

FLEX
Monoklonski mišji
Antimiogenin
 Klon F5D
Spreman za upotrebu
 (Dako Omnis)

Šifra GA067

- Namena** Za in vitro dijagnostičku upotrebu.
 FLEX monoklonski mišji antimiogenin, klon F5D, spreman za upotrebu (Dako Omnis), namenjen je za korišćenje u oblasti imunohistohemije (IHH) u kombinaciji sa instrumentom Dako Omnis. Ovo antitelo obeležava protein miogenin u normalnom i neoplastičnom tkivu fiksiranom u formalinu i ukalupljenom u parafinu (FFPE) i doprinosi klasifikaciji rabdomyosarkoma i Vilmsovog tumora (1). Rezultati panela antitela doprinose diferencijalnoj klasifikaciji. Kliničko tumačenje bojenja ili odsustva istog treba upotpuniti morfološkim studijama pomoću odgovarajućih kontrolnih uzoraka, a treba da ga sprovede kvalifikovani patolog u kontekstu kliničke istorije pacijenta i drugih izvršenih dijagnostičkih testova. Ovo antitelo je namenjeno za korišćenje nakon postavljanja primarne dijagnoze tumora na osnovu konvencionalne histopatologije uz korišćenje neimunoloških histohemijskih boja.
- Rezime i objašnjenje** Gen miogenin je član porodice miogenih regulatornih gena gde spadaju MyoD, myf5 i MRF4. Ovi geni kodiraju skup transkripcionih faktora koji su ključni za razvoj mišića. Pokazalo se da su transfekcije miogenina u multipotentne mezodermalne ćelije dovele do konverzije mezodermalnih ćelija u mioblaste (3-5). Ekspresija miogenina je ograničena na ćelije koje potiču od skeletnih mišića (3). Pokazalo se da protein miogenin postoji kao dimer ili tetramer ali je najčešće prisutan u kompleksima višeg reda (6).
 Pogledajte Opšta uputstva za imunohistohemijsko (IHH) bojenje kompanije Dako ili uputstva za detekcioni sistem za IHH procedure: Princip procedure; Potrebni materijali koji se ne isporučuju; Čuvanje; Priprema uzorka; Postupak bojenja; Kontrola kvaliteta; Identifikovanje i uklanjanje grešaka; Tumačenje bojenja; Opšta ograničenja.
- Dostavljeni reagens** Monoklonsko mišje antitelo spremno za upotrebu, u tečnom stanju u puferu koji sadrži stabilizujući protein i 0,015 mol/L natrijum-azida.
Klon: F5D (2). Izotip: IgG1, kapa.
- Imunogen** Peptid miogenina pacova (aa 73-94) konjugovao je u noseći protein i fuzioni peptid koji sadrži miogenin aa 30-224 (2).
- Specifičnost** Antitelo prepoznaje epitop smešten u regiji amino-kiselina 138-158 proteina miogenina i utvrđeno je da obeležava humani miogenin (2).
- Mere opreza**
1. Za in vitro dijagnostičku upotrebu.
 2. Za stručne korisnike.
 3. Ovaj proizvod sadrži natrijum-azid (NaN₃), izuzetno toksičnu hemikaliju u čistom obliku. U koncentracijama u kojima se nalazi u ovom proizvodu, iako nije klasifikovan kao opasan, natrijum-azid može da reaguje sa olovnim i bakarnim cevima i dovodi do nakupljanja izuzetno eksplozivnog taloga metalnih azida. Po odlaganju, isprati velikim količinama vode da se metalni azidi ne bi taložili u cevima.
 4. Kao i kod svih proizvoda dobijenih iz bioloških izvora, potrebno je primenjivati odgovarajuće procedure manipulacije.
 5. Nositi odgovarajuću ličnu zaštitnu opremu da ne bi došlo do kontakta sa očima i kožom.
 6. Nepotrošen rastvor treba da se odloži u skladu sa lokalnim, regionalnim i državnim propisima.
- Čuvanje** Čuvati na temperaturama 2–8 °C. Tokom čuvanja poklopac treba da bude zatvoren. Ne koristiti nakon datuma isteka roka utisnutog na bočici. Trajanje stabilnosti u instrumentu je 80 sati. Trajanje stabilnosti u instrumentu se prati softverom Dako Omnis. Ako se reagensi čuvaju u uslovima drugačijim od propisanih, korisnik mora da proveriti te uslove. Nema očiglednih znakova koji bi mogli da ukažu na nestabilnost ovog proizvoda. Zato je potrebno vršiti istovremenu pozitivnu i negativnu kontrolu nad uzorcima pacijenta. Ako se uoči neočekivano bojenje koje se ne može objasniti variranjem laboratorijskih procedura i ako se posumnja na problem sa antitelom, obratite se tehničkoj službi kompanije Dako.

Pregled protokola za bojenje*

| Korak | Reagens | Protokol |
|-------------------|--------------------------------------|--|
| Deparafinizacija | Clearify™ (šifra GC810) | Podrazumevano |
| Priprema | EnVision FLEX, High pH (šifra GV804) | Termički indukovano demaskiranje epitopa (HIER) u trajanju od 30 min |
| Primarno antitelo | Ready-to-Use (šifra GA067) | Inkubacija u trajanju od 15 min |

| | | |
|-----------------------------|--|---|
| Negativni kontrolni reagens | FLEX Negative Control, Mouse (šifra GA750) | Inkubacija u trajanju od 15 min |
| Vizuelizacija | EnVision FLEX (šifra GV800) | Blok: 3 min; Polimer: 20 min; Hromogen: 5 min |
| Kontrastno bojenje | Hematoxylin (šifra GC808) | Inkubacija u trajanju od 3 min |
| Pravljenje preparata | Potreban je bezvodni trajni preparat | Dehidriranje, razbistravanje i pravljenje trajnog aparata moraju da se izvrše nakon vađenja |
| Kontrola kvaliteta | Tkivo | Šema bojenja |
| Kontrolno tkivo | Rabdomiosarkom, ćelije tumora | Jedarsko, mogu se uočiti tragovi bojenja citoplazme |

*Korisnik mora obavezno da pročita uputstvo priloženo uz reagens koji će koristiti i da potraži detalje u Korisničkim priručnicima za Dako Omnis.

Priprema uzorka

Parafinski isečci: Antitelo može da se koristi za označavanje isečaka tkiva fiksiranih formalinom i uklopljenih u parafin. Isečeni uzorci tkiva treba da imaju debljinu 4 µm. Radi boljeg prianjanja isečaka tkiva za staklene pločice, preporučuje se korišćenje sredstva FLEX IHC Microscope Slides, šifra K8020.

Postupak bojenja

Deparafinizacija, demaskiranje cilja, imunohistohemijsko bojenje i kontrastno bojenje se vrše u uređaju Dako Omnis. Koraci bojenja i vremena inkubacije su preprogramirani u softveru uređaja Dako Omnis. Ako protokol nije dostupan u sistemu Dako Omnis, može da se preuzme sa adrese www.agilent.com, iz odeljka *Dako Omnis Protocol Update* (Ažuriranje protokola za Dako Omnis). Potražite detaljna uputstva o postavljanju pločica i reagenasa u osnovnom korisničkom priručniku za Dako Omnis.

Dako Omnis obezbeđuje da se isečci tkiva ne isuše u pripremnom procesu ili tokom procedure imunohistohemijskog bojenja.

Predtretman: Deparafinizacija FFPE isečaka tkiva se vrši koristeći Clearify™, šifra GC810. Preporučuje se demaskiranje cilja pomoću termički indukovano demaskiranja epitopa (HIER) koristeći razblaženi rastvor EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Dako Omnis).

Vizuelizacija: Za vizuelizaciju se preporučuje sistem EnVision FLEX, High pH (Dako Omnis), šifra GV800.

Kontrastno bojenje: Preporučena kontrastna boja je Hematoxylin (Dako Omnis), šifra GC808.

Pravljenje trajnog preparata: Nakon bojenja u uređaju Dako Omnis, isečci moraju da se dehidriraju, razbistre i stave na pločicu pomoću metode pravljenja trajnog preparata.

Kontrola kvaliteta

Pozitivna i negativna kontrolna tkiva i negativni reagens treba istovremeno obraditi prema istom protokolu koji je korišćen za uzorke pacijenta. Pozitivno kontrolno tkivo treba da sadrži rabdomiosarkom, a na ćelijama/strukturama treba da budu uočljive šeme reakcije opisane za ovo tkivo u odeljku „Radne odlike“. Preporučeni negativni kontrolni reagens je FLEX Negative Control, Mouse (Dako Omnis), šifra GA750.

Tumačenje bojenja

Šema ćelijskog bojenja je jedarska. Mogu se uočiti tragovi bojenja citoplazme.

Radne odlike

Normalna tkiva: Pri testiranju normalnog tkiva nije uočeno nikakvo bojenje (7).

Reaktivnost normalnog tkiva (7).








| Tip tkiva (br. testiranih) | Pozitivni elementi tkiva | Tip tkiva (br. testiranih) | Pozitivni elementi tkiva |
|----------------------------|--------------------------|---|--------------------------|
| Adrenalno (3) | 0/3 | Oblažuće ćelije (uzorci zida grudnog koša, trbušnog zida, perikardijuma, gastrointestinalne površine, srca i/ili pluća) (3) | 0/3 |
| Bubreg (3) | 0/3 | Pankreas (3) | 0/3 |
| Cerviks (3) | 0/3 | Paratireoida (3) | 0/3 |
| Debelo crevo (3) | 0/3 | Periferni nerv (3) | 0/3 |
| Dojka (3) | 0/3 | Pijuvućna žlezda (3) | 0/3 |
| Ezofagus (3) | 0/3 | Plućno krilo (3) | 0/3 |
| Hipofiza (3) | 0/3 | Prostata (3) | 0/3 |
| Jajnik (3) | 0/3 | Skeletni mišić (3) | 0/3 |
| Jetra (3) | 0/3 | Slezina (3) | 0/3 |
| Koštana srž (3) | 0/3 | Srce (3) | 0/3 |
| Koža (3) | 0/3 | Tanko crevo (3) | 0/3 |
| Krajnik (3) | 0/3 | Testis (3) | 0/3 |
| Materica (3) | 0/3 | Timus (3) | 0/3 |
| Mozak, cerebellum (3) | 0/3 | Tireoidea (3) | 0/3 |
| Mozak, cerebrum (3) | 0/3 | Želudac (3) | 0/3 |

Abnormalna tkiva: Rabdomiosarkomi 30/33 i Vilmsov tumor 1/1 obeleženi antitelom. Imunoreaktivnost nije zabeležena kod Evingovog sarkoma/pPNET 0/26 ili neuroblastoma 0/12 (1).

Reference

1. Wang NP, Marx J, McNutt MA, Rutledge JC, Gown Am. Expression of myogenic regulatory proteins (myogenin and MyoD1) in small blue round cell tumors of childhood. Am J Pathol 1995; 147: 1799-810.
2. Wright WE, Dac-Korytko I, Farmer K. Monoclonal antimyogenin antibodies define epitopes outside the bHLH domain where binding interferes with protein-protein and protein-DNA interaction. Dev Genet 1996; 19:131-8.
3. Wright WE, Sassoon DA, Lin VK. Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. Cell 1989; 56:607-17.
4. Auradé F, Pinset C, Chafey P, Gros F, Monterras D. Myf5, MyoD, myogenin and MRF4 myogenic derivatives of the embryonic mesenchymal cell line C3H10T1/2 exhibit the same adult muscle phenotype. Differentiation 1994; 55:185-92.
5. Weintraub H, Davis R, Tapscott S, Thayer M, Krause M, Benezra R, et al. The *myoD* gene family: Nodal point during specification of the muscle cell lineage. Science 1991; 251:761-6.
6. Farmer K, Catala F, Wright WE. Alternative multimeric structures affect myogenin DNA binding activity. J Biol Chem 1992; 267:5631-6.
7. Dako in-house test. Report D39623.

Objašnjenje simbola

| | | | | | |
|---|--|---|-------------------------|---|------------|
|  REF | Broj kataloga |  2°C - 8°C | Ograničenja temperature |  | Proizvođač |
|  IVD | Medicinski uređaj za in vitro dijagnostiku |  LOT | Kôd serije | | |
|  i | Pročitajte uputstvo za upotrebu |  | Upotrebljivo do | | |

Izdanje 11. 2016.

Manufactured by:
Dako North America, Inc.

Manufactured for:
Dako Denmark A/S
Produktionsvej 42
DK-2600 Glostrup
Denmark
Tel. +45 44 85 95 00
Fax +45 44 85 95 95