočajo boljše interpretacijo specifičnega obarvanja na mestu antigena. V idealnem primeru negativna kontrola reagenta vsebuje protitelo IgG PRAME, proizvedeno iz supernatanta tkivne kulture na enak način kot primarni protitelesa, vendar ne kaže specifične reaktivnosti s človeškimi tkivi v istem matrici/raztopini kot protitelesa Biocare. Protitelo negativne kontrole razredčite na enako koncentracijo imunoglobulina ali beljakovin kot razredčeno primarno protitelesa z enakim razredčilom. Če se fetalni telečji serum po obdelavi ohrani v čistem protitelesu, se fetalni telečji serum v koncentraciji beljakovin, ki je enaka razredčeni primarno protitelo v istem razredčilu je prav tako primerno za uporabo. (Glejte priloženi reagent). Samo razredčilo se lahko uporabi kot manj zaželena alternativa prej opisanim negativnim kontrolam reagenta. Inkubacijsko obdobje za negativno kontrolo reagenta mora ustrezati obdobju primarnega protitelesa.

Kadar se plošče z več protitelesi uporabljajo na serijskih odsekih, lahko negativno obarvana področja enega preparata služijo kot negativna/nespecifična vezavna kontrola ozadja za druga protitelesa. Za razlikovanje endogene encimske aktivnosti ali nespecifične vezave encimov od specifične imunoreaktivnosti se lahko dodatna bolnikova tkiva obarvajo izključno s substrat-kromogenom ali encimskimi kompleksi (PAP, avidin-biotin, streptavidin) oziroma substrat-kromogen.

Preverjanje testa:

Pred prvo uporabo protitelesa ali sistema obarvanja v diagnostičnem postopku mora uporabnik preveriti specifičnost protitelesa tako, da ga testira na nizu lastnih tkiv z znanimi imunohistokemičnimi značilnostmi, ki predstavljajo znana pozitivna in negativna tkiva. Glejte postopke nadzora kakovosti, ki so bili predhodno opisani v tem razdelku navodila za uporabo izdelka, in priporočila za nadzor kakovosti programa certificiranja CAP⁹ za imunohistokemijo in/ali smernice NCCLS IHC¹⁰). Te postopke nadzora kakovosti je treba ponoviti za vsako novo serijo protiteles ali vsakič, ko pride do spremembe parametrov testa. Tkiva, navedena v razdelku o značilnostih delovanja, so primerna za preverjanje analize.

Odpravljanje težav:

Sledite priporočilom protokola za specifična protitelesa v skladu s priloženim podatkovnim listom. Če pride do netipičnih rezultatov, se obrnite na tehnično podporo Biocare na 1-800-542-2002.

Razlaga barvanja:

Pozitivna kontrola tkiva:

Najprej je treba pregledati pozitivno kontrolo tkiva, obarvano z navedenim protitelesom, da se prepričamo, ali vsi reagenti delujejo pravilno. Ustrezno obarvanje ciljnih celic (kot je navedeno zgoraj) kaže na pozitivno reaktivnost. Če pozitivne kontrole tkiva ne pokažejo pozitivnega obarvanja, je treba vse rezultate s preskusnimi vzorci obravnavati kot neveljavne.

Barva reakcijskega produkta se lahko razlikuje glede na uporabljene substratne kromogene. Za pričakovane barvne reakcije glejte navodila za embalažo substrata. Poleg tega lahko opazimo metakromazijo pri različnih metodah obarvanja.¹¹

Ko se uporabi nasprotno barvanje, bo odvisno od dolžine inkubacije in moči uporabljenega nasprotnega barvanja povzročilo obarvanje celičnih jeder. Prekomerno ali nepopolno kontrastno barvanje lahko ogrozi pravilno interpretacijo rezultatov. Glejte protokol(e) za priporočeno kontrastno barvanje.

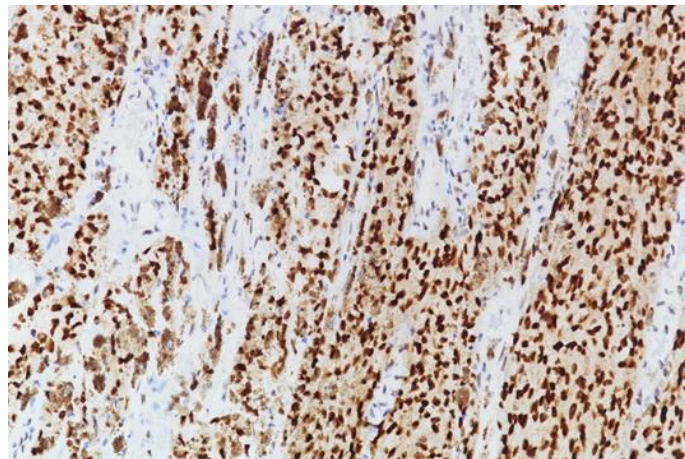
Negativna kontrola tkiva :

Negativno tkivno kontrolo je treba pregledati po pozitivni tkivni kontroli, da se preveri specifičnost označevanja tarčnega antigena s primarnim protitelesom. Odsotnost specifičnega barvanja pri negativni tkivni kontroli potrjuje pomanjkanje navzkrižne reaktivnosti protiteles na celice/celične komponente. Če pride do specifičnega obarvanja (lažno pozitivno obarvanje) pri negativni zunanji kontroli tkiva, je treba rezultate bolnikovega vzorca šteti za neveljavne.

Nespecifično obarvanje, če je prisotno, ima običajno razpršen videz. Občasno obarvanje vezivnega tkiva je mogoče opaziti tudi v odsekih tkiv, ki so preveč fiksirana s formalinom. Za razlago rezultatov obarvanja uporabite nedotaknjene celice. Nekrotične ali degenerirane celice se pogosto obarvajo nespecifično.

Bolnikovo tkivo:

Preglejte bolnikove vzorce, obarvane z navedenim protitelesom zadnji. Intenzivnost pozitivnega obarvanja je treba oceniti v kontekstu morebitnega nespecifičnega obarvanja ozadja negativne reagentne kontrole. Kot pri vsakem imunohistokemičnem testu negativen rezultat pomeni, da antigen ni bil odkrit, ne pa, da antigena ni bilo v testiranih celicah/tkivu. Po potrebi uporabite ploščo protiteles za identifikacijo lažno negativnih reakcij.



Melanom obarvan s protitelesom PRAME [EPR20330].

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Slovenian

BIOCARE
M E D I C A L

Glejte povzetek in razlago, omejitve in značilnosti delovanja za posebne informacije glede indicirane imunoreaktivnosti protiteles.

Omejitve:

Splošne omejitve:

1. Za *in vitro* diagnostično uporabo
2. Ta izdelek je samo za profesionalno uporabo: Imunohistokemija je večstopenjski diagnostični proces, ki je sestavljen iz specializiranega usposabljanja za izbiro ustreznih reagentov; izbira, fiksacija in obdelava tkiv; priprava preparata IHC; in interpretacijo rezultatov barvanja.
3. Obarvanje tkiva je odvisno od ravnanja in obdelave tkiva pred barvanjem. Nepravilna fiksacija, zamrzovanje, odmrzovanje, pranje, sušenje, segrevanje, rezanje ali kontaminacija z drugimi tkivi ali tekočinami lahko povzroči artefakte, ujetost protiteles ali lažno negativne rezultate. Neskladni rezultati so lahko posledica razlik v metodah fiksacije in vdelave ali inherentnih nepravilnosti v tkivu.¹²
4. Prekomerno ali nepopolno kontrastno barvanje lahko ogrozi pravilno interpretacijo rezultatov.
5. Klinično interpretacijo kakršnega koli pozitivnega ali negativnega obarvanja je treba ovrednotiti v okviru klinične slike, morfološke in drugih histopatoloških meril. Klinično interpretacijo kakršnega koli pozitivnega ali negativnega obarvanja je treba dopolniti z morfološkimi študijami z uporabo ustreznih pozitivnih in negativnih notranjih in zunanjih kontrol ter drugih diagnostičnih testov. Odgovornost kvalificiranega patologa, ki je seznanjen s pravilno uporabo protiteles, reagentov in metod IHC, je za razlago vseh korakov, uporabljenih za pripravo in razlago končnega pripravka IHC.
6. Optimalna razreditev protiteles in protokoli za določeno aplikacijo se lahko razlikujejo. Ti vključujejo, vendar niso omejeni na fiksacijo, metodo odvzema toplote, inkubacijske čase, debelino odsekov tkiva in uporabljen komplet za odkrivanje. Zaradi vrhunske občutljivosti teh edinstvenih reagentov navedeni priporočeni inkubacijski časi in titri ne veljajo za druge detekcijske sisteme, saj se lahko rezultati razlikujejo. Priporočila in protokoli podatkovnega lista temeljijo na izključni uporabi izdelkov Biocare. Navsezadnje je odgovornost raziskovalca, da določi optimalne pogoje.
7. Ta izdelek ni namenjen uporabi v pretočni citometriji. Značilnosti delovanja za pretočno citometrijo niso bile določene.
8. Tkiva oseb, okuženih z virusom hepatitisa B in vsebujejo površinski antigen hepatitisa B (HBsAg), so lahko nespecifično obarvana s hrenovo peroksidazo.¹³
9. Reagenti lahko pokažejo nepričakovane reakcije v predhodno netestiranih tkivih. Možnosti nepričakovanih reakcij tudi v testiranih skupinah tkiv ni mogoče popolnoma odpraviti zaradi biološke variabilnosti izražanja antigenov v novotvorbah ali drugih patoloških tkivih.¹⁴ Obrnite se na tehnično podporo družbe Biocare na 1-800-542-2002 ali prek informacij o tehnični podpori na biocare.net z dokumentiranimi nepričakovanimi reakcijami.
10. Normalni/neimunski serumi iz istega živalskega izvora kot sekundarni antiserumi, uporabljeni v korakih blokiranja, lahko povzročijo lažno negativne ali lažno pozitivne rezultate zaradi avtoproteles ali naravnih protiteles.
11. Lažno pozitivne rezultate lahko opazimo zaradi neimunološke vezave beljakovin ali reakcijskih produktov substrata. Lahko jih povzroči tudi aktivnost psevdoperoksidaze (eritrociti), aktivnost endogene peroksidaze (citokrom C) ali endogeni biotin (npr. jetra, dojke, možgani, ledvice), odvisno od vrste uporabljenega imunskega barvanja.¹²

Posebne omejitve izdelka:

Ni dodatnih posebnih omejitev za izdelek.

Značilnosti delovanja:

Ponovljivost:

Ponovljivost delovanja protiteles je bila preverjena s testiranjem izbranega normalnega in tumorskega tkiva na različne dni in različnih instrumentov z več operaterji. Barvanje izbranih tkiv je bilo dosledno in izvedeno po pričakovanih.

Imunoreaktivnost:

V tabelah 1 in 2 spodaj so bile prikazane naslednje pozitivne in negativne imunoreaktivnosti.

Spodnji seznam ni izčrpen, vendar opisuje vrste imunoreaktivnosti, opažene pri navedenem protitelesu.

Pri tem izdelku ni znana nespecifična reaktivnost protiteles.

Povzetek pričakovanih rezultatov:

Razširjenost PRAME v normalnih in obolelih tkivih je bila ocenjena z uporabo tkivnih mikromrež (TMA).

Testirana normalna tkiva so bila obarvana, kot je bilo pričakovano, z visokimi stopnjami obarvanja v modih in brez obarvanja v drugih tkivih.

Obarvanje PRAME je bilo opaženo na visoki ravni pri melanomu, kot je bilo pričakovano, in na različnih ravneh v drugih rakavih tkivih, kot so jajčniki, pljuča, prostata in dojke.

Analična zmogljivost:

Opravljeni so bili testi obarvanja za občutljivost in specifičnost, rezultati pa so navedeni spodaj.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Slovenian

BIOCARE
M E D I C A L

Občutljivost in specifičnost:

Tabela 1: Občutljivost in specifičnost protitelesa sta bili določeni s testiranjem normalnih tkiv FFPE.

Tkivo	Pozitivni primeri	Skupaj primerov
Veliki možgani	0	6
Mali možgani	0	3
Nadledvične žleze	0	3
Jajčnik	0	3
trebušna slinavka	0	3
sapnik	0	3
hipofiza	0	3
Testis*	3	3
Ščitnica	0	3
Prsi	0	3
Vranica	0	3
tonzil	0	3
Timus	0	3
Kostni mozeg**	0	1
Pljuča	0	3
srce	0	3
požiralnik	0	3
želodec	0	3
Tanko črevo	0	3
Debelo črevo	0	3
Jetra	0	3
Žleza slinavka	0	3
Ledvica	0	3
Prostata	0	3
Maternica	0	3
Maternični vrat	0	3
Skeletna mišica	0	3
koža	0	3
Periferni živec	0	3
Obložne celice	0	3
Glava, vrat in žleza slinavka	0	6
Bezgavka	0	3

* Jedrsko obarvanje 3-4 jakosti

** Manjkata dva vzorca

Tabela 2: Občutljivost in specifičnost protitelesa sta bili določeni s testiranjem različnih neoplastičnih tkiv FFPE.

Patologija	Pozitivni primeri	Skupaj primerov
melanom	29	39
Rak jajčnikov	9	44
Rak na dojki	10	26
Rak debelega črevesa	4	43
Pljučni rak	21	50
Rak na prostati	18	41
Adrenokortikalni karcinom	0	1
Rak mehurja	0	2
Meningioma	0	2
Astroцитom	0	1
Ploščatocelični karcinom (požiralnik)	0	2
Adenokarcinom (želodec)	0	2
Adenokarcinom (tanko črevo)	0	1
Adenokarcinom (debelega črevesa in danke)	0	6
Ledvični rak	0	2
Rak jeter	0	4
Limfom	0	3
Ploščatocelični karcinom (glava in vrat, ustna votlina, jezik)	0	1
Nazofaringealni karcinom	1	1
Adenokarcinom (trebušne slinavke)	0	1
Adenokarcinom (prostate)	0	2
Adenoidno cistični karcinom (glava in vrat, žleza slinavka)	0	1
Ploščatocelični karcinom (koža)	0	1
Seminoma	0	2
Rak ščitnice	0	2
Rak materničnega vratu	0	2
Rak endometrija	1	2

Ekspresija PRAME v različnih neoplazmah lahko kaže spremenljiv odstotek tumorske pozitivnosti. Glejte tabelo 3 za odstotke tumorskih celic s pozitivnim obarvanjem (razvrščene po kvartilih), opažene pri različnih neoplazmah, ki jih najdete v tabeli 2.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Slovenian

BIOCARE
M E D I C A L

Tabela 3: Odstotek pozitivnega obarvanja tumorskih celic v različnih neoplazmah FFPE.

Tkiva	Odstotek obarvanja tumorskih celic # primerov, ki kažejo odstotek obarvanja od skupnega števila primerov (%)				
	<1 %	1-25 %	26-50 %	51-75 %	> 75 %
Rak jajčnikov	35/44 (79,5%)	2/44 (4,5 %)	3/44 (6,8%)	3/44 (6,8 %)	1/44 (2,3 %)
Rak na dojki	16/26 (61,5%)	7/26 (26,9 %)	1/26 (3,8 %)	2/26 (7,7 %)	0 (0%)
Rak debelega črevesa	39/43 (88,4%)	4/43 (11,6 %)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Pljučni rak	29/50 (58,0%)	7/50 (14,0%)	4/50 (8,0 %)	7/50 (14,0 %)	3/50 (6,0 %)
Rak na prostati	23/41 (56,1 %)	9/41 (22,0 %)	3/41 (7,3 %)	2/41 (4,9 %)	4/41 (9,8%)
Nazofaringealni karcinom	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1/1 (100%)
Rak endometrija	1/2 (50 %)	0 (0%)	0 (0%)	1/2 (50%)	0 (0%)
melanom	10/39 (25,6%)	6/39 (15,4%)	5/39 (12,8 %)	6/39 (15,4 %)	12/39 (30,8 %)

Odstotek obarvanja tumorskih celic, predstavljen za vse intenzivnosti obarvanja.

Barvanje tkiv, ki prikazuje različne ravni izražanja proteina PRAME.

Rezultati testiranja analitične učinkovitosti so pokazali, da lahko protiteleso PRAME [EPR20330] pravilno zazna protein PRAME pri uporabi definiranega protokola IHC. Nenormalni rezultati testa tkiva podpirajo sklep, da je PRAME [EPR20330] občutljiv na protein PRAME pri uporabi priporočenih protokolov IHC. Protiteleso PRAME [EPR20330] lahko zazna nizke do visoke ravni proteina PRAME. Običajno testiranje tkiv ni pokazalo nepričakovanega odkrivanja PRAME v 32 vrstah tkiv. Ni bilo nepričakovane navzkrižne reaktivnosti. Rezultati podpirajo trditev, da je protiteleso PRAME [EPR20330] zelo specifično (analitična specifičnost) za protein PRAME.

Klinična učinkovitost:

Izvedeni so bili testi barvanja za diagnostično občutljivost in specifičnost, rezultati pa so navedeni spodaj. Pozitivna in negativna imunoreaktivnost je bila zabeležena v tabeli 4.

Tri stekelca TMA za melanom so obarvali pri Biocare in poslali zunanjemu patologu, da jih prebere in oceni. Tkiva melanoma so pokazala raznolikost rezultatov obarvanja v razponu od 0 (negativno) do močnega (4). Večina melanocitnih nevusov ni pokazala reaktivnosti na PRAME, nekaj pa jih je imelo močno reaktivnost.

Tabela 4: Odstotek pozitivnega obarvanja tumorskih celic v različnih melanocitnih neoplazmah FFPE in koži.

Tkiva	Odstotek obarvanja tumorskih celic # primerov, ki kažejo odstotek obarvanja od skupnega števila primerov (%)				
	<1 %	1-25 %	26-50 %	51-75 %	> 75 %
melanom	28/133 (21,1%)	50/133 (37,6%)	10/133 (7,5%)	8/133 (6,0%)	37/133 (27,8%)
Metastatski melanom	7/38 (18,4%)	10/38 (26,3 %)	3/38 (7,9 %)	2/38 (5,3 %)	16/38 (42,1%)
Melanocitni nevusi	14. 12. (85,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2/12 (14,3 %)
koža	10/10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Odstotek obarvanja tumorskih celic, predstavljen za vse intenzivnosti obarvanja.

Barvanje tkiv, ki prikazuje različne ravni izražanja proteina PRAME.

Primarna končna točka testa je bila ocena diagnostične občutljivosti protitelesa PRAME [EPR20330] v postopku IHC, opredeljena kot stopnja odkritja pozitivnega melanoma pri potrjenih pozitivnih vzorcih. [TP/(TP+FN)]

Sekundarna končna točka je bila ovrednotenje diagnostične specifičnosti – negativna stopnja odkrivanja za potrjene negativne vzorce melanoma. [TN/(TN+FP)]

Bilo je 35 lažno negativnih primerov melanoma, ki so prejeli zlato standardno patološko oceno kot melanom, vendar so bili negativni za PRAME. 136 primerov je bilo resnično pozitivnih, saj so imeli diagnosticiran melanom in so pokazali signal za PRAME. Dva lažno pozitivna rezultata sta bila odkrita v 14 vzorcih melanocitnih nevusov, ki so bili diagnosticirani kot benigni in so pokazali signal za PRAME.

Iz podatkov je ocenjena diagnostična občutljivost = $136 / (136 + 35) = 79,5 \%$

Iz podatkov je ocenjena diagnostična specifičnost = $22 / (22 + 2) = 91,7 \%$

Na podlagi naših izračunov smo dosegli ocenjeno diagnostično občutljivost 79,5 % in ocenjeno diagnostično specifičnost 91,7 % za odkrivanje melanoma.

Iz tega sklepamo, da je protiteleso PRAME [EPR20330], kot ga je testiral Biocare na vzorcih melanoma in melanocitnih nevusov, občutljivo na melanom in zelo specifično za melanom.

Odpravljanje težav: (Podajte razlago za vsako od spodnjih točk)

1. Nobeno steklec ni obarvan – preverite, da ugotovite, ali so bila uporabljena ustrezna pozitivna kontrola, tkivo, protitelesa in izdelki za odkrivanje.
2. Šibko obarvanje vseh stekelcev – Preverite, da ugotovite, ali so bila uporabljena ustrezna pozitivna kontrola, tkivo, protitelesa in izdelki za odkrivanje.
3. Prekomerno ozadje vseh stekelcev – morda so visoke ravni endogenega biotina (če uporabljate izdelke za odkrivanje na osnovi biotina), endogena aktivnost HRP, ki pretvarja kromogen v obarvani končni produkt (uporabite blok peroksidaze) ali presežek nespecifične interakcije z beljakovinami (uporabite beljakovino blok, kot je raztopina za blokiranje na osnovi seruma ali kazeina).
4. Odrezki tkiv se med inkubacijo sperejo s stekelcev – Preverite stekelca, da zagotovite, da so pozitivno naelektrena.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Slovenian

BIOCARE
M E D I C A L

5. Specifično barvanje je pretemno – Preverite protokol, da ugotovite, ali je bil na objektnem stekelcu uporabljen ustrezen titer protiteles, kot tudi ustrezne inkubacijske čase za vse reagente. Poleg tega zagotovite, da ima protokol dovolj korakov pranja, da odstranite odvečne reagente po zaključku korakov inkubacije.

Reference:

1. Kiernan JA. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. *Theory and Practice of Histotechnology*. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. *Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule*, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. *J Histotechnol*. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. *Biotech Histochem*. 1996 Jan;71(5):263-70.
6. Center for Disease Control Manual. *Guide: Safety Management*, NO. CDC-22, Atlanta, GA. April 30, 1976 "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts."
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition* CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
8. CLSI *Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2)* CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011
9. College of American Pathologists (CAP) *Certification Program for Immunohistochemistry*. Northfield IL. [Http://www.cap.org](http://www.cap.org) (800) 323-4040.
10. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. *Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline*. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
11. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. *Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques*. *Histochemistry* 1987; 86:471-478.
12. Nadji M, Morales AR. *Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls*. *Lab Med*1983;14:767.
13. Omata M, Liew CT, Ashcavi M, Peters RL. *Nonimmunologic binding of horseradishperoxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry*. *Am J Clin Path* 1980;73:626.
14. Herman GE and Elfont EA. *The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control*. *Biotech & Histochem* 1991;66:194.
15. Zhang W, *et al*. PRAME expression and promoter hypermethylation in epithelial ovarian cancer. *Oncotarget*, 2016 Jul; 7(29):45352-69.
16. Lezcano C, *et al*. PRAME expression in melanocytic tumors. *Am J Surg Pathol*. 2018 Nov; 42(11):1456-65.

Ultraline je razvilo izključno podjetje Biocare Medical LLC in ne pomenijo odobritve ali odobritve protiteles Biocare s strani Ventana Medical Systems, Inc ali Roche. Biocare, Ventana in Roche niso na noben način povezani, povezani ali povezani. Ventana®, BenchMark®, ultraView in OptiView so blagovne znamke družbe Roche.

Protitelesa serije Q je razvila izključno družba Biocare Medical LLC in ne pomenijo odobritve ali odobritve protiteles Biocare s strani Leica Biosystems. Biocare in Leica Biosystems nista na noben način povezana, povezana ali povezana. Leica, Leica Biosystems, BOND-MAX in BOND-III so blagovne znamke družbe Leica Biosystems.

Povzetek varnosti in učinkovitosti je na voljo tukaj:
<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Spanish

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats				
Format	Catalog Number	Description	Dilution	Diluent
Concentrate	ACI 3252 A, B	0.1, 0.5 mL	1:100	Van Gogh Yellow
Predilute	API 3252 AA, G20, H	6.0, 20, 25 mL	Ready-to-use	N/A
ONCORE Pro	OPAI 3252 T60	60 tests	Ready-to-use	N/A
Q Series-- For Leica BOND-III	ALI 3252 G7	7.0 mL	Ready-to-use	N/A
UltraLine -- For BenchMark	AVI 3252 G, G25	6.0, 25 mL	Ready-to-use	N/A

Uso previsto:

Para uso diagnóstico *in vitro*

PRAME [EPR20330] es un anticuerpo monoclonal de conejo destinado para uso en laboratorio después de que se haya realizado el diagnóstico inicial del tumor mediante histopatología convencional utilizando tinciones histoquímicas no inmunológicas, en la identificación cualitativa de la proteína PRAME mediante inmunohistoquímica (IHC) en parafina fijada con formalina. tejidos humanos incrustados (FFPE). La interpretación clínica de cualquier tinción o su ausencia debe complementarse con estudios morfológicos utilizando controles adecuados y debe ser evaluada dentro del contexto de la historia clínica del paciente y otras pruebas de diagnóstico por un patólogo calificado como ayuda para realizar otras determinaciones clínicas.

Resumen y explicación:

PRAME se encuentra en el cromosoma 22q11.22 y codifica una proteína de 509 aminoácidos. PRAME es un gen autosómico del antígeno del cáncer de testículo (CTA) que se ha demostrado que se expresa en melanoma, diversas neoplasias malignas no melanocíticas, incluido el cáncer de pulmón de células no pequeñas, el carcinoma de mama, el carcinoma de ovario y varios otros citados. No se sabe que los tejidos sanos normales expresen PRAME, excepto los testículos, los ovarios, las glándulas suprarrenales y algunos otros citados en la literatura. ^(15,16)

Principio de Procedimiento:

Este producto de anticuerpo se puede utilizar como anticuerpo primario en pruebas inmunohistoquímicas de secciones de tejido fijadas con formalina e incluidas en parafina. En general, inmunohistoquímica (IHC) Las técnicas de tinción permiten la visualización de antígenos mediante la aplicación secuencial de un anticuerpo específico contra el antígeno (anticuerpo primario), un anticuerpo secundario contra el anticuerpo primario (enlace opcional anticuerpo/sonda), un complejo enzimático y un sustrato cromogénico con pasos de lavado interpuestos. La activación enzimática del cromógeno da como resultado un producto de reacción visible en el sitio del antígeno. Luego se puede contrateñir la muestra y cubrir con un cubreobjetos. Los resultados se interpretan utilizando una luz. microscopio y ayuda en el diagnóstico diferencial de procesos fisiopatológicos, que pueden o Puede no estar asociado con un antígeno en particular.

Materiales y métodos:

Reactivos proporcionados:

Fuente huésped: monoclonal de conejo.

Reactividad de la especie: humana. Otras especies no probadas.

Clon: EPR20330

Isotipo: IgG

Concentración de Proteínas: Concentración de IgG Específica: Contacte con el Soporte Técnico de Biocare

Especificidad: PRAME

Localización Celular: Núcleo y membrana celular.

Método: Monoclonal de conejo recombinante purificado por afinidad.

Reconstitución, mezcla, dilución, valoración:

El reactivo de anticuerpos prediluido se diluye de manera óptima para su uso con los sistemas de tinción enumerados anteriormente. Una mayor dilución puede provocar la pérdida de la tinción del antígeno. El usuario debe validar cualquier cambio de este tipo. Las diferencias en el procesamiento de tejidos

y los procedimientos técnicos en el laboratorio del usuario pueden producir una variabilidad significativa en los resultados, lo que requiere la realización regular de controles internos (consulte la sección Control de calidad). El reactivo concentrado requiere dilución como se indica en la tabla anterior.

Aplicaciones conocidas:

Inmunohistoquímica (tejidos incluidos en parafina y fijados con formalina)

Se suministra como: solución salina tamponada, pH 5,9-7,9, que contiene un vehículo proteico y menos de 0,1 % de conservante de azida sódica . Consulte la Hoja de datos de seguridad para obtener detalles adicionales.

Materiales y reactivos necesarios pero no proporcionados:

Portaobjetos de microscopio cargados positivamente.

Controles de tejido positivos y negativos.

Cámara del Desierto (o horno de secado similar)

Xileno o sustituto del xileno

Etanol o alcohol reactivo

Cámara de ocultación (olla a presión)

Agua desionizada o destilada

Tampón de lavado

Reactivos de pretratamiento

Bloqueo de peroxidasa

Bloque de proteínas (opcional)

Sonda de detección y polímero.

Reactivos de control negativo

cromógenos

Hematoxilina (contratinción)

reactivo de azulado

Medio de montaje

Vidrio de protección

Microscopio óptico (aumento 40-400X)

Las configuraciones del producto de anticuerpo están disponibles para su uso en los instrumentos indicados en la tabla anterior.

Almacenamiento y estabilidad:

Conservar entre 2°C y 8°C. El producto es estable hasta la fecha de vencimiento impresa en la etiqueta del vial, cuando se almacena en estas condiciones. No utilizar después de la fecha de caducidad. Se debe verificar el almacenamiento en cualquier condición distinta a las especificadas. Los reactivos diluidos deben utilizarse lo antes posible; almacene el reactivo restante entre 2°C y 8°C. Biocare no ha establecido la estabilidad del reactivo diluido por el usuario .

Se deben realizar controles positivos y negativos simultáneamente con todas las muestras de pacientes. Si se observa una tinción inesperada que no puede explicarse por variaciones en los procedimientos de laboratorio y se sospecha un problema con el anticuerpo, comuníquese con el soporte técnico de Biocare al 1-800-542-2002 o mediante la información de soporte técnico proporcionada en biocare.net.

Preparación de espécimen:

Los tejidos fijados en formalina son adecuados para su uso antes de la inclusión en parafina. Los tejidos óseos deben descalcificarse antes del



60 Berry Drive
Pacheco, CA 94553
USA

170/190



TP v3 (12/15/2021)

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080



Westervoortsedijk 60
8627 AT Arnhem
The Netherlands

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Spanish

BIOCARE
M E D I C A L

procesamiento del tejido para facilitar el corte del tejido y evitar daños a las hojas del micrótopo. ^{1, 2}

Los tejidos correctamente fijados e incluidos que expresen el antígeno objetivo especificado deben almacenarse en un lugar fresco. La Ley de Mejora de Laboratorios Clínicos (CLIA) de 1988 exige en 42 CFR § 493.1259(b) que "El laboratorio debe conservar los portaobjetos teñidos al menos diez años a partir de la fecha de examen y conservar los bloques de muestras al menos dos años después de la fecha del examen". ³

Tratamiento de tejidos antes de la tinción:

Realice la recuperación de epítomos inducida por calor (HIER) según el protocolo recomendado a continuación. Se ha demostrado que el uso rutinario de HIER antes de la IHC minimiza la inconsistencia y estandariza la tinción. ^{4, 5}

Advertencias y precauciones:

1. Este anticuerpo contiene menos del 0,1 % de azida sódica. Las concentraciones inferiores al 0,1% no son materiales peligrosos reportables según US 29 CFR 1910.1200, Comunicación de peligros de OSHA y la Directiva CE 91/155/EC. La azida de sodio (NaN_3) utilizada como conservante es tóxica si se ingiere. La azida de sodio puede reaccionar con las tuberías de plomo y cobre para formar azidas metálicas altamente explosivas. Al desecharlo, enjuague con grandes volúmenes de agua para evitar la acumulación de azida en las tuberías. (Centro para el Control de Enfermedades, 1976, Instituto Nacional de Seguridad y Salud Ocupacional, 1976) ⁶

2. Las muestras, antes y después de la fijación, y todos los materiales expuestos a ellas deben manipularse como si pudieran transmitir infecciones y eliminarse con las precauciones adecuadas. Nunca pipetee reactivos con la boca y evite el contacto de la piel y las membranas mucosas con reactivos y muestras. Si los reactivos o las muestras entran en contacto con áreas sensibles, lave con abundante agua. ⁷

3. La contaminación microbiana de los reactivos puede provocar un aumento de la tinción inespecífica.

4. Tiempos de incubación o temperaturas distintas a las especificadas pueden dar resultados erróneos. El usuario debe validar cualquier cambio de este tipo.

5. No utilice el reactivo después de la fecha de vencimiento impresa en el vial.

6. El reactivo de anticuerpos prediluido se diluye de manera óptima para su uso. Una mayor dilución puede provocar la pérdida de la tinción del antígeno.

7. La dilución del reactivo de anticuerpos concentrado debe validarse antes de su uso. Cualquier diluyente utilizado que no esté específicamente recomendado también debe validarse en cuanto a compatibilidad y estabilidad.

8. Deseche todos los reactivos usados y cualquier otro material desechable contaminado siguiendo los procedimientos para desechos infecciosos o potencialmente infecciosos. Es responsabilidad de cada laboratorio manipular los residuos sólidos y líquidos según su naturaleza y grado de peligrosidad y tratarlos y eliminarlos (o hacer que los traten y eliminarlos) de acuerdo con las normas aplicables.

9. Siga las normas locales de eliminación de su ubicación junto con las recomendaciones de la Hoja de datos de seguridad para determinar la eliminación segura de este producto.

10. La SDS está disponible previa solicitud y se encuentra en <http://biocare.net>.

11. Para informar sospechas de incidentes graves relacionados con este dispositivo, comuníquese con el representante local de Biocare y la autoridad competente del Estado miembro o país en el que está establecido el usuario.

Instrucciones de uso:

Protocolos de tinción recomendados para PRAME [EPR20330]:

IntelliPATH FLX and manual use:

API3252 para IntelliPATH FLX y uso manual, ha sido estandarizado con el sistema de detección MACH 4. Utilice TBS para los pasos de lavado.

Peroxide Block:	Bloquear durante 5 minutos con Peroxidized 1.
Pretreatment:	Realice la recuperación de calor utilizando Borg Decloaker. Consulte la hoja de datos de Borg Decloaker para obtener instrucciones específicas.
Protein Block (Optional):	Incubar durante 5-10 minutos a temperatura ambiente con Background Punisher.
Primary Antibody:	Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
Detection:	Sonda: N/A
	Polímero: Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente con un polímero conjugado secundario.
Chromogen:	Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente con DAB de Biocare – O – Incubar durante 5-7 minutos a temperatura ambiente con Warp Red.
Counterstain	Contrateñir con hematoxilina. Enjuague con agua desionizada. Aplicar la Solución Azulante de Tacha durante 1 minuto. Enjuague con agua desionizada.

ONCORE Pro Automated Slide Staining System:

OPAI3252 está diseñado para usarse con ONCORE Pro. Consulte el Manual del usuario para obtener instrucciones de uso específicas. Los parámetros de protocolo en el Editor de protocolos deben programarse de la siguiente manera:

Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	PRAME Rb	PRAME Rb AP
Protocol Template (Description):	Special Template (ONCORE Pro-Tect Detection Required)	Rb AP Template 1
Dewaxing (DS Buffer Option):	DS2-50	DS Buffer
Antigen Retrieval (AR Option):	AR1, high pH; 103°C	AR1, high pH; 103°C
Block Option:	Buffer	Buffer
Reagent Name, Time, Temp.:	PRAME Rb, 45 min., 25°C	PRAME Rb, 30 min., 25°C

Ventana BenchMark ULTRA:

AVI3252 está diseñado para usarse con BenchMark ULTRA. Consulte el Manual del usuario para obtener instrucciones de uso específicas. Los parámetros de protocolo recomendados son los siguientes:

Template/Detection:	OptiView DAB IHC
Pretreatment Protocol:	CC1 64 minutes
Peroxidase:	Pre-Primary Peroxidase Inhibitor
Primary Antibody:	32 minutes, 36°C

Q Series – For Leica BOND-III:

ALI3252 está diseñado para usarse con el Leica BOND-III. Consulte el Manual del usuario para obtener instrucciones de uso específicas. Los parámetros de protocolo recomendados son los siguientes:

Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	IHC Protocol F	IHC Protocol J
Detection:	Bond Polymer Refine	Bond Polymer Refine Red

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Spanish

BIOCARE
M E D I C A L

HIER:	20 min with ER2	20 min with ER2
Peroxide Block:	5 min	
Marker (Primary Antibody):	15 min	15 min
Post Primary:	8 min	
Polymer:	8 min	
Post Primary AP:		20 min
Polymer AP:		30 min
Mixed Chromogen Refine:	10 min	10 min + 5 min
Hematoxylin:	5 min	5 min

Control de calidad:

Consulte los Estándares de calidad del CLSI para el diseño e implementación de ensayos de inmunohistoquímica; Guía aprobada-Segunda edición (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011 ⁸

Control Positivo de Tejidos: Melanoma, testículo normal

Los materiales de control positivo externo deben ser muestras frescas fijadas, procesadas e incluidas lo antes posible de la misma manera que las muestras del paciente. Los controles de tejido positivos son indicativos de tejidos correctamente preparados y técnicas de tinción adecuadas. En cada proceso de tinción se debe incluir un control de tejido externo positivo para cada conjunto de condiciones de prueba.

Los tejidos utilizados para los materiales de control positivo externo deben seleccionarse de muestras de pacientes con niveles bajos bien caracterizados de actividad diana positiva que proporcione una tinción positiva débil. El bajo nivel de positividad para los controles positivos externos está diseñado para garantizar la detección de cambios sutiles en la sensibilidad del anticuerpo primario debido a inestabilidad o problemas con la metodología IHC. Los portaobjetos de control de tejido disponibles comercialmente o las muestras procesadas de manera diferente a las muestras del paciente validan únicamente el rendimiento del reactivo y no verifican la preparación del tejido.

Los controles de tejido positivos conocidos solo deben utilizarse para monitorear el desempeño correcto de los tejidos procesados y los reactivos de prueba, en lugar de como ayuda para formular un diagnóstico específico de muestras de pacientes. Si los controles de tejido positivos no logran demostrar una tinción positiva, los resultados de las muestras de prueba deben considerarse inválidos.

Control de tejido negativo:

Utilice un control de tejido negativo (que se sabe que es negativo para PRAME) fijado, procesado e incluido de manera idéntica a las muestras del paciente en cada proceso de tinción para verificar la especificidad del anticuerpo primario IHC para demostración del antígeno diana y para proporcionar una indicación de tinción de fondo específica (tinción falsa positiva). Además, la variedad de diferentes tipos de células presentes en la mayoría de las secciones de tejido puede ser utilizado por el laboratorio como sitios de control negativo interno para verificar el desempeño de la IHC. especificaciones. Los tipos y fuentes de muestras que pueden usarse para tejido negativo. Los controles se enumeran en la sección Características de rendimiento.

Si se produce una tinción específica (tinción falsa positiva) en el control de tejido negativo, los resultados de las muestras del paciente se deben considerar no válidos.

Control de reactivos negativos no específicos:

Utilice un control reactivo negativo no específico en lugar del anticuerpo primario con una sección de cada muestra de paciente para evaluar la tinción no específica y permitir una mejor interpretación de la tinción específica en el sitio del antígeno. Idealmente, un control reactivo negativo contiene un anticuerpo

PRAME IgG producido a partir del sobrenadante de cultivo de tejidos de la misma manera que el control primario. anticuerpo pero no muestra reactividad específica con tejidos humanos en la misma matriz/solución que el anticuerpo Biocare . Diluir un anticuerpo de control negativo a la misma concentración de inmunoglobulina o proteína que el anticuerpo primario diluido. anticuerpo utilizando el mismo diluyente. Si el suero fetal de ternera se retiene en el anticuerpo puro después del procesamiento, el suero fetal de ternera en una concentración de proteínas equivalente al diluido El anticuerpo primario en el mismo diluyente también es adecuado para su uso. (Consulte el reactivo proporcionado). Se puede utilizar diluyente solo como una alternativa menos deseable a los controles reactivos negativos descritos anteriormente. El período de incubación del control reactivo negativo debe corresponder al del anticuerpo primario.

Cuando se utilizan paneles de varios anticuerpos en secciones en serie, las áreas teñidas negativamente de un portaobjetos pueden servir como control de fondo de unión negativa/no específica para otros anticuerpos. Para diferenciar la actividad enzimática endógena o la unión no específica de enzimas de la inmunorreactividad específica, se pueden teñir tejidos adicionales del paciente exclusivamente con sustrato-cromógeno o complejos enzimáticos (PAP, avidina-biotina, estreptavidina) y sustrato-cromógeno, respectivamente.

Verificación del ensayo:

Antes del uso inicial de un anticuerpo o sistema de tinción en un procedimiento de diagnóstico, el usuario debe verificar la especificidad del anticuerpo probándolo en una serie de tejidos internos con características de rendimiento inmunohistoquímico conocidas que representen tejidos positivos y negativos conocidos. Consulte los procedimientos de control de calidad descritos anteriormente en esta sección del prospecto del producto y las recomendaciones de control de calidad del Programa de Certificación CAP ⁹ para Inmunohistoquímica y/o la directriz NCCLS IHC ¹⁰). Estos procedimientos de control de calidad deben repetirse para cada nuevo lote de anticuerpos o siempre que haya un cambio en los parámetros del ensayo. Los tejidos enumerados en la sección Características de rendimiento son adecuados para la verificación del ensayo.

Solución de problemas:

Siga las recomendaciones del protocolo específico de anticuerpos según la hoja de datos proporcionada. Si se producen resultados atípicos, comuníquese con el soporte técnico de Biocare al 1-800-542-2002.

Interpretación de la tinción:

Control Positivo de Tejidos:

Primero se debe examinar el control de tejido positivo teñido con el anticuerpo indicado para comprobar que todos los reactivos funcionan correctamente. La tinción apropiada de las células diana (como se indicó anteriormente) es indicativa de reactividad positiva. Si los controles de tejido positivos no logran demostrar una tinción positiva, cualquier resultado con las muestras de prueba debe considerarse inválido.

El color del producto de reacción puede variar dependiendo de los cromógenos del sustrato utilizados. Consulte los prospectos del paquete del sustrato para conocer las reacciones de color esperadas. Además, se puede observar metacromasia en variaciones del método de tinción. ¹¹

Cuando se utiliza una contratinción, dependiendo de la duración de la incubación y la potencia de la contratinción utilizada, la contratinción dará como resultado una coloración de los núcleos celulares. Una contratinción excesiva o incompleta puede comprometer la interpretación adecuada de los resultados. Consulte los protocolos para conocer la contratinción recomendada.

Control de tejido negativo :

El control de tejido negativo debe examinarse después del control de tejido positivo para verificar la especificidad del marcaje del antígeno diana por parte del anticuerpo primario. La ausencia de tinción específica en el control



60 Berry Drive
Pacheco, CA 94553
USA

172/190



TP v3 (12/15/2021)

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080



Westervoortsedijk 60
6827 AT Arnhem
The Netherlands

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Spanish

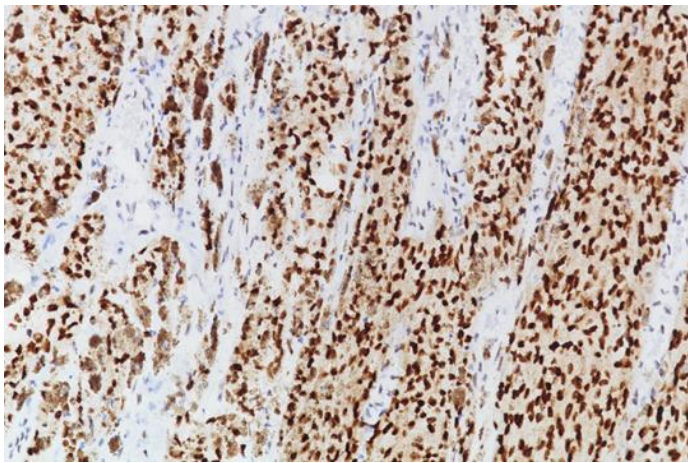
BIOCARE
M E D I C A L

de tejido negativo confirma la falta de reactividad cruzada de anticuerpos con células/componentes celulares. Si se produce una tinción específica (tinción falsa positiva) en el control de tejido externo negativo, los resultados con la muestra del paciente se deben considerar no válidos.

La tinción inespecífica, si está presente, suele tener una apariencia difusa. También se puede observar tinción esporádica del tejido conectivo en secciones de tejidos excesivamente fijados con formalina. Utilice células intactas para la interpretación de los resultados de la tinción. Las células necróticas o degeneradas a menudo se tiñen de forma inespecífica.

Tejido del paciente:

Examinar muestras de pacientes teñidas con el anticuerpo indicado. último. La intensidad de la tinción positiva debe evaluarse en el contexto de cualquier tinción de fondo inespecífica del control de reactivo negativo. Como ocurre con cualquier prueba inmunohistoquímica, un resultado negativo significa que no se detectó el antígeno, no que el antígeno estuviera ausente en las células/tejido analizado. Si es necesario, utilice un panel de anticuerpos para identificar reacciones falsas negativas.



Melanoma teñido con anticuerpo PRAME [EPR20330].

Consulte Resumen y explicación, limitaciones y características de rendimiento para obtener información específica sobre la inmunorreactividad de los anticuerpos indicada.

Limitaciones:

Limitaciones generales:

1. Para uso diagnóstico *in vitro*
2. Este producto es sólo para uso profesional: La inmunohistoquímica es un proceso de diagnóstico de varios pasos que consiste en una capacitación especializada en la selección de los reactivos adecuados; selección, fijación y procesamiento de tejidos; preparación del portaobjetos IHC; e interpretación de los resultados de la tinción. La tinción de tejidos depende de la manipulación y procesamiento del tejido antes de la tinción. La fijación, congelación, descongelación, lavado, secado, calentamiento, corte o contaminación inadecuados con otros tejidos o fluidos pueden producir artefactos, atrapamiento de anticuerpos o resultados falsos negativos. Los resultados inconsistentes pueden deberse a variaciones en los métodos de fijación e inclusión, o a irregularidades inherentes dentro del tejido.¹²
4. Una contratinción excesiva o incompleta puede comprometer la interpretación adecuada de los resultados.
5. La interpretación clínica de cualquier tinción positiva o negativa debe evaluarse dentro del contexto de la presentación clínica, la morfología y otros criterios histopatológicos. La interpretación clínica de cualquier tinción positiva o negativa debe complementarse con estudios

morfológicos utilizando controles internos y externos positivos y negativos adecuados, así como otras pruebas de diagnóstico. Es responsabilidad de un patólogo calificado que esté familiarizado con el uso adecuado de los anticuerpos, reactivos y métodos de IHC interpretar todos los pasos utilizados para preparar e interpretar la preparación IHC final.

6. La dilución óptima de anticuerpos y los protocolos para una aplicación específica pueden variar. Estos incluyen, entre otros, fijación, método de recuperación de calor, tiempos de incubación, grosor de la sección de tejido y kit de detección utilizado. Debido a la sensibilidad superior de estos reactivos únicos, los tiempos de incubación recomendados y los títulos enumerados no son aplicables a otros sistemas de detección, ya que los resultados pueden variar. Las recomendaciones y protocolos de la ficha técnica se basan en el uso exclusivo de productos Biocare. En última instancia, es responsabilidad del investigador determinar las condiciones óptimas.
7. Este producto no está diseñado para usarse en citometría de flujo. No se han determinado las características de rendimiento para la citometría de flujo.
8. Los tejidos de personas infectadas con el virus de la hepatitis B y que contienen el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) pueden presentar tinciones inespecíficas con peroxidasa de rábano picante.¹³
9. Los reactivos pueden demostrar reacciones inesperadas en tejidos no probados previamente. La posibilidad de reacciones inesperadas incluso en grupos de tejidos probados no se puede eliminar por completo debido a la variabilidad biológica de la expresión de antígenos en neoplasias u otros tejidos patológicos.¹⁴ Comuníquese con el soporte técnico de Biocare al 1-800-542-2002, o a través de la información de soporte técnico proporcionada en biocare.net, con reacciones inesperadas documentadas.
10. Los sueros normales/no inmunes de la misma fuente animal que los antisueros secundarios utilizados en los pasos de bloqueo pueden causar resultados falsos negativos o falsos positivos debido a autoanticuerpos o anticuerpos naturales.
11. Se pueden observar resultados falsos positivos debido a la unión no inmunológica de proteínas o productos de reacción del sustrato. También pueden ser causados por actividad pseudo peroxidasa (eritrocitos), actividad peroxidasa endógena (citocromo C) o biotina endógena (p. ej., hígado, mama, cerebro, riñón), según el tipo de inmunotinción utilizada.¹²

Limitaciones específicas del producto:

No hay limitaciones adicionales específicas del producto.

Características de presentación:

Reproducibilidad:

La reproducibilidad del rendimiento de los anticuerpos se verificó probando tejido normal y tumoral seleccionado en varios días y varios instrumentos con múltiples operadores. La tinción de los tejidos seleccionados fue consistente y se realizó como se esperaba.

Inmunoreactividad:

Las siguientes inmunorreactividades positivas y negativas se han demostrado en las Tablas 1 y 2 a continuación.

La lista que se proporciona a continuación no es exhaustiva, pero caracteriza los tipos de inmunorreactividades observadas con el anticuerpo indicado.

No se ha observado reactividad de anticuerpos no específicos en este producto.

Resumen de resultados esperados:

La prevalencia de PRAME en tejidos normales y en estado patológico se evaluó mediante microarrays de tejidos (TMA).

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Spanish

Los tejidos normales analizados se tiñeron como se esperaba, observándose altos niveles de tinción en los testículos y ninguna tinción en otros tejidos. La tinción de PRAME se observó en un nivel alto en melanoma como se esperaba, y en niveles variables en otros tejidos cancerosos como ovario, pulmón, próstata y mama.

Rendimiento analítico:

Se realizaron pruebas de tinción para determinar sensibilidad y especificidad y los resultados se enumeran a continuación .

BIOCARE
M E D I C A L

Sensibilidad y especificidad:

Tabla 1: La sensibilidad y especificidad del anticuerpo se determinaron analizando tejidos normales FFPE.

Tejido	Casos Positivos	Casos totales
Cerebro	0	6
Cerebelo	0	3
Suprarrenal	0	3
Ovario	0	3
Páncreas	0	3
Tráquea	0	3
Pituitaria	0	3
Testículo*	3	3
Tiroides	0	3
Mama	0	3
Bazo	0	3
Amígdala	0	3
timo	0	3
Médula ósea**	0	1
Pulmón	0	3
Corazón	0	3
Esófago	0	3
Estómago	0	3
Intestino delgado	0	3
Colon	0	3
Hígado	0	3
Glándula salival	0	3
Riñón	0	3
Próstata	0	3
Útero	0	3
Cuello uterino	0	3
Músculo esquelético	0	3
Piel	0	3
Nervio periférico	0	3
Revestimiento de celdas	0	3
Cabeza, cuello y glándula salival.	0	6
Ganglio linfático	0	3

* Tinción nuclear de fuerza 3-4

** Faltan dos muestras

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Spanish

BIOCARE
M E D I C A L

Tabla 2: La sensibilidad y especificidad del anticuerpo se determinaron analizando una variedad de tejidos neoplásicos FFPE.

Patología	Casos Positivos	Casos totales
Melanoma	29	39
Cáncer de ovario	9	44
Cáncer de mama	10	26
Cáncer de colon	4	43
Cáncer de pulmón	21	50
Cáncer de próstata	18	41
Carcinoma suprarrenal	0	1
Cáncer de vejiga	0	2
meningioma	0	2
astrocitoma	0	1
Carcinoma de células escamosas (esófago)	0	2
Adenocarcinoma (estómago)	0	2
Adenocarcinoma (intestino delgado)	0	1
Adenocarcinoma (colon y recto)	0	6
Cáncer de RIÑÓN	0	2
Cáncer de hígado	0	4
Linfoma	0	3
Carcinoma de células escamosas (cabeza y cuello, cavidad oral, lengua)	0	1
El carcinoma nasofaríngeo	1	1
Adenocarcinoma (páncreas)	0	1
Adenocarcinoma (próstata)	0	2
Carcinoma adenoide quístico (cabeza y cuello, glándula salival)	0	1
Carcinoma de células escamosas (piel)	0	1
seminoma	0	2
Cáncer de tiroides	0	2
Cáncer de cuello uterino	0	2
Cáncer de endometrio	1	2

La expresión de PRAME en diversas neoplasias puede exhibir un porcentaje variable de positividad tumoral. Consulte la Tabla 3 para conocer los porcentajes de células tumorales con tinción positiva (categorizados por cuartiles) observados en diversas neoplasias que se encuentran en la Tabla 2.

Tabla 3: Porcentaje de tinción de células tumorales positivas en diversas neoplasias FFPE.

tejidos	Porcentaje de células tumorales que se tiñen # de casos que presentan tinción Porcentaje del total # de casos (%)				
	<1%	1-25%	26-50%	51-75%	> 75%
Cáncer de ovario	35/44 (79,5%)	2/44 (4,5%)	3/44 (6,8%)	3/44 (6,8%)	1/44 (2,3%)
Cáncer de mama	16/26 (61,5%)	7/26 (26,9%)	1/26 (3,8%)	2/26 (7,7%)	0 (0%)
Cáncer de colon	39/43 (88,4%)	4/43 (11,6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Cáncer de pulmón	29/50 (58,0%)	7/50 (14,0%)	4/50 (8,0%)	7/50 (14,0%)	3/50 (6,0%)
Cáncer de próstata	23/41 (56,1%)	9/41 (22,0%)	3/41 (7,3%)	2/41 (4,9%)	4/41 (9,8%)
El carcinoma nasofaríngeo	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1/1 (100%)
Cáncer de endometrio	1/2 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	1/2 (50%)	0 (0%)
Melanoma	10/39 (25,6%)	6/39 (15,4%)	5/39 (12,8%)	6/39 (15,4%)	12/39 (30,8%)

Porcentaje de tinción de células tumorales presentada para todas las intensidades de tinción.

Tinción en tejidos que muestran niveles variables de expresión de la proteína PRAME.

Los resultados de las pruebas de rendimiento analítico demostraron que el anticuerpo PRAME [EPR20330] puede detectar correctamente la proteína PRAME cuando se utiliza el protocolo IHC definido. Los resultados anormales de las pruebas de tejido respaldan la conclusión de que PRAME [EPR20330] es sensible a la proteína PRAME cuando se utilizan los protocolos IHC recomendados. El anticuerpo PRAME [EPR20330] es capaz de detectar niveles bajos a altos de la proteína PRAME. Las pruebas de tejido normal no mostraron ninguna detección inesperada de PRAME en 32 tipos de tejido. No hubo reactividad cruzada inesperada. Los resultados respaldan la afirmación de que el anticuerpo PRAME [EPR20330] es altamente específico (especificidad analítica) para la proteína PRAME.

Rendimiento clínico:

Se realizaron pruebas de tinción para determinar la sensibilidad y especificidad del diagnóstico y los resultados se enumeran a continuación. La inmunorreactividad positiva y negativa se registró en la Tabla 4.

Se tiñeron tres portaobjetos de melanoma TMA en Biocare y se enviaron a un patólogo externo para que los leyera y calificara. Los tejidos de melanoma mostraron una diversidad de puntuaciones de tinción que van desde 0 (negativo) hasta fuerte (4). La mayoría de los nevos melanocíticos no mostraron reactividad PRAME, pero algunos tuvieron una fuerte reactividad.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Spanish

BIOCARE
M E D I C A L

Tabla 4: Porcentaje de tinción de células tumorales positivas en diversas neoplasias melanocíticas FFPE y piel.

tejidos	Porcentaje de células tumorales que se tiñen # de casos que presentan tinción Porcentaje del total # de casos (%)				
	<1%	1-25%	26-50%	51-75%	> 75%
Melanoma	28/133 (21,1%)	50/133 (37,6%)	10/133 (7,5%)	8/133 (6,0%)	37/133 (27,8%)
melanoma metastásico	7/38 (18,4%)	10/38 (26,3%)	3/38 (7,9%)	2/38 (5,3%)	16/38 (42,1%)
Nevos melanocíticos	12/14 (85,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2/12 (14,3%)
Piel	10/10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Porcentaje de tinción de células tumorales presentada para todas las intensidades de tinción.

Tinción en tejidos que muestran niveles variables de expresión de la proteína PRAME.

El criterio de valoración principal de la prueba fue evaluar la sensibilidad diagnóstica del anticuerpo PRAME [EPR20330] en el procedimiento IHC, definido como la tasa de detección positiva de melanoma de las muestras positivas confirmadas. [TP/(TP+FN)]

Un criterio de valoración secundario fue evaluar la especificidad del diagnóstico: la tasa de detección negativa para muestras negativas de melanoma confirmado. [TN/(TN+FP)]

Hubo 35 casos de melanoma falsos negativos que habían recibido la evaluación patológica estándar de oro como melanoma pero fueron negativos para PRAME. 136 casos fueron verdaderos positivos, ya que fueron diagnosticados con melanoma y mostraron señal para PRAME. Se detectaron dos falsos positivos en las 14 muestras de nevos melanocíticos que fueron diagnosticadas como benignas y que mostraban señal de PRAME.

A partir de los datos, la sensibilidad diagnóstica estimada = $136 / (136 + 35) = 79,5\%$

A partir de los datos, la especificidad diagnóstica estimada = $22 / (22 + 2) = 91,7\%$

Según nuestros cálculos, llegamos a una sensibilidad diagnóstica estimada del 79,5% y una especificidad diagnóstica estimada del 91,7% para la detección del melanoma.

De esto concluimos que el anticuerpo PRAME [EPR20330], probado por Biocare en muestras de melanoma y nevos melanocíticos, es sensible al melanoma y altamente específico para el melanoma.

Solución de problemas: (Proporcione una explicación para cada uno de los puntos a continuación)

1. Sin tinción de ningún portaobjetos: verifique que se hayan utilizado tejido de control positivo, anticuerpos y productos de detección adecuados.
2. Tinción débil de todos los portaobjetos: verifique que se hayan utilizado tejido de control positivo, anticuerpos y productos de detección adecuados.
3. Fondo excesivo en todos los portaobjetos: puede haber niveles altos de biotina endógena (si se utilizan productos de detección a base de biotina), actividad HRP endógena que convierte el cromógeno en un producto final coloreado (use un bloque de peroxidasa) o un exceso de

interacción proteica no específica (use una proteína). bloqueante, como una solución bloqueadora a base de suero o caseína).

4. Las secciones de tejido se lavan de los portaobjetos durante la incubación. Revise los portaobjetos para asegurarse de que estén cargados positivamente.
5. Tinción específica demasiado oscura: consulte el protocolo para determinar si se aplicó el título de anticuerpos adecuado al portaobjetos, así como los tiempos de incubación adecuados para todos los reactivos. Además, asegúrese de que el protocolo tenga suficientes pasos de lavado para eliminar el exceso de reactivos una vez completados los pasos de incubación.

Referencias:

1. Kiernan JA. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. *Theory and Practice of Histotechnology*. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. *Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule*, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. *J Histotechnol*. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. *Biotech Histochem*. 1996 Jan;71(5):263-70.
6. Center for Disease Control Manual. *Guide: Safety Management*, NO. CDC-22, Atlanta, GA. April 30, 1976 "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts."
7. *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.*
8. *CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (1/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011*
9. *College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry*. Northfield IL. <http://www.cap.org> (800) 323-4040.
10. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. *Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)*. Wayne, PA. 1997;1-46.
11. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. *Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques*. *Histochemistry* 1987; 86:471-478.
12. Nadji M, Morales AR. *Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls*. *Lab Med*1983;14:767.
13. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. *Nonimmunologic binding of horseradishperoxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry*. *Am J Clin Path* 1980;73:626.
14. Herman GE and Elfont EA. *The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control*. *Biotech & Histochem* 1991;66:194.
15. Zhang W, et al. *PRAME expression and promoter hypermethylation in epithelial ovarian cancer*. *Oncotarget*, 2016 Jul; 7(29):45352-69.
16. Lezcano C, et al. *PRAME expression in melanocytic tumors*. *Am J Surg Pathol*. 2018 Nov; 42(11):1456-65.

Ultraline son desarrollados únicamente por Biocare Medical LLC y no implican la aprobación ni el respaldo de los anticuerpos de Biocare por parte de Ventana Medical Systems, Inc o Roche. Biocare, Ventana y Roche no están afiliados, asociados ni relacionados de ninguna manera. Ventana®, BenchMark®, ultraView y OptiView son marcas comerciales de Roche.

Los anticuerpos de la serie Q son desarrollados únicamente por Biocare Medical LLC y no implican la aprobación ni el respaldo de los anticuerpos Biocare por parte de Leica Biosystems. Biocare y Leica Biosystems no están afiliados, asociados ni relacionados de ninguna manera. Leica, Leica Biosystems, BOND-MAX y BOND-III son marcas comerciales de Leica Biosystems.

El resumen de seguridad y rendimiento se puede encontrar aquí: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Swedish

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats				
Format	Catalog Number	Description	Dilution	Diluent
Concentrate	ACI 3252 A, B	0.1, 0.5 mL	1:100	Van Gogh Yellow
Predilute	API 3252 AA, G20, H	6.0, 20, 25 mL	Ready-to-use	N/A
ONCORE Pro	OPAI 3252 T60	60 tests	Ready-to-use	N/A
Q Series-- For Leica BOND-III	ALI 3252 G7	7.0 mL	Ready-to-use	N/A
UltraLine -- For BenchMark	AVI 3252 G, G25	6.0, 25 mL	Ready-to-use	N/A

Avsedd användning:

För *in vitro* diagnostisk användning

PRAME [EPR20330] är en monoklonal kaninantikropp som är avsedd för laboratorieanvändning efter att den initiala diagnosen av tumör har ställts genom konventionell histopatologi med användning av icke-immunologiska histokemiska färgningar, i kvalitativ identifiering av PRAME- protein genom immunhistokemi (IHC) i formalinfixerad paraffin- inbäddade (FFPE) mänskliga vävnader. Den kliniska tolkningen av eventuell färgning eller frånvaro av denna bör kompletteras med morfologiska studier med lämpliga kontroller och bör utvärderas inom ramen för patientens kliniska historia och andra diagnostiska tester av en kvalificerad patolog som ett hjälpmedel för att göra andra kliniska bestämningar.

Sammanfattning och förklaring:

PRAME finns på kromosom 22q11.22 och kodar för ett protein på 509 aminosyror. PRAME är en gen för autosomal cancer-testis-antigen (CTA) som har visat sig uttryckas i melanom, olika icke-melanocytiska maligna neoplasmer, inklusive icke-småcellig lungcancer, bröstcancer, äggstockscancer och flera andra citerade. Normala friska vävnader är inte kända för att uttrycka PRAME förutom testiklar, äggstockar, binjuror och några andra som nämns i litteraturen. ^(15,16)

Procedurprincip:

Denna antikroppsprodukt kan användas som den primära antikroppen vid immunhistokemistestning av formalinfixerade, paraffininbäddade vävnadssnitt. I allmänhet immunhistokemiska (IHC) färgningstekniker möjliggör visualisering av antigener via sekventiell applicering av en specifik antikropp mot antigenet (primär antikropp), en sekundär antikropp mot den primära antikroppen (valfri länkantikropp/sond), ett enzymkomplex och ett kromogent substrat med mellanliggande tvättsteg. Den enzymatiska aktiveringen av kromogenen resulterar i en synlig reaktionsprodukt vid antigenstället. Provet kan sedan motfärgas och locket glider. Resultaten tolkas med hjälp av ett ljus mikroskop och hjälp vid differentialdiagnostik av patofysiologiska processer, som kan eller kanske inte är associerad med ett visst antigen.

Material och metoder:

Reagens som tillhandahålls:

Värd Källa: Kanin monoklonal

Arter Reaktivitet: Människan. Andra arter inte testade.

Klon: EPR20330

Isotyp: IgG

Proteinkoncentration: Specifik IgG-koncentration: Kontakta Biocares tekniska support

Specificitet: PRAME

Cellulär lokalisering: Kärna och cellmembran

Metod: Affinitetsrenad rekombinant kanin monoklonal.

Rekonstitution, blandning, spädning, titrering:

Förutspädd antikroppsreagens är optimalt utspädd för användning med ovan angivna färgningssystem. Ytterligare utspädning kan resultera i förlust av antigenfärgning. Användaren måste validera alla sådana ändringar. Skillnader i vävnadsbearbetning och tekniska procedurer i användarens laboratorium kan ge betydande variationer i resultat som kräver regelbunden utförande av interna kontroller (se avsnittet Kvalitetskontroll).

Koncentrerat reagens kräver spädning enligt tabellen ovan.

Kända applikationer:

Immunhistokemi (formalinfixerade paraffininbäddade vävnader)

Levereras som: Bufferad koksaltlösning, pH 5,9-7,9 innehållande en proteinbärare och mindre än 0,1 % natriumazidkonserveringsmedel . Se säkerhetsdatabladet för ytterligare information.

Material och reagens som behövs men inte tillhandahålls:

Objektglas positivt laddade.
Positiva och negativa vävnadskontroller
Desert Chamber (eller liknande torkugn)
Xylen eller xylenersättning
Etanol eller reagens alkohol
Decloaking Chamber (tryckkokare)
Avjoniserat eller destillerat vatten
Tvättbuffert
Förbehandlingsreagens
Peroxidasblock
Proteinblock (valfritt)
Detektionssond och polymer
Negativa kontrollreagenser
Kromogener
Hematoxylin (motfärgning)
Blånande reagens
Monteringsmedium
Täckglas
Ljuskroskop (40-400X förstoring)

Konfigurationer av antikroppsprodukten är tillgängliga för användning på de instrument som anges i tabellen ovan.

Lagring och stabilitet:

Förvara vid 2°C till 8°C. Produkten är stabil till det utgångsdatum som är tryckt på injektionsflaskans etikett när den förvaras under dessa förhållanden. Använd inte efter utgångsdatum. Förvaring under alla andra förhållanden än de angivna måste verifieras. Utspädda reagenser bör användas omedelbart; förvara eventuellt kvarvarande reagens vid 2°C till 8°C. Stabiliteten för användarens utspädda reagens har inte fastställts av Biocare .

Positiva och negativa kontroller bör köras samtidigt med alla patientprover. Om oväntad färgning observeras som inte kan förklaras av variationer i laboratorieprocedurer och ett problem med antikroppen misstänks, kontakta Biocares tekniska support på 1-800-542-2002 eller via den tekniska supportinformationen på biocare.net.

Provförberedelse:

Vävnader fixerade i formalin är lämpliga för användning före paraffininbäddning. Ossös vävnad bör avkalkas före vävnadsbearbetning för att underlätta vävnadsskärning och förhindra skador på mikrotombladen. ^{1,2}

Korrekt fixerade och inbäddade vävnader som uttrycker det specificerade antigenmålet bör förvaras på en sval plats. Clinical Laboratory Improvement

 Biocare Medical

60 Berry Drive
Pacheco, CA 94553

USA

177/190



TP v3 (12/15/2021)

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080

 EMERGO EUROPE

Westervoortsedijk 60

8627 AT Arnhem

The Netherlands

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Swedish

BIOCARE
M E D I C A L

Act (CLIA) från 1988 kräver i 42 CFR § 493.1259(b) att "Laboratoriet måste behålla färgade objektglas minst tio år från datumet för undersöka och behålla provblocken minst två år från datumet för undersökningen." ³

Behandling av vävnader före färgning:

Utför Heat Induced Epitope Retrieval (HIER) enligt rekommenderat protokoll nedan. Rutinmässig användning av HIER före IHC har visat sig minimera inkonsekvens och standardisera färgning. ^{4,5}

Varning och försiktighetsåtgärder:

1. Denna antikropp innehåller mindre än 0,1 % natriumazid. Koncentrationer mindre än 0,1 % är inte rapporterbara farliga material enligt US 29 CFR 1910.1200, OSHA Hazard Communication och EG-direktiv 91/155/EC. Natriumazid (NaN₃) som används som konserveringsmedel är giftigt vid förtäring. Natriumazid kan reagera med bly- och kopparrör för att bilda högexplosiva metallazider. Vid kassering, spola med stora volymer vatten för att förhindra aziduppbbyggnad i rörledning. (Center for Disease Control, 1976, National Institute of Occupational Safety and Health, 1976) ⁶

2. Prover, före och efter fixering, och allt material som exponeras för dem ska hanteras som om de skulle kunna överföra infektion och kasseras med lämpliga försiktighetsåtgärder. Pipettera aldrig reagens genom munnen och undvik att komma i kontakt med huden och slemhinnorna med reagenser och prover. Om reagenser eller prover kommer i kontakt med känsliga områden, tvätta med rikliga mängder vatten. ⁷

3. Mikrobiell kontaminering av reagenser kan resultera i en ökning av ospecifik färgning.

4. Andra inkubationstider eller temperaturer än de angivna kan ge felaktiga resultat. Användaren måste validera alla sådana ändringar.

5. Använd inte reagens efter det utgångsdatum som är tryckt på flaskan.

6. Förutspädd antikropsreagens är optimalt utspädd för användning. Ytterligare utspädning kan resultera i förlust av antigenfärgning.

7. Spädning av koncentrerad antikropsreagens måste valideras före användning. Några Spädningsmedel som inte rekommenderas specifikt måste också valideras för kompatibilitet och stabilitet.

8. Kassera alla använda reagenser och alla andra kontaminerade engångsmaterial enligt procedurer för smittsamt eller potentiellt smittsamt avfall. Det är varje laboratoriums ansvar att hantera fast och flytande avfall i enlighet med deras natur och grad av farlighet och att behandla och kassera det (eller låta behandla och kassera dem) i enlighet med tillämpliga bestämmelser.

9. Följ lokala avfallsföreskrifter för din plats tillsammans med rekommendationerna i säkerhetsdatabladet för att fastställa säker kassering av denna produkt

10. Säkerhetsdatabladet är tillgängligt på begäran och finns på <http://biocare.net>.

11. För att rapportera misstänkta allvarliga incidenter relaterade till denna enhet, kontakta den lokala Biocare-representanten och den behöriga myndigheten i den medlemsstat eller det land där användaren är etablerad.

Användningsinstruktioner:

Rekommenderade färgningsprotokoll för PRAME [EPR20330]:

IntelliPATH FLX and manual use:

API3252 för IntelliPATH FLX och manuell användning, har standardiserats med MACH 4-detektionssystem. Använd TBS för tvättsteg.

Peroxide Block:	Blockera i 5 minuter med Peroxidized 1.
Pretreatment:	Utför värmeåtervinning med Borg Decloaker. Se Borg Decloakers datablad för specifika instruktioner.
Protein Block (Optional):	Inkubera i 5-10 minuter vid RT med Background Punisher.
Primary Antibody:	Inkubera i 30 minuter vid RT.
Detection:	Sond: N/A

	Polymer: Inkubera i 30 minuter vid RT med en sekundärkonjugerad polymer.
Chromogen:	Inkubera i 5 minuter vid RT med Biocares DAB – ELLER – Inkubera i 5-7 minuter vid RT med Warp Red.
Counterstain	Motfärga med hematoxylin. Skölj med avjoniserat vatten. Applicera Tacha's Blueing Solution i 1 minut. Skölj med avjoniserat vatten.

ONCORE Pro Automated Slide Staining System:

OPAI3252 är avsedd för användning med ONCORE Pro. Se användarmanualen för specifika instruktioner för användning. Protokollparametrar i Protocol Editor bör programmeras enligt följande:

Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	PRAME Rb	PRAME Rb AP
Protocol Template (Description):	Special Template (ONCORE Pro-Tect Detection Required)	Rb AP Template 1
Dewaxing (DS Buffer Option):	DS2-50	DS Buffer
Antigen Retrieval (AR Option):	AR1, high pH; 103°C	AR1, high pH; 103°C
Block Option:	Buffer	Buffer
Reagent Name, Time, Temp.:	PRAME Rb, 45 min., 25°C	PRAME Rb, 30 min., 25°C

Ventana BenchMark ULTRA:

AVI3252 är avsedd för användning med BenchMark ULTRA. Se användarmanualen för specifika instruktioner för användning. Rekommenderade protokollparametrar är följande:

Template/Detection:	OptiView DAB IHC
Pretreatment Protocol:	CC1 64 minutes
Peroxidase:	Pre-Primary Peroxidase Inhibitor
Primary Antibody:	32 minutes, 36°C

Q Series – For Leica BOND-III:

ALI3252 är avsedd att användas med Leica BOND-III. Se användarmanualen för specifika instruktioner för användning. Rekommenderade protokollparametrar är följande:

Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	IHC Protocol F	IHC Protocol J
Detection:	Bond Polymer Refine	Bond Polymer Refine Red
HIER:	20 min with ER2	20 min with ER2
Peroxide Block:	5 min	
Marker (Primary Antibody):	15 min	15 min
Post Primary:	8 min	
Polymer:	8 min	
Post Primary AP:		20 min
Polymer AP:		30 min
Mixed Chromogen Refine:	10 min	10 min + 5 min
Hematoxylin:	5 min	5 min

 Biocare Medical

60 Berry Drive
Pacheco, CA 94553

USA

178/190



TP v3 (12/15/2021)

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080

 EMERGO EUROPE

Westervoortsedijk 60

8627 AT Arnhem

The Netherlands

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Swedish

BIOCARE
M E D I C A L

Kvalitetskontroll:

Se CLSI kvalitetsstandarder för design och implementering av immunhistokemianalyser; Godkänd guideline-andra upplagan (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011⁸

Positiv vävnadskontroll: Melanom, normal testikel

Extern positiv kontrollmaterial bör vara färskta prover fixerade, bearbetade och inbäddade så snart som möjligt på samma sätt som patientprovet/patienterna. Positiva vävnadskontroller tyder på korrekt preparerade vävnader och korrekta färgningstekniker. En positiv extern vävnadskontroll för varje uppsättning testbetingelser bör inkluderas i varje färgningskörning.

De vävnader som används för de externa positiva kontrollmaterialen bör väljas från patientprover med välkarakteriserade låga nivåer av den positiva målaktiviteten som ger svag positiv färgning. Den låga nivån av positivitet för externa positiva kontroller är utformad för att säkerställa upptäckt av subtila förändringar i den primära antikroppens känslighet från instabilitet eller problem med IHC-metoden. Kommerciellt tillgängliga vävnadskontrollobjektglas eller prover som bearbetats annorlunda än patientproven/patienterna validerar endast reagensprestanda och verifierar inte vävnadsberedning.

Kända positiva vävnadskontroller bör endast användas för att övervaka korrekt prestanda hos bearbetade vävnader och testreagens, snarare än som ett hjälpmedel för att formulera en specifik diagnos av patientprover. Om de positiva vävnadskontrollerna inte visar positiv färgning, bör resultaten med testproverna anses ogiltiga.

Negativ vävnadskontroll:

Använd en negativ vävnadskontroll (känd för att vara PRAME-negativ) fixerad, bearbetad och inbäddad på ett sätt som är identiskt med patientproverna med varje färgningskörning för att verifiera specificiteten hos den primära IHC-antikroppen för demonstration av målantigenet och för att ge en indikation på specifik bakgrundsfärgning (falsk positiv färgning). Det kan också mångfalden av olika celltyper som finns i de flesta vävnadsnitt användas av laboratoriet som interna negativa kontrollplatser för att verifiera IHC:s prestanda specifikationer. Typer och källor för prover som kan användas för negativ vävnad kontrollerna listas i avsnittet Prestandaegenskaper.

Om specifik färgning (falsk positiv färgning) inträffar i den negativa vävnadskontrollen, bör resultaten med patientproverna anses ogiltiga.

Ospecifik negativ reagenskontroll:

Använd en ospecifik negativ reagenskontroll i stället för den primära antikroppen med en sektion av varje patientprov för att utvärdera ospecifik färgning och möjliggör bättre tolkning av specifik färgning på antigenstället. Helst innehåller en negativ reagenskontroll en PRAME IgG-antikropp framställd från vävnadskultursupernatant på samma sätt som den primära antikropp men uppvisar ingen specifik reaktivitet med mänskliga vävnader i samma matris/lösning som Biocare- antikroppen. Späd en negativ kontrollantikropp mot samma immunglobulin- eller proteinkoncentration som den utspädda primära antikropp med användning av identiskt utspädningsmedel. Om fetalt kalvserum hålls kvar i den rena antikroppen efter bearbetning, fetalt kalvserum i en proteinkoncentration som motsvarar den utspädda primär antikropp i samma spädningsmedel är också lämplig för användning. (Se medföljande reagens). Enbart utspädningsmedel kan användas som ett mindre önskvärt alternativ till de tidigare beskrivna negativa reagenskontrollerna. Inkubationstiden för den negativa reagenskontrollen bör motsvara den för den primära antikroppen.

När paneler med flera antikroppar används på seriella snitt, kan de negativt färgande områdena på ett objektglas fungera som en negativ/ickespecifik bindningsbakgrundskontroll för andra antikroppar. För att differentiera endogen enzymaktivitet eller ospecifik bindning av enzymer från specifik

immunreaktivitet, kan ytterligare patientvävnader färgas utslutande med substrat-kromogen eller enzymkomplex (PAP, avidin-biotin, streptavidin) respektive substrat-kromogen.

Assayverifiering:

Innan en antikropp eller färgningssystem används initialt i en diagnostisk procedur bör användaren verifiera antikroppens specificitet genom att testa den på en serie interna vävnader med kända immunhistokemiska prestandaegenskaper som representerar kända positiva och negativa vävnader. Se de kvalitetskontrollprocedurer som tidigare beskrivits i detta avsnitt av produktbilagan och till kvalitetskontrollrekommendationerna i CAP Certification Program⁹ for Immunohistochemistry och/eller NCCLS IHC-riktlinje¹⁰). Dessa kvalitetskontrollprocedurer bör upprepas för varje nytt antikroppsparti, eller närhelst det sker en förändring i analysparametrarna. Vävnader listade i avsnittet Prestandaegenskaper är lämpliga för analysverifiering.

Felsökning:

Följ de antikroppsspecifika protokollrekommendationerna enligt det medföljande databladet. Om atypiska resultat uppstår, kontakta Biocares tekniska support på 1-800-542-2002.

Tolkning av färgning:

Positiv vävnadskontroll:

Den positiva vävnadskontrollen färgad med indikerad antikropp bör undersökas först för att säkerställa att alla reagenser fungerar korrekt. Lämplig färgning av målceller (som indikerat ovan) indikerar positiv reaktivitet. Om de positiva vävnadskontrollerna inte visar positiv färgning, bör alla resultat med testproverna anses ogiltiga.

Färgen på reaktionsprodukten kan variera beroende på använda substratkromogener. Se substratets bipacksedel för förväntade färgreaktioner. Vidare kan metakromasi observeras i variationer av färgningsmetoden.¹¹

När en motfärgning används, beroende på inkubationslängden och styrkan hos den använda motfärgningen, kommer motfärgning att resultera i en färgning av cellkärnorna. Överdriven eller ofullständig motfärgning kan äventyra korrekt tolkning av resultaten. Se protokoll för rekommenderad motfärgning.

Negativ vävnadskontroll:

Den negativa vävnadskontrollen bör undersökas efter den positiva vävnadskontrollen för att verifiera specificiteten för märkningen av målantigenet med den primära antikroppen. Frånvaron av specifik färgning i den negativa vävnadskontrollen bekräftar avsaknaden av antikroppskorsreaktivitet mot celler/cellulära komponenter. Om specifik färgning (falsk positiv färgning) inträffar i den negativa externa vävnadskontrollen, bör resultaten med patientprovet anses ogiltiga.

Ospecifik färgning, om sådan finns, har vanligtvis ett diffust utseende. Sporadisk färgning av bindväv kan också observeras i snitt från alltför formalinfixerade vävnader. Använd intakta celler för tolkning av färgningsresultat. Nekrotiska eller degenererade celler färgas ofta ospecifikt.

Patientvävnad:

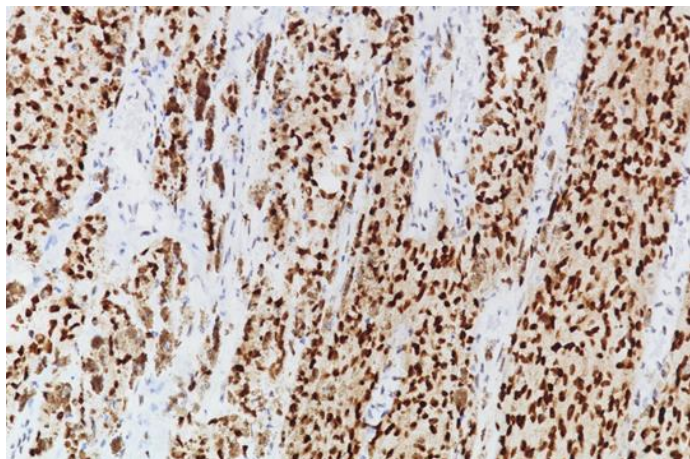
Undersök patientprover färgade med indikerad antikropp sista. Positiv färgningsintensitet bör bedömas inom ramen för eventuell ospecifik bakgrundsfärgning av den negativa reagenskontrollen. Som med alla immunhistokemiska tester betyder ett negativt resultat att antigenet inte upptäcktes, inte att antigenet saknades i cellerna/vävnaden som analyserades. Använd vid behov en panel av antikroppar för att identifiera falsknegativa reaktioner.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Swedish

BIOCARE
M E D I C A L



Melanom färgat med PRAME [EPR20330] antikropp.

Se Sammanfattning och förklaring, begränsningar och prestandaegenskaper för specifik information om indikerad antikroppssimmunreaktivitet.

Begränsningar:

Allmänna begränsningar:

1. För *in vitro* diagnostisk användning
2. Denna produkt är endast avsedd för professionellt bruk: Immunhistokemi är en diagnostisk process i flera steg som består av specialiserad utbildning i val av lämpliga reagenser; vävnadsval, fixering och bearbetning; förberedelse av IHC-objektglaset; och tolkning av färgningsresultaten.
3. Vävnadsfärgning är beroende av hantering och bearbetning av vävnaden före färgning. Felaktig fixering, frysning, upptining, tvättning, torkning, uppvärmning, sektionering eller kontaminering med andra vävnader eller vätskor kan ge artefakter, antikroppsfångning eller falskt negativa resultat. Inkonsekventa resultat kan bero på variationer i fixerings- och inbäddningsmetoder, eller på inneboende oregelbundenheter i vävnaden.¹²
4. Överdriven eller ofullständig motfärgning kan äventyra korrekt tolkning av resultaten.
5. Den kliniska tolkningen av positiv eller negativ färgning bör utvärderas mot bakgrund av klinisk presentation, morfologi och andra histopatologiska kriterier. Den kliniska tolkningen av positiv eller negativ färgning bör kompletteras med morfologiska studier med korrekta positiva och negativa interna och externa kontroller samt andra diagnostiska tester. Det är en kvalificerad patolog som är bekant med korrekt användning av IHC-antikroppar, reagens och metoder som ansvarar för att tolka alla steg som används för att förbereda och tolka det slutliga IHC-preparatet.
6. Den optimala antikroppsspädningen och protokollen för en specifik tillämpning kan variera. Dessa inkluderar, men är inte begränsade till, fixering, värmeåtervinningsmetod, inkubationstider, vävnadssnitttjocklek och detektionskit som används. På grund av den överlägsna känsligheten hos dessa unika reagenser är de rekommenderade inkubationstiderna och titrarna som anges inte tillämpliga på andra detektionssystem, eftersom resultaten kan variera. Databladets rekommendationer och protokoll är baserade på exklusiv användning av Biocare-produkter. Ytterst är det utredarens ansvar att fastställa optimala förhållanden.
7. Denna produkt är inte avsedd för användning i flödescytometri. Prestandaegenskaper har inte fastställts för flödescytometri.
8. Vävnader från personer infekterade med hepatit B-virus och som innehåller hepatit B-antigen (HBsAg) kan uppvisa ospecifik färgning med pepparrotsperoxidasa.¹³

9. Reagenser kan uppvisa oväntade reaktioner i tidigare otestade vävnader. Möjligheten för oväntade reaktioner även i testade vävnadsgrupper kan inte helt elimineras på grund av biologisk variation av antigenuttryck i neoplasmer eller andra patologiska vävnader.¹⁴ Kontakta Biocares tekniska support på 1-800-542-2002, eller via den tekniska supportinformationen på biocare.net, med dokumenterade oväntade reaktioner.
10. Normala/icke-immuna sera från samma djurkälla som sekundära antiserer som används i blockeringssteg kan orsaka falsknegativa eller falskt positiva resultat på grund av autoantikroppar eller naturliga antikroppar.
11. Falskt positiva resultat kan ses på grund av icke-immunologisk bindning av proteiner eller substratreaktionsprodukter. De kan också orsakas av pseudoperoxidasaktivitet (erytrocyter), endogen peroxidaktivitet (cytokrom C) eller endogent biotin (t.ex. lever, bröst, hjärna, njure) beroende på vilken typ av immunfärgning som används.¹²

Produktspecifika begränsningar:

Inga ytterligare produktspecifika begränsningar.

Prestandaegenskaper:

Reproducerbarhet:

Reproducerbarheten av antikroppspredanda verifierades genom att testa utvald normal vävnad och tumörvävnad på olika dagar och olika instrument med flera operatörer. Färgning av de utvalda vävnaderna var konsekvent och utfördes som förväntat.

Immunreaktivitet:

Följande positiva och negativa immunreaktiviteter har visats i tabellerna 1 och 2 nedan.

Listan nedan är inte uttömmande men karakteriserar de typer av immunreaktiviteter som observerats med den angivna antikroppen.

Det finns ingen känd ospecifik antikropsreaktivitet i denna produkt.

Sammanfattning av förväntade resultat:

Prevalensen av PRAME i normala vävnader och vävnader i sjukdomstillstånd utvärderades med hjälp av Tissue Microarrays (TMA).

De normala testade vävnaderna färgades som förväntat, med höga nivåer av färgning observerade i testklarna och ingen färgning i andra vävnader. Färgning av PRAME observerades vid en hög nivå vid melanom som förväntat, och vid varierande nivåer i andra cancervävnader såsom äggstockar, lungor, prostata och bröst.

Analytisk prestanda:

Färgningstester för sensitivitet och specificitet utfördes och resultaten listas nedan.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Swedish

BIOCARE
M E D I C A L

Känslighet och specificitet:

Tabell 1: Antikroppens känslighet och specificitet bestämdes genom att testa normala FFPE-vävnader.

Vävnad	Positiva fall	Totalt ärenden
Stora hjärnan	0	6
Lilla hjärnan	0	3
Binjuren	0	3
Äggstock	0	3
Bukspottkörteln	0	3
Trakea	0	3
Hypofys	0	3
Testis*	3	3
Sköldkörteln	0	3
Bröst	0	3
Mjälte	0	3
Tonsill	0	3
Bräss	0	3
Benmärg**	0	1
Lunga	0	3
Hjärta	0	3
Matstrupe	0	3
Mage	0	3
Tunntarm	0	3
Kolon	0	3
Lever	0	3
Spottkörtel	0	3
Njure	0	3
Prostata	0	3
Livmoder	0	3
Cervix	0	3
Skelettmuskel	0	3
Hud	0	3
Perifer nerv	0	3
Foder celler	0	3
Huvud, hals och spottkörtel	0	6
Lymfkörtel	0	3

* 3-4 styrka kärnfärgning

** Två prover saknas

Tabell 2: Antikroppens känslighet och specificitet bestämdes genom att testa en mängd olika FFPE-neoplastiska vävnader.

Patologi	Positiva fall	Totalt ärenden
Melanom	29	39
Äggstockscancer	9	44
Bröstcancer	10	26
Koloncancer	4	43
Lungcancer	21	50
Prostatacancer	18	41
Binjurebarkcarcinom	0	1
Blåscancer	0	2
Meningiom	0	2
Astrocytom	0	1
Skivepitelcancer (esofagus)	0	2
Adenocarcinom (mage)	0	2
Adenocarcinom (tunntarm)	0	1
Adenocarcinom (tjocktarm och ändtarm)	0	6
Njurcancer	0	2
Lever cancer	0	4
Lymfom	0	3
Skivepitelcancer (huvud & hals, munhåla, tunga)	0	1
Nasofaryngealt karcinom	1	1
Adenocarcinom (bukspottkörteln)	0	1
Adenocarcinom (prostata)	0	2
Adenoid cystiskt karcinom (huvud och hals, spottkörtel)	0	1
Skivepitelcancer (hud)	0	1
Seminom	0	2
Sköldkörtelcancer	0	2
Livmoderhalscancer	0	2
Endometrium cancer	1	2

PRAME-uttryck i olika neoplasmer kan uppvisa variabel procentuell tumörpositivitet. Se tabell 3 för positiva färgande tumörcellprocenter (kategoriserade efter kvartiler) som observerats i olika neoplasmer som finns i tabell 2.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Swedish

BIOCARE
M E D I C A L

Tabell 3: Procent positiv tumörcellsfärgning i olika FFPE-neoplasmer.

Vävnader	Procent tumörceller färgning # fall uppvisar färgning Procentandel av totalt # fall (%)				
	<1 %	1-25 %	26-50 %	51-75 %	> 75 %
Äggstockscancer	35/44 (79,5 %)	2/44 (4,5 %)	3/44 (6,8 %)	3/44 (6,8 %)	1/44 (2,3 %)
Bröstcancer	16/26 (61,5 %)	26/7 (26,9 %)	1/26 (3,8 %)	26/2 (7,7 %)	0 (0 %)
Koloncancer	39/43 (88,4 %)	4/43 (11,6 %)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Lungcancer	29/50 (58,0 %)	7/50 (14,0 %)	4/50 (8,0 %)	7/50 (14,0 %)	3/50 (6,0 %)
Prostatacancer	23/41 (56,1 %)	9/41 (22,0 %)	3/41 (7,3 %)	2/41 (4,9 %)	4/41 (9,8 %)
Nasofaryngealt karinom	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1/1 (100 %)
Endometrium cancer	1/2 (50 %)	0 (0%)	0 (0%)	1/2 (50 %)	0 (0%)
Melanom	10/39 (25,6 %)	6/39 (15,4 %)	5/39 (12,8 %)	6/39 (15,4 %)	39/12 (30,8 %)

Procent tumörcellsfärgning presenteras för alla färgningsintensiteter.
Färgning på vävnader som visar olika nivåer av PRAME-proteinuttryck.

Resultaten av den analytiska prestandatestningen visade att PRAME [EPR20330]-antikroppen korrekt kan detektera PRAME-proteinet när det definierade IHC-protokollet används. Resultaten av onormala vävnadstest stöder slutsatsen att PRAME [EPR20330] är känslig för PRAME-proteinet när de rekommenderade IHC-protokollen används. PRAME [EPR20330]-antikroppen kan detektera låga till höga nivåer av PRAME-proteinet. Den normala vävnadstestningen visade ingen oväntad upptäckt av PRAME över 32 vävnadstyper. Det fanns ingen oväntad korsreaktivitet. Resultaten stöder påståendet att PRAME [EPR20330] antikropp är mycket specifik (analytisk specificitet) för PRAME-proteinet.

Klinisk prestanda:

Färgningstester för diagnostisk sensitivitet och specificitet utfördes och resultaten listas nedan. Positiv och negativ immunreaktivitet har registrerats i tabell 4.

Tre melanom TMA-objektglas färgades på Biocare och skickades till en extern patolog för att läsas och graderas. Melanomvävnader visade en mångfald av färgningspoäng från 0 (negativa) till starka (4). De flesta melanocytiska nevi visade ingen PRAME-reaktivitet, men några få hade stark reaktivitet.

Tabell 4: Procent positiv tumörcellsfärgning i olika FFPE-melanocytiska neoplasmer och hud.

Vävnader	Procent tumörceller färgning # fall uppvisar färgning Procentandel av totalt # fall (%)				
	<1 %	1-25 %	26-50 %	51-75 %	> 75 %
Melanom	28/133 (21,1 %)	50/133 (37,6 %)	10/133 (7,5 %)	8/133 (6,0 %)	37/133 (27,8 %)
Metastaserande melanom	7/38 (18,4 %)	38/10 (26,3 %)	3/38 (7,9 %)	2/38 (5,3 %)	16/38 (42,1 %)
Melanocytisk nevi	14/12 (85,7 %)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2/12 (14,3 %)
Hud	10/10 (100 %)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Procent tumörcellsfärgning presenteras för alla färgningsintensiteter.
Färgning på vävnader som visar olika nivåer av PRAME-proteinuttryck.

Testets primära slutpunkt var att utvärdera den diagnostiska känsligheten för PRAME [EPR20330]-antikroppen i IHC-proceduren, definierad som den positiva melanomdetektionshastigheten för de bekräftade positiva proverna. [TP/(TP+FN)]

En sekundär slutpunkt var att utvärdera den diagnostiska specificiteten - den negativa detektionshastigheten för bekräftade melanomnegativa prover. [TN/(TN+FP)]

Det fanns 35 falskt negativa melanomfall som hade fått den patologiska guldstandard som melanom men som var negativa för PRAME. 136 fall var sant positiva genom att de diagnostiserades med melanom och visade signal för PRAME. Två falskt positiva detekterades i de 14 melanocytiska nevi-proverna som diagnostiserades som benigna som visade signal för PRAME.

Från data, uppskattad diagnostisk känslighet = $136 / (136 + 35) = 79,5 \%$
Från data, uppskattad diagnostisk specificitet = $22 / (22 + 2) = 91,7 \%$

Baserat på våra beräkningar kommer vi fram till en uppskattad diagnostisk sensitivitet på 79,5 % och en uppskattad diagnostisk specificitet på 91,7 % för melanomdetektion.

Av detta drar vi slutsatsen att PRAME [EPR20330]-antikroppen, som testats av Biocare på melanom och melanocytiska nevi-prover, är känslig för melanom och mycket specifik för melanom.

Felsökning: (Ge en förklaring för var och en av punkterna nedan)

1. Ingen färgning av några objektglas – Kontrollera att lämplig positiv kontrollvävnad, antikroppar och detektionsprodukter har använts.
2. Svag färgning av alla objektglas – Kontrollera att lämplig positiv kontrollvävnad, antikroppar och detektionsprodukter har använts.
3. Överdriven bakgrund av alla objektglas – Det kan finnas höga nivåer av endogen biotin (om du använder biotinbaserade detektionsprodukter), endogen HRP-aktivitet som omvandlar kromogen till färgad slutprodukt (använd peroxidblock) eller överskott av icke-specifik proteininteraktion (använd ett protein block, såsom serum- eller kaseinbaserad blockeringslösning).
4. Vävnadssektioner tvättar bort objektglasen under inkubationen – Kontrollera objektglasen för att säkerställa att de är positivt laddade.
5. Specifik färgning för mörk – Kontrollera protokollet för att avgöra om korrekt antikroppstiter applicerades på objektglasen, samt korrekta inkubationstider för alla reagenser. Se dessutom till att protokollet har

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Swedish

BIOCARE
M E D I C A L

tillräckligt med tvättsteg för att ta bort överflödigt reagens efter att inkubationsstegen har slutförts.

Referenser:

1. Kiernan JA. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. *Theory and Practice of Histotechnology*. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. *Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule*, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. *J Histotechnol*. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. *Biotech Histochem*. 1996 Jan;71(5):263-70.
6. Center for Disease Control Manual. *Guide: Safety Management*, NO. CDC-22, Atlanta, GA. April 30, 1976 "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts."
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition* CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
8. CLSI *Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2)* CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011
9. College of American Pathologists (CAP) *Certification Program for Immunohistochemistry*. Northfield IL. [Http://www.cap.org](http://www.cap.org) (800) 323-4040.
10. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. *Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline*. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
11. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. *Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques*. *Histochemistry* 1987; 86:471-478.
12. Nadji M, Morales AR. *Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls*. *Lab Med*1983;14:767.
13. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. *Nonimmunologic binding of horseradishperoxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry*. *Am J Clin Path* 1980;73:626.
14. Herman GE and Elfont EA. *The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control*. *Biotech & Histochem* 1991;66:194.
15. Zhang W, *et al*. PRAME expression and promoter hypermethylation in epithelial ovarian cancer. *Oncotarget*, 2016 Jul; 7(29):45352-69.
16. Lezcano C, *et al*. PRAME expression in melanocytic tumors. *Am J Surg Pathol*. 2018 Nov; 42(11):1456-65.

Ultraline- antikroppar utvecklas enbart av Biocare Medical LLC och innebär inte godkännande eller godkännande av Biocare -antikroppar av Ventana Medical Systems, Inc eller Roche. Biocare, Ventana och Roche är inte anslutna, associerade eller relaterade på något sätt. Ventana®, BenchMark®, ultraView och OptiView är varumärken som tillhör Roche.

Antikroppar i Q-serien utvecklas enbart av Biocare Medical LLC och innebär inte godkännande eller godkännande av Biocare -antikroppar av Leica Biosystems. Biocare och Leica Biosystems är inte anslutna, associerade eller relaterade på något sätt. Leica, Leica Biosystems, BOND-MAX och BOND-III är varumärken som tillhör Leica Biosystems.

Sammanfattningen av säkerhet och prestanda finns här: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Turkish

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats				
Format	Catalog Number	Description	Dilution	Diluent
Concentrate	ACI 3252 A, B	0.1, 0.5 mL	1:100	Van Gogh Yellow
Predilute	API 3252 AA, G20, H	6.0, 20, 25 mL	Ready-to-use	N/A
ONCORE Pro	OPAI 3252 T60	60 tests	Ready-to-use	N/A
Q Series-- For Leica BOND-III	ALI 3252 G7	7.0 mL	Ready-to-use	N/A
UltraLine -- For BenchMark	AVI 3252 G, G25	6.0, 25 mL	Ready-to-use	N/A

Kullanım amacı:

İn vitro Diagnostik Kullanım İçin

, formalinle sabitlenmiş parafinde PRAME proteininin immünohistokimya (IHC) ile kalitatif tanımlanmasında, tümörün ilk tanısının immünohistokimya olmayan histokimyasal boyalar kullanılarak geleneksel histopatoloji ile yapılmasından sonra laboratuvarında kullanılması amaçlanan bir tavşan monoklonal antikorudur. gömülü (FFPE) insan dokuları. Herhangi bir lekelenmenin veya yokluğunun klinik yorumu, uygun kontroller kullanılarak yapılan morfolojik çalışmalarla tamamlanmalı ve hastanın klinik geçmişi ve diğer klinik tespitlerin yapılmasına yardımcı olmak üzere kalifiye bir patolog tarafından diğer tanısal testler bağlamında değerlendirilmelidir.

Özet ve Açıklama:

PRAME, 22q11.22 kromozomunda bulunur ve 509 amino asitlik bir proteini kodlar. PRAME, melanomda, küçük hücreli dışı akciğer kanseri, meme karsinomu, yumurtalık karsinomu dahil olmak üzere çeşitli melanositik olmayan malign neoplazmlarda ve adı geçen birkaç başkasında eksprese edildiği gösterilen bir otozomal kanser-testis antijeni (CTA) genidir. Testis, yumurtalık, adrenaller ve literatürde adı geçen diğer birkaç doku dışında normal sağlıklı dokuların PRAME eksprese ettiği bilinmemektedir. ^(15,16)

Prosedür Prensipleri:

Bu antikor ürünü, formalinle sabitlenmiş, parafine gömülmüş doku kesitlerinin immünohistokimya testlerinde birincil antikor olarak kullanılabilir. Genel olarak immünohistokimyasal (IHC) boyama teknikleri, bir ardışık uygulama yoluyla antijenlerin görselleştirilmesine izin verir antijene spesifik antikor (birincil antikor), birincil antikora ikincil bir antikor (isteğe bağlı bağlantı antikor/prob), bir enzim kompleksi ve araya giren yıkama adımlarına sahip bir kromojenik substrat. Kromojenin enzimatik aktivasyonu, antijen bölgesinde görünür bir reaksiyon ürünü ile sonuçlanır. Numune daha sonra zıt boyanabilir ve kapak kaydırılabilir. Sonuçlar bir ışık kullanılarak yorumlanır olabilecek veya patofizyolojik süreçlerin ayrıntı tanısında yardımcı olabilir. belirli bir antijenle ilişkili olmayabilir.

Malzemeler ve yöntemler:

Sağlanan Reaktifler:

Ana Bilgisayar Kaynağı: Tavşan monoklonal

Türlerin Reaktivitesi: İnsan. Diğer türler test edilmemiştir.

Klon: EPR20330

İzotip: IgG

Protein Konsantrasyonu: Spesifik IgG Konsantrasyonu: Biocare Teknik Desteğiyle İletişime Geçin

Özgülük: PRAME

Hücresel Lokalizasyon: Çekirdek ve hücre zarı

Yöntem: Afinite ile saflaştırılmış rekombinant tavşan monoklonal.

Sulandırma, Karıştırma, Seyreltme, Titrasyon:

Önceden seyreltilmiş antikor reaktif, yukarıda listelenen boyama sistemleriyle kullanım için optimum şekilde seyreltilir. Daha fazla seyreltme, antijen boyamasının kaybına neden olabilir. Kullanıcının bu tür değişiklikleri doğrulaması gerekir. Kullanıcının laboratuvarındaki doku işleme ve teknik prosedürlerdeki farklılıklar, kurum içi kontrollerin düzenli olarak gerçekleştirilmesini gerektiren sonuçlarda önemli değişikliklere neden olabilir (bkz. Kalite Kontrol bölümü).

Konsantrasyon reaktifin yukarıdaki tabloda belirtildiği gibi seyreltilmesi gerekir.

Bilinen Uygulamalar:

İmmünohistokimya (formalinle sabitlenmiş parafine gömülü dokular)

Şu Şekilde Sağlanır: Bir protein taşıyıcı ve %0,1'den az sodyum azid koruyucu içeren pH 5,9-7,9 olan tamponlu salin solüsyonu. Ek ayrıntılar için Güvenlik Veri Sayfasına bakın.

Gerekli Olan Ancak Sağlanmayan Malzemeler ve Reaktifler:

Mikroskop pozitif yüklü kayar.
Pozitif ve negatif doku kontrolleri
Çöl Odası (veya benzeri Kurutma fırını)
Ksilen veya ksilen ikamesi
Etanol veya reaktif alkol
Gizlenme Odası (Düdüklü tencere)
Deiyonize veya damıtılmış su
Yıkama tamponu
Ön arıtma reaktifleri
Peroksidad bloğu
Protein bloğu (isteğe bağlı)
Algılama probu ve polimer
Negatif kontrol reaktifleri
Kromojenler
Hematoksilen (karşı boya)
Mavileştirme reaktifi
Montaj ortamı
Lamel camı
Işık Mikroskobu (40-400X büyütme)

Antikor ürününün konfigürasyonları yukarıdaki tabloda belirtilen cihazlarda kullanım için mevcuttur.

Depolama ve Stabilite:

2°C ile 8°C arasında saklayın. Ürün, bu koşullar altında saklandığında flakon etiketi üzerinde yazılı olan son kullanma tarihine kadar stabildir. Son kullanma tarihinden sonra kullanmayınız. Belirtilenlerin dışındaki koşullar altında depolama doğrulanmalıdır. Seyreltilmiş reaktifler derhal kullanılmalıdır; kalan reaktif 2°C ila 8°C'de saklayın. Kullanıcı tarafından seyreltilen reaktifin stabilitesi Biocare tarafından belirlenmemiştir.

Pozitif ve negatif kontroller tüm hasta örnekleriyle aynı anda çalıştırılmalıdır. Laboratuvar prosedürlerindeki değişikliklerle açıklanamayan beklenmedik bir lekelenme gözlemlenirse ve antikorla ilgili bir sorundan şüpheleniliyorsa, 1-800-542-2002 numaralı telefondan veya biocare.net adresinde sağlanan teknik destek bilgileri aracılığıyla Biocare Teknik Desteğiyle iletişime geçin.

Numune hazırlama:

Formalinde sabitlenen dokular parafine gömülmeden önce kullanıma uygundur. Doku kesmeyi kolaylaştırmak ve mikrotom bıçaklarının zarar görmesini önlemek için doku işlemeden önce kemik dokuların kireçten arındırılması gerekir. ^{1, 2}

Belirtilen antijen hedefini ifade eden uygun şekilde sabitlenmiş ve gömülü dokular serin bir yerde saklanmalıdır. 1988 tarihli Klinik Laboratuvar İyileştirme Yasası (CLIA), 42 CFR § 493.1259(b)'de şunu gerektirmektedir: "Laboratuvar, boyalı slaytları, onay tarihinden itibaren en az on yıl muhafaza



60 Berry Drive
Pacheco, CA 94553

USA

184/190



TP v3 (12/15/2021)

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080



Westervoortsedijk 60

6827 AT Arnhem

The Netherlands

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Turkish

BIOCARE
M E D I C A L

etmelidir. numune bloklarını inceleme tarihinden itibaren en az iki yıl boyunca saklayın. ³

Dokuların Boyama Öncesi Tedavisi:

Aşağıda önerilen protokole göre Isı Kaynaklı Epitop Alma (HIER) işlemini gerçekleştirin. HIER'in IHC'den önce rutin kullanımının tutarsızlığı en az indirdiği ve boyamayı standartlaştırdığı gösterilmiştir. ^{4,5}

Uyarı ve Önlemler :

1. Bu antikor %0,1'den az sodyum azit içerir . %0,1'in altındaki konsantrasyonlar, US 29 CFR 1910.1200, OSHA Tehlike iletişimi ve EC Direktifi 91/155/EC'ye göre raporlanması gereken tehlikeli maddeler değildir. Korumayı kullanarak kullanılan sodyum azit (NaN₃), yutulması halinde toksiktir. Sodyum azit, kurşun ve bakır tesisatlarla reaksiyona girerek son derece patlayıcı metal azidler oluşturabilir . İmha edildikten sonra, tesisatta azit birikmesini önlemek için bol miktarda suyla yıkayın . (Hastalık Kontrol Merkezi, 1976, Ulusal Mesleki Güvenlik ve Sağlık Enstitüsü, 1976) ⁶
2. Tespitten önce ve sonra numuneler ve bunlara maruz kalan tüm materyaller, enfeksiyon bulaştırılabilecek gibi kullanılmalı ve uygun önlemler alınarak imha edilmelidir. Reaktifleri asla ağız yoluyla pipetlemeyin ve reaktiflerin ve numunelerin cilt ve mukoza zarlarına temasından kaçınınız. Reaktifler veya numuneler hassas alanlarla temas ederse bol miktarda suyla yıkayın. ⁷
3. Reaktiflerin mikrobiyal kontaminasyonu spesifik olmayan boyamanın artmasına neden olabilir.
4. Belirtilenlerin dışındaki inkübasyon süreleri veya sıcaklıklar hatalı sonuçlar verebilir. Kullanıcının bu tür değişiklikleri doğrulaması gerekir.
5. Reaktif şişenin üzerinde yazılı olan son kullanma tarihinden sonra kullanmayın.
6. Önceden seyreltilmiş antikor reaktif kullanım için en uygun şekilde seyreltilir . Daha fazla seyreltme, antijen boyamasının kaybına neden olabilir.
7. Konsantre antikor reaktifinin seyreltilmesi kullanımdan önce doğrulanmalıdır. Herhangi Özel olarak önerilmeyen seyreltmenin de uyumluluk ve stabilize açısından doğrulanması gerekir.
8. Enfeksiyöz veya potansiyel olarak enfeksiyöz atık prosedürlerini izleyerek kullanılmış tüm reaktifleri ve diğer kontamine tek kullanımlık malzemeleri atın. Katı ve sıvı atıkların doğasına ve tehlike derecesine göre işlenmesi ve ilgili düzenlemelere uygun olarak atılması ve imha edilmesi (veya atılıp bertaraf edilmesi) her laboratuvarın sorumluluğundadır.
9. Bu ürünün güvenli bir şekilde imha edilmesini belirlemek için, bulunduğunuz yerdeki yerel imha yönetmeliklerinin yanı sıra Güvenlik Veri Sayfasındaki önerilere uyun.
10. SDS talep üzerine sağlanır ve <http://biocare.net> adresinde bulunur.
11. Bu cihazla ilgili şüphelenilen ciddi olayları bildirmek için yerel Biocare temsilcisiyle ve kullanıcının yerleşik olduğu Üye Devletin veya Ülkenin yetkili makamıyla iletişime geçin.

Kullanım için talimatlar:

PRAME [EPR20330] için Önerilen Boyama Protokolleri:

IntelliPATH FLX and manual use:

IntelliPATH FLX ve manuel kullanıma yönelik API3252 , MACH 4 tespit sistemi ile standartlaştırılmıştır. Adımları yıkamak için TBS kullanın.	
Peroxide Block:	Peroxidazed 1 ile 5 dakika süreyle bloke edin .
Pretreatment:	Decloaker'ı kullanarak ısı alımını gerçekleştirin . Özel talimatlar için Borg Decloaker veri sayfasına bakın .
Protein Block (Optional):	Arkaplan Punisher ile oda sıcaklığında 5-10 dakika inkübe edin.
Primary Antibody:	Oda sıcaklığında 30 dakika boyunca inkübe edin.
Detection:	Prob: Yok
	Polimer: İkincil konjuge polimer ile oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edin.

Chromogen:	Biocare'in DAB'si ile oda sıcaklığında 5 dakika boyunca inkübe edin – VEYA – Warp Red ile oda sıcaklığında 5-7 dakika boyunca inkübe edin.
Counterstain	Hematoksilen ile karşı boyama. Deiyonize su ile durulayın. Tacha'nın Bluing Solüsyonunu 1 dakika boyunca uygulayın. Deiyonize su ile durulayın.

ONCORE Pro Automated Slide Staining System:

OPAI3252, ONCORE Pro ile kullanılmak üzere tasarlanmıştır. Özel kullanım talimatları için Kullanım Kılavuzuna bakın. Protokol Düzenleyicideki protokol parametreleri aşağıdaki gibi programlanmalıdır:		
Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	PRAME Rb	PRAME Rb AP
Protocol Template (Description):	Special Template (ONCORE Pro-Tect Detection Required)	Rb AP Template 1
Dewaxing (DS Buffer Option):	DS2-50	DS Buffer
Antigen Retrieval (AR Option):	AR1, high pH; 103°C	AR1, high pH; 103°C
Block Option:	Buffer	Buffer
Reagent Name, Time, Temp.:	PRAME Rb, 45 min., 25°C	PRAME Rb, 30 min., 25°C

Ventana BenchMark ULTRA:

BenchMark ULTRA ile kullanılmak üzere tasarlanmıştır . Özel kullanım talimatları için Kullanım Kılavuzuna bakın. Önerilen protokol parametreleri aşağıdaki gibidir:	
Template/Detection:	OptiView DAB IHC
Pretreatment Protocol:	CC1 64 minutes
Peroxidase:	Pre-Primary Peroxidase Inhibitor
Primary Antibody:	32 minutes, 36°C

Q Series – For Leica BOND-III:

ALI3252 , Leica BOND-III ile birlikte kullanılmak üzere tasarlanmıştır. Özel kullanım talimatları için Kullanım Kılavuzuna bakın. Önerilen protokol parametreleri aşağıdaki gibidir:		
Chromogen Staining Option	DAB	Red
Protocol Name:	IHC Protocol F	IHC Protocol J
Detection:	Bond Polymer Refine	Bond Polymer Refine Red
HIER:	20 min with ER2	20 min with ER2
Peroxide Block:	5 min	
Marker (Primary Antibody):	15 min	15 min
Post Primary:	8 min	
Polymer:	8 min	
Post Primary AP:		20 min
Polymer AP:		30 min
Mixed Chromogen Refine:	10 min	10 min + 5 min
Hematoxylin:	5 min	5 min

Kalite kontrol:

İmmünohistokimya Testlerinin Tasarımı ve Uygulanmasına ilişkin CLSI Kalite Standartlarına bakın; Onaylanmış Kılavuz-İkinci Baskı (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA ABD (www.clsi.org). 2011 ⁸

Biocare Medical

60 Berry Drive
Pacheco, CA 94553

USA

185/190



TP v3 (12/15/2021)

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080

EC REP EMERGO EUROPE

Westervoortsedijk 60

8627 AT Arnhem

The Netherlands

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Turkish

BIOCARE
M E D I C A L

Pozitif Doku Kontrolü: Melanom, normal testis

Harici Pozitif kontrol malzemeleri, hasta numunesi/numuneleri ile aynı şekilde mümkün olan kısa sürede sabitlenmiş, işlenmiş ve gömülmüş taze numunelerden oluşmalıdır. Pozitif doku kontrolleri, doğru hazırlanmış dokuların ve uygun boyama tekniklerinin göstergesidir. Her boyama işlemine, her test koşulu seti için bir pozitif dış doku kontrolü dahil edilmelidir.

Harici pozitif kontrol materyalleri için kullanılan dokular, zayıf pozitif boyama veren, iyi karakterize edilmiş düşük pozitif hedef aktivitesi seviyelerine sahip hasta numunelerinden seçilmelidir. Harici pozitif kontroller için düşük pozitiflik düzeyi, birincil antikor duyarlılığında istikrarsızlıktan veya IHC metodolojisindeki sorunlardan kaynaklanan hafif değişikliklerin tespit edilmesini sağlamak için tasarlanmıştır. Ticari olarak temin edilebilen doku kontrol slaytları veya hasta numunesinden/numunelerinden farklı şekilde işlenmiş numuneler yalnızca reaktif performansını doğrular ve doku hazırlığını doğrulamaz.

Bilinen pozitif doku kontrolleri, hasta örneklerine yönelik spesifik bir teşhisin formüle edilmesine yardımcı olmak yerine, yalnızca işlenmiş dokuların ve test reaktiflerinin doğru performansını izlemek için kullanılmalıdır. Pozitif doku kontrolleri pozitif boyama göstermezse test örnekleriyle elde edilen sonuçlar geçersiz sayılmalıdır.

Negatif Doku Kontrolü:

IHC birincil antikorunun spesifikliğini doğrulamak için her boyama çalışmasında hasta numunesi/numuneleri ile aynı şekilde sabitlenmiş, işlenmiş ve gömülmüş bir negatif doku kontrolü (PRAME negatif olarak bilinir) kullanın. Hedef antijenin gösterilmesi ve spesifik arka plan boyamasının bir göstergesinin sağlanması (yanlış pozitif boyama). Ayrıca çoğu doku kesitinde mevcut olan farklı hücre tiplerinin çeşitliliği, IHC'nin performansını doğrulamak için laboratuvarcı tarafından dahili negatif kontrol alanları olarak kullanılacaktır özellikler. Negatif doku için kullanılacak örnek türleri ve kaynakları kontroller Performans Özellikleri bölümünde listelenmiştir.

Negatif doku kontrolünde spesifik boyama (yanlış pozitif boyama) meydana gelirse hasta numuneleriyle elde edilen sonuçlar geçersiz sayılmalıdır.

Spesifik Olmayan Negatif Reaktif Kontrolü:

Spesifik olmayan boyamayı değerlendirmek için her hasta örneğinin bir bölümü ile birincil antikor yerine spesifik olmayan bir negatif reaktif kontrolü kullanın ve antijen bölgesindeki spesifik boyamanın daha iyi yorumlanmasına izin verir. İdeal olarak bir negatif reaktif kontrolü, birincil kontrolle aynı şekilde doku kültürü süpernatantından üretilen bir PRAME IgG antikorunu içerir. **antikordur ancak** Biocare antikorunu ile aynı matris/çözelti içinde insan dokularıyla spesifik bir reaktivite sergilemez. Negatif kontrol antikorunu, seyreltilmiş primer ile aynı immünooglobulin veya protein konsantrasyonuna seyreltin Aynı seyreltici kullanılarak antikor. Fetal buzağı serumu işleminden sonra saf antikorda kalırsa, seyreltilmiş serumu eşdeğer bir protein konsantrasyonunda fetal dana serumu Aynı seyrelticideki birincil antikor da kullanıma uygundur. (Sağlanan reaktifte bakın). Tek başına seyreltici, daha önce açıklanan negatif reaktif kontrollerine daha az tercih edilen bir alternatif olarak kullanılabilir. Negatif reaktif kontrolüne yönelik kuluçka süresi, birincil antikorunkine karşılık gelmelidir.

Seri bölümlerde birkaç antikordan oluşan paneller kullanıldığında, bir slaydın negatif boyama alanları, diğer antikorlar için negatif/spesifik olmayan bağlanma arka planı kontrolü görevi görebilir. Endojen enzim aktivitesini veya enzimlerin spesifik olmayan bağlanmasını spesifik immünoaktiviteden ayırt etmek için, ilave hasta dokuları sırasıyla substrat-kromojen veya enzim kompleksleri (PAP, avidin-biyotin, streptavidin) ve substrat-kromojen ile özel olarak boyanabilir.

Test Doğrulaması:

Bir antikorun veya boyama sisteminin bir teşhis prosedüründe ilk kullanımından önce kullanıcı, antikorun özgüllüğünü, onu bilinen pozitif ve negatif dokuları temsil eden bilinen immünohistokimyasal performans

özelliklerine sahip bir dizi kurum içi doku üzerinde test ederek doğrulanmalıdır. Ürün ekinin bu bölümünde daha önce özetlenen kalite kontrol prosedürleri ve İmmünohistokimya için CAP Sertifikasyon Programının ⁹ ve/veya NCCLS IHC kılavuzunun ¹⁰ kalite kontrol tavsiyelerine bakın. Bu kalite kontrol prosedürleri her yeni antikor lotu için veya test parametrelerinde her değişiklik olduğunda tekrarlanmalıdır. Performans Özellikleri Bölümünde listelenen dokular test doğrulanması için uygundur.

Sorun giderme:

Sağlanan veri sayfasına göre antikora özel protokol önerilerini izleyin. Tipik olmayan sonuçlar ortaya çıkarsa 1-800-542-2002 numaralı telefondan Biocare Teknik Desteğiyle iletişime geçin .

Boyamanın Yorumlanması:

Pozitif Doku Kontrolü:

Belirtilen antikorla boyanmış pozitif doku kontrolü, tüm reaktiflerin düzgün çalıştığından emin olmak için ilk önce incelenmelidir. Hedef hücrelerin uygun şekilde boyanması (yukarıda belirtildiği gibi) pozitif reaktivitenin göstergesidir. Pozitif doku kontrolleri pozitif boyama göstermezse test numuneleriyle elde edilen sonuçlar geçersiz sayılmalıdır.

Reaksiyon ürününün rengi, kullanılan substrat kromojenlerine bağlı olarak değişebilir. Beklenen renk reaksiyonları için alt tabaka paketindeki eklere bakın. Ayrıca boyama yönteminin varyasyonlarında metakromazi gözlemlenebilir. ¹¹

Bir karşıt boyama kullanıldığında, kuluçka süresine ve kullanılan karşıt boyamanın gücüne bağlı olarak karşıt boyama, hücre çekirdeklerinin renklenmesine neden olacaktır. Aşırı veya eksik karşıt boyama, sonuçların doğru şekilde yorumlanmasını tehlikeye atabilir. Önerilen karşıt boyama için protokol(ler)e bakın.

Negatif Doku Kontrolü :

Hedef antijenin birincil antikor tarafından etiketlenmesinin özgüllüğünü doğrulamak için pozitif doku kontrolünden sonra negatif doku kontrolü incelenmelidir. Negatif doku kontrolünde spesifik boyamanın olmaması, hücrelere/hücresele bileşenlere karşı antikor çapraz reaktivitesinin olmadığını doğrular . Negatif dış doku kontrolünde spesifik boyama (yanlış pozitif boyama) meydana gelirse hasta numunesiyle elde edilen sonuçlar geçersiz sayılmalıdır.

Spesifik olmayan boyama, mevcutsa genellikle yaygın bir görünüme sahiptir. Aşırı formalinle fikse edilmiş dokulardan alınan kesitlerde ara sıra bağ dokusunda lekelenme de gözlemlenebilir. Boyama sonuçlarının yorumlanması için sağlam hücreleri kullanın. Nekrotik veya dejenerer hücreler sıklıkla spesifik olmayan bir şekilde boyanır.

Hasta Dokusu:

Belirtilen antikorla boyanmış hasta numunelerini inceleyin son. Pozitif boyama yoğunluğunda, negatif reaktif kontrolünün spesifik olmayan arka plan boyaması bağlamında değerlendirilmelidir. Herhangi bir immünohistokimyasal testte olduğu gibi, negatif sonuç, antijenin test edilen hücrelerde/dokuda bulunmadığı anlamına değil, antijenin tespit edilmediği anlamına gelir. Gerekirse yanlış negatif reaksiyonları tanımlamak için bir antikor paneli kullanın.

 Biocare Medical

60 Berry Drive
Pacheco, CA 94553

USA

186/190



TP v3 (12/15/2021)

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080

 EMERGO EUROPE

Westervoortsedijk 60

8627 AT Arnhem

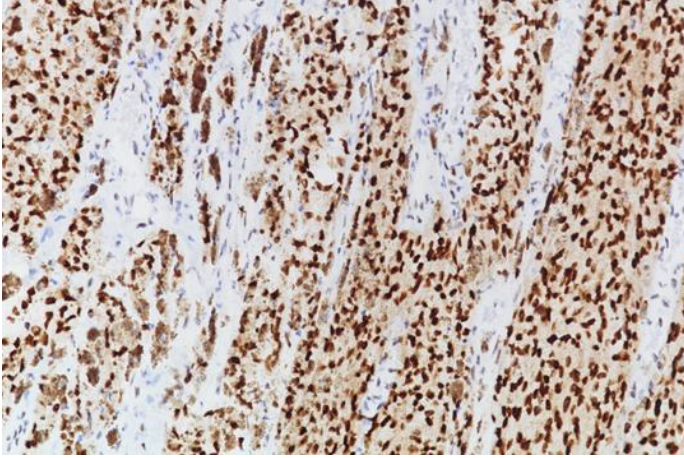
The Netherlands

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Turkish

BIOCARE
M E D I C A L



PRAME [EPR20330] antikorlu ile boyanmış melanom.

Belirtilen antikor immünoreaktivitesi ile ilgili spesifik bilgiler için Özet ve Açıklama, Sınırlamalar ve Performans Özellikleri'ne bakın.

Sınırlamalar:

Genel Sınırlamalar:

1. *In vitro* diagnostik kullanım için
2. Bu ürün yalnızca profesyonel kullanım içindir: İmmünohistokimya, uygun reaktiflerin seçiminde özel eğitimden oluşan çok adımlı bir teşhis sürecidir; doku seçimi, fiksasyonu ve işlenmesi; IHC slaytının hazırlanması; ve boyama sonuçlarının yorumlanması.
3. Doku boyaması, boyamadan önce dokunun işlenmesine ve işlenmesine bağlıdır. Uygun sabitleme, dondurma, çözme, yıkama, kurutma, ısıtma, kesit alma veya diğer doku veya sıvılarla kontaminasyon; artefaktlara, antikor sıkışmasına veya yanlış negatif sonuçlara neden olabilir. Tutsuz sonuçlar, sabitleme ve gömme yöntemlerindeki farklılıklara veya doku içindeki doğal düzensizliklere bağlı olabilir.¹²
4. Aşırı veya eksik karşı boyama, sonuçların doğru şekilde yorumlanmasını tehlikeye atabilir.
5. Herhangi bir pozitif veya negatif boyamanın klinik yorumu, klinik sunum, morfoloji ve diğer histopatolojik kriterler kapsamında değerlendirilmelidir. Herhangi bir pozitif veya negatif boyamanın klinik yorumu, uygun pozitif ve negatif iç ve dış kontrollerin yanı sıra diğer teşhis testlerinin kullanıldığı morfolojik çalışmalarla tamamlanmalıdır. Nihai IHC hazırlığını hazırlamak ve yorumlamak için kullanılan tüm adımları yorumlamak, IHC antikorlarının, reaktiflerinin ve yöntemlerinin doğru kullanımına aşina olan nitelikli bir patologun sorumluluğundadır.
6. Belirli bir uygulama için optimum antikor seyreltmesi ve protokolleri farklılık gösterebilir. Bunlar arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere, fiksasyon, ısı geri alma yöntemi, inkübasyon süreleri, doku kesiti kalınlığı ve kullanılan tespit kiti yer alır. Bu benzersiz reaktiflerin üstün hassasiyeti nedeniyle, önerilen inkübasyon süreleri ve listelenen titreler, sonuçlar farklılık gösterebileceğinden diğer tespit sistemleri için geçerli değildir. Veri sayfası önerileri ve protokolleri Biocare ürünlerinin özel kullanımına dayanmaktadır. Sonuçta optimal koşulları belirlemek araştırmacının sorumluluğundadır.
7. Bu ürünün akış sitometrisinde kullanılması amaçlanmamıştır. Akış sitometrisi için performans özellikleri belirlenmemiştir.
8. Hepatit B virüsü ile enfekte olmuş ve hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) içeren kişilerden alınan dokular, yabancı turpu peroksidazı ile spesifik olmayan boyama sergileyebilir.¹³
9. Reaktifler daha önce test edilmemiş dokularda beklenmeyen reaksiyonlar gösterebilir. Test edilen doku gruplarında bile beklenmeyen reaksiyonların olasılığı, neoplazmalarda veya diğer patolojik dokularda antijen ekspresyonunun biyolojik değişkenliği nedeniyle tamamen ortadan kaldırılamaz.¹⁴ 1-800-542-2002 numaralı telefondan veya

biocare.net'te sağlanan teknik destek bilgileri aracılığıyla, belgelenmiş beklenmedik reaksiyon(lar)la birlikte Biocare'in Teknik Desteğiyle iletişime geçin .

10. Bloklama adımlarında kullanılan ikincil antiserumlarla aynı hayvan kaynağından alınan normal/immün olmayan serumlar, otoantikörler veya doğal antikörler nedeniyle yanlış negatif veya yanlış pozitif sonuçlara neden olabilir.
11. Proteinlerin veya substrat reaksiyon ürünlerinin immünolojik olmayan bağlanması nedeniyle yanlış pozitif sonuçlar görülebilir. Ayrıca kullanılan immün boyanın türüne bağlı olarak psödo peroksidaz aktivitesi (eritrositler), endojen peroksidaz aktivitesi (sitokrom C) veya endojen biyotin (örn. karaciğer, meme, beyin, böbrek) nedeniyle de kaynaklanabilir.¹²

Ürüne Özel Sınırlamalar:

Ürüne özel ek sınırlama yoktur.

Performans Özellikleri:

Yeniden üretilebilirlik:

Seçilmiş normal ve tümör dokusunun çeşitli günlerde ve çeşitli cihazlarda birden fazla operatörle test edilmesiyle doğrulandı . Seçilen dokuların boyanması tutarlıydı ve beklendiği gibi yapıldı.

İmmünoreaktivite:

Aşağıdaki pozitif ve negatif immünoreaktiviteler aşağıdaki Tablo 1 ve 2'de gösterilmiştir.

Aşağıda verilen liste kapsamlı değildir ancak belirtilen antikorla gözlemlenen immünoreaktivite türlerini karakterize eder.

Bu üründe bilinen spesifik olmayan antikor reaktivitesi gözlemlenmemiştir.

Beklenen Sonuçların Özeti:

Normal ve hastalık durumundaki dokularda PRAME prevalansı, Doku Mikrodizileri (TMA'lar) kullanılarak değerlendirildi.

Test edilen normal dokular beklendiği gibi boyandı; testlerde yüksek düzeyde boyanma gözlemlendi ve diğer dokularda boyanma olmadı. PRAME boyanması beklendiği gibi melanomda yüksek düzeyde, yumurtalık, akciğer, prostat ve meme gibi diğer kanser dokularında ise değişen düzeylerde gözlemlendi.

Analitik Performans:

Duyarlılık ve özgüllük için boyama testleri yapılmıştır ve sonuçlar aşağıda listelenmiştir .

Biocare Medical

60 Berry Drive
Pacheco, CA 94553

USA

187/190



TP v3 (12/15/2021)

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080

EC REP EMERGO EUROPE

Westervoortsedijk 60

6827 AT Arnhem

The Netherlands

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Turkish

BIOCARE
M E D I C A L

Duyarlılık ve Özgünlük:

Tablo 1: Antikoron duyarlılığı ve özgüllüğü FFPE normal dokularının test edilmesiyle belirlendi.

Doku	Olumlu Durumlar	Toplam Vakalar
Beyin	0	6
Beyincik	0	3
Adrenal	0	3
Yumurtalık	0	3
Pankreas	0	3
Trakea	0	3
Hipofiz	0	3
Testis*	3	3
Tiroid	0	3
Göğüs	0	3
Dalak	0	3
Bademcik	0	3
Timus	0	3
Kemik iliği**	0	1
Akciğer	0	3
Kalp	0	3
Yemek borusu	0	3
Karın	0	3
İnce bağırsak	0	3
Kolon	0	3
Karaciğer	0	3
Tükürük bezi	0	3
Böbrek	0	3
Prostat	0	3
Rahim	0	3
Serviks, rahim ağzı	0	3
İskelet kası	0	3
Deri	0	3
Periferik Sinir	0	3
Astar Hücreleri	0	3
Baş, boyun ve tükürük bezleri	0	6
Lenf düğümü	0	3

* 3-4 kuvvetli nükleer boyama

** İki örnek eksik

Tablo 2: Antikoron duyarlılığı ve özgüllüğü çeşitli FFPE neoplastik dokuların test edilmesiyle belirlendi.

Patoloji	Olumlu Durumlar	Toplam Vakalar
Melanom	29	39
Yumurtalık Kanseri	9	44
Meme kanseri	10	26
Kolon kanseri	4	43
Akciğer kanseri	21	50
Prostat kanseri	18	41
Adrenokortikal karsinom	0	1
Mesane kanseri	0	2
Menenjiyom	0	2
Astrositom	0	1
Skuamöz Hücreli karsinom (yemek borusu)	0	2
Adenokarsinom (mide)	0	2
Adenokarsinom (ince bağırsak)	0	1
Adenokarsinom (kolon ve rektum)	0	6
Böbrek kanseri	0	2
Karaciğer kanseri	0	4
Lenfoma	0	3
Skuamöz Hücreli karsinom (baş ve boyun, ağız boşluğu, dil)	0	1
Nazofarenks karsinomu	1	1
Adenokarsinom (pankreas)	0	1
Adenokarsinom (prostat)	0	2
Adenoid kistik karsinom (baş ve boyun, tükürük bezi)	0	1
Skuamöz Hücreli karsinom (cilt)	0	1
Seminom	0	2
Tiroid kanseri	0	2
Rahim ağzı kanseri	0	2
Endometriyum Kanseri	1	2

Çeşitli neoplazmalarda PRAME ekspresyonu değişken yüzdede tümör pozitifliği sergileyebilir. Tablo 2'de bulunan çeşitli neoplazmalarda gözlemlenen pozitif boyanan tümör hücresi yüzdeleri (dörtlü gruplara göre kategorize edilmiş) için Tablo 3'e bakın.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Turkish

BIOCARE
M E D I C A L

Tablo 3: Çeşitli FFPE neoplazmlarında yüzde pozitif tümör hücresi boyaması.

Dokular	Tümör Hücrelerinin Boyanma Yüzdesi									
	# Vaka Toplam	# Vakanın Boyanma Gösteren Yüzdesi (%)	<%1	%1-25	%26-50	%51-75	> %75			
Yumurtalık Kanseri	35/44	(%79,5)	2/44	(%4,5)	3/44	(%6,8)	3/44	(%6,8)	1/44	(%2,3)
Meme kanseri	16/26	(%61,5)	7/26	(%26,9)	1/26	(%3,8)	2/26	(%7,7)	0	(%0)
Kolon kanseri	39/43	(%88,4)	4/43	(%11,6)	0	(%0)	0	(%0)	0	(%0)
Akciğer kanseri	29/50	(%58,0)	7/50	(%14,0)	4/50	(%8,0)	7/50	(%14,0)	3/50	(%6,0)
Prostat kanseri	23/41	(%56,1)	9/41	(%22,0)	3/41	(%7,3)	2/41	(%4,9)	4/41	(%9,8)
Nazofarenks karsinomu	0	(%0)	0	(%0)	0	(%0)	0	(%0)	1/1	(100%)
Endometriyum Kanseri	1/2	(%50)	0	(%0)	0	(%0)	1/2	(%50)	0	(%0)
Melanom	10/39	(%25,6)	6/39	(%15,4)	5/39	(%12,8)	6/39	(%15,4)	12/39	(%30,8)

Tüm boyama yoğunlukları için sunulan tümör hücresi boyama yüzdesi. Değişen seviyelerde PRAME protein ekspresyonu gösteren dokularda boyama.

Analitik performans testinin sonuçları, PRAME [EPR20330] antikorunun, tanımlanan IHC protokolünü kullanırken PRAME proteinini doğru şekilde tespit edebildiğini gösterdi. Anormal doku testi sonuçları, önerilen IHC protokolleri kullanıldığında PRAME'nin [EPR20330] PRAME proteinine duyarlı olduğu sonucunu desteklemektedir. PRAME [EPR20330] antikorunu, PRAME proteininin düşük ila yüksek seviyelerini tespit edebilir. Normal doku testi, 32 doku tipinde PRAME'nin beklenmeyen bir tespitini göstermedi. Beklenmedik bir çapraz reaksiyon görülmedi. Sonuçlar, PRAME [EPR20330] antikorunun PRAME proteinine oldukça spesifik (analitik spesifiklik) olduğu iddiasını desteklemektedir.

Klinik Performans:

Tanısal duyarlılık ve özgüllük için boyama testleri yapılmıştır ve sonuçlar aşağıda listelenmiştir. Pozitif ve negatif immünoreaktivite Tablo 4'te kaydedilmiştir.

Biocare'de boyandı ve okunup derecelendirilmesi için harici bir patoloğa gönderildi. Melanom dokuları 0'dan (negatif) güçlüye (4) kadar değişen çeşitli boyama skorları gösterdi. Çoğu melanositik nevüs PRAME reaktivitesi göstermedi, ancak birkaçı güçlü reaktiviteye sahipti.

Tablo 4: Çeşitli FFPE melanositik neoplazmlarda ve deride pozitif tümör hücresi boyama yüzdesi.

Dokular	Tümör Hücrelerinin Boyanma Yüzdesi									
	# Vaka Toplam	# Vakanın Boyanma Gösteren Yüzdesi (%)	<%1	%1-25	%26-50	%51-75	> %75			
Melanom	28/133	(%21,1)	50/133	(%37,6)	10/133	(%7,5)	8/133	(%6,0)	37/133	(%27,8)
Metastatik melanom	7/38	(%18,4)	10/38	(%26,3)	3/38	(%7,9)	2/38	(%5,3)	16/38	(%42,1)
Melanositik nevüs	12/14	(%85,7)	0	(%0)	0	(%0)	0	(%0)	2/12	(%14,3)
Deri	10/10	(%100)	0	(%0)	0	(%0)	0	(%0)	0	(%0)

Tüm boyama yoğunlukları için sunulan tümör hücresi boyama yüzdesi. Değişen seviyelerde PRAME protein ekspresyonu gösteren dokularda boyama.

Testin birincil son noktası, doğrulanmış pozitif örneklerin pozitif melanom tespit oranı olarak tanımlanan, IHC prosedüründe PRAME [EPR20330] antikorunun tanısal duyarlılığını değerlendirmektir. [TP/(TP+FN)]

İkincil bir son nokta, teşhis özgüllüğünün (doğrulanmış melanom negatif örnekleri için negatif tespit oranı) değerlendirilmesiydi. [TN/(TN+FP)]

Altın standart patolojik değerlendirmeyi melanom olarak alan ancak PRAME negatif olan 35 yanlış negatif melanom vakası vardı. 136 vaka, melanom tanısı konduğundan ve PRAME sinyali gösterdiğinden gerçek pozitif. İyi huylu olarak teşhis edilen ve PRAME sinyali gösteren 14 melanositik nevüs örneğinde iki hatalı pozitif tespit edildi.

Verilere göre tahmini tanısal hassasiyet = $136 / (136 + 35) = \%79,5$
Verilerden tahmin edilen teşhis özgüllüğü = $22 / (22 + 2) = \%91,7$

Hesaplamalarımıza dayanarak, melanom tespiti için tahmini %79,5 tanısal hassasiyete ve %91,7'lik tahmini tanısal özgüllüğe ulaşıyoruz.

Biocare tarafından melanom ve melanositik nevüs örnekleri üzerinde test edilen PRAME [EPR20330] antikorunun melanomaya duyarlı ve melanomaya oldukça spesifik olduğu sonucuna vardık.

Sorun giderme: (Aşağıdaki noktaların her biri için açıklama sağlayın)

- Hiçbir slaytta lekelenme yok – Uygun pozitif kontrol dokusunun, antikorun ve tespit ürünlerinin kullanıldığını belirlemek için kontrol edin.
- Tüm slaytların zayıf boyanması – Uygun pozitif kontrol dokusunun, antikorun ve tespit ürünlerinin kullanıldığını belirlemek için kontrol edin.
- son ürüne dönüştüren endojen HRP aktivitesi (peroksidaz bloğu kullanın) veya aşırı spesifik olmayan protein etkileşimi (bir protein kullanın) olabilir serum veya kazein bazlı bloke etme solüsyonu gibi blokaj).
- Doku bölümleri inkübasyon sırasında slaytları yıkar – Pozitif yüklü olduklarından emin olmak için slaytları kontrol edin.
- Spesifik boyama çok koyu – Slayda uygun antikor titresinin uygulanıp uygulanmadığını ve ayrıca tüm reaktifler için uygun inkübasyon sürelerini belirlemek için protokolü kontrol edin. Ek olarak, kuluçka adımları tamamlandıktan sonra fazla reaktifleri çıkarmak için protokolün yeterli yıkama adımına sahip olduğundan emin olun.

PRAME [EPR20330]

Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
901-3252-092023

Turkish

BIOCARE
M E D I C A L

Referanslar:

1. Kiernan JA. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. New York: Pergamon Press 1981.
 2. Sheehan DC and Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
 3. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
 4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. J Histotechnol. 1999 Sep;22(3):177-92.
 5. Taylor CR, et al. Biotech Histochem. 1996 Jan;71(5):263-70.
 6. Center for Disease Control Manual. Guide: Safety Management, NO. CDC-22, Atlanta, GA. April 30, 1976 "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts."
 7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
 8. CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011
 9. College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. Http://www.cap.org (800) 323-4040.
 10. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
 11. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques. Histochemistry 1987; 86:471-478.
 12. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Lab Med1983;14:767.
 13. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradishperoxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. AmJ Clin Path 1980;73:626.
 14. Herman GE and Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech & Histochem 1991;66:194.
 15. Zhang W, et al. PRAME expression and promoter hypermethylation in epithelial ovarian cancer. Oncotarget, 2016 Jul; 7(29):45352-69.
 16. Lezcano C, et al. PRAME expression in melanocytic tumors. Am J Surg Pathol. 2018 Nov; 42(11):1456-65.
- ekspresyonu. Ben J Surg Pathol . 2018 Kasım; 42(11):1456-65.

Ultraline antikorlar yalnızca Biocare Medical LLC tarafından geliştirilmiştir ve Biocare antikorlarının Ventana Medical Systems, Inc veya Roche tarafından onaylandığı veya onaylandığı anlamına gelmez . Biocare , Ventana ve Roche'un hiçbir şekilde bağlı, ilişkili veya ilişkili değildir. Ventana®, BenchMark ®, ultraView ve OptiView Roche'un ticari markalarıdır.

Biocare Medical LLC tarafından geliştirilmiştir ve Biocare antikorlarının Leica Biosystems tarafından onaylandığı veya onaylandığı anlamına gelmez . Biocare ve Leica Biosystems'in hiçbir şekilde bağlantılı, ilişkili veya ilişkili değildir. Leica, Leica Biosystems, BOND-MAX ve BOND-III, Leica Biosystems'in ticari markalarıdır.

Güvenlik ve performansın özetini burada bulabilirsiniz:
<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>.

 Biocare Medical

60 Berry Drive
Pacheco, CA 94553

USA

190/190



TP v3 (12/15/2021)

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080

 EMERGO EUROPE

Westervoortsedijk 60

6827 AT Arnhem

The Netherlands