

CD68 (Kp-1) Mouse Monoclonal Antibody

Para Diagnóstico In Vitro (IVD)

Identificación del Producto

REF	Descripción
168M-94	0,1 ml concentrado
168M-95	0,5 ml concentrado
168M-96	1,0 ml concentrado
168M-97	1,0 ml prediluido listo para usar
168M-98	7,0 ml prediluido listo para usar

Definiciones de los Símbolos

KEY-CODE	código
P	prediluir
C	concentrado
A	ascitis
E	suero
S	sobrenadante
DIL	rango de dilución del concentrado

Uso Previsto

Este anticuerpo está destinado para uso diagnóstico *in vitro* (IVD).

CD68 (Kp-1) Mouse Monoclonal Primary Antibody está diseñado para el uso en la detección de la glicoproteína CD68 en tejido fijado con formol e incluido en parafina teñido en una prueba de inmunohistoquímica (IHC) cualitativa.

Los resultados obtenidos con el uso de este producto junto con la historia clínica relevante del paciente, otras pruebas diagnósticas y controles adecuados debe interpretarlos un patólogo cualificado.

Resumen y Explicación

El anti-CD68 marca líneas de células de monocitos/macrófagos. Este anticuerpo es capaz de teñir monocitos, células de Kupffer, osteoclastos, granulocitos y sus precursores; los linfomas son negativos o muestran unos pocos gránulos. Este anticuerpo puede ser útil para la identificación de tumores mielomonocíticos e histiocíticos. Sin embargo, por el hecho de que detecta un epítipo resistente a la formalina que puede estar asociado a gránulos lisosomales, otras células ricas en lisosomas pueden también teñir.¹⁻³

Principios y Procedimientos

El anticuerpo primario indicado puede utilizarse como anticuerpo primario para la tinción inmunohistoquímica de cortes de tejido fijado con formol y embebido en parafina. En general, la tinción inmunohistoquímica junto con el sistema de detección mediante unión con peroxidasa de rábano (HRP) o fosfatasa alcalina permite la visualización de antígenos a través de la aplicación secuencial de un anticuerpo específico (anticuerpo primario) al antígeno, un anticuerpo secundario (anticuerpo de unión) al anticuerpo primario, un complejo enzimático y un sustrato cromogénico con etapas de lavado intermedias. La activación enzimática del cromógeno da lugar a un producto de reacción visible en el sitio del antígeno. La muestra puede entonces contrateñirse y aplicarse un cubreobjetos. Los resultados se interpretan con un microscopio óptico.

Materiales y Métodos

Reactivos Suministrados

Composición del Producto	
Prediluir: diluido en	Amortiguador Tris, pH 7,3-7,7, con un 1% de BSA y <0,1% de azida de sodio
Concentrado: diluido en	Amortiguador Tris, pH 7,3-7,7, con un 1% de BSA y <0,1% de azida de sodio
Host	ratón
Isotipo	IgG ₁ /k
Intervalo de dilución de trabajo recomendado	1:100-1:500
Fuente	sobrenadante

Vea la etiqueta del producto para información específica sobre el lote acerca de lo siguiente:

1. Concentración de anticuerpos de inmunoglobulina
2. Detalles de la fuente

Reconstitución, Mezcla, Dilución y Titulación

El anticuerpo prediluido está listo para usar y optimizado para la tinción. El anticuerpo concentrado está optimizado para diluirlo en el rango de dilución con Cell Marque Diamond Antibody Diluent.

Materiales y Reactivos Necesarios No Suministrados

Los siguientes reactivos y materiales pueden ser necesarios para la tinción, pero no se incluyen con el anticuerpo primario:

1. Tejido de control positivo y negativo
2. Portaobjetos para microscopio con carga positiva
3. Horno de secado capaz de mantener una temperatura de 53-65 °C

4. Cubetas o baños de tinción

5. Cronómetro

6. Xileno o sustituto de xileno

7. Alcohol reactivo o etanol

Nota: El tratamiento previo de un paso de Cell Marque, Trilogy™ (N.º de catálogo 920P-06), puede sustituir los elementos de los puntos 6 y 7 anteriores.

8. Agua desionizada o destilada

9. Equipo de calentamiento, como la olla de presión eléctrica para el paso del tratamiento previo del tejido

10. Sistema de detección como HiDef Detection™ HRP Polymer System (N.º de catálogo 954D-20) o HiDef Detection™ Alk Phos Polymer System (N.º de catálogo 962D-20)

11. Cromógeno, como DAB Substrate Kit (N.º de catálogo 957D-20) o Permanent Red Chromogen Kit (N.º de catálogo 960D-10)

12. TBS IHC Wash Buffer + Tween® 20 (N.º de catálogo 935B-09)

13. Hematoxylin u otra contratinción

14. Diluyentes de anticuerpo, como Diamond: Antibody Diluent (N.º de catálogo 938B-05) o Emerald: Antibody Diluent (N.º de catálogo 936B-08)

15. Peroxide Block (N.º de catálogo 925B-05) para usar con HRP

16. Avidin-Biotin Blocking Reagents para usar con detección con estreptavidina-biotina

17. Negative Control Reagent (N.º de catálogo 939B-02 para universal)

18. Mounting Medium

19. Cubreobjetos

20. Microscopio óptico (40-400x)

Conservación y Manipulación

Almacenar a 2-8 °C. No congelar.

Para garantizar la dispensación adecuada del reactivo y la estabilidad del anticuerpo, tras cada utilización se debe volver a poner el tapón y almacenar el frasco inmediatamente en la nevera, en posición vertical.

Todos los reactivos de anticuerpo tienen una fecha de caducidad. El reactivo es estable hasta la fecha indicada en la etiqueta siempre que se almacene correctamente. No usar el reactivo después de la fecha de caducidad para el método de almacenamiento descrito.

No hay signos definitivos que indiquen la inestabilidad de este producto, por lo que los controles positivos y negativos deben analizarse simultáneamente con muestras desconocidas. Contacte con el servicio técnico de Cell Marque si tiene sospechas sobre la inestabilidad del reactivo.

Extracción y Preparación de la Muestra para su Análisis

Cuando se utiliza el procedimiento habitual, los tejidos fijados en formol en tampón neutro y embebidos en parafina resultan adecuados para el uso con este anticuerpo primario cuando se utiliza con los kits de detección de Cell Marque (consulte la sección Materiales y reactivos necesarios no suministrados). Nota: Cell Marque evalúa el resultado solo en tejidos humanos. El fijador de tejido recomendado es formalina tamponada neutral 10%. Pueden tener lugar resultados variables como consecuencia de una fijación prolongada o procesos especiales tales como la decalcificación en la preparación de la médula ósea.

Cada sección debe cortarse con el grosor apropiado (aproximadamente 3 µm) y colocarse en un portaobjetos de vidrio con carga positiva. Los portaobjetos que contienen el corte de

tejido pueden secarse durante al menos 2 horas (pero no más de 24 horas) en un horno a una temperatura de 53-65 °C.

Advertencias y Precauciones

1. Adopte las precauciones adecuadas cuando se manipulen los reactivos. Usar guantes y batas de laboratorio desechables cuando se manipulen materiales potencialmente carcinógenos o tóxicos (como xileno).
2. Evite el contacto de los reactivos con los ojos y las membranas mucosas. Si se produce el contacto con áreas sensibles, lávese con agua abundante.
3. Las muestras del paciente y todos los materiales en contacto con ellas deben tratarse como si fuesen materiales potencialmente infecciosos y desecharse con las precauciones adecuadas. Nunca pipetear con la boca.
4. Evitar la contaminación microbiana de los reactivos, ya que podrían producirse resultados incorrectos.
5. El usuario debe validar los tiempos y temperaturas de incubación.
6. Los reactivos prediluidos listos para usar están diluidos óptimamente por lo que una dilución adicional podría producir la pérdida de tinción del antígeno.
7. Los reactivos concentrados pueden diluirse óptimamente en base a la determinación del usuario. El usuario deberá validar igualmente tanto la compatibilidad como el efecto en la estabilidad de cualquier disolvente utilizado que no esté recomendado específicamente en este documento.
8. Este producto no se clasifica como sustancia peligrosa cuando se usa según las instrucciones. El conservante del reactivo es inferior al 0,1% de ácido fólico y no cumple los criterios de la OSHA para sustancias peligrosas a la concentración indicada. Consulte la hoja de datos de seguridad de los materiales.
9. El usuario debe validar cualquier condición de almacenamiento que no sea una de las especificadas en el prospecto.
10. El disolvente puede incluir albúmina de suero bovino y el sobrenadante puede contener suero bovino. Los productos que contienen suero fetal bovino y los productos que contienen albúmina de suero bovino se compran a los proveedores comerciales. Los certificados de origen de la fuente animal utilizada en estos productos obran en el archivo de Cell Marque. Los certificados aseguran que las fuentes bovinas provienen de países con riesgo mínimo de BSE y relacionan como fuentes de bovinos EE. UU. y Canadá.
11. Como con cualquier producto proveniente de fuentes biológicas, deberán emplearse procedimientos de manipulación apropiados.

Instrucciones de Uso

Protocolos de tinción recomendados para el anticuerpo primario indicado:

HiDef HRP:

HiDef Detection™ HRP Polymer System (N.º de catálogo 954D-20)

1. Técnica de recuperación del epítipo: HIER, Reactivo para la recuperación del epítipo: Trilogy
2. Tiempo de incubación de anticuerpo (minutos): 10-30
3. Tiempo de incubación de HiDef Detection Amplifier (minutos): 10
4. Tiempo de incubación de HiDef Detection Polymer Detector (minutos): 10
5. Tiempo de incubación de DAB (minutos): 1-10

6. Deshidrate y cubra el portaobjetos.

HiDef Alk Phos:

HiDef Detection™ Alk Phos Polymer System (N.º de catálogo 9620-20)

1. Técnica de recuperación del epítipo: HIER, Reactivo para la recuperación del epítipo: Trilogy
2. Tiempo de incubación de anticuerpo (minutos): 10-30
3. Tiempo de incubación de HiDef Detection Amplifier (minutos): 10
4. Tiempo de incubación de HiDef Detection Polymer Detector (minutos): 10
5. Tiempo de incubación de Permanent Red (minutos): 15-30
6. Deshidrate y cubra el portaobjetos.

Procedimientos de Control de Calidad

Control de Tejido Positivo

Cada vez que se realice el procedimiento de tinción, debe procesarse un control positivo del tejido. Este tejido puede contener células o componentes del tejido de tinción positiva y negativa y servir como tejido de control positivo y negativo. Los tejidos de control deben ser muestras frescas de autopsia, biopsia o cirugía preparadas o fijadas con la mayor brevedad con un proceso idéntico al de los cortes en estudio. El uso de un corte de tejido fijado o procesado de forma diferente a la muestra en estudio servirá para el control de todos los reactivos y pasos del método excepto la fijación y el procesamiento del tejido.

Un tejido con una tinción positiva débil es más adecuado para un control de calidad óptimo y para detectar niveles pequeños de degradación del reactivo. El control de tejido positivo para el anticuerpo primario indicado puede incluir lo siguiente:

Control de Tejido Positivo	
Tejido	Visualización
Amígdalas	Citoplasmática, Membranoso

Los controles de tejido positivos conocidos solo se deben usar para monitorizar el comportamiento correcto de los tejidos procesados y los reactivos de la prueba, y no como ayuda para establecer un diagnóstico específico de las muestras del paciente. Si los controles positivos del tejido no muestran una tinción positiva apropiada, los resultados de las muestras en estudio se deben considerar no válidos.

Control de Tejido Negativo

El mismo tejido utilizado para el control de tejido positivo se puede utilizar en el control de tejido negativo. La variedad de tipos de células presentes en la mayoría de los cortes de tejidos ofrece sitios de control negativo internos, pero esto debe verificarlo el usuario. Los componentes que no se tiñen deben demostrar la ausencia de tinción específica y proporcionar una indicación de tinción de fondo no específica. Si se produce una tinción específica en los sitios de control de tejido negativo, los resultados obtenidos con las muestras del paciente deben considerarse no válidas.

Discrepancias Inexplicables

Las discrepancias inexplicables de los controles deben remitirse de inmediato al servicio técnico de Cell Marque. Si los resultados del control de calidad no cumplen las especificaciones, los resultados del paciente no son válidos. Véase la sección Resolución de

problemas de este prospecto. Identifique y corrija el problema; a continuación, repita todo el procedimiento con las muestras del paciente.

Reactivo de Control Negativo

Se debe utilizar un reactivo de control negativo para cada muestra para ayudar a interpretar los resultados. Para evaluar una tinción no específica se utiliza un reactivo de control negativo en lugar del anticuerpo primario. Se deberá tratar el portaobjetos con el reactivo de control negativo haciendo coincidir las especies huéspedes del anticuerpo primario e idéneamente con la misma concentración de IgG. El periodo de incubación para el reactivo de control negativo deberá ser igual que el periodo de incubación del anticuerpo primario.

Interpretación de los Resultados

El procedimiento de inmunotinción causa la precipitación de un producto de reacción coloreado en los sitios del antígeno localizados por el anticuerpo primario. Consulte en el prospecto correspondiente del sistema de detección las reacciones de color esperadas. Un patólogo cualificado experimentado en procedimientos de inmunohistoquímica debe evaluar los controles de tejido positivos y negativos antes de interpretar los resultados.

Control de Tejido Positivo

El control de tejido positivo teñido debe examinarse primero para determinar que todos los reactivos funcionan adecuadamente. La presencia de un producto de reacción con el color adecuado dentro de las células diana es indicativa de una reactividad positiva. Consulte en el prospecto del sistema de detección utilizado las reacciones de color esperadas. Según sea la duración de la incubación y la potencia de la hematoxilina empleada, la contratinción dará como resultado una coloración azul de pálida a oscura de los núcleos celulares. Una contratinción excesiva o incompleta puede comprometer la interpretación adecuada de los resultados. Si los controles de tejidos positivos no muestran una tinción positiva apropiada, los resultados de las muestras en estudio se deben considerar no válidos.

Control de Tejido Negativo

El control de tejido negativo debe examinarse después del control de tejido positivo para verificar la marcación específica del antígeno diana por el anticuerpo primario. La ausencia de tinción específica en el control de tejido negativo confirma la ausencia de reactividad cruzada del anticuerpo con las células o los componentes celulares. Si se produce una tinción específica en el control de tejido negativo, los resultados obtenidos con la muestra del paciente se consideran no válidos. La tinción no específica, si la hay, tendrá un aspecto difuso. También se puede observar una ligera tinción específica esporádica del tejido conjuntivo en cortes de tejidos que no estén fijados óptimamente. Para la interpretación de los resultados de la tinción deben usarse células intactas. Las células necróticas o degeneradas muestran una tinción no específica.

Tejido del Paciente

Las muestras del paciente se deben examinar al final. La intensidad de la tinción positiva se debe valorar en el contexto de cualquier tinción de fondo del control de reactivo negativo. Como en cualquier prueba de inmunohistoquímica, un resultado negativo significa que el antígeno en cuestión no se ha detectado, no que el antígeno esté ausente de las células o del tejido analizado. Un panel de anticuerpos puede ayudar a identificar reacciones negativas falsas (consulte la sección Sumario de resultados esperados). La morfología de cada muestra del tejido también debe examinarse utilizando un corte con tinción de hematoxilina y eosina al interpretar cualquier resultado de inmunohistoquímica. Un patólogo cualificado debe interpretar los resultados morfológicos del paciente y sus datos clínicos pertinentes.

Limitaciones

- El color del anticuerpo no afecta lo funcionamiento.
- Este reactivo es "de exclusivo uso profesional", ya que la inmunohistoquímica es un proceso diagnóstico de varias etapas que requiere una formación especializada en la selección de los reactivos, tejidos, fijación y procesamiento apropiados; la preparación del portaobjetos de inmunohistoquímica y la interpretación de los resultados de la tinción.
- Para uso exclusivo de laboratorio.
- Para diagnóstico *in vitro*.
- La tinción de los tejidos depende de la manipulación y el procesamiento de los mismos antes de la tinción. Una fijación, congelación, descongelación, lavado, secado, calentado o corte inadecuados o la contaminación con otros tejidos o líquidos puede producir artefactos, bloqueo del anticuerpo o resultados falsos negativos. Los resultados inconsistentes pueden ser consecuencia de las variaciones en los métodos de fijación y embebido, así como de irregularidades inherentes dentro del tejido.
- Una contratinción excesiva o incompleta puede comprometer la interpretación adecuada de los resultados.
- La interpretación clínica de una tinción positiva o de su ausencia debe evaluarse en el contexto de la historia clínica, la morfología, otros criterios histopatológicos, así como otras pruebas diagnósticas. Este anticuerpo está diseñado para utilizarlo en un panel de anticuerpos si fuera pertinente. Es responsabilidad de un patólogo cualificado familiarizarse con los anticuerpos, reactivos, paneles de diagnóstico y métodos usados para obtener una preparación con tinción. La tinción se debe realizar en un laboratorio certificado con la supervisión de un anatomopatólogo responsable de la revisión de los portaobjetos teñidos y de la verificación de la idoneidad de los controles negativos y positivos.
- Cell Marque provee anticuerpos y reactivos en una dilución óptima para usar como se indica. Cualquier desviación de los procedimientos recomendados del método puede invalidar los resultados esperados. Se deben utilizar y documentar los controles apropiados. Los usuarios deben asumir en cualquier caso la responsabilidad de la interpretación de los resultados del paciente.
- Cell Marque provee los anticuerpos primarios en formato concentrado de manera que el usuario pueda diluirlos después óptimamente para usarlos según determine y observando las técnicas de validación adecuadas. Los usuarios deben validar el uso de cualquier disolvente que no se recomiende en este documento. Una vez que el anticuerpo primario haya sido validado como adecuado para usar, cualquier desviación de los procedimientos de prueba recomendados puede invalidar los resultados esperados. Se deben utilizar y documentar los controles apropiados. Los usuarios deben asumir en cualquier caso la responsabilidad de la interpretación de los resultados del paciente.
- Este producto no está diseñado para utilizarlo en citometría de flujo.
- Los reactivos pueden mostrar reacciones inesperadas en tejidos no estudiados previamente. No puede excluirse completamente la posibilidad de reacciones inesperadas, incluso en grupos de tejidos analizados, debido a la variabilidad biológica de la expresión del antígeno en neoplasmas u otros tejidos patológicos. Póngase en contacto con el servicio técnico de Cell Marque si sospecha que ha habido una reacción inesperada documentada.
- Los tejidos de personas infectadas con el virus de la hepatitis B y que contengan antígeno de superficie (HBsAg) pueden mostrar una tinción no específica con peroxidasa de rábano.
- Cuando se utilizan en pasos de bloqueo, los sueros normales procedentes del mismo origen animal que los antisueros secundarios pueden provocar resultados de falsos negativos o falsos positivos debido al efecto de los autoanticuerpos o anticuerpos naturales.

- Pueden verse resultados de falsos positivos debido a la unión de proteínas o productos de reacción del sustrato por mecanismos no inmunológicos. También pueden estar causados por la actividad de la pseudoperoxidasa (eritrocitos), actividad de la peroxidasa endógena (citocromo C) o biotina endógena (ejemplo: hígado, cerebro, mama, riñón) dependiendo del tipo de técnica de inmunotinción empleada.
- Como en cualquier prueba de inmunohistoquímica, un resultado negativo significa que el antígeno no se ha detectado, no que el antígeno esté ausente de las células o del tejido analizado.
- Los productos de anticuerpo prediluidos están optimizados como productos listos para usar. Debido a la posibilidad de variaciones en la fijación y procesamiento del tejido, puede ser necesario aumentar o reducir el tiempo de incubación del anticuerpo primario en muestras individuales.
- El anticuerpo, en combinación con sistemas de detección y sus accesorios, detecta los antígenos que sobreviven al proceso habitual de fijación con formol, procesamiento y corte del tejido. Los usuarios que se desvíen de los procedimientos de prueba recomendados son responsables, como lo serían en cualquier caso, de la interpretación y validación de los resultados del paciente.

Sumario de Resultados Esperados

Consulte las siguientes tablas de reactividad:

Estudio Normal			
Tejido	N.º Teñido (+)	N.º Total	Notas
Cerebro	1	1	
Córtex adrenal	0	1	
Ovarios	0	1	
Páncreas	0	2	
Paratiroides	0	1	
Pituitaria	1	1	
Testículos	0	1	
Tiroides	0	1	
Pecho	0	2	
Bazo	1	1	
Amígdalas	5	5	
Timo	0	1	
Médula ósea	2	2	
Pulmones	0	2	
Corazón	0	1	
Esófago	0	1	
Estómago	0	1	
Intestino delgado	0	1	

Estudio Normal			
Tejido	N.º Teñido (+)	N.º Total	Notas
Colon	0	1	
Hígado	0	1	
Glándula salival	0	1	
Vesícula biliar	1	1	
Riñones	0	1	
Vejiga	0	1	
Próstata	0	2	
Útero	0	2	
Trompas de Falopio	0	1	
Uréter	0	1	
Cérvix	0	1	
Músculos del esqueleto	0	2	
Músculo liso	0	4	
Piel	0	1	
Nervios periféricos	0	1	
Mesotelio	0	1	
Grasa	0	1	
Placenta	0	1	

Este anticuerpo tiñe tejidos normales como está indicado en la literatura.

Estudio de la Enfermedad del Tejido			
Tejido	N.º Teñido (+)	N.º Total	Notas
Leucemia mieloide aguda	2	2	
Histiocitosis de células de Langerhans	2	2	
Sarcoma de células dendríticas foliculares	1	1	
Carcinoma ductal invasivo de mama	0	21	
Adenocarcinoma de colon	0	23	

Este anticuerpo tiñe tumores como está indicado en la literatura.

Resolución de Problemas

1. Si el control positivo muestra una tinción más débil de la esperada, deben analizarse otros controles positivos realizados en la misma tinción para determinar si se debe al anticuerpo primario o a uno de los reactivos secundarios comunes.
2. Si el control positivo da negativo, se deben analizar otros controles positivos usados en la misma ejecución para determinar si se debe al anticuerpo primario o a uno de los reactivos secundarios comunes. Los tejidos pueden haberse recogido, fijado o desparafinado de manera inadecuada. Deberá seguirse el procedimiento adecuado para la recogida, la conservación y la fijación.
3. Si se produce una tinción de fondo excesiva, pueden haber niveles altos de biotina endógena. Se deberá incluir una etapa de bloqueo con biotina a no ser que se esté utilizando un sistema de detección sin biotina, en cuyo caso ninguna biotina presente sería un factor que contribuyera a la tinción de fondo.
4. Si no se ha eliminado toda la parafina deberá repetirse el procedimiento de desparafinación.
5. Si los cortes de tejido lavan el portaobjetos, deben comprobarse los mismos para garantizar que tienen carga positiva. Otras posibilidades que podrían afectar adversamente a la adhesión del tejido incluyen un secado insuficiente del corte de tejido en el portaobjetos antes de la tinción o fijación en formol que no fuera neutralizado con tampón apropiadamente. El grosor del tejido también puede ser un factor causante.

Para conocer la acción correctiva, consulte la sección de las instrucciones de uso o contacte con el servicio técnico de Cell Marque a través de techsupport@cellmarque.com.

Bibliografía

1. Holness CL, et al. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood*. 1993; 81:1607-13.
2. Leong A, et al. Manual of Diagnostic Antibodies for Immunohistochemistry. Greenwich Medical Media Ltd. 2003; p.135-6.
3. Lau SK, et al. CD163: a specific marker of macrophages in paraffin-embedded tissue samples. *Am J Clin Pathol*. 2004; 122:794-801.

Limitaciones de Responsabilidad

*TWEEN es una marca registrada de Croda International PLC.

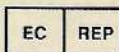
©2017 Sigma-Aldrich Co. LLC. Todos los derechos reservados. SIGMA-ALDRICH es una marca comercial de Sigma-Aldrich Co. LLC, registrada en EE. UU. y en otros países. Cell Marque, Trilogy, Declere y HiDef Detection son marcas comerciales de Sigma-Aldrich Co. LLC o de sus filiales.



www.cellmarque.com



6500 Sierra College Blvd. • Rocklin, CA 95677 USA • 916-746-8900



EMERGO EUROPE
Prinsessegracht 20, 2514 AP The Hague, The Netherlands



CM Template #2.4
Implementation date 11 Nov 2017

CD79a (JCB117) Mouse Monoclonal Antibody

Para Diagnóstico In Vitro (IVD)

Identificación del Producto

REF	Descripción
179M-94	0,1 ml concentrado
179M-95	0,5 ml concentrado
179M-96	1,0 ml concentrado
179M-97	1,0 ml prediluido listo para usar
179M-98	7,0 ml prediluido listo para usar

Definiciones de los Símbolos

KEY-CODE	código
P	prediluir
C	concentrado
A	ascitis
E	suero
S	sobrenadante
DIL	rango de dilución del concentrado

Uso Previsto

Este anticuerpo está destinado para uso diagnóstico *in vitro* (IVD).

CD79a (JCB117) Mouse Monoclonal Primary Antibody está diseñado para el uso en la detección de la proteína CD79a en tejido fijado con formol e incluido en parafina teñido en una prueba de inmunohistoquímica (IHC) cualitativa.

Los resultados obtenidos con el uso de este producto junto con la historia clínica relevante del paciente, otras pruebas diagnósticas y controles adecuados debe interpretarlos un patólogo cualificado.

Resumen y Explicación

La CD79 es una proteína de membrana dimerica con dos cadenas de componentes diferentes: CD79a y CD79b.¹⁻³ CD79a se expresa en células B desde la fase pro-B hasta la fase de diferenciación de células B.² CD79a es útil como marcador en neoplasias de células B.¹⁻³

Principios y Procedimientos

El anticuerpo primario indicado puede utilizarse como anticuerpo primario para la tinción inmunohistoquímica de cortes de tejido fijado con formol y embebido en parafina. En general, la tinción inmunohistoquímica junto con el sistema de detección mediante unión con peroxidasa de rábano (HRP) o fosfatasa alcalina permite la visualización de antígenos a través de la aplicación secuencial de un anticuerpo específico (anticuerpo primario) al antígeno, un anticuerpo secundario (anticuerpo de unión) al anticuerpo primario, un complejo enzimático y un sustrato cromogénico con etapas de lavado intermedias. La activación enzimática del cromógeno da lugar a un producto de reacción visible en el sitio del antígeno. La muestra puede entonces contrateñirse y aplicarse un cubreobjetos. Los resultados se interpretan con un microscopio óptico.

Materiales y Métodos

Reactivos Suministrados

Composición del Producto	
Prediluir: diluido en	Amortiguador Tris, pH 7,3-7,7, con un 1% de BSA y <0,1% de azida de sodio
Concentrado: diluido en	Amortiguador Tris, pH 7,3-7,7, con un 1% de BSA y <0,1% de azida de sodio
Host	ratón
Isotipo	IgG ₁ /k
Intervalo de dilución de trabajo recomendado	1:100-1:500
Fuente	sobrenadante

Vea la etiqueta del producto para información específica sobre el lote acerca de lo siguiente:

1. Concentración de anticuerpos de inmunoglobulina
2. Detalles de la fuente

Reconstitución, Mezcla, Dilución y Titulación

El anticuerpo prediluido está listo para usar y optimizado para la tinción. El anticuerpo concentrado está optimizado para diluirlo en el rango de dilución con Cell Marque Diamond Antibody Diluent.

Materiales y Reactivos Necesarios No Suministrados

Los siguientes reactivos y materiales pueden ser necesarios para la tinción, pero no se incluyen con el anticuerpo primario:

1. Tejido de control positivo y negativo
2. Portaobjetos para microscopio con carga positiva
3. Horno de secado capaz de mantener una temperatura de 53-65 °C

4. Cubetas o baños de tinción

5. Cronómetro

6. Xileno o sustituto de xileno

7. Alcohol reactivo o etanol

Nota: El tratamiento previo de un paso de Cell Marque, Trilogy™ (N.º de catálogo 920P-06), puede sustituir los elementos de los puntos 6 y 7 anteriores.

8. Agua desionizada o destilada

9. Equipo de calentamiento, como la olla de presión eléctrica para el paso del tratamiento previo del tejido

10. Sistema de detección como HiDef Detection™ HRP Polymer System (N.º de catálogo 954D-20) o HiDef Detection™ Alk Phos Polymer System (N.º de catálogo 962D-20)

11. Cromógeno, como DAB Substrate Kit (N.º de catálogo 957D-20) o Permanent Red Chromogen Kit (N.º de catálogo 960D-10)

12. TBS IHC Wash Buffer + Tween® 20 (N.º de catálogo 935B-09)

13. Hematoxylin u otra contratinción

14. Diluyentes de anticuerpo, como Diamond: Antibody Diluent (N.º de catálogo 938B-05) o Emerald: Antibody Diluent (N.º de catálogo 936B-08)

15. Peroxide Block (N.º de catálogo 925B-05) para usar con HRP

16. Avidin-Biotin Blocking Reagents para usar con detección con estreptavidina-biotina

17. Negative Control Reagent (N.º de catálogo 939B-02 para universal)

18. Mounting Medium

19. Cubreobjetos

20. Microscopio óptico (40-400x)

Conservación y Manipulación

Almacenar a 2-8 °C. No congelar.

Para garantizar la dispensación adecuada del reactivo y la estabilidad del anticuerpo, tras cada utilización se debe volver a poner el tapón y almacenar el frasco inmediatamente en la nevera, en posición vertical.

Todos los reactivos de anticuerpo tienen una fecha de caducidad. El reactivo es estable hasta la fecha indicada en la etiqueta siempre que se almacene correctamente. No usar el reactivo después de la fecha de caducidad para el método de almacenamiento descrito.

No hay signos definitivos que indiquen la inestabilidad de este producto, por lo que los controles positivos y negativos deben analizarse simultáneamente con muestras desconocidas. Contacte con el servicio técnico de Cell Marque si tiene sospechas sobre la inestabilidad del reactivo.

Extracción y Preparación de la Muestra para su Análisis

Cuando se utiliza el procedimiento habitual, los tejidos fijados en formol en tampón neutro y embebidos en parafina resultan adecuados para el uso con este anticuerpo primario cuando se utiliza con los kits de detección de Cell Marque (consulte la sección Materiales y reactivos necesarios no suministrados). Nota: Cell Marque evalúa el resultado solo en tejidos humanos. El fijador de tejido recomendado es formalina tamponada neutral 10%. Pueden tener lugar resultados variables como consecuencia de una fijación prolongada o procesos especiales tales como la descalcificación en la preparación de la médula ósea.

Cada sección debe cortarse con el grosor apropiado (aproximadamente 3 µm) y colocarse en un portaobjetos de vidrio con carga positiva. Los portaobjetos que contienen el corte de

tejido pueden secarse durante al menos 2 horas (pero no más de 24 horas) en un horno a una temperatura de 53-65 °C.

Advertencias y Precauciones

1. Adopte las precauciones adecuadas cuando se manipulen los reactivos. Usar guantes y batas de laboratorio desechables cuando se manipulen materiales potencialmente carcinógenos o tóxicos (como xileno).
2. Evite el contacto de los reactivos con los ojos y las membranas mucosas. Si se produce el contacto con áreas sensibles, lávese con agua abundante.
3. Las muestras del paciente y todos los materiales en contacto con ellas deben tratarse como si fuesen materiales potencialmente infecciosos y desecharse con las precauciones adecuadas. Nunca pipetear con la boca.
4. Evitar la contaminación microbiana de los reactivos, ya que podrían producirse resultados incorrectos.
5. El usuario debe validar los tiempos y temperaturas de incubación.
6. Los reactivos prediluidos listos para usar están diluidos óptimamente por lo que una dilución adicional podría producir la pérdida de tinción del antígeno.
7. Los reactivos concentrados pueden diluirse óptimamente en base a la determinación del usuario. El usuario deberá validar igualmente tanto la compatibilidad como el efecto en la estabilidad de cualquier disolvente utilizado que no esté recomendado específicamente en este documento.
8. Este producto no se clasifica como sustancia peligrosa cuando se usa según las instrucciones. El conservante del reactivo es inferior al 0,1% de ácido sódico y no cumple los criterios de la OSHA para sustancias peligrosas a la concentración indicada. Consulte la hoja de datos de seguridad de los materiales.
9. El usuario debe validar cualquier condición de almacenamiento que no sea una de las especificadas en el prospecto.
10. El disolvente puede incluir albúmina de suero bovino y el sobrenadante puede contener suero bovino. Los productos que contienen suero fetal bovino y los productos que contienen albúmina de suero bovino se compran a los proveedores comerciales. Los certificados de origen de la fuente animal utilizada en estos productos obran en el archivo de Cell Marque. Los certificados aseguran que las fuentes bovinas provienen de países con riesgo mínimo de BSE y relacionan como fuentes de bovinos EE. UU. y Canadá.
11. Como con cualquier producto proveniente de fuentes biológicas, deberán emplearse procedimientos de manipulación apropiados.

Instrucciones de Uso

Protocolos de tinción recomendados para el anticuerpo primario indicado:

HiDef HRP:

HiDef Detection™ HRP Polymer System (N.º de catálogo 954D-20)

1. Técnica de recuperación del epítipo: HIER, Reactivo para la recuperación del epítipo: Trilogy
2. Tiempo de incubación de anticuerpo (minutos): 10-30
3. Tiempo de incubación de HiDef Detection Amplifier (minutos): 10
4. Tiempo de incubación de HiDef Detection Polymer Detector (minutos): 10
5. Tiempo de incubación de DAB (minutos): 1-10

6. Deshidrate y cubra el portaobjetos.

HiDef Alk Phos:

HiDef Detection™ Alk Phos Polymer System (N.º de catálogo 962D-20)

1. Técnica de recuperación del epítipo: HIER, Reactivo para la recuperación del epítipo: Trilogy
2. Tiempo de incubación de anticuerpo (minutos): 10-30
3. Tiempo de incubación de HiDef Detection Amplifier (minutos): 10
4. Tiempo de incubación de HiDef Detection Polymer Detector (minutos): 10
5. Tiempo de incubación de Permanent Red (minutos): 15-30
6. Deshidrate y cubra el portaobjetos.

Procedimientos de Control de Calidad

Control de Tejido Positivo

Cada vez que se realice el procedimiento de tinción, debe procesarse un control positivo del tejido. Este tejido puede contener células o componentes del tejido de tinción positiva y negativa y servir como tejido de control positivo y negativo. Los tejidos de control deben ser muestras frescas de autopsia, biopsia o cirugía preparadas o fijadas con la mayor brevedad con un proceso idéntico al de los cortes en estudio. El uso de un corte de tejido fijado o procesado de forma diferente a la muestra en estudio servirá para el control de todos los reactivos y pasos del método excepto la fijación y el procesamiento del tejido.

Un tejido con una tinción positiva débil es más adecuado para un control de calidad óptimo y para detectar niveles pequeños de degradación del reactivo. El control de tejido positivo para el anticuerpo primario indicado puede incluir lo siguiente:

Control de Tejido Positivo	
Tejido	Visualización
Amígdalas	Membranoso

Los controles de tejido positivos conocidos solo se deben usar para monitorizar el comportamiento correcto de los tejidos procesados y los reactivos de la prueba, y no como ayuda para establecer un diagnóstico específico de las muestras del paciente. Si los controles positivos del tejido no muestran una tinción positiva apropiada, los resultados de las muestras en estudio se deben considerar no válidos.

Control de Tejido Negativo

El mismo tejido utilizado para el control de tejido positivo se puede utilizar en el control de tejido negativo. La variedad de tipos de células presentes en la mayoría de los cortes de tejidos ofrece sitios de control negativo internos, pero esto debe verificarlo el usuario. Los componentes que no se tiñen deben demostrar la ausencia de tinción específica y proporcionar una indicación de tinción de fondo no específica. Si se produce una tinción específica en los sitios de control de tejido negativo, los resultados obtenidos con las muestras del paciente deben considerarse no válidas.

Discrepancias Inexplicables

Las discrepancias inexplicables de los controles deben remitirse de inmediato al servicio técnico de Cell Marque. Si los resultados del control de calidad no cumplen las especificaciones, los resultados del paciente no son válidos. Véase la sección Resolución de

problemas de este prospecto. Identifique y corrija el problema; a continuación, repita todo el procedimiento con las muestras del paciente.

Reactivo de Control Negativo

Se debe utilizar un reactivo de control negativo para cada muestra para ayudar a interpretar los resultados. Para evaluar una tinción no específica se utiliza un reactivo de control negativo en lugar del anticuerpo primario. Se deberá tratar el portaobjetos con el reactivo de control negativo haciendo coincidir las especies huéspedes del anticuerpo primario e idéneamente con la misma concentración de IgG. El periodo de incubación para el reactivo de control negativo deberá ser igual que el periodo de incubación del anticuerpo primario.

Interpretación de los Resultados

El procedimiento de inmunotinción causa la precipitación de un producto de reacción coloreado en los sitios del antígeno localizados por el anticuerpo primario. Consulte en el prospecto correspondiente del sistema de detección las reacciones de color esperadas. Un patólogo cualificado experimentado en procedimientos de inmunohistoquímica debe evaluar los controles de tejido positivos y negativos antes de interpretar los resultados.

Control de Tejido Positivo

El control de tejido positivo teñido debe examinarse primero para determinar que todos los reactivos funcionan adecuadamente. La presencia de un producto de reacción con el color adecuado dentro de las células diana es indicativa de una reactividad positiva. Consulte en el prospecto del sistema de detección utilizado las reacciones de color esperadas. Según sea la duración de la incubación y la potencia de la hematoxilina empleada, la contratinción dará como resultado una coloración azul de pálida a oscura de los núcleos celulares. Una contratinción excesiva o incompleta puede comprometer la interpretación adecuada de los resultados. Si los controles de tejidos positivos no muestran una tinción positiva apropiada, los resultados de las muestras en estudio se deben considerar no válidos.

Control de Tejido Negativo

El control de tejido negativo debe examinarse después del control de tejido positivo para verificar la marcación específica del antígeno diana por el anticuerpo primario. La ausencia de tinción específica en el control de tejido negativo confirma la ausencia de reactividad cruzada del anticuerpo con las células o los componentes celulares. Si se produce una tinción específica en el control de tejido negativo, los resultados obtenidos con la muestra del paciente se consideran no válidos. La tinción no específica, si la hay, tendrá un aspecto difuso. También se puede observar una ligera tinción específica esporádica del tejido conjuntivo en cortes de tejidos que no estén fijados óptimamente. Para la interpretación de los resultados de la tinción deben usarse células intactas. Las células necróticas o degeneradas muestran una tinción no específica.

Tejido del Paciente

Las muestras del paciente se deben examinar al final. La intensidad de la tinción positiva se debe valorar en el contexto de cualquier tinción de fondo del control de reactivo negativo. Como en cualquier prueba de inmunohistoquímica, un resultado negativo significa que el antígeno en cuestión no se ha detectado, no que el antígeno esté ausente de las células o del tejido analizado. Un panel de anticuerpos puede ayudar a identificar reacciones negativas falsas (consulte la sección Sumario de resultados esperados). La morfología de cada muestra del tejido también debe examinarse utilizando un corte con tinción de hematoxilina y eosina al interpretar cualquier resultado de inmunohistoquímica. Un patólogo cualificado debe interpretar los resultados morfológicos del paciente y sus datos clínicos pertinentes.

Limitaciones

- El color del anticuerpo no afecta lo funcionamiento.
- Este reactivo es "de exclusivo uso profesional", ya que la inmunohistoquímica es un proceso diagnóstico de varias etapas que requiere una formación especializada en la selección de los reactivos, tejidos, fijación y procesamiento apropiados; la preparación del portaobjetos de inmunohistoquímica y la interpretación de los resultados de la tinción.
- Para uso exclusivo de laboratorio.
- Para diagnóstico *in vitro*.
- La tinción de los tejidos depende de la manipulación y el procesamiento de los mismos antes de la tinción. Una fijación, congelación, descongelación, lavado, secado, calentado o corte inadecuados o la contaminación con otros tejidos o líquidos puede producir artefactos, bloqueo del anticuerpo o resultados falsos negativos. Los resultados inconsistentes pueden ser consecuencia de las variaciones en los métodos de fijación y embebido, así como de irregularidades inherentes dentro del tejido.
- Una contratinción excesiva o incompleta puede comprometer la interpretación adecuada de los resultados.
- La interpretación clínica de una tinción positiva o de su ausencia debe evaluarse en el contexto de la historia clínica, la morfología, otros criterios histopatológicos, así como otras pruebas diagnósticas. Este anticuerpo está diseñado para utilizarlo en un panel de anticuerpos si fuera pertinente. Es responsabilidad de un patólogo cualificado familiarizarse con los anticuerpos, reactivos, paneles de diagnóstico y métodos usados para obtener una preparación con tinción. La tinción se debe realizar en un laboratorio certificado con la supervisión de un anatomopatólogo responsable de la revisión de los portaobjetos teñidos y de la verificación de la idoneidad de los controles negativos y positivos.
- Cell Marque provee anticuerpos y reactivos en una dilución óptima para usar como se indica. Cualquier desviación de los procedimientos recomendados del método puede invalidar los resultados esperados. Se deben utilizar y documentar los controles apropiados. Los usuarios deben asumir en cualquier caso la responsabilidad de la interpretación de los resultados del paciente.
- Cell Marque provee los anticuerpos primarios en formato concentrado de manera que el usuario pueda diluirlos después óptimamente para usarlos según determine y observando las técnicas de validación adecuadas. Los usuarios deben validar el uso de cualquier disolvente que no se recomiende en este documento. Una vez que el anticuerpo primario haya sido validado como adecuado para usar, cualquier desviación de los procedimientos de prueba recomendados puede invalidar los resultados esperados. Se deben utilizar y documentar los controles apropiados. Los usuarios deben asumir en cualquier caso la responsabilidad de la interpretación de los resultados del paciente.
- Este producto no está diseñado para utilizarlo en citometría de flujo.
- Los reactivos pueden mostrar reacciones inesperadas en tejidos no estudiados previamente. No puede excluirse completamente la posibilidad de reacciones inesperadas, incluso en grupos de tejidos analizados, debido a la variabilidad biológica de la expresión del antígeno en neoplasmas u otros tejidos patológicos. Póngase en contacto con el servicio técnico de Cell Marque si sospecha que ha habido una reacción inesperada documentada.
- Los tejidos de personas infectadas con el virus de la hepatitis B y que contengan antígeno de superficie (HBsAg) pueden mostrar una tinción no específica con peroxidasa de rábano.
- Cuando se utilizan en pasos de bloqueo, los sueros normales procedentes del mismo origen animal que los antisueros secundarios pueden provocar resultados de falsos negativos o falsos positivos debido al efecto de los autoanticuerpos o anticuerpos naturales.

14. Pueden verse resultados de falsos positivos debido a la unión de proteínas o productos de reacción del sustrato por mecanismos no inmunológicos. También pueden estar causados por la actividad de la pseudoperoxidasa (eritrocitos), actividad de la peroxidasa endógena (citocromo C) o biorina endógena (ejemplo: hígado, cerebro, mama, riñón) dependiendo del tipo de técnica de inmunotinción empleada.

15. Como en cualquier prueba de inmunohistoquímica, un resultado negativo significa que el antígeno no se ha detectado, no que el antígeno esté ausente de las células o del tejido analizado.

16. Los productos de anticuerpo prediluidos están optimizados como productos listos para usar. Debido a la posibilidad de variaciones en la fijación y procesamiento del tejido, puede ser necesario aumentar o reducir el tiempo de incubación del anticuerpo primario en muestras individuales.

17. El anticuerpo, en combinación con sistemas de detección y sus accesorios, detecta los antígenos que sobreviven al proceso habitual de fijación con formol, procesamiento y corte del tejido. Los usuarios que se desvíen de los procedimientos de prueba recomendados son responsables, como lo serían en cualquier caso, de la interpretación y validación de los resultados del paciente.

Sumario de Resultados Esperados

Consulte las siguientes tablas de reactividad:

Estudio Normal			
Tejido	N.º Teñido (+)	N.º Total	Notas
Cerebro	0	1	
Córtex adrenal	0	1	
Ovarios	0	1	
Páncreas	0	2	
Paratiroides	0	1	
Pituitaria	0	1	
Testículos	0	1	
Tiroides	0	1	
Pecho	0	2	
Bazo	1	1	
Amígdalas	1	1	
Timo	1	1	
Médula ósea	0	1	
Pulmones	0	2	
Corazón	0	1	
Esófago	0	1	
Estómago	0	1	
Intestino delgado	0	1	

Estudio Normal			
Tejido	N.º Teñido (+)	N.º Total	Notas
Colon	0	1	
Hígado	0	1	
Glándula salival	0	1	
Vesícula biliar	0	1	
Riñones	0	1	
Vejiga	0	1	
Próstata	0	2	
Útero	0	2	
Trompas de Falopio	0	1	
Uréter	0	1	
Cérvix	0	1	
Músculos del esqueleto	0	1	
Músculo liso	0	4	
Piel	0	1	
Nervios periféricos	0	1	
Mesotelio	0	1	
Grasa	0	1	
Placenta	0	1	

Este anticuerpo tiñe tejidos normales como está indicado en la literatura.

Estudio de la Enfermedad del Tejido			
Tejido	N.º Teñido (+)	N.º Total	Notas
Linfoma folicular	1	1	
Tumor miofibroblástico inflamatorio	1	1	
Plasmacitoma	1	1	
Linfoma linfocítico pequeño	1	1	
Carcinoma ductal invasivo de mama	0	13	
Adenocarcinoma de colon	0	11	

Este anticuerpo tiñe tumores como está indicado en la literatura.

Resolución de Problemas

1. Si el control positivo muestra una tinción más débil de la esperada, deben analizarse otros controles positivos realizados en la misma tinción para determinar si se debe al anticuerpo primario o a uno de los reactivos secundarios comunes.
2. Si el control positivo da negativo, se deben analizar otros controles positivos usados en la misma ejecución para determinar si se debe al anticuerpo primario o a uno de los reactivos secundarios comunes. Los tejidos pueden haberse recogido, fijado o desparafinado de manera inadecuada. Deberá seguirse el procedimiento adecuado para la recogida, la conservación y la fijación.
3. Si se produce una tinción de fondo excesiva, pueden haber niveles altos de biotina endógena. Se deberá incluir una etapa de bloqueo con biotina a no ser que se esté utilizando un sistema de detección sin biotina, en cuyo caso ninguna biotina presente sería un factor que contribuyera a la tinción de fondo.
4. Si no se ha eliminado toda la parafina deberá repetirse el procedimiento de desparafinación.
5. Si los cortes de tejido lavan el portaobjetos, deben comprobarse los mismos para garantizar que tienen carga positiva. Otras posibilidades que podrían afectar adversamente a la adhesión del tejido incluyen un secado insuficiente del corte de tejido en el portaobjetos antes de la tinción o fijación en formol que no fuera neutralizado con tampón apropiadamente. El grosor del tejido también puede ser un factor causante.

Para conocer la acción correctiva, consulte la sección de las instrucciones de uso o contacte con el servicio técnico de Cell Marque a través de techsupport@cellmarque.com.

Bibliografía

1. Mason DY, et al. CD79a: a novel marker for B-cell neoplasms in routinely processed tissue samples. *Blood*. 1995; 86:1453-9.
2. Bhargava P, et al. CD79a is heterogeneously expressed in neoplastic and normal myeloid precursors and megakaryocytes in an antibody clone-dependent manner. *Am J Clin Pathol*. 2007; 128:306-13.
3. Chu PG, et al. CD79: a review. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2001; 9:97-106.

Limitaciones de Responsabilidad

*TWEEN es una marca registrada de Croda International PLC.

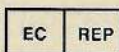
©2017 Sigma-Aldrich Co. LLC. Todos los derechos reservados. SIGMA-ALDRICH es una marca comercial de Sigma-Aldrich Co. LLC, registrada en EE. UU. y en otros países. Cell Marque, Trilogy, Declere y HiDef Detection son marcas comerciales de Sigma-Aldrich Co. LLC o de sus filiales.



www.cellmarque.com



6600 Sierra College Blvd. • Rocklin, CA 95677 USA • 916-746-8900



EMERGO EUROPE

Prinsessegracht 20, 2514 AP The Hague, The Netherlands



CM Template #2.4

Implementation date 13 Nov 2017

THE CELL MARQUE
MADE IN U.S.A.

THE CELL MARQUE
MADE IN U.S.A.

THE CELL MARQUE
MADE IN U.S.A.

THE CELL MARQUE
MADE IN U.S.A.

THE CELL MARQUE
MADE IN U.S.A.

THE CELL MARQUE
MADE IN U.S.A.

THE CELL MARQUE
MADE IN U.S.A.

CD99 (EPR3097Y) Rabbit Monoclonal Primary Antibody

Para Diagnóstico In Vitro (IVD)

Identificación del Producto

REF	Descripción
199R-14	0,1 ml concentrado
199R-15	0,5 ml concentrado
199R-16	1,0 ml concentrado
199R-17	1,0 ml prediluido listo para usar
199R-18	7,0 ml prediluido listo para usar

Definiciones de los Símbolos

KEY-CODE	código
P	prediluir
C	concentrado
A	ascitis
E	suero
S	sobrenadante
DIL	rango de dilución del concentrado

Uso Previsto

Este anticuerpo está destinado para uso diagnóstico *in vitro* (IVD).

El CD99 (EPR3097Y) Rabbit Monoclonal Primary Antibody está diseñado para utilizarse en un laboratorio para detectar la proteína CD99 en tejidos embebidos en parafina, fijados con formalina y teñidos en inmunohistoquímica cualitativa (IHC).

Los resultados obtenidos con el uso de este producto junto con la historia clínica relevante del paciente, otras pruebas diagnósticas y controles adecuados debe interpretarlos un patólogo cualificado.

Resumen y Explicación

El CD99, detectado con varios anticuerpos, se expresa en casi todos los sarcomas de Ewing y en los tumores neuroectodérmicos primitivos periféricos (ES/PNET) y demuestra tinción membranosa fuerte y difusa¹⁻⁴. Otros tumores que pueden mostrar expresión del CD99 son los carcinomas neuroendocrinos, los condrosarcomas mesenquimales, los tumores fibrosos solitarios, los sarcomas sinoviales, los tumores vasculares, los tumores de células pequeñas, redondas y azules, el linfoma linfoblástico, la leucemia mieloide aguda y el sarcoma mieloide⁵.

Sin embargo, la reactividad membranosa difusa y fuerte del CD99 favorece el ES/PNET frente a las otras consideraciones de diagnóstico⁵. Los otros tumores del CD99+ normalmente muestran tinción citoplásmica y más heterogénea. Por lo tanto, al realizar una interpretación diagnóstica final, hay que considerar al CD99 en un grupo con otros anticuerpos.⁴⁻⁵

Principios y Procedimientos

El anticuerpo primario indicado puede utilizarse como anticuerpo primario para la tinción inmunohistoquímica de cortes de tejido fijado con formol y embebido en parafina. En general, la tinción inmunohistoquímica junto con el sistema de detección mediante unión con peroxidasa de rábano (HRP) o fosfatasa alcalina permite la visualización de antígenos a través de la aplicación secuencial de un anticuerpo específico (anticuerpo primario) al antígeno, un anticuerpo secundario (anticuerpo de unión) al anticuerpo primario, un complejo enzimático y un sustrato cromogénico con etapas de lavado intermedias. La activación enzimática del cromógeno da lugar a un producto de reacción visible en el sitio del antígeno. La muestra puede entonces contrateñirse y aplicarse un cubreportaobjetos. Los resultados se interpretan con un microscopio óptico.

Materiales y Métodos

Reactivos Suministrados

Composición del Producto	
Prediluir: diluido en	Amortiguador Tris, pH 7,3-7,7, con un 1% de BSA y <0,1% de azida de sodio
Concentrado: diluido en	Amortiguador Tris, pH 7,3-7,7, con un 1% de BSA y <0,1% de azida de sodio
Host	conejo
Isotipo	IgG
Intervalo de dilución de trabajo recomendado	1:100-1:500
Fuente	sobrenadante

Vea la etiqueta del producto para información específica sobre el lote acerca de lo siguiente:

1. Concentración de anticuerpos de inmunoglobulina
2. Detalles de la fuente

Reconstitución, Mezcla, Dilución y Titulación

El anticuerpo prediluido está listo para usar y optimizado para la tinción. El anticuerpo concentrado está optimizado para diluirlo en el rango de dilución con Cell Marque Diamond Antibody Diluent.

Materiales y Reactivos Necesarios No Suministrados

Los siguientes reactivos y materiales pueden ser necesarios para la tinción, pero no se incluyen con el anticuerpo primario:

1. Tejido de control positivo y negativo
2. Portaobjetos para microscopio con carga positiva
3. Horno de secado capaz de mantener una temperatura de 53-65 °C
4. Cubetas o baños de tinción
5. Cronómetro
6. Xileno o sustituto de xileno
7. Alcohol reactivo o etanol

Nota: El tratamiento previo de un paso de Cell Marque, Trilogy™ (N.º de catálogo 920P-06), puede sustituir los elementos de los puntos 6 y 7 anteriores.

8. Agua desionizada o destilada
9. Equipo de calentamiento, como la olla de presión eléctrica para el paso del tratamiento previo del tejido
10. Sistema de detección como HiDef Detection™ HRP Polymer System (N.º de catálogo 954D-20) o HiDef Detection™ Alk Phos Polymer System (N.º de catálogo 962D-20)
11. Cromógeno, como DAB Substrate Kit (N.º de catálogo 957D-20) o Permanent Red Chromogen Kit (N.º de catálogo 960D-10)
12. TBS IHC Wash Buffer + Tween® 20 (N.º de catálogo 935B-09)
13. Hematoxylin u otra contratinción
14. Diluyentes de anticuerpo, como Diamond: Antibody Diluent (N.º de catálogo 938B-05) o Emerald: Antibody Diluent (N.º de catálogo 936B-08)
15. Peroxide Block (N.º de catálogo 925B-05) para usar con HRP
16. Avidin-Biotin Blocking Reagents para usar con detección con estreptavidina-biotina
17. Negative Control Reagent (N.º de catálogo 939B-02 para universal)
18. Mounting Medium
19. Cubreobjetos
20. Microscopio óptico (40-400x)

Conservación y Manipulación

Almacenar a 2-8 °C. No congelar.

Para garantizar la dispensación adecuada del reactivo y la estabilidad del anticuerpo, tras cada utilización se debe volver a poner el tapón y almacenar el frasco inmediatamente en la nevera, en posición vertical.

Todos los reactivos de anticuerpo tienen una fecha de caducidad. El reactivo es estable hasta la fecha indicada en la etiqueta siempre que se almacene correctamente. No usar el reactivo después de la fecha de caducidad para el método de almacenamiento descrito.

No hay signos definitivos que indiquen la inestabilidad de este producto, por lo que los controles positivos y negativos deben analizarse simultáneamente con muestras desconocidas. Contacte con el servicio técnico de Cell Marque si tiene sospechas sobre la inestabilidad del reactivo.

Extracción y Preparación de la Muestra para su Análisis

Cuando se utiliza el procedimiento habitual, los tejidos fijados en formol en tampón neutro y embebidos en parafina resultan adecuados para el uso con este anticuerpo primario cuando se utiliza con los kits de detección de Cell Marque (consulte la sección Materiales y reactivos necesarios no suministrados). Nota: Cell Marque evalúa el resultado solo en tejidos humanos. El fijador de tejido recomendado es formalina tamponada neutral 10%. Pueden tener lugar resultados variables como consecuencia de una fijación prolongada o procesos especiales tales como la descalcificación en la preparación de la médula ósea.

Cada sección debe cortarse con el grosor apropiado (aproximadamente 3 µm) y colocarse en un portaobjetos de vidrio con carga positiva. Los portaobjetos que contienen el corte de tejido pueden secarse durante al menos 2 horas (pero no más de 24 horas) en un horno a una temperatura de 53-65 °C.

Advertencias y Precauciones

1. Adopte las precauciones adecuadas cuando se manipulen los reactivos. Usar guantes y batas de laboratorio desechables cuando se manipulen materiales potencialmente carcinógenos o tóxicos (como xileno).
2. Evite el contacto de los reactivos con los ojos y las membranas mucosas. Si se produce el contacto con áreas sensibles, lávese con agua abundante.
3. Las muestras del paciente y todos los materiales en contacto con ellas deben tratarse como si fuesen materiales potencialmente infecciosos y desecharse con las precauciones adecuadas. Nunca pipetear con la boca.
4. Evitar la contaminación microbiana de los reactivos, ya que podrían producirse resultados incorrectos.
5. El usuario debe validar los tiempos y temperaturas de incubación.
6. Los reactivos prediluidos listos para usar están diluidos óptimamente por lo que una dilución adicional podría producir la pérdida de tinción del antígeno.
7. Los reactivos concentrados pueden diluirse óptimamente en base a la determinación del usuario. El usuario deberá validar igualmente tanto la compatibilidad como el efecto en la estabilidad de cualquier disolvente utilizado que no esté recomendado específicamente en este documento.
8. Este producto no se clasifica como sustancia peligrosa cuando se usa según las instrucciones. El conservante del reactivo es inferior al 0,1% de ácido sódico y no cumple los criterios de la OSHA para sustancias peligrosas a la concentración indicada. Consulte la hoja de datos de seguridad de los materiales.
9. El usuario debe validar cualquier condición de almacenamiento que no sea una de las especificadas en el prospecto.
10. El disolvente puede incluir albúmina de suero bovino y el sobrenadante puede contener suero bovino. Los productos que contienen suero fetal bovino y los productos que contienen albúmina de suero bovino se compran a los proveedores comerciales. Los certificados de origen de la fuente animal utilizada en estos productos obran en el archivo de Cell Marque. Los certificados aseguran que las fuentes bovinas provienen de países con riesgo mínimo de BSE y relacionan como fuentes de bovinos EE. UU. y Canadá.
11. Como con cualquier producto proveniente de fuentes biológicas, deberán emplearse procedimientos de manipulación apropiados.

Instrucciones de Uso

Protocolos de tinción recomendados para el anticuerpo primario indicado:

HiDef HRP:

HiDef Detection™ HRP Polymer System (N.º de catálogo 954D-20)

1. Técnica de recuperación del epítipo: HIER, Reactivo para la recuperación del epítipo: Trilogy
2. Tiempo de incubación de anticuerpo (minutos): 10-30
3. Tiempo de incubación de HiDef Detection Amplifier (minutos): 10
4. Tiempo de incubación de HiDef Detection Polymer Detector (minutos): 10
5. Tiempo de incubación de DAB (minutos): 1-10
6. Deshidrate y cubra el portaobjetos.

HiDef Alk Phos:

HiDef Detection™ Alk Phos Polymer System (N.º de catálogo 962D-20)

1. Técnica de recuperación del epítipo: HIER, Reactivo para la recuperación del epítipo: Trilogy
2. Tiempo de incubación de anticuerpo (minutos): 10-30
3. Tiempo de incubación de HiDef Detection Amplifier (minutos): 10
4. Tiempo de incubación de HiDef Detection Polymer Detector (minutos): 10
5. Tiempo de incubación de Permanent Red (minutos): 15-30
6. Deshidrate y cubra el portaobjetos.

Procedimientos de Control de Calidad

Control de Tejido Positivo

Cada vez que se realice el procedimiento de tinción, debe procesarse un control positivo del tejido. Este tejido puede contener células o componentes del tejido de tinción positiva y negativa y servir como tejido de control positivo y negativo. Los tejidos de control deben ser muestras frescas de autopsia, biopsia o cirugía preparadas o fijadas con la mayor brevedad con un proceso idéntico al de los cortes en estudio. El uso de un corte de tejido fijado o procesado de forma diferente a la muestra en estudio servirá para el control de todos los reactivos y pasos del método excepto la fijación y el procesamiento del tejido.

Un tejido con una tinción positiva débil es más adecuado para un control de calidad óptimo y para detectar niveles pequeños de degradación del reactivo. El control de tejido positivo para el anticuerpo primario indicado puede incluir lo siguiente:

Control de Tejido Positivo	
Tejido	Visualización
Sarcoma de Ewing	Membranoso
Páncreas	Membranoso

Los controles de tejido positivos conocidos solo se deben usar para monitorizar el comportamiento correcto de los tejidos procesados y los reactivos de la prueba, y no como ayuda para establecer un diagnóstico específico de las muestras del paciente. Si los controles

positivos del tejido no muestran una tinción positiva apropiada, los resultados de las muestras en estudio se deben considerar no válidos.

Control de Tejido Negativo

El mismo tejido utilizado para el control de tejido positivo se puede utilizar en el control de tejido negativo. La variedad de tipos de células presentes en la mayoría de los cortes de tejidos ofrece sitios de control negativo internos, pero esto debe verificarlo el usuario. Los componentes que no se tiñen deben demostrar la ausencia de tinción específica y proporcionar una indicación de tinción de fondo no específica. Si se produce una tinción específica en los sitios de control de tejido negativo, los resultados obtenidos con las muestras del paciente deben considerarse no válidas.

Discrepancias Inexplicables

Las discrepancias inexplicables de los controles deben remitirse de inmediato al servicio técnico de Cell Marque. Si los resultados del control de calidad no cumplen las especificaciones, los resultados del paciente no son válidos. Véase la sección Resolución de problemas de este prospecto. Identifique y corrija el problema; a continuación, repita todo el procedimiento con las muestras del paciente.

Reactivo de Control Negativo

Se debe utilizar un reactivo de control negativo para cada muestra para ayudar a interpretar los resultados. Para evaluar una tinción no específica se utiliza un reactivo de control negativo en lugar del anticuerpo primario. Se deberá tratar el portaobjetos con el reactivo de control negativo haciendo coincidir las especies huéspedes del anticuerpo primario e idéneamente con la misma concentración de IgG. El periodo de incubación para el reactivo de control negativo deberá ser igual que el periodo de incubación del anticuerpo primario.

Interpretación de los Resultados

El procedimiento de inmunotinción causa la precipitación de un producto de reacción coloreado en los sitios del antígeno localizados por el anticuerpo primario. Consulte en el prospecto correspondiente del sistema de detección las reacciones de color esperadas. Un patólogo cualificado experimentado en procedimientos de inmunohistoquímica debe evaluar los controles de tejido positivos y negativos antes de interpretar los resultados.

Control de Tejido Positivo

El control de tejido positivo teñido debe examinarse primero para determinar que todos los reactivos funcionan adecuadamente. La presencia de un producto de reacción con el color adecuado dentro de las células diana es indicativa de una reactividad positiva. Consulte en el prospecto del sistema de detección utilizado las reacciones de color esperadas. Según sea la duración de la incubación y la potencia de la hematoxilina empleada, la contratinción dará como resultado una coloración azul de pálida a oscura de los núcleos celulares. Una contratinción excesiva o incompleta puede comprometer la interpretación adecuada de los resultados. Si los controles de tejidos positivos no muestran una tinción positiva apropiada, los resultados de las muestras en estudio se deben considerar no válidos.

Control de Tejido Negativo

El control de tejido negativo debe examinarse después del control de tejido positivo para verificar la marcación específica del antígeno diana por el anticuerpo primario. La ausencia de tinción específica en el control de tejido negativo confirma la ausencia de reactividad cruzada del anticuerpo con las células o los componentes celulares. Si se produce una tinción específica en el control de tejido negativo, los resultados obtenidos con la muestra del paciente se consideran no válidos. La tinción no específica, si la hay, tendrá un aspecto difuso.

También se puede observar una ligera tinción específica esporádica del tejido conjuntivo en cortes de tejidos que no estén fijados óptimamente. Para la interpretación de los resultados de la tinción deben usarse células intactas. Las células necróticas o degeneradas muestran una tinción no específica.

Tejido del Paciente

Las muestras del paciente se deben examinar al final. La intensidad de la tinción positiva se debe valorar en el contexto de cualquier tinción de fondo del control de reactivo negativo. Como en cualquier prueba de inmunohistoquímica, un resultado negativo significa que el antígeno en cuestión no se ha detectado, no que el antígeno esté ausente de las células o del tejido analizado. Un panel de anticuerpos puede ayudar a identificar reacciones negativas falsas (consulte la sección Sumario de resultados esperados). La morfología de cada muestra del tejido también debe examinarse utilizando un corte con tinción de hematoxilina y eosina al interpretar cualquier resultado de inmunohistoquímica. Un patólogo cualificado debe interpretar los resultados morfológicos del paciente y sus datos clínicos pertinentes.

Limitaciones

1. El color del anticuerpo no afecta lo funcionamiento.
2. Este reactivo es "de exclusivo uso profesional", ya que la inmunohistoquímica es un proceso diagnóstico de varias etapas que requiere una formación especializada en la selección de los reactivos, tejidos, fijación y procesamiento apropiados; la preparación del portaobjetos de inmunohistoquímica y la interpretación de los resultados de la tinción.
3. Para uso exclusivo de laboratorio.
4. Para diagnóstico *in vitro*.
5. La tinción de los tejidos depende de la manipulación y el procesamiento de los mismos antes de la tinción. Una fijación, congelación, descongelación, lavado, secado, calentado o corte inadecuados o la contaminación con otros tejidos o líquidos puede producir artefactos, bloqueo del anticuerpo o resultados falsos negativos. Los resultados inconsistentes pueden ser consecuencia de las variaciones en los métodos de fijación y embebido, así como de irregularidades inherentes dentro del tejido.
6. Una contratinción excesiva o incompleta puede comprometer la interpretación adecuada de los resultados.
7. La interpretación clínica de una tinción positiva o de su ausencia debe evaluarse en el contexto de la historia clínica, la morfología, otros criterios histopatológicos, así como otras pruebas diagnósticas. Este anticuerpo está diseñado para utilizarlo en un panel de anticuerpos si fuera pertinente. Es responsabilidad de un patólogo cualificado familiarizarse con los anticuerpos, reactivos, paneles de diagnóstico y métodos usados para obtener una preparación con tinción. La tinción se debe realizar en un laboratorio certificado con la supervisión de un anatomopatólogo responsable de la revisión de los portaobjetos teñidos y de la verificación de la idoneidad de los controles negativos y positivos.
8. Cell Marque provee anticuerpos y reactivos en una dilución óptima para usar como se indica. Cualquier desviación de los procedimientos recomendados del método puede invalidar los resultados esperados. Se deben utilizar y documentar los controles apropiados. Los usuarios deben asumir en cualquier caso la responsabilidad de la interpretación de los resultados del paciente.
9. Cell Marque provee los anticuerpos primarios en formato concentrado de manera que el usuario pueda diluirlos después óptimamente para usarlos según determine y observando las técnicas de validación adecuadas. Los usuarios deben validar el uso de cualquier disolvente que no se recomienda en este documento. Una vez que el anticuerpo primario haya sido validado como adecuado para usar, cualquier desviación de los procedimientos

de prueba recomendados puede invalidar los resultados esperados. Se deben utilizar y documentar los controles apropiados. Los usuarios deben asumir en cualquier caso la responsabilidad de la interpretación de los resultados del paciente.

10. Este producto no está diseñado para utilizarlo en citometría de flujo.
11. Los reactivos pueden mostrar reacciones inesperadas en tejidos no estudiados previamente. No puede excluirse completamente la posibilidad de reacciones inesperadas, incluso en grupos de tejidos analizados, debido a la variabilidad biológica de la expresión del antígeno en neoplasmas u otros tejidos patológicos. Póngase en contacto con el servicio técnico de Cell Marque si sospecha que ha habido una reacción inesperada documentada.
12. Los tejidos de personas infectadas con el virus de la hepatitis B y que contengan antígeno de superficie (HBsAg) pueden mostrar una tinción no específica con peroxidasa de rábano.
13. Cuando se utilizan en pasos de bloqueo, los sueros normales procedentes del mismo origen animal que los antisueros secundarios pueden provocar resultados de falsos negativos o falsos positivos debido al efecto de los autoanticuerpos o anticuerpos naturales.
14. Pueden verse resultados de falsos positivos debido a la unión de proteínas o productos de reacción del sustrato por mecanismos no inmunológicos. También pueden estar causados por la actividad de la pseudoperoxidasa (eritrocitos), actividad de la peroxidasa endógena (citocromo C) o biotina endógena (ejemplo: hígado, cerebro, mama, riñón) dependiendo del tipo de técnica de inmunotinción empleada.
15. Como en cualquier prueba de inmunohistoquímica, un resultado negativo significa que el antígeno no se ha detectado, no que el antígeno esté ausente de las células o del tejido analizado.
16. Los productos de anticuerpo prediluidos están optimizados como productos listos para usar. Debido a la posibilidad de variaciones en la fijación y procesamiento del tejido, puede ser necesario aumentar o reducir el tiempo de incubación del anticuerpo primario en muestras individuales.
17. El anticuerpo, en combinación con sistemas de detección y sus accesorios, detecta los antígenos que sobreviven al proceso habitual de fijación con formol, procesamiento y corte del tejido. Los usuarios que se desvíen de los procedimientos de prueba recomendados son responsables, como lo serían en cualquier caso, de la interpretación y validación de los resultados del paciente.

Sumario de Resultados Esperados

Consulte las siguientes tablas de reactividad:

Estudio Normal			
Tejido	N.º Teñido (+)	N.º Total	Notas
Cerebro	1	1	Astroцитos dispersos +
Córtex adrenal	1	1	
Ovarios	1	1	Folículos +, Estromas +
Páncreas	1	1	exocrino +, Endocrino +
Paratiroides	0	1	

Estudio Normal			
Tejido	N.º Teñido (+)	N.º Total	Notas
Pituitaria	0	1	
Testículos	1	1	Células de Sertoli +
Tiroides	0	1	
Pecho	2	2	Conductos difusos +, Acini +
Bazo	1	1	
Amígdalas	1	1	
Timo	1	1	
Médula ósea	1	1	Precursores de glóbulos blancos +
Pulmones	0	2	
Corazón	0	1	
Esófago	0	1	
Estómago	0	1	
Intestino delgado	1	1	
Colon	1	1	
Hígado	1	1	sinusoides +
Glándula salival	1	1	
Vesícula biliar	1	1	
Riñones	1	1	
Vejiga	1	1	
Próstata	0	2	
Útero	2	2	Células endometriales
Trompas de Falopio	1	1	
Uréter	1	1	
Cérvix	1	1	Epitelio endocervical +
Músculos del esqueleto	0	1	
Músculo liso	0	3	
Piel	0	1	
Nervios periféricos	0	1	
Mesotelio	0	1	
Grasa	0	1	
Placenta	1	1	Células estromales +

Este producto anticuerpo marca una variedad de componentes celulares normales como las células epiteliales columnares, fibroblastos, astrocitos, células del ovario dispersas y sinusoides hepáticos.

Estudio de la Enfermedad del Tejido			
Tejido	N.º Teñido (+)	N.º Total	Notas
Adenocarcinoma de colon	14	19	
Linfoma linfoblástico	9	9	
Sarcoma de Ewing	6	6	
Rabdomiosarcoma	6	6	
Carcinoma ductal invasivo de mama	4	23	
Leiomiomasarcoma	3	3	
Sarcoma sinovial	3	4	
Dermatofibrosarcoma protuberans	2	2	
Tumor del timo	2	5	
Fibrosarcoma	1	1	
Tumor de célula granular	1	1	
Dermatofibroma	0	8	

Este anticuerpo tiñe tumores como está indicado en la literatura.

Resolución de Problemas

1. Si el control positivo muestra una tinción más débil de la esperada, deben analizarse otros controles positivos realizados en la misma tinción para determinar si se debe al anticuerpo primario o a uno de los reactivos secundarios comunes.
2. Si el control positivo da negativo, se deben analizar otros controles positivos usados en la misma ejecución para determinar si se debe al anticuerpo primario o a uno de los reactivos secundarios comunes. Los tejidos pueden haberse recogido, fijado o desparafinado de manera inadecuada. Deberá seguirse el procedimiento adecuado para la recogida, la conservación y la fijación.
3. Si se produce una tinción de fondo excesiva, pueden haber niveles altos de biotina endógena. Se deberá incluir una etapa de bloqueo con biotina a no ser que se esté utilizando un sistema de detección sin biotina, en cuyo caso ninguna biotina presente sería un factor que contribuyera a la tinción de fondo.
4. Si no se ha eliminado toda la parafina deberá repetirse el procedimiento de desparafinación.
5. Si los cortes de tejido lavan el portaobjetos, deben comprobarse los mismos para garantizar que tienen carga positiva. Otras posibilidades que podrían afectar adversamente a la adhesión del tejido incluyen un secado insuficiente del corte de tejido en el portaobjetos antes de la tinción o fijación en formol que no fuera neutralizado con tampón apropiadamente. El grosor del tejido también puede ser un factor causante.

Para conocer la acción correctiva, consulte la sección de las instrucciones de uso o contacte con el servicio técnico de Cell Marque a través de techsupport@cellmarque.com.

Bibliografía

1. Rettig, WJ, et al. Ewing's sarcoma: new approaches to histogenesis and molecular plasticity. *Lab Invest* 1992;66:133.
2. Fellingner, EJ, et al. Comparison of cell surface antigen HBA71 (p30/32MIC2), neuron-specific enolase, and vimentin in the immunohistochemical analysis of Ewing's sarcoma of bone. *Amer J Surg Pathol* 1992;16:746.
3. Ambros, IM, et al. MIC2 is a specific marker for Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. Evidence for a common histogenesis of Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors from MIC2 expression and specific chromosome aberration. *Cancer* 1991;139:317.
4. Khoury JD. Ewing sarcoma family of tumors. *Adv Anat Pathol*. 2005;12:212-20.
5. Dabos, DJ. Diagnostic Immunohistochemistry. Theranostic and Genomic Applications. 2014. pp126.

Limitaciones de Responsabilidad

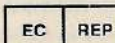
Cell Marque es el fabricante legal de los anticuerpos de diagnóstico *in vitro* de la marca Cell Marque + RabMAB. Cell Marque utiliza la tecnología RabMAB de Abcam PLC para esta marca. La tecnología monoclonal de conejo está patentada y RabMAB es una marca registrada de Abcam PLC.

*TWEEN es una marca registrada de Croda International PLC.

©2017 Sigma-Aldrich Co. LLC. Todos los derechos reservados. SIGMA-ALDRICH es una marca comercial de Sigma-Aldrich Co. LLC, registrada en EE. UU. y en otros países. Cell Marque, Trilogy, Declere y HiDef Detection son marcas comerciales de Sigma-Aldrich Co. LLC o de sus filiales.

 www.cellmarque.com

 6600 Sierra College Blvd. • Rocklin, CA 95677 USA • 916-746-8900

 EMERGO EUROPE
Prinsessegracht 20, 2514 AP The Hague, The Netherlands



CM Template #2.4
Implementation date 13 Nov 2017

CDX-2 (EPR2764Y) Rabbit Monoclonal Primary Antibody

Para Diagnóstico In Vitro (IVD)

Identificación del Producto

REF	Descripción
235R-14	0,1 ml concentrado
235R-15	0,5 ml concentrado
235R-16	1,0 ml concentrado
235R-17	1,0 ml prediluido listo para usar
235R-18	7,0 ml prediluido listo para usar
235R-10	25,0 ml prediluido listo para usar

Definiciones de los Símbolos

KEY-CODE	código
P	prediluir
C	concentrado
A	ascitis
E	suero
S	sobrenadante
DIL	rango de dilución del concentrado

Uso Previsto

Este anticuerpo está destinado para uso diagnóstico *in vitro* (IVD).

El CDX-2 (EPR2764Y) Rabbit Monoclonal Primary Antibody está diseñado para utilizarse en un laboratorio para detectar la proteína CDX-2 en tejidos embebidos en parafina, fijados con formalina y teñidos en inmunohistoquímica cualitativa (IHC).

Los resultados obtenidos con el uso de este producto junto con la historia clínica relevante del paciente, otras pruebas diagnósticas y controles adecuados debe interpretarlos un patólogo cualificado.

Resumen y Explicación

El CDX-2 es un factor de transcripción de la homeosecuencia inferior cuya expresión en el adulto normalmente se presenta en el epitelio intestinal.¹ Participa en el desarrollo y mantenimiento de la mucosa intestinal.² Esta proteína se expresa inmunohistoquímicamente en los núcleos del epitelio intestinal normal.¹ La expresión de la proteína del CDX-2 se ha observado en cánceres gastrointestinales. El anti-CDX-2 ha resultado útil para

establecer el origen gastrointestinal de los carcinoides y adenocarcinomas metastásicos^{2,3} y resulta especialmente útil para distinguir el adenocarcinoma colorrectal metastásico del adenocarcinoma pulmonar.^{1,4,5,6,7} Sin embargo, los carcinomas mucinosos de ovario también se tiñen positivamente con este anticuerpo, lo que limita la utilidad de este marcador en la distinción del adenocarcinoma colorrectal metastásico del carcinoma mucinoso de ovario.⁸

Principios y Procedimientos

El anticuerpo primario indicado puede utilizarse como anticuerpo primario para la tinción inmunohistoquímica de cortes de tejido fijado con formol y embebido en parafina. En general, la tinción inmunohistoquímica junto con el sistema de detección mediante unión con peroxidasa de rábano (HRP) o fosfatasa alcalina permite la visualización de antígenos a través de la aplicación secuencial de un anticuerpo específico (anticuerpo primario) al antígeno, un anticuerpo secundario (anticuerpo de unión) al anticuerpo primario, un complejo enzimático y un sustrato cromogénico con etapas de lavado intermedias. La activación enzimática del cromógeno da lugar a un producto de reacción visible en el sitio del antígeno. La muestra puede entonces contrateñirse y aplicarse un cubreobjetos. Los resultados se interpretan con un microscopio óptico.

Materiales y Métodos

Reactivos Suministrados

Composición del Producto	
Prediluir; diluido en	Amortiguador Tris, pH 7,3-7,7, con un 1% de BSA y <0,1% de azida de sodio
Concentrado; diluido en	Amortiguador Tris, pH 7,3-7,7, con un 1% de BSA y <0,1% de azida de sodio
Host	conejo
Isotipo	IgG
Intervalo de dilución de trabajo recomendado	1:100-1:500
Fuente	sobrenadante

Vea la etiqueta del producto para información específica sobre el lote acerca de lo siguiente:

1. Concentración de anticuerpos de inmunoglobulina
2. Detalles de la fuente

Reconstitución, Mezcla, Dilución y Titulación

El anticuerpo prediluido está listo para usar y optimizado para la tinción. El anticuerpo concentrado está optimizado para diluirlo en el rango de dilución con Cell Marque Diamond Antibody Diluent.

Materiales y Reactivos Necesarios No Suministrados

Los siguientes reactivos y materiales pueden ser necesarios para la tinción, pero no se incluyen con el anticuerpo primario:

1. Tejido de control positivo y negativo
2. Portaobjetos para microscopio con carga positiva
3. Horno de secado capaz de mantener una temperatura de 53-65 °C
4. Cubetas o baños de tinción
5. Cronómetro
6. Xileno o sustituto de xileno
7. Alcohol reactivo o etanol

Nota: El tratamiento previo de un paso de Cell Marque, Trilogy™ (N.º de catálogo 920P-06), puede sustituir los elementos de los puntos 6 y 7 anteriores.

8. Agua desionizada o destilada
9. Equipo de calentamiento, como la olla de presión eléctrica para el paso del tratamiento previo del tejido
10. Sistema de detección como HiDef Detection™ HRP Polymer System (N.º de catálogo 954D-20) o HiDef Detection™ Alk Phos Polymer System (N.º de catálogo 962D-20)
11. Cromógeno, como DAB Substrate Kit (N.º de catálogo 957D-20) o Permanent Red Chromogen Kit (N.º de catálogo 960D-10)
12. TBS IHC Wash Buffer + Tween® 20 (N.º de catálogo 935B-09)
13. Hematoxylin u otra contratinción
14. Diluyentes de anticuerpo, como Diamond: Antibody Diluent (N.º de catálogo 938B-05) o Emerald: Antibody Diluent (N.º de catálogo 936B-08)
15. Peroxide Block (N.º de catálogo 925B-05) para usar con HRP
16. Avidin-Biotin Blocking Reagents para usar con detección con estreptavidina-biotina
17. Negative Control Reagent (N.º de catálogo 939B-02 para universal)
18. Mounting Medium
19. Cubreobjetos
20. Microscopio óptico (40-400x)

Conservación y Manipulación

Almacenar a 2-8 °C. No congelar.

Para garantizar la dispensación adecuada del reactivo y la estabilidad del anticuerpo, tras cada utilización se debe volver a poner el tapón y almacenar el frasco inmediatamente en la nevera, en posición vertical.

Todos los reactivos de anticuerpo tienen una fecha de caducidad. El reactivo es estable hasta la fecha indicada en la etiqueta siempre que se almacene correctamente. No usar el reactivo después de la fecha de caducidad para el método de almacenamiento descrito.

No hay signos definitivos que indiquen la inestabilidad de este producto, por lo que los controles positivos y negativos deben analizarse simultáneamente con muestras desconocidas. Contacte con el servicio técnico de Cell Marque si tiene sospechas sobre la inestabilidad del reactivo.

Extracción y Preparación de la Muestra para su Análisis

Cuando se utiliza el procedimiento habitual, los tejidos fijados en formol en tampón neutro y embebidos en parafina resultan adecuados para el uso con este anticuerpo primario cuando se utiliza con los kits de detección de Cell Marque (consulte la sección Materiales y reactivos necesarios no suministrados). Nota: Cell Marque evalúa el resultado solo en tejidos humanos. El fijador de tejido recomendado es formalina tamponada neutral 10%. Pueden tener lugar resultados variables como consecuencia de una fijación prolongada o procesos especiales tales como la descalcificación en la preparación de la médula ósea.

Cada sección debe cortarse con el grosor apropiado (aproximadamente 3 µm) y colocarse en un portaobjetos de vidrio con carga positiva. Los portaobjetos que contienen el corte de tejido pueden secarse durante al menos 2 horas (pero no más de 24 horas) en un horno a una temperatura de 53-65 °C.

Advertencias y Precauciones

1. Adopte las precauciones adecuadas cuando se manipulen los reactivos. Usar guantes y batas de laboratorio desechables cuando se manipulen materiales potencialmente carcinógenos o tóxicos (como xileno).
2. Evite el contacto de los reactivos con los ojos y las membranas mucosas. Si se produce el contacto con áreas sensibles, lávese con agua abundante.
3. Las muestras del paciente y todos los materiales en contacto con ellas deben tratarse como si fuesen materiales potencialmente infecciosos y desecharse con las precauciones adecuadas. Nunca pipetear con la boca.
4. Evitar la contaminación microbiana de los reactivos, ya que podrían producirse resultados incorrectos.
5. El usuario debe validar los tiempos y temperaturas de incubación.
6. Los reactivos prediluidos listos para usar están diluidos óptimamente por lo que una dilución adicional podría producir la pérdida de tinción del antígeno.
7. Los reactivos concentrados pueden diluirse óptimamente en base a la determinación del usuario. El usuario deberá validar igualmente tanto la compatibilidad como el efecto en la estabilidad de cualquier disolvente utilizado que no esté recomendado específicamente en este documento.
8. Este producto no se clasifica como sustancia peligrosa cuando se usa según las instrucciones. El conservante del reactivo es inferior al 0,1% de ácido sódico y no cumple los criterios de la OSHA para sustancias peligrosas a la concentración indicada. Consulte la hoja de datos de seguridad de los materiales.
9. El usuario debe validar cualquier condición de almacenamiento que no sea una de las especificadas en el prospecto.
10. El disolvente puede incluir albúmina de suero bovino y el sobrenadante puede contener suero bovino. Los productos que contienen suero fetal bovino y los productos que contienen albúmina de suero bovino se compran a los proveedores comerciales. Los certificados de origen de la fuente animal utilizada en estos productos obran en el archivo de Cell Marque. Los certificados aseguran que las fuentes bovinas provienen de países con riesgo mínimo de BSE y relacionan como fuentes de bovinos EE. UU. y Canadá.
11. Como con cualquier producto proveniente de fuentes biológicas, deberán emplearse procedimientos de manipulación apropiados.

Instrucciones de Uso

Protocolos de tinción recomendados para el anticuerpo primario indicado:

HiDef HRP:

HiDef Detection™ HRP Polymer System (N.º de catálogo 954D-20)

1. Técnica de recuperación del epítipo: HIER, Reactivo para la recuperación del epítipo: Trilogy
2. Tiempo de incubación de anticuerpo (minutos): 10-30
3. Tiempo de incubación de HiDef Detection Amplifier (minutos): 10
4. Tiempo de incubación de HiDef Detection Polymer Detector (minutos): 10
5. Tiempo de incubación de DAB (minutos): 1-10
6. Deshidrate y cubra el portaobjetos.

HiDef Alk Phos:

HiDef Detection™ Alk Phos Polymer System (N.º de catálogo 962D-20)

1. Técnica de recuperación del epítipo: HIER, Reactivo para la recuperación del epítipo: Trilogy
2. Tiempo de incubación de anticuerpo (minutos): 10-30
3. Tiempo de incubación de HiDef Detection Amplifier (minutos): 10
4. Tiempo de incubación de HiDef Detection Polymer Detector (minutos): 10
5. Tiempo de incubación de Permanent Red (minutos): 15-30
6. Deshidrate y cubra el portaobjetos.

Procedimientos de Control de Calidad

Control de Tejido Positivo

Cada vez que se realice el procedimiento de tinción, debe procesarse un control positivo del tejido. Este tejido puede contener células o componentes del tejido de tinción positiva y negativa y servir como tejido de control positivo y negativo. Los tejidos de control deben ser muestras frescas de autopsia, biopsia o cirugía preparadas o fijadas con la mayor brevedad con un proceso idéntico al de los cortes en estudio. El uso de un corte de tejido fijado o procesado de forma diferente a la muestra en estudio servirá para el control de todos los reactivos y pasos del método excepto la fijación y el procesamiento del tejido.

Un tejido con una tinción positiva débil es más adecuado para un control de calidad óptimo y para detectar niveles pequeños de degradación del reactivo. El control de tejido positivo para el anticuerpo primario indicado puede incluir lo siguiente:

Control de Tejido Positivo	
Tejido	Visualización
Colon	Nuclear

Los controles de tejido positivos conocidos solo se deben usar para monitorizar el comportamiento correcto de los tejidos procesados y los reactivos de la prueba, y no como ayuda para establecer un diagnóstico específico de las muestras del paciente. Si los controles positivos del tejido no muestran una tinción positiva apropiada, los resultados de las muestras en estudio se deben considerar no válidos.

Control de Tejido Negativo

El mismo tejido utilizado para el control de tejido positivo se puede utilizar en el control de tejido negativo. La variedad de tipos de células presentes en la mayoría de los cortes de tejidos ofrece sitios de control negativo internos, pero esto debe verificarlo el usuario. Los componentes que no se tiñen deben demostrar la ausencia de tinción específica y proporcionar una indicación de tinción de fondo no específica. Si se produce una tinción específica en los sitios de control de tejido negativo, los resultados obtenidos con las muestras del paciente deben considerarse no válidos.

Discrepancias Inexplicables

Las discrepancias inexplicables de los controles deben remitirse de inmediato al servicio técnico de Cell Marque. Si los resultados del control de calidad no cumplen las especificaciones, los resultados del paciente no son válidos. Véase la sección Resolución de problemas de este prospecto. Identifique y corrija el problema; a continuación, repita todo el procedimiento con las muestras del paciente.

Reactivo de Control Negativo

Se debe utilizar un reactivo de control negativo para cada muestra para ayudar a interpretar los resultados. Para evaluar una tinción no específica se utiliza un reactivo de control negativo en lugar del anticuerpo primario. Se deberá tratar el portaobjetos con el reactivo de control negativo haciendo coincidir las especies huéspedes del anticuerpo primario e idéneamente con la misma concentración de IgG. El periodo de incubación para el reactivo de control negativo deberá ser igual que el periodo de incubación del anticuerpo primario.

Interpretación de los Resultados

El procedimiento de inmunotinción causa la precipitación de un producto de reacción coloreado en los sitios del antígeno localizados por el anticuerpo primario. Consulte en el prospecto correspondiente del sistema de detección las reacciones de color esperadas. Un patólogo cualificado experimentado en procedimientos de inmunohistoquímica debe evaluar los controles de tejido positivos y negativos antes de interpretar los resultados.

Control de Tejido Positivo

El control de tejido positivo teñido debe examinarse primero para determinar que todos los reactivos funcionan adecuadamente. La presencia de un producto de reacción con el color adecuado dentro de las células diana es indicativa de una reactividad positiva. Consulte en el prospecto del sistema de detección utilizado las reacciones de color esperadas. Según sea la duración de la incubación y la potencia de la hematoxilina empleada, la contratinción dará como resultado una coloración azul de pálida a oscura de los núcleos celulares. Una contratinción excesiva o incompleta puede comprometer la interpretación adecuada de los resultados. Si los controles de tejidos positivos no muestran una tinción positiva apropiada, los resultados de las muestras en estudio se deben considerar no válidos.

Control de Tejido Negativo

El control de tejido negativo debe examinarse después del control de tejido positivo para verificar la marcación específica del antígeno diana por el anticuerpo primario. La ausencia de tinción específica en el control de tejido negativo confirma la ausencia de reactividad cruzada del anticuerpo con las células o los componentes celulares. Si se produce una tinción específica en el control de tejido negativo, los resultados obtenidos con la muestra del paciente se consideran no válidos. La tinción no específica, si la hay, tendrá un aspecto difuso. También se puede observar una ligera tinción específica esporádica del tejido conjuntivo en cortes de tejidos que no estén fijados óptimamente. Para la interpretación de los resultados de

la tinción deben usarse células intactas. Las células necróticas o degeneradas muestran una tinción no específica.

Tejido del Paciente

Las muestras del paciente se deben examinar al final. La intensidad de la tinción positiva se debe valorar en el contexto de cualquier tinción de fondo del control de reactivo negativo. Como en cualquier prueba de inmunohistoquímica, un resultado negativo significa que el antígeno en cuestión no se ha detectado, no que el antígeno esté ausente de las células o del tejido analizado. Un panel de anticuerpos puede ayudar a identificar reacciones negativas falsas (consulte la sección Sumario de resultados esperados). La morfología de cada muestra del tejido también debe examinarse utilizando un corte con tinción de hematoxilina y eosina al interpretar cualquier resultado de inmunohistoquímica. Un patólogo cualificado debe interpretar los resultados morfológicos del paciente y sus datos clínicos pertinentes.

Limitaciones

- El color del anticuerpo no afecta lo funcionamiento.
- Este reactivo es "de exclusivo uso profesional", ya que la inmunohistoquímica es un proceso diagnóstico de varias etapas que requiere una formación especializada en la selección de los reactivos, tejidos, fijación y procesamiento apropiados; la preparación del portaobjetos de inmunohistoquímica y la interpretación de los resultados de la tinción.
- Para uso exclusivo de laboratorio.
- Para diagnóstico *in vitro*.
- La tinción de los tejidos depende de la manipulación y el procesamiento de los mismos antes de la tinción. Una fijación, congelación, descongelación, lavado, secado, calentado o corte inadecuados o la contaminación con otros tejidos o líquidos puede producir artefactos, bloqueo del anticuerpo o resultados falsos negativos. Los resultados inconsistentes pueden ser consecuencia de las variaciones en los métodos de fijación y embebido, así como de irregularidades inherentes dentro del tejido.
- Una contratinción excesiva o incompleta puede comprometer la interpretación adecuada de los resultados.
- La interpretación clínica de una tinción positiva o de su ausencia debe evaluarse en el contexto de la historia clínica, la morfología, otros criterios histopatológicos, así como otras pruebas diagnósticas. Este anticuerpo está diseñado para utilizarlo en un panel de anticuerpos si fuera pertinente. Es responsabilidad de un patólogo cualificado familiarizarse con los anticuerpos, reactivos, paneles de diagnóstico y métodos usados para obtener una preparación con tinción. La tinción se debe realizar en un laboratorio certificado con la supervisión de un anatomopatólogo responsable de la revisión de los portaobjetos teñidos y de la verificación de la idoneidad de los controles negativos y positivos.
- Cell Marque provee anticuerpos y reactivos en una dilución óptima para usar como se indica. Cualquier desviación de los procedimientos recomendados del método puede invalidar los resultados esperados. Se deben utilizar y documentar los controles apropiados. Los usuarios deben asumir en cualquier caso la responsabilidad de la interpretación de los resultados del paciente.
- Cell Marque provee los anticuerpos primarios en formato concentrado de manera que el usuario pueda diluirlos después óptimamente para usarlos según determine y observando las técnicas de validación adecuadas. Los usuarios deben validar el uso de cualquier disolvente que no se recomiende en este documento. Una vez que el anticuerpo primario haya sido validado como adecuado para usar, cualquier desviación de los procedimientos de prueba recomendados puede invalidar los resultados esperados. Se deben utilizar y
- documentar los controles apropiados. Los usuarios deben asumir en cualquier caso la responsabilidad de la interpretación de los resultados del paciente.
- Este producto no está diseñado para utilizarlo en citometría de flujo.
- Los reactivos pueden mostrar reacciones inesperadas en tejidos no estudiados previamente. No puede excluirse completamente la posibilidad de reacciones inesperadas, incluso en grupos de tejidos analizados, debido a la variabilidad biológica de la expresión del antígeno en neoplasmas u otros tejidos patológicos. Póngase en contacto con el servicio técnico de Cell Marque si sospecha que ha habido una reacción inesperada documentada.
- Los tejidos de personas infectadas con el virus de la hepatitis B y que contengan antígeno de superficie (HBsAg) pueden mostrar una tinción no específica con peroxidasa de rábano.
- Cuando se utilizan en pasos de bloqueo, los sueros normales procedentes del mismo origen animal que los antisueros secundarios pueden provocar resultados de falsos negativos o falsos positivos debido al efecto de los autoanticuerpos o anticuerpos naturales.
- Pueden verse resultados de falsos positivos debido a la unión de proteínas o productos de reacción del sustrato por mecanismos no inmunológicos. También pueden estar causados por la actividad de la pseudoperoxidasa (eritrocitos), actividad de la peroxidasa endógena (citocromo C) o biotina endógena (ejemplo: hígado, cerebro, mama, riñón) dependiendo del tipo de técnica de inmunotinción empleada.
- Como en cualquier prueba de inmunohistoquímica, un resultado negativo significa que el antígeno no se ha detectado, no que el antígeno esté ausente de las células o del tejido analizado.
- Los productos de anticuerpo prediluidos están optimizados como productos listos para usar. Debido a la posibilidad de variaciones en la fijación y procesamiento del tejido, puede ser necesario aumentar o reducir el tiempo de incubación del anticuerpo primario en muestras individuales.
- El anticuerpo, en combinación con sistemas de detección y sus accesorios, detecta los antígenos que sobreviven al proceso habitual de fijación con formol, procesamiento y corte del tejido. Los usuarios que se desvíen de los procedimientos de prueba recomendados son responsables, como lo serían en cualquier caso, de la interpretación y validación de los resultados del paciente.

Sumario de Resultados Esperados

Consulte las siguientes tablas de reactividad:

Estudio Normal			
Tejido	N.º Teñido (+)	N.º Total	Notas
Cerebro	0	1	
Córtex adrenal	0	1	
Ovarios	0	1	
Páncreas	1	1	núcleos de epitelio ductal
Paratiroides	0	1	
Pituitaria	0	1	

Estudio Normal			
Tejido	N.º Teñido (+)	N.º Total	Notas
Testículos	0	1	
Tiroides	0	1	
Pecho	0	2	
Bazo	0	1	
Amígdalas	0	1	
Timo	0	1	
Médula ósea	0	1	
Pulmones	0	2	
Corazón	0	1	
Esófago	0	1	
Estómago	0	1	
Intestino delgado	1	1	
Colon	1	1	
Hígado	0	1	
Glándula salival	0	1	
Vesícula biliar	0	1	
Riñones	1	1	
Vejiga	1	1	
Próstata	0	2	
Útero	0	2	
Trompas de Falopio	0	1	
Uréter	0	1	
Cérvix	0	1	
Músculos del esqueleto	1	1	
Músculo liso	0	3	
Piel	0	1	
Nervios periféricos	0	1	
Mesotelio	0	1	
Grasa	0	1	
Placenta	0	1	

Este anticuerpo tiñe tejidos normales como está indicado en la literatura.

Estudio de la Enfermedad del Tejido			
Tejido	N.º Teñido (+)	N.º Total	Notas
Adenocarcinoma de colon	20	20	
Carcinoma ductal invasivo de mama	0	23	
Adenocarcinoma de estómago	0	1	

Este anticuerpo tiñe tumores como está indicado en la literatura.

Resolución de Problemas

1. Si el control positivo muestra una tinción más débil de la esperada, deben analizarse otros controles positivos realizados en la misma tinción para determinar si se debe al anticuerpo primario o a uno de los reactivos secundarios comunes.
2. Si el control positivo da negativo, se deben analizar otros controles positivos usados en la misma ejecución para determinar si se debe al anticuerpo primario o a uno de los reactivos secundarios comunes. Los tejidos pueden haberse recogido, fijado o desparafinado de manera inadecuada. Deberá seguirse el procedimiento adecuado para la recogida, la conservación y la fijación.
3. Si se produce una tinción de fondo excesiva, pueden haber niveles altos de biotina endógena. Se deberá incluir una etapa de bloqueo con biotina a no ser que se esté utilizando un sistema de detección sin biotina, en cuyo caso ninguna biotina presente sería un factor que contribuyera a la tinción de fondo.
4. Si no se ha eliminado toda la parafina deberá repetirse el procedimiento de desparafinación.
5. Si los cortes de tejido lavan el portaobjetos, deben comprobarse los mismos para garantizar que tienen carga positiva. Otras posibilidades que podrían afectar adversamente a la adhesión del tejido incluyen un secado insuficiente del corte de tejido en el portaobjetos antes de la tinción o fijación en formol que no fuera neutralizado con tampón apropiadamente. El grosor del tejido también puede ser un factor causante.

Para conocer la acción correctiva, consulte la sección de las instrucciones de uso o contacte con el servicio técnico de Cell Marque a través de techsupport@cellmarque.com.

Bibliografía

1. Mazziotta RM, et al. CDX2 immunostaining as a gastrointestinal marker: expression in lung carcinomas is a potential pitfall. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2005; 13:55-60.
2. Erickson LA, et al. Cdx2 as a marker for neuroendocrine tumors of unknown primary sites. *Endocr Pathol*. 2004; 15:247-52.
3. Saqi A, et al. Usefulness of CDX2 and TTF-1 in differentiating gastrointestinal from pulmonary carcinoids. *Am J Clin Pathol*. 2005; 123:394-404.
4. Saad RS, et al. Usefulness of Cdx2 in separating mucinous bronchioloalveolar adenocarcinoma of the lung from metastatic mucinous colorectal adenocarcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2004; 122:421-7.
5. Kaimakchiev V, et al. The homeobox intestinal differentiation factor CDX2 is selectively expressed in gastrointestinal adenocarcinomas. *Mod Pathol*. 2004; 17:1392-9.



6. Werling RW, et al. CDX2, a highly sensitive and specific marker of adenocarcinomas of intestinal origin: an immunohistochemical survey of 476 primary and metastatic carcinomas. *Am J Surg Pathol.* 2003; 27:303-10.
7. Groisman GM, et al. The value of Cdx2 immunostaining in differentiating primary ovarian carcinomas from colonic carcinomas metastatic to the ovaries. *Int J Gynecol Pathol.* 2004; 231:52-7.
8. Moskaluk CA, et al. Cdx2 protein expression in normal and malignant human tissues: an immunohistochemical survey using tissue microarrays. *Mod Pathol.* 2003; 16:913-9.

Limitaciones de Responsabilidad

Cell Marque es el fabricante legal de los anticuerpos de diagnóstico *in vitro* de la marca Cell Marque + RabMAb. Cell Marque utiliza la tecnología RabMAb de Abcam PLC para esta marca. La tecnología monoclonal de conejo está patentada y RabMAb es una marca registrada de Abcam PLC.

*TWEEN es una marca registrada de Croda International PLC.

©2017 Sigma-Aldrich Co. LLC. Todos los derechos reservados. SIGMA-ALDRICH es una marca comercial de Sigma-Aldrich Co. LLC, registrada en EE. UU. y en otros países. Cell Marque, Trilogy, Declere y HiDef Detection son marcas comerciales de Sigma-Aldrich Co. LLC o de sus filiales.

 www.cellmarque.com

 6600 Sierra College Blvd. • Rocklin, CA 95677 USA • 916-746-8900

EC	REP	EMERGO EUROPE Prinsessegracht 20, 2514 AP The Hague, The Netherlands
----	-----	---



CM Template #2.4
Implementation date 13 Nov 2017

Cyclin D1 (SP4) Rabbit Monoclonal Antibody

Para Diagnóstico In Vitro (IVD)

Identificación del Producto

REF	Descripción
241R-14	0,1 ml concentrado
241R-15	0,5 ml concentrado
241R-16	1,0 ml concentrado
241R-17	1,0 ml prediluido listo para usar
241R-18	7,0 ml prediluido listo para usar

Definiciones de los Símbolos

KEY-CODE	código
P	prediluir
C	concentrado
A	ascitis
E	suero
S	sobrenadante
DIL	rango de dilución del concentrado

Uso Previsto

Este anticuerpo está destinado para uso diagnóstico *in vitro* (IVD).

El anticuerpo primario monoclonal de conejo ciclina D1 (SP4) está diseñado para utilizarse en un laboratorio para detectar la proteína ciclina D1 en tejidos embebidos en parafina, fijados con formalina y teñidos en pruebas de inmunohistoquímica (IHC) cualitativa.

Los resultados obtenidos con el uso de este producto junto con la historia clínica relevante del paciente, otras pruebas diagnósticas y controles adecuados debe interpretarlos un patólogo cualificado.

Resumen y Explicación

Las ciclinas son proteínas que rigen las transiciones por distintas fases del ciclo celular regulando la actividad de las cinasas dependientes de la ciclina.¹ La ciclina D1, uno de los reguladores principales del ciclo celular, es un protooncogén putativo que se encuentra en una gran variedad de neoplasias humanas. Este anticuerpo resulta útil para distinguir los linfomas de células del manto (positivo en ciclina D1).²

Principios y Procedimientos

El anticuerpo primario indicado puede utilizarse como anticuerpo primario para la tinción inmunohistoquímica de cortes de tejido fijado con formol y embebido en parafina. En general, la tinción inmunohistoquímica junto con el sistema de detección mediante unión con peroxidasa de rábano (HRP) o fosfatasa alcalina permite la visualización de antígenos a través de la aplicación secuencial de un anticuerpo específico (anticuerpo primario) al antígeno, un anticuerpo secundario (anticuerpo de unión) al anticuerpo primario, un complejo enzimático y un sustrato cromogénico con etapas de lavado intermedias. La activación enzimática del cromógeno da lugar a un producto de reacción visible en el sitio del antígeno. La muestra puede entonces contrateñirse y aplicarse un cubreobjetos. Los resultados se interpretan con un microscopio óptico.

Materiales y Métodos

Reactivos Suministrados

Composición del Producto	
Prediluir: diluido en	Amortiguador Tris, pH 7,3-7,7, con un 1% de BSA y <0,1% de azida de sodio
Concentrado: diluido en	Amortiguador Tris, pH 7,3-7,7, con un 1% de BSA y <0,1% de azida de sodio
Host	conejo
Isotipo	IgG
Intervalo de dilución de trabajo recomendado	1:100-1:500
Fuente	sobrenadante

Vea la etiqueta del producto para información específica sobre el lote acerca de lo siguiente:

1. Concentración de anticuerpos de inmunoglobulina
2. Detalles de la fuente

Reconstitución, Mezcla, Dilución y Titulación

El anticuerpo prediluido está listo para usar y optimizado para la tinción. El anticuerpo concentrado está optimizado para diluirlo en el rango de dilución con Cell Marque Diamond Antibody Diluent.

Materiales y Reactivos Necesarios No Suministrados

Los siguientes reactivos y materiales pueden ser necesarios para la tinción, pero no se incluyen con el anticuerpo primario:

1. Tejido de control positivo y negativo
2. Portaobjetos para microscopio con carga positiva
3. Horno de secado capaz de mantener una temperatura de 53-65 °C

4. Cubetas o baños de tinción

5. Cronómetro

6. Xileno o sustituto de xileno

7. Alcohol reactivo o etanol

Nota: El tratamiento previo de un paso de Cell Marque, Trilogy™ (N.º de catálogo 920P-06), puede sustituir los elementos de los puntos 6 y 7 anteriores.

8. Agua desionizada o destilada

9. Equipo de calentamiento, como la olla de presión eléctrica para el paso del tratamiento previo del tejido

10. Sistema de detección como HiDef Detection™ HRP Polymer System (N.º de catálogo 954D-20) o HiDef Detection™ Alk Phos Polymer System (N.º de catálogo 962D-20)

11. Cromógeno, como DAB Substrate Kit (N.º de catálogo 957D-20) o Permanent Red Chromogen Kit (N.º de catálogo 960D-10)

12. TBS IHC Wash Buffer + Tween® 20 (N.º de catálogo 935B-09)

13. Hematoxylin u otra contratinción

14. Diluyentes de anticuerpo, como Diamond: Antibody Diluent (N.º de catálogo 938B-05) o Emerald: Antibody Diluent (N.º de catálogo 936B-08)

15. Peroxide Block (N.º de catálogo 925B-05) para usar con HRP

16. Avidin-Biotin Blocking Reagents para usar con detección con estreptavidina-biotina

17. Negative Control Reagent (N.º de catálogo 939B-02 para universal)

18. Mounting Medium

19. Cubreobjetos

20. Microscopio óptico (40-400x)

Conservación y Manipulación

Almacenar a 2-8 °C. No congelar.

Para garantizar la dispensación adecuada del reactivo y la estabilidad del anticuerpo, tras cada utilización se debe volver a poner el tapón y almacenar el frasco inmediatamente en la nevera, en posición vertical.

Todos los reactivos de anticuerpo tienen una fecha de caducidad. El reactivo es estable hasta la fecha indicada en la etiqueta siempre que se almacene correctamente. No usar el reactivo después de la fecha de caducidad para el método de almacenamiento descrito.

No hay signos definitivos que indiquen la inestabilidad de este producto, por lo que los controles positivos y negativos deben analizarse simultáneamente con muestras desconocidas. Contacte con el servicio técnico de Cell Marque si tiene sospechas sobre la inestabilidad del reactivo.

Extracción y Preparación de la Muestra para su Análisis

Cuando se utiliza el procedimiento habitual, los tejidos fijados en formol en tampón neutro y embebidos en parafina resultan adecuados para el uso con este anticuerpo primario cuando se utiliza con los kits de detección de Cell Marque (consulte la sección Materiales y reactivos necesarios no suministrados). Nota: Cell Marque evalúa el resultado solo en tejidos humanos. El fijador de tejido recomendado es formalina tamponada neutral 10%. Pueden tener lugar resultados variables como consecuencia de una fijación prolongada o procesos especiales tales como la descalcificación en la preparación de la médula ósea.

Cada sección debe cortarse con el grosor apropiado (aproximadamente 3 µm) y colocarse en un portaobjetos de vidrio con carga positiva. Los portaobjetos que contienen el corte de

tejido pueden secarse durante al menos 2 horas (pero no más de 24 horas) en un horno a una temperatura de 53-65 °C.

Advertencias y Precauciones

1. Adopte las precauciones adecuadas cuando se manipulen los reactivos. Usar guantes y batas de laboratorio desechables cuando se manipulen materiales potencialmente carcinógenos o tóxicos (como xileno).
2. Evite el contacto de los reactivos con los ojos y las membranas mucosas. Si se produce el contacto con áreas sensibles, lávese con agua abundante.
3. Las muestras del paciente y todos los materiales en contacto con ellas deben tratarse como si fuesen materiales potencialmente infecciosos y desecharse con las precauciones adecuadas. Nunca pipetear con la boca.
4. Evitar la contaminación microbiana de los reactivos, ya que podrían producirse resultados incorrectos.
5. El usuario debe validar los tiempos y temperaturas de incubación.
6. Los reactivos prediluidos listos para usar están diluidos óptimamente por lo que una dilución adicional podría producir la pérdida de tinción del antígeno.
7. Los reactivos concentrados pueden diluirse óptimamente en base a la determinación del usuario. El usuario deberá validar igualmente tanto la compatibilidad como el efecto en la estabilidad de cualquier disolvente utilizado que no esté recomendado específicamente en este documento.
8. Este producto no se clasifica como sustancia peligrosa cuando se usa según las instrucciones. El conservante del reactivo es inferior al 0,1% de ácido sódico y no cumple los criterios de la OSHA para sustancias peligrosas a la concentración indicada. Consulte la hoja de datos de seguridad de los materiales.
9. El usuario debe validar cualquier condición de almacenamiento que no sea una de las especificadas en el prospecto.
10. El disolvente puede incluir albúmina de suero bovino y el sobrenadante puede contener suero bovino. Los productos que contienen suero fetal bovino y los productos que contienen albúmina de suero bovino se compran a los proveedores comerciales. Los certificados de origen de la fuente animal utilizada en estos productos obran en el archivo de Cell Marque. Los certificados aseguran que las fuentes bovinas provienen de países con riesgo mínimo de BSE y relacionan como fuentes de bovinos EE. UU. y Canadá.
11. Como con cualquier producto proveniente de fuentes biológicas, deberán emplearse procedimientos de manipulación apropiados.

Instrucciones de Uso

Protocolos de tinción recomendados para el anticuerpo primario indicado:

HiDef HRP:

HiDef Detection™ HRP Polymer System (N.º de catálogo 954D-20)

1. Técnica de recuperación del epítipo: HIER, Reactivo para la recuperación del epítipo: Trilogy
2. Tiempo de incubación de anticuerpo (minutos): 10-30
3. Tiempo de incubación de HiDef Detection Amplifier (minutos): 10
4. Tiempo de incubación de HiDef Detection Polymer Detector (minutos): 10
5. Tiempo de incubación de DAB (minutos): 1-10

6. Deshidrate y cubra el portaobjetos.

HiDef Alk Phos:

HiDef Detection™ Alk Phos Polymer System (N.º de catálogo 962D-20)

1. Técnica de recuperación del epítipo: HIER, Reactivo para la recuperación del epítipo: Trilogy
2. Tiempo de incubación de anticuerpo (minutos): 10-30
3. Tiempo de incubación de HiDef Detection Amplifier (minutos): 10
4. Tiempo de incubación de HiDef Detection Polymer Detector (minutos): 10
5. Tiempo de incubación de Permanent Red (minutos): 15-30
6. Deshidrate y cubra el portaobjetos.

Procedimientos de Control de Calidad

Control de Tejido Positivo

Cada vez que se realice el procedimiento de tinción, debe procesarse un control positivo del tejido. Este tejido puede contener células o componentes del tejido de tinción positiva y negativa y servir como tejido de control positivo y negativo. Los tejidos de control deben ser muestras frescas de autopsia, biopsia o cirugía preparadas o fijadas con la mayor brevedad con un proceso idéntico al de los cortes en estudio. El uso de un corte de tejido fijado o procesado de forma diferente a la muestra en estudio servirá para el control de todos los reactivos y pasos del método excepto la fijación y el procesamiento del tejido.

Un tejido con una tinción positiva débil es más adecuado para un control de calidad óptimo y para detectar niveles pequeños de degradación del reactivo. El control de tejido positivo para el anticuerpo primario indicado puede incluir lo siguiente:

Control de Tejido Positivo	
Tejido	Visualización
Linfoma de célula del manto	Nuclear

Los controles de tejido positivos conocidos solo se deben usar para monitorizar el comportamiento correcto de los tejidos procesados y los reactivos de la prueba, y no como ayuda para establecer un diagnóstico específico de las muestras del paciente. Si los controles positivos del tejido no muestran una tinción positiva apropiada, los resultados de las muestras en estudio se deben considerar no válidos.

Control de Tejido Negativo

El mismo tejido utilizado para el control de tejido positivo se puede utilizar en el control de tejido negativo. La variedad de tipos de células presentes en la mayoría de los cortes de tejidos ofrece sitios de control negativo internos, pero esto debe verificarlo el usuario. Los componentes que no se tienen deben demostrar la ausencia de tinción específica y proporcionar una indicación de tinción de fondo no específica. Si se produce una tinción específica en los sitios de control de tejido negativo, los resultados obtenidos con las muestras del paciente deben considerarse no válidas.

Discrepancias Inexplicables

Las discrepancias inexplicables de los controles deben remitirse de inmediato al servicio técnico de Cell Marque. Si los resultados del control de calidad no cumplen las especificaciones, los resultados del paciente no son válidos. Véase la sección Resolución de

problemas de este prospecto. Identifique y corrija el problema; a continuación, repita todo el procedimiento con las muestras del paciente.

Reactivo de Control Negativo

Se debe utilizar un reactivo de control negativo para cada muestra para ayudar a interpretar los resultados. Para evaluar una tinción no específica se utiliza un reactivo de control negativo en lugar del anticuerpo primario. Se deberá tratar el portaobjetos con el reactivo de control negativo haciendo coincidir las especies huéspedes del anticuerpo primario e idéneamente con la misma concentración de IgG. El periodo de incubación para el reactivo de control negativo deberá ser igual que el periodo de incubación del anticuerpo primario.

Interpretación de los Resultados

El procedimiento de inmunotinción causa la precipitación de un producto de reacción coloreado en los sitios del antígeno localizados por el anticuerpo primario. Consulte en el prospecto correspondiente del sistema de detección las reacciones de color esperadas. Un patólogo cualificado experimentado en procedimientos de inmunohistoquímica debe evaluar los controles de tejido positivos y negativos antes de interpretar los resultados.

Control de Tejido Positivo

El control de tejido positivo teñido debe examinarse primero para determinar que todos los reactivos funcionan adecuadamente. La presencia de un producto de reacción con el color adecuado dentro de las células diana es indicativa de una reactividad positiva. Consulte en el prospecto del sistema de detección utilizado las reacciones de color esperadas. Según sea la duración de la incubación y la potencia de la hematoxilina empleada, la contratinción dará como resultado una coloración azul de pálida a oscura de los núcleos celulares. Una contratinción excesiva o incompleta puede comprometer la interpretación adecuada de los resultados. Si los controles de tejidos positivos no muestran una tinción positiva apropiada, los resultados de las muestras en estudio se deben considerar no válidos.

Control de Tejido Negativo

El control de tejido negativo debe examinarse después del control de tejido positivo para verificar la marcación específica del antígeno diana por el anticuerpo primario. La ausencia de tinción específica en el control de tejido negativo confirma la ausencia de reactividad cruzada del anticuerpo con las células o los componentes celulares. Si se produce una tinción específica en el control de tejido negativo, los resultados obtenidos con la muestra del paciente se consideran no válidos. La tinción no específica, si la hay, tendrá un aspecto difuso. También se puede observar una ligera tinción específica esporádica del tejido conjuntivo en cortes de tejidos que no estén fijados óptimamente. Para la interpretación de los resultados de la tinción deben usarse células intactas. Las células necróticas o degeneradas muestran una tinción no específica.

Tejido del Paciente

Las muestras del paciente se deben examinar al final. La intensidad de la tinción positiva se debe valorar en el contexto de cualquier tinción de fondo del control de reactivo negativo. Como en cualquier prueba de inmunohistoquímica, un resultado negativo significa que el antígeno en cuestión no se ha detectado, no que el antígeno esté ausente de las células o del tejido analizado. Un panel de anticuerpos puede ayudar a identificar reacciones negativas falsas (consulte la sección Sumario de resultados esperados). La morfología de cada muestra del tejido también debe examinarse utilizando un corte con tinción de hematoxilina y eosina al interpretar cualquier resultado de inmunohistoquímica. Un patólogo cualificado debe interpretar los resultados morfológicos del paciente y sus datos clínicos pertinentes.

Limitaciones

1. El color del anticuerpo no afecta lo funcionamiento.
2. Este reactivo es "de exclusivo uso profesional", ya que la inmunohistoquímica es un proceso diagnóstico de varias etapas que requiere una formación especializada en la selección de los reactivos, tejidos, fijación y procesamiento apropiados; la preparación del portaobjetos de inmunohistoquímica y la interpretación de los resultados de la tinción.
3. Para uso exclusivo de laboratorio.
4. Para diagnóstico *in vitro*.
5. La tinción de los tejidos depende de la manipulación y el procesamiento de los mismos antes de la tinción. Una fijación, congelación, descongelación, lavado, secado, calentado o corte inadecuados o la contaminación con otros tejidos o líquidos puede producir artefactos, bloqueo del anticuerpo o resultados falsos negativos. Los resultados inconsistentes pueden ser consecuencia de las variaciones en los métodos de fijación y embebido, así como de irregularidades inherentes dentro del tejido.
6. Una contratinción excesiva o incompleta puede comprometer la interpretación adecuada de los resultados.
7. La interpretación clínica de una tinción positiva o de su ausencia debe evaluarse en el contexto de la historia clínica, la morfología, otros criterios histopatológicos, así como otras pruebas diagnósticas. Este anticuerpo está diseñado para utilizarlo en un panel de anticuerpos si fuera pertinente. Es responsabilidad de un patólogo cualificado familiarizarse con los anticuerpos, reactivos, paneles de diagnóstico y métodos usados para obtener una preparación con tinción. La tinción se debe realizar en un laboratorio certificado con la supervisión de un anatomopatólogo responsable de la revisión de los portaobjetos teñidos y de la verificación de la idoneidad de los controles negativos y positivos.
8. Cell Marque provee anticuerpos y reactivos en una dilución óptima para usar como se indica. Cualquier desviación de los procedimientos recomendados del método puede invalidar los resultados esperados. Se deben utilizar y documentar los controles apropiados. Los usuarios deben asumir en cualquier caso la responsabilidad de la interpretación de los resultados del paciente.
9. Cell Marque provee los anticuerpos primarios en formato concentrado de manera que el usuario pueda diluirlos después óptimamente para usarlos según determine y observando las técnicas de validación adecuadas. Los usuarios deben validar el uso de cualquier disolvente que no se recomiende en este documento. Una vez que el anticuerpo primario haya sido validado como adecuado para usar, cualquier desviación de los procedimientos de prueba recomendados puede invalidar los resultados esperados. Se deben utilizar y documentar los controles apropiados. Los usuarios deben asumir en cualquier caso la responsabilidad de la interpretación de los resultados del paciente.
10. Este producto no está diseñado para utilizarlo en citometría de flujo.
11. Los reactivos pueden mostrar reacciones inesperadas en tejidos no estudiados previamente. No puede excluirse completamente la posibilidad de reacciones inesperadas, incluso en grupos de tejidos analizados, debido a la variabilidad biológica de la expresión del antígeno en neoplasmas u otros tejidos patológicos. Póngase en contacto con el servicio técnico de Cell Marque si sospecha que ha habido una reacción inesperada documentada.
12. Los tejidos de personas infectadas con el virus de la hepatitis B y que contengan antígeno de superficie (HBsAg) pueden mostrar una tinción no específica con peroxidasa de rábano.
13. Cuando se utilizan en pasos de bloqueo, los sueros normales procedentes del mismo origen animal que los antisueros secundarios pueden provocar resultados de falsos negativos o falsos positivos debido al efecto de los autoanticuerpos o anticuerpos naturales.

14. Pueden verse resultados de falsos positivos debido a la unión de proteínas o productos de reacción del sustrato por mecanismos no inmunológicos. También pueden estar causados por la actividad de la pseudoperoxidasa (eritrocitos), actividad de la peroxidasa endógena (citocromo C) o biotina endógena (ejemplo: hígado, cerebro, mama, riñón) dependiendo del tipo de técnica de inmunotinción empleada.

15. Como en cualquier prueba de inmunohistoquímica, un resultado negativo significa que el antígeno no se ha detectado, no que el antígeno esté ausente de las células o del tejido analizado.

16. Los productos de anticuerpo prediluidos están optimizados como productos listos para usar. Debido a la posibilidad de variaciones en la fijación y procesamiento del tejido, puede ser necesario aumentar o reducir el tiempo de incubación del anticuerpo primario en muestras individuales.

17. El anticuerpo, en combinación con sistemas de detección y sus accesorios, detecta los antígenos que sobreviven al proceso habitual de fijación con formol, procesamiento y corte del tejido. Los usuarios que se desvíen de los procedimientos de prueba recomendados son responsables, como lo serían en cualquier caso, de la interpretación y validación de los resultados del paciente.

Sumario de Resultados Esperados

Consulte las siguientes tablas de reactividad:

Estudio Normal			
Tejido	N.º Teñido (+)	N.º Total	Notas
Cerebro	0	1	
Córtex adrenal	0	1	
Ovarios	0	1	
Páncreas	0	1	
Paratiroides	0	1	
Pituitaria	0	1	
Testículos	0	1	
Tiroides	0	1	
Pecho	0	2	
Bazo	0	1	
Amígdalas	0	1	
Timo	0	1	
Médula ósea	0	1	
Pulmones	0	2	
Corazón	0	1	
Esófago	1	1	
Estómago	1	1	
Intestino delgado	1	1	

Estudio Normal			
Tejido	N.º Teñido (+)	N.º Total	Notas
Colon	0	1	
Hígado	0	1	
Glándula salival	0	1	
Vesícula biliar	0	1	
Riñones	0	1	
Vejiga	0	1	
Próstata	0	1	
Útero	0	1	
Trompas de Falopio	0	1	
Uréter	0	1	
Cérvix	0	1	
Músculos del esqueleto	0	1	
Músculo liso	0	2	
Piel	1	1	
Nervios periféricos	0	2	
Mesotelio	0	1	
Grasa	0	1	
Placenta	1	1	

Este anticuerpo tiñe tejidos normales como está indicado en la literatura.

Estudio de la Enfermedad del Tejido			
Tejido	N.º Teñido (+)	N.º Total	Notas
Carcinoma de mama metastásico	8	9	
Carcinoma ductal in situ de mama	6	6	
Carcinoma de colorectal	6	6	
Linfoma de célula del manto	3	3	
Carcinoma de células escamosas metastásico	3	3	
Leucemia de células pilosas	1	3	
linfoma linfocítico pequeño	1	3	
Leiomioma	0	3	

Este anticuerpo tiñe tumores como está indicado en la literatura.

Resolución de Problemas

1. Si el control positivo muestra una tinción más débil de la esperada, deben analizarse otros controles positivos realizados en la misma tinción para determinar si se debe al anticuerpo primario o a uno de los reactivos secundarios comunes.
2. Si el control positivo da negativo, se deben analizar otros controles positivos usados en la misma ejecución para determinar si se debe al anticuerpo primario o a uno de los reactivos secundarios comunes. Los tejidos pueden haberse recogido, fijado o desparafinado de manera inadecuada. Deberá seguirse el procedimiento adecuado para la recogida, la conservación y la fijación.
3. Si se produce una tinción de fondo excesiva, pueden haber niveles altos de biotina endógena. Se deberá incluir una etapa de bloqueo con biotina a no ser que se esté utilizando un sistema de detección sin biotina, en cuyo caso ninguna biotina presente sería un factor que contribuyera a la tinción de fondo.
4. Si no se ha eliminado toda la parafina deberá repetirse el procedimiento de desparafinación.
5. Si los cortes de tejido lavan el portaobjetos, deben comprobarse los mismos para garantizar que tienen carga positiva. Otras posibilidades que podrían afectar adversamente a la adhesión del tejido incluyen un secado insuficiente del corte de tejido en el portaobjetos antes de la tinción o fijación en formol que no fuera neutralizado con tampón apropiadamente. El grosor del tejido también puede ser un factor causante.

Para conocer la acción correctiva, consulte la sección de las instrucciones de uso o contacte con el servicio técnico de Cell Marque a través de techsupport@cellmarque.com.

Bibliografía

1. Bartkova J, et al. Abnormal patterns of D-type cyclin expression and G1 regulation in human head and neck cancer. *Cancer Research*. 1995; 55:949-56.
2. Hankin RC, et al. Mantle cell lymphoma. *Arch Pathol Lab Med*. 1999; 123:1182-8.

Limitaciones de Responsabilidad

*TWEEN es una marca registrada de Croda International PLC.

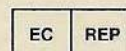
©2018 Sigma-Aldrich Co. LLC. Todos los derechos reservados. SIGMA-ALDRICH es una marca comercial de Sigma-Aldrich Co. LLC, registrada en EE. UU. y en otros países. Cell Marque, Trilogy, Declere y HiDef Detection son marcas comerciales de Sigma-Aldrich Co. LLC o de sus filiales.



www.cellmarque.com



6600 Sierra College Blvd. • Rocklin, CA 95677 USA • 916-746-8900



EMERGO EUROPE
Prinsessegracht 20, 2514 AP The Hague, The Netherlands



CM Template #2.4
Implementation date 16 Feb 2018

Cytokeratin 20 (Ks20.8) Mouse Monoclonal Antibody

Para Diagnóstico In Vitro (IVD)

Identificación del Producto

REF	Descripción
320M-14	0,1 ml concentrado
320M-15	0,5 ml concentrado
320M-16	1,0 ml concentrado
320M-17	1,0 ml prediluido listo para usar
320M-18	7,0 ml prediluido listo para usar
320M-10	25,0 ml prediluido listo para usar

Definiciones de los Símbolos

KEY-CODE	código
P	prediluir
C	concentrado
A	ascitis
E	suero
S	sobrenadante
DIL	rango de dilución del concentrado

Uso Previsto

Este anticuerpo está destinado para uso diagnóstico *in vitro* (IVD).

El anticuerpo primario monoclonal de ratón citoqueratina 20 (Ks20.8) está diseñado para utilizarse en un laboratorio para detectar la proteína citoqueratina 20 en tejidos embebidos en parafina, fijados con formalina y teñidos en pruebas de inmunohistoquímica (IHC) cualitativa.

Los resultados obtenidos con el uso de este producto junto con la historia clínica relevante del paciente, otras pruebas diagnósticas y controles adecuados debe interpretarlos un patólogo cualificado.

Resumen y Explicación

La citoqueratina 20 es una proteína de filamento intermedia 46 kDa que reacciona principalmente con células de Merkel, del urotelio y del epitelio intestinal y gástrico.¹⁻⁴ La anti-Cytokeratin 20 resulta útil para identificar tipos específicos de estas células epiteliales en condiciones normales hiperplásicas y neoplásicas.³ La citoqueratina 20 se ha detectado en adenocarcinomas de colon, estómago y de las vías biliares.⁵⁻⁷ Los carcinomas de células de

Merkel han mostrado reactividad. En cambio, los carcinomas de mama generalmente no son reactivos.

Principios y Procedimientos

El anticuerpo primario indicado puede utilizarse como anticuerpo primario para la tinción inmunohistoquímica de cortes de tejido fijado con formol y embebido en parafina. En general, la tinción inmunohistoquímica junto con el sistema de detección mediante unión con peroxidasa de rábano (HRP) o fosfatasa alcalina permite la visualización de antígenos a través de la aplicación secuencial de un anticuerpo específico (anticuerpo primario) al antígeno, un anticuerpo secundario (anticuerpo de unión) al anticuerpo primario, un complejo enzimático y un sustrato cromogénico con etapas de lavado intermedias. La activación enzimática del cromógeno da lugar a un producto de reacción visible en el sitio del antígeno. La muestra puede entonces contrateñirse y aplicarse a un cubreportaobjetos. Los resultados se interpretan con un microscopio óptico.

Materiales y Métodos

Reactivos Suministrados

Composición del Producto	
Prediluir: diluido en	Amortiguador Tris, pH 7,3-7,7, con un 1% de BSA y <0,1% de azida de sodio
Concentrado: diluido en	Amortiguador Tris, pH 7,3-7,7, con un 1% de BSA y <0,1% de azida de sodio
Host	ratón
Isotipo	IgG _{2b} /k
Intervalo de dilución de trabajo recomendado	1:200-1:500
Fuente	sobrenadante

Vea la etiqueta del producto para información específica sobre el lote acerca de lo siguiente:

1. Concentración de anticuerpos de inmunoglobulina
2. Detalles de la fuente

Reconstitución, Mezcla, Dilución y Titulación

El anticuerpo prediluido está listo para usar y optimizado para la tinción. El anticuerpo concentrado está optimizado para diluirlo en el rango de dilución con Cell Marque Diamond Antibody Diluent.

Materiales y Reactivos Necesarios No Suministrados

Los siguientes reactivos y materiales pueden ser necesarios para la tinción, pero no se incluyen con el anticuerpo primario:

1. Tejido de control positivo y negativo
2. Portaobjetos para microscopio con carga positiva
3. Horno de secado capaz de mantener una temperatura de 53-65 °C
4. Cubetas o baños de tinción
5. Cronómetro
6. Xileno o sustituto de xileno
7. Alcohol reactivo o etanol

Nota: El tratamiento previo de un paso de Cell Marque, Trilogy™ (N.º de catálogo 920P-06), puede sustituir los elementos de los puntos 6 y 7 anteriores.

8. Agua desionizada o destilada
9. Equipo de calentamiento, como la olla de presión eléctrica para el paso del tratamiento previo del tejido
10. Sistema de detección como HiDef Detection™ HRP Polymer System (N.º de catálogo 954D-20) o HiDef Detection™ Alk Phos Polymer System (N.º de catálogo 962D-20)
11. Cromógeno, como DAB Substrate Kit (N.º de catálogo 957D-20) o Permanent Red Chromogen Kit (N.º de catálogo 960D-10)
12. TBS IHC Wash Buffer + Tween® 20 (N.º de catálogo 935B-09)
13. Hematoxylin u otra contratinción
14. Diluyentes de anticuerpo, como Diamond: Antibody Diluent (N.º de catálogo 938B-05) o Emerald: Antibody Diluent (N.º de catálogo 936B-08)
15. Peroxide Block (N.º de catálogo 925B-05) para usar con HRP
16. Avidin-Biotin Blocking Reagents para usar con detección con estreptavidina-biotina
17. Negative Control Reagent (N.º de catálogo 939B-02 para universal)
18. Mounting Medium
19. Cubreobjetos
20. Microscopio óptico (40-400x)

Conservación y Manipulación

Almacenar a 2-8 °C. No congelar.

Para garantizar la dispensación adecuada del reactivo y la estabilidad del anticuerpo, tras cada utilización se debe volver a poner el tapón y almacenar el frasco inmediatamente en la nevera, en posición vertical.

Todos los reactivos de anticuerpo tienen una fecha de caducidad. El reactivo es estable hasta la fecha indicada en la etiqueta siempre que se almacene correctamente. No usar el reactivo después de la fecha de caducidad para el método de almacenamiento descrito.

No hay signos definitivos que indiquen la inestabilidad de este producto, por lo que los controles positivos y negativos deben analizarse simultáneamente con muestras desconocidas. Contacte con el servicio técnico de Cell Marque si tiene sospechas sobre la inestabilidad del reactivo.

Extracción y Preparación de la Muestra para su Análisis

Cuando se utiliza el procedimiento habitual, los tejidos fijados en formol en tampón neutro y embebidos en parafina resultan adecuados para el uso con este anticuerpo primario cuando se utiliza con los kits de detección de Cell Marque (consulte la sección Materiales y reactivos necesarios no suministrados). Nota: Cell Marque evalúa el resultado solo en tejidos humanos. El fijador de tejido recomendado es formalina tamponada neutral 10%. Pueden tener lugar resultados variables como consecuencia de una fijación prolongada o procesos especiales tales como la descalcificación en la preparación de la médula ósea.

Cada sección debe cortarse con el grosor apropiado (aproximadamente 3 µm) y colocarse en un portaobjetos de vidrio con carga positiva. Los portaobjetos que contienen el corte de tejido pueden secarse durante al menos 2 horas (pero no más de 24 horas) en un horno a una temperatura de 53-65 °C.

Advertencias y Precauciones

1. Adopte las precauciones adecuadas cuando se manipulen los reactivos. Usar guantes y batas de laboratorio desechables cuando se manipulen materiales potencialmente carcinógenos o tóxicos (como xileno).
2. Evite el contacto de los reactivos con los ojos y las membranas mucosas. Si se produce el contacto con áreas sensibles, lávese con agua abundante.
3. Las muestras del paciente y todos los materiales en contacto con ellas deben tratarse como si fuesen materiales potencialmente infecciosos y desecharse con las precauciones adecuadas. Nunca pipetear con la boca.
4. Evitar la contaminación microbiana de los reactivos, ya que podrían producirse resultados incorrectos.
5. El usuario debe validar los tiempos y temperaturas de incubación.
6. Los reactivos prediluidos listos para usar están diluidos óptimamente por lo que una dilución adicional podría producir la pérdida de tinción del antígeno.
7. Los reactivos concentrados pueden diluirse óptimamente en base a la determinación del usuario. El usuario deberá validar igualmente tanto la compatibilidad como el efecto en la estabilidad de cualquier disolvente utilizado que no esté recomendado específicamente en este documento.
8. Este producto no se clasifica como sustancia peligrosa cuando se usa según las instrucciones. El conservante del reactivo es inferior al 0,1% de ácido fólico y no cumple los criterios de la OSHA para sustancias peligrosas a la concentración indicada. Consulte la hoja de datos de seguridad de los materiales.
9. El usuario debe validar cualquier condición de almacenamiento que no sea una de las especificadas en el prospecto.
10. El disolvente puede incluir albúmina de suero bovino y el sobrenadante puede contener suero bovino. Los productos que contienen suero fetal bovino y los productos que contienen albúmina de suero bovino se compran a los proveedores comerciales. Los certificados de origen de la fuente animal utilizada en estos productos obran en el archivo de Cell Marque. Los certificados aseguran que las fuentes bovinas provienen de países con riesgo mínimo de BSE y relacionan como fuentes de bovinos EE. UU. y Canadá.
11. Como con cualquier producto proveniente de fuentes biológicas, deberán emplearse procedimientos de manipulación apropiados.

Instrucciones de Uso

Protocolos de tinción recomendados para el anticuerpo primario indicado:

HiDef HRP:

HiDef Detection™ HRP Polymer System (N.º de catálogo 954D-20)

1. Técnica de recuperación del epítipo: HIER, Reactivo para la recuperación del epítipo: Trilogy
2. Tiempo de incubación de anticuerpo (minutos): 10-30
3. Tiempo de incubación de HiDef Detection Amplifier (minutos): 10
4. Tiempo de incubación de HiDef Detection Polymer Detector (minutos): 10
5. Tiempo de incubación de DAB (minutos): 1-10
6. Deshidrate y cubra el portaobjetos.

HiDef Alk Phos:

HiDef Detection™ Alk Phos Polymer System (N.º de catálogo 962D-20)

1. Técnica de recuperación del epítipo: HIER, Reactivo para la recuperación del epítipo: Trilogy
2. Tiempo de incubación de anticuerpo (minutos): 10-30
3. Tiempo de incubación de HiDef Detection Amplifier (minutos): 10
4. Tiempo de incubación de HiDef Detection Polymer Detector (minutos): 10
5. Tiempo de incubación de Permanent Red (minutos): 15-30
6. Deshidrate y cubra el portaobjetos.

Procedimientos de Control de Calidad

Control de Tejido Positivo

Cada vez que se realice el procedimiento de tinción, debe procesarse un control positivo del tejido. Este tejido puede contener células o componentes del tejido de tinción positiva y negativa y servir como tejido de control positivo y negativo. Los tejidos de control deben ser muestras frescas de autopsia, biopsia o cirugía preparadas o fijadas con la mayor brevedad con un proceso idéntico al de los cortes en estudio. El uso de un corte de tejido fijado o procesado de forma diferente a la muestra en estudio servirá para el control de todos los reactivos y pasos del método excepto la fijación y el procesamiento del tejido.

Un tejido con una tinción positiva débil es más adecuado para un control de calidad óptimo y para detectar niveles pequeños de degradación del reactivo. El control de tejido positivo para el anticuerpo primario indicado puede incluir lo siguiente:

Control de Tejido Positivo	
Tejido	Visualización
Carcinoma de colon	Citoplasmática

Los controles de tejido positivos conocidos solo se deben usar para monitorizar el comportamiento correcto de los tejidos procesados y los reactivos de la prueba, y no como ayuda para establecer un diagnóstico específico de las muestras del paciente. Si los controles positivos del tejido no muestran una tinción positiva apropiada, los resultados de las muestras en estudio se deben considerar no válidos.

Control de Tejido Negativo

El mismo tejido utilizado para el control de tejido positivo se puede utilizar en el control de tejido negativo. La variedad de tipos de células presentes en la mayoría de los cortes de tejidos ofrece sitios de control negativo internos, pero esto debe verificarlo el usuario. Los componentes que no se tiñen deben demostrar la ausencia de tinción específica y proporcionar una indicación de tinción de fondo no específica. Si se produce una tinción específica en los sitios de control de tejido negativo, los resultados obtenidos con las muestras del paciente deben considerarse no válidos.

Discrepancias Inexplicables

Las discrepancias inexplicables de los controles deben remitirse de inmediato al servicio técnico de Cell Marque. Si los resultados del control de calidad no cumplen las especificaciones, los resultados del paciente no son válidos. Véase la sección Resolución de problemas de este prospecto. Identifique y corrija el problema; a continuación, repita todo el procedimiento con las muestras del paciente.

Reactivo de Control Negativo

Se debe utilizar un reactivo de control negativo para cada muestra para ayudar a interpretar los resultados. Para evaluar una tinción no específica se utiliza un reactivo de control negativo en lugar del anticuerpo primario. Se deberá tratar el portaobjetos con el reactivo de control negativo haciendo coincidir las especies huéspedes del anticuerpo primario e idéneamente con la misma concentración de IgG. El periodo de incubación para el reactivo de control negativo deberá ser igual que el periodo de incubación del anticuerpo primario.

Interpretación de los Resultados

El procedimiento de inmunotinción causa la precipitación de un producto de reacción coloreado en los sitios del antígeno localizados por el anticuerpo primario. Consulte en el prospecto correspondiente del sistema de detección las reacciones de color esperadas. Un patólogo cualificado experimentado en procedimientos de inmunohistoquímica debe evaluar los controles de tejido positivos y negativos antes de interpretar los resultados.

Control de Tejido Positivo

El control de tejido positivo teñido debe examinarse primero para determinar que todos los reactivos funcionan adecuadamente. La presencia de un producto de reacción con el color adecuado dentro de las células diana es indicativa de una reactividad positiva. Consulte en el prospecto del sistema de detección utilizado las reacciones de color esperadas. Según sea la duración de la incubación y la potencia de la hematoxilina empleada, la contratinción dará como resultado una coloración azul de pálida a oscura de los núcleos celulares. Una contratinción excesiva o incompleta puede comprometer la interpretación adecuada de los resultados. Si los controles de tejidos positivos no muestran una tinción positiva apropiada, los resultados de las muestras en estudio se deben considerar no válidos.

Control de Tejido Negativo

El control de tejido negativo debe examinarse después del control de tejido positivo para verificar la marcación específica del antígeno diana por el anticuerpo primario. La ausencia de tinción específica en el control de tejido negativo confirma la ausencia de reactividad cruzada del anticuerpo con las células o los componentes celulares. Si se produce una tinción específica en el control de tejido negativo, los resultados obtenidos con la muestra del paciente se consideran no válidos. La tinción no específica, si la hay, tendrá un aspecto difuso. También se puede observar una ligera tinción específica esporádica del tejido conjuntivo en cortes de tejidos que no estén fijados óptimamente. Para la interpretación de los resultados de

la tinción deben usarse células intactas. Las células necróticas o degeneradas muestran una tinción no específica.

Tejido del Paciente

Las muestras del paciente se deben examinar al final. La intensidad de la tinción positiva se debe valorar en el contexto de cualquier tinción de fondo del control de reactivo negativo. Como en cualquier prueba de inmunohistoquímica, un resultado negativo significa que el antígeno en cuestión no se ha detectado, no que el antígeno esté ausente de las células o del tejido analizado. Un panel de anticuerpos puede ayudar a identificar reacciones negativas falsas (consulte la sección Sumario de resultados esperados). La morfología de cada muestra del tejido también debe examinarse utilizando un corte con tinción de hematoxilina y eosina al interpretar cualquier resultado de inmunohistoquímica. Un patólogo cualificado debe interpretar los resultados morfológicos del paciente y sus datos clínicos pertinentes.

Limitaciones

1. El color del anticuerpo no afecta lo funcionamiento.
2. Este reactivo es "de exclusivo uso profesional", ya que la inmunohistoquímica es un proceso diagnóstico de varias etapas que requiere una formación especializada en la selección de los reactivos, tejidos, fijación y procesamiento apropiados; la preparación del portaobjetos de inmunohistoquímica y la interpretación de los resultados de la tinción.
3. Para uso exclusivo de laboratorio.
4. Para diagnóstico *in vitro*.
5. La tinción de los tejidos depende de la manipulación y el procesamiento de los mismos antes de la tinción. Una fijación, congelación, descongelación, lavado, secado, calentado o corte inadecuados o la contaminación con otros tejidos o líquidos puede producir artefactos, bloqueo del anticuerpo o resultados falsos negativos. Los resultados inconsistentes pueden ser consecuencia de las variaciones en los métodos de fijación y embebido, así como de irregularidades inherentes dentro del tejido.
6. Una contratinción excesiva o incompleta puede comprometer la interpretación adecuada de los resultados.
7. La interpretación clínica de una tinción positiva o de su ausencia debe evaluarse en el contexto de la historia clínica, la morfología, otros criterios histopatológicos, así como otras pruebas diagnósticas. Este anticuerpo está diseñado para utilizarse en un panel de anticuerpos si fuera pertinente. Es responsabilidad de un patólogo cualificado familiarizarse con los anticuerpos, reactivos, paneles de diagnóstico y métodos usados para obtener una preparación con tinción. La tinción se debe realizar en un laboratorio certificado con la supervisión de un anatomopatólogo responsable de la revisión de los portaobjetos teñidos y de la verificación de la idoneidad de los controles negativos y positivos.
8. Cell Marque provee anticuerpos y reactivos en una dilución óptima para usar como se indica. Cualquier desviación de los procedimientos recomendados del método puede invalidar los resultados esperados. Se deben utilizar y documentar los controles apropiados. Los usuarios deben asumir en cualquier caso la responsabilidad de la interpretación de los resultados del paciente.
9. Cell Marque provee los anticuerpos primarios en formato concentrado de manera que el usuario pueda diluirlos después óptimamente para usarlos según determine y observando las técnicas de validación adecuadas. Los usuarios deben validar el uso de cualquier disolvente que no se recomiende en este documento. Una vez que el anticuerpo primario haya sido validado como adecuado para usar, cualquier desviación de los procedimientos de prueba recomendados puede invalidar los resultados esperados. Se deben utilizar y

documentar los controles apropiados. Los usuarios deben asumir en cualquier caso la responsabilidad de la interpretación de los resultados del paciente.

10. Este producto no está diseñado para utilizarlo en citometría de flujo.
11. Los reactivos pueden mostrar reacciones inesperadas en tejidos no estudiados previamente. No puede excluirse completamente la posibilidad de reacciones inesperadas, incluso en grupos de tejidos analizados, debido a la variabilidad biológica de la expresión del antígeno en neoplasmas u otros tejidos patológicos. Póngase en contacto con el servicio técnico de Cell Marque si sospecha que ha habido una reacción inesperada documentada.
12. Los tejidos de personas infectadas con el virus de la hepatitis B y que contengan antígeno de superficie (HBsAg) pueden mostrar una tinción no específica con peroxidasa de rábano.
13. Cuando se utilizan en pasos de bloqueo, los sueros normales procedentes del mismo origen animal que los antisueros secundarios pueden provocar resultados de falsos negativos o falsos positivos debido al efecto de los autoanticuerpos o anticuerpos naturales.
14. Pueden verse resultados de falsos positivos debido a la unión de proteínas o productos de reacción del sustrato por mecanismos no inmunológicos. También pueden estar causados por la actividad de la pseudoperoxidasa (eritrocitos), actividad de la peroxidasa endógena (citocromo C) o biotina endógena (ejemplos: hígado, cerebro, mama, riñón) dependiendo del tipo de técnica de inmuntinción empleada.
15. Como en cualquier prueba de inmunohistoquímica, un resultado negativo significa que el antígeno no se ha detectado, no que el antígeno esté ausente de las células o del tejido analizado.
16. Los productos de anticuerpo prediluidos están optimizados como productos listos para usar. Debido a la posibilidad de variaciones en la fijación y procesamiento del tejido, puede ser necesario aumentar o reducir el tiempo de incubación del anticuerpo primario en muestras individuales.
17. El anticuerpo, en combinación con sistemas de detección y sus accesorios, detecta los antígenos que sobreviven al proceso habitual de fijación con formol, procesamiento y corte del tejido. Los usuarios que se desvíen de los procedimientos de prueba recomendados son responsables, como lo serían en cualquier caso, de la interpretación y validación de los resultados del paciente.

Sumario de Resultados Esperados

Consulte las siguientes tablas de reactividad:

Estudio Normal			
Tejido	N.º Teñido (+)	N.º Total	Notas
Cerebro	0	1	
Córtex adrenal	0	1	
Ovarios	0	1	
Páncreas	0	1	
Paratiroides	0	1	
Pituitaria	0	1	

Estudio Normal			
Tejido	N.º Teñido (+)	N.º Total	Notas
Testículos	0	1	
Tiroides	0	1	
Pecho	0	2	
Bazo	0	1	
Amígdalas	0	1	
Timo	0	1	
Médula ósea	0	1	
Pulmones	0	2	
Corazón	0	1	
Esófago	0	1	
Estómago	1	1	
Intestino delgado	1	1	
Colon	1	1	
Hígado	0	1	
Glándula salival	0	1	
Vesícula biliar	0	1	
Riñones	0	1	
Vejiga	1	1	
Próstata	0	1	
Útero	0	1	
Trompas de Falopio	0	1	
Uréter	0	1	
Cérvix	0	1	
Músculos del esqueleto	0	1	
Músculo liso	0	1	
Piel	0	1	
Nervios periféricos	0	1	
Mesotelio	0	1	
Grasa	0	1	
Placenta	0	1	

Este anticuerpo tiñe tejidos normales como está indicado en la literatura.

Estudio de la Enfermedad del Tejido			
Tejido	N.º Teñido (+)	N.º Total	Notas
Adenocarcinoma de colon	16	19	
Carcinoma de células transicionales	1	1	
Carcinoma ductal invasivo de mama	0	23	
Adenocarcinoma de estómago	0	1	

Este anticuerpo tiñe tumores como está indicado en la literatura.

Resolución de Problemas

1. Si el control positivo muestra una tinción más débil de la esperada, deben analizarse otros controles positivos realizados en la misma tinción para determinar si se debe al anticuerpo primario o a uno de los reactivos secundarios comunes.
2. Si el control positivo da negativo, se deben analizar otros controles positivos usados en la misma ejecución para determinar si se debe al anticuerpo primario o a uno de los reactivos secundarios comunes. Los tejidos pueden haberse recogido, fijado o desparafinado de manera inadecuada. Deberá seguirse el procedimiento adecuado para la recogida, la conservación y la fijación.
3. Si se produce una tinción de fondo excesiva, pueden haber niveles altos de biotina endógena. Se deberá incluir una etapa de bloqueo con biotina a no ser que se esté utilizando un sistema de detección sin biotina, en cuyo caso ninguna biotina presente sería un factor que contribuyera a la tinción de fondo.
4. Si no se ha eliminado toda la parafina deberá repetirse el procedimiento de desparafinación.
5. Si los cortes de tejido lavan el portaobjetos, deben comprobarse los mismos para garantizar que tienen carga positiva. Otras posibilidades que podrían afectar adversamente a la adhesión del tejido incluyen un secado insuficiente del corte de tejido en el portaobjetos antes de la tinción o fijación en formol que no fuera neutralizado con tampón apropiadamente. El grosor del tejido también puede ser un factor causante.

Para conocer la acción correctiva, consulte la sección de las instrucciones de uso o contacte con el servicio técnico de Cell Marque a través de techsupport@cellmarque.com.

Bibliografía

1. Moll R, et al. Identification of protein IT of the intestinal cytoskeleton as a novel type 1 cytokeratin with unusual properties and expression patterns. *J Cell Biol.* 1990; 111:567-80.
2. Moll R, et al. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell.* 1982; 31:11-24.
3. Han AC, Duszak R Jr. Coexpression of cytokeratins 7 and 20 confirms urothelial carcinoma presenting as an intrarenal tumor. *Cancer.* 1999; 86:2327-30.
4. Moll R, et al. Cytokeratin 20 in human carcinomas: a new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. *AJP.* 1992; 140:427-47.
5. Tot T. Adenocarcinomas metastatic to the liver: the value of cytokeratins 20 and 7 in search for unknown primary tumors. *Cancer* 1999; 85:171-7.

6. Lau SK, et al. Comparative immunohistochemical profile of hepatocellular carcinoma, cholangiocarcinoma, and metastatic adenocarcinoma. Hum Pathol. 2002; 33:1175-81.
7. Rullier A et al. Cytokeratin 7 and 20 expression in cholangiocarcinomas varies along the biliary tract but still differs from that in colorectal carcinoma metastasis. Am J Surg Pathol. 2000; 24:870-6.

Limitaciones de Responsabilidad

*TWEEN es una marca registrada de Croda International PLC.

©2017 Sigma-Aldrich Co. LLC. Todos los derechos reservados. SIGMA-ALDRICH es una marca comercial de Sigma-Aldrich Co. LLC, registrada en EE. UU. y en otros países. Cell Marque, Trilogy, Declere y HiDef Detection son marcas comerciales de Sigma-Aldrich Co. LLC o de sus filiales.



www.cellmarque.com



6600 Sierra College Blvd. • Rocklin, CA 95677 USA • 916-746-8900



EMERGO EUROPE

Prinsessegracht 20, 2514 AP The Hague, The Netherlands



CM Template #2.4

Implementation date 14 Nov 2017

Cytokeratin 7 (OV-TL 12/30) Mouse Monoclonal Antibody

Para Diagnóstico In Vitro (IVD)

Identificación del Producto

REF	Descripción
307M-94	0,1 ml concentrado
307M-95	0,5 ml concentrado
307M-96	1,0 ml concentrado
307M-97	1,0 ml prediluido listo para usar
307M-98	7,0 ml prediluido listo para usar
307M-90	25,0 ml prediluido listo para usar

Definiciones de los Símbolos

KEY-CODE	código
P	prediluir
C	concentrado
A	ascitis
E	sueros
S	sobrenadante
DIL	rango de dilución del concentrado

Uso Previsto

Este anticuerpo está destinado para uso diagnóstico *in vitro* (IVD).

El Cytokeratin 7 (OV-TL 12/30) Mouse Monoclonal Primary Antibody está diseñado para utilizarse en un laboratorio para detectar la proteína citoqueratina 7 en tejidos embebidos en parafina, fijados con formalina y teñidos en pruebas de inmunohistoquímica (IHC) cualitativa.

Los resultados obtenidos con el uso de este producto junto con la historia clínica relevante del paciente, otras pruebas diagnósticas y controles adecuados debe interpretarlos un patólogo cualificado.

Resumen y Explicación

La anti-cytokeratin 7 reacciona con proteínas que se encuentran en la mayoría de las células ductales, glandulares, de transición y epiteliales del conducto biliar. El marcado de la Cytokeratin 7 (CK7) puede ayudar a distinguir entre carcinomas de pulmón¹ y mama y carcinomas uroteliales que normalmente dan tinción positiva, y los carcinomas de colon y próstata, que normalmente carecen de la expresión CK7.²⁻⁷ CK 7 es un marcador común de

los adenocarcinomas primarios de pulmón (casi todos los casos) con menor especificidad, ya que también se observa en otros carcinomas primarios de pulmón y en carcinomas no pulmonares.¹ La anti-cytokeratin 7 también ha resultado útil en el diagnóstico diferencial de las neoplasias de ovario.⁸ Este anticuerpo no reconoce las proteínas de los filamentos intermedios.

Principios y Procedimientos

El anticuerpo primario indicado puede utilizarse como anticuerpo primario para la tinción inmunohistoquímica de cortes de tejido fijado con formal y embebido en parafina. En general, la tinción inmunohistoquímica junto con el sistema de detección mediante unión con peroxidasa de rábano (HRP) o fosfatasa alcalina permite la visualización de antígenos a través de la aplicación secuencial de un anticuerpo específico (anticuerpo primario) al antígeno, un anticuerpo secundario (anticuerpo de unión) al anticuerpo primario, un complejo enzimático y un sustrato cromogénico con etapas de lavado intermedias. La activación enzimática del cromógeno da lugar a un producto de reacción visible en el sitio del antígeno. La muestra puede entonces contrateñirse y aplicarse un cubreobjetos. Los resultados se interpretan con un microscopio óptico.

Materiales y Métodos

Reactivos Suministrados

Composición del Producto	
Prediluir: diluido en	Amortiguador Tris, pH 7,3-7,7, con un 1% de BSA y <0,1% de azida de sodio
Concentrado: diluido en	Amortiguador Tris, pH 7,3-7,7, con un 1% de BSA y <0,1% de azida de sodio
Host	ratón
Isotipo	IgG ₁ /k
Intervalo de dilución de trabajo recomendado	1:100-1:500
Fuente	sobrenadante

Vea la etiqueta del producto para información específica sobre el lote acerca de lo siguiente:

1. Concentración de anticuerpos de inmunoglobulina
2. Detalles de la fuente

Reconstitución, Mezcla, Dilución y Titulación

El anticuerpo prediluido está listo para usar y optimizado para la tinción. El anticuerpo concentrado está optimizado para diluirlo en el rango de dilución con Cell Marque Diamond Antibody Diluent.

Materiales y Reactivos Necesarios No Suministrados

Los siguientes reactivos y materiales pueden ser necesarios para la tinción, pero no se incluyen con el anticuerpo primario:

1. Tejido de control positivo y negativo
2. Portaobjetos para microscopio con carga positiva
3. Horno de secado capaz de mantener una temperatura de 53-65 °C
4. Cubetas o baños de tinción
5. Cronómetro
6. Xileno o sustituto de xileno
7. Alcohol reactivo o etanol

Nota: El tratamiento previo de un paso de Cell Marque, Trilogy™ (N.º de catálogo 920P-06), puede sustituir los elementos de los puntos 6 y 7 anteriores.

8. Agua desionizada o destilada
9. Equipo de calentamiento, como la olla de presión eléctrica para el paso del tratamiento previo del tejido
10. Sistema de detección como HiDef Detection™ HRP Polymer System (N.º de catálogo 954D-20) o HiDef Detection™ Alk Phos Polymer System (N.º de catálogo 962D-20)
11. Cromógeno, como DAB Substrate Kit (N.º de catálogo 957D-20) o Permanent Red Chromogen Kit (N.º de catálogo 960D-10)
12. TBS IHC Wash Buffer + Tween® 20 (N.º de catálogo 935B-09)
13. Hematoxylin u otra contratinción
14. Diluyentes de anticuerpo, como Diamond: Antibody Diluent (N.º de catálogo 938B-05) o Emerald: Antibody Diluent (N.º de catálogo 936B-08)
15. Peroxide Block (N.º de catálogo 925B-05) para usar con HRP
16. Avidin-Biotin Blocking Reagents para usar con detección con estreptavidina-biotina
17. Negative Control Reagent (N.º de catálogo 939B-02 para universal)
18. Mounting Medium
19. Cubreobjetos
20. Microscopio óptico (40-400x)

Conservación y Manipulación

Almacenar a 2-8 °C. No congelar.

Para garantizar la dispensación adecuada del reactivo y la estabilidad del anticuerpo, tras cada utilización se debe volver a poner el tapón y almacenar el frasco inmediatamente en la nevera, en posición vertical.

Todos los reactivos de anticuerpo tienen una fecha de caducidad. El reactivo es estable hasta la fecha indicada en la etiqueta siempre que se almacene correctamente. No usar el reactivo después de la fecha de caducidad para el método de almacenamiento descrito.

No hay signos definitivos que indiquen la inestabilidad de este producto, por lo que los controles positivos y negativos deben analizarse simultáneamente con muestras desconocidas. Contacte con el servicio técnico de Cell Marque si tiene sospechas sobre la inestabilidad del reactivo.

Extracción y Preparación de la Muestra para su Análisis

Cuando se utiliza el procedimiento habitual, los tejidos fijados en formol en tampón neutro y embebidos en parafina resultan adecuados para el uso con este anticuerpo primario cuando se utiliza con los kits de detección de Cell Marque (consulte la sección Materiales y reactivos necesarios no suministrados). Nota: Cell Marque evalúa el resultado solo en tejidos humanos. El fijador de tejido recomendado es formalina tamponada neutral 10%. Pueden tener lugar resultados variables como consecuencia de una fijación prolongada o procesos especiales tales como la descalcificación en la preparación de la médula ósea.

Cada sección debe cortarse con el grosor apropiado (aproximadamente 3 µm) y colocarse en un portaobjetos de vidrio con carga positiva. Los portaobjetos que contienen el corte de tejido pueden secarse durante al menos 2 horas (pero no más de 24 horas) en un horno a una temperatura de 53-65 °C.

Advertencias y Precauciones

1. Adopte las precauciones adecuadas cuando se manipulen los reactivos. Usar guantes y batas de laboratorio desechables cuando se manipulen materiales potencialmente carcinógenos o tóxicos (como xileno).
2. Evite el contacto de los reactivos con los ojos y las membranas mucosas. Si se produce el contacto con áreas sensibles, lávese con agua abundante.
3. Las muestras del paciente y todos los materiales en contacto con ellas deben tratarse como si fuesen materiales potencialmente infecciosos y desecharse con las precauciones adecuadas. Nunca pipetear con la boca.
4. Evitar la contaminación microbiana de los reactivos, ya que podrían producirse resultados incorrectos.
5. El usuario debe validar los tiempos y temperaturas de incubación.
6. Los reactivos prediluidos listos para usar están diluidos óptimamente por lo que una dilución adicional podría producir la pérdida de tinción del antígeno.
7. Los reactivos concentrados pueden diluirse óptimamente en base a la determinación del usuario. El usuario deberá validar igualmente tanto la compatibilidad como el efecto en la estabilidad de cualquier disolvente utilizado que no esté recomendado específicamente en este documento.
8. Este producto no se clasifica como sustancia peligrosa cuando se usa según las instrucciones. El conservante del reactivo es inferior al 0,1% de ácido sódico y no cumple los criterios de la OSHA para sustancias peligrosas a la concentración indicada. Consulte la hoja de datos de seguridad de los materiales.
9. El usuario debe validar cualquier condición de almacenamiento que no sea una de las especificadas en el prospecto.
10. El disolvente puede incluir albúmina de suero bovino y el sobrenadante puede contener suero bovino. Los productos que contienen suero fetal bovino y los productos que contienen albúmina de suero bovino se compran a los proveedores comerciales. Los certificados de origen de la fuente animal utilizada en estos productos obran en el archivo de Cell Marque. Los certificados aseguran que las fuentes bovinas provienen de países con riesgo mínimo de BSE y relacionan como fuentes de bovinos EE. UU. y Canadá.
11. Como con cualquier producto proveniente de fuentes biológicas, deberán emplearse procedimientos de manipulación apropiados.

Instrucciones de Uso

Protocolos de tinción recomendados para el anticuerpo primario indicado:

HiDef HRP:

HiDef Detection™ HRP Polymer System (N.º de catálogo 954D-20)

1. Técnica de recuperación del epítipo: HIER, Reactivo para la recuperación del epítipo: Trilogy
2. Tiempo de incubación de anticuerpo (minutos): 10-30
3. Tiempo de incubación de HiDef Detection Amplifier (minutos): 10
4. Tiempo de incubación de HiDef Detection Polymer Detector (minutos): 10
5. Tiempo de incubación de DAB (minutos): 1-10
6. Deshidrate y cubra el portaobjetos.

HiDef Alk Phos:

HiDef Detection™ Alk Phos Polymer System (N.º de catálogo 962D-20)

1. Técnica de recuperación del epítipo: HIER, Reactivo para la recuperación del epítipo: Trilogy
2. Tiempo de incubación de anticuerpo (minutos): 10-30
3. Tiempo de incubación de HiDef Detection Amplifier (minutos): 10
4. Tiempo de incubación de HiDef Detection Polymer Detector (minutos): 10
5. Tiempo de incubación de Permanent Red (minutos): 15-30
6. Deshidrate y cubra el portaobjetos.

Procedimientos de Control de Calidad

Control de Tejido Positivo

Cada vez que se realice el procedimiento de tinción, debe procesarse un control positivo del tejido. Este tejido puede contener células o componentes del tejido de tinción positiva y negativa y servir como tejido de control positivo y negativo. Los tejidos de control deben ser muestras frescas de autopsia, biopsia o cirugía preparadas o fijadas con la mayor brevedad con un proceso idéntico al de los cortes en estudio. El uso de un corte de tejido fijado o procesado de forma diferente a la muestra en estudio servirá para el control de todos los reactivos y pasos del método excepto la fijación y el procesamiento del tejido.

Un tejido con una tinción positiva débil es más adecuado para un control de calidad óptimo y para detectar niveles pequeños de degradación del reactivo. El control de tejido positivo para el anticuerpo primario indicado puede incluir lo siguiente:

Control de Tejido Positivo	
Tejido	Visualización
Adenocarcinoma pulmonar	Citoplasmática
Glándula salival	Citoplasmática

Los controles de tejido positivos conocidos solo se deben usar para monitorizar el comportamiento correcto de los tejidos procesados y los reactivos de la prueba, y no como ayuda para establecer un diagnóstico específico de las muestras del paciente. Si los controles

positivos del tejido no muestran una tinción positiva apropiada, los resultados de las muestras en estudio se deben considerar no válidos.

Control de Tejido Negativo

El mismo tejido utilizado para el control de tejido positivo se puede utilizar en el control de tejido negativo. La variedad de tipos de células presentes en la mayoría de los cortes de tejidos ofrece sitios de control negativo internos, pero esto debe verificarlo el usuario. Los componentes que no se tiñen deben demostrar la ausencia de tinción específica y proporcionar una indicación de tinción de fondo no específica. Si se produce una tinción específica en los sitios de control de tejido negativo, los resultados obtenidos con las muestras del paciente deben considerarse no válidas.

Discrepancias Inexplicables

Las discrepancias inexplicables de los controles deben remitirse de inmediato al servicio técnico de Cell Marque. Si los resultados del control de calidad no cumplen las especificaciones, los resultados del paciente no son válidos. Véase la sección Resolución de problemas de este prospecto. Identifique y corrija el problema; a continuación, repita todo el procedimiento con las muestras del paciente.

Reactivo de Control Negativo

Se debe utilizar un reactivo de control negativo para cada muestra para ayudar a interpretar los resultados. Para evaluar una tinción no específica se utiliza un reactivo de control negativo en lugar del anticuerpo primario. Se deberá tratar el portaobjetos con el reactivo de control negativo haciendo coincidir las especies huéspedes del anticuerpo primario e idéneamente con la misma concentración de IgG. El periodo de incubación para el reactivo de control negativo deberá ser igual que el periodo de incubación del anticuerpo primario.

Interpretación de los Resultados

El procedimiento de inmunotinción causa la precipitación de un producto de reacción coloreado en los sitios del antígeno localizados por el anticuerpo primario. Consulte en el prospecto correspondiente del sistema de detección las reacciones de color esperadas. Un patólogo cualificado experimentado en procedimientos de inmunohistoquímica debe evaluar los controles de tejido positivos y negativos antes de interpretar los resultados.

Control de Tejido Positivo

El control de tejido positivo teñido debe examinarse primero para determinar que todos los reactivos funcionan adecuadamente. La presencia de un producto de reacción con el color adecuado dentro de las células diana es indicativa de una reactividad positiva. Consulte en el prospecto del sistema de detección utilizado las reacciones de color esperadas. Según sea la duración de la incubación y la potencia de la hematoxilina empleada, la contratinción dará como resultado una coloración azul de pálida a oscura de los núcleos celulares. Una contratinción excesiva o incompleta puede comprometer la interpretación adecuada de los resultados. Si los controles de tejidos positivos no muestran una tinción positiva apropiada, los resultados de las muestras en estudio se deben considerar no válidos.

Control de Tejido Negativo

El control de tejido negativo debe examinarse después del control de tejido positivo para verificar la marcación específica del antígeno diana por el anticuerpo primario. La ausencia de tinción específica en el control de tejido negativo confirma la ausencia de reactividad cruzada del anticuerpo con las células o los componentes celulares. Si se produce una tinción específica en el control de tejido negativo, los resultados obtenidos con la muestra del paciente se consideran no válidos. La tinción no específica, si la hay, tendrá un aspecto difuso.

También se puede observar una ligera tinción específica esporádica del tejido conjuntivo en cortes de tejidos que no estén fijados óptimamente. Para la interpretación de los resultados de la tinción deben usarse células intactas. Las células necróticas o degeneradas muestran una tinción no específica.

Tejido del Paciente

Las muestras del paciente se deben examinar al final. La intensidad de la tinción positiva se debe valorar en el contexto de cualquier tinción de fondo del control de reactivo negativo. Como en cualquier prueba de inmunohistoquímica, un resultado negativo significa que el antígeno en cuestión no se ha detectado, no que el antígeno esté ausente de las células o del tejido analizado. Un panel de anticuerpos puede ayudar a identificar reacciones negativas falsas (consulte la sección Sumario de resultados esperados). La morfología de cada muestra del tejido también debe examinarse utilizando un corte con tinción de hematoxilina y eosina al interpretar cualquier resultado de inmunohistoquímica. Un patólogo cualificado debe interpretar los resultados morfológicos del paciente y sus datos clínicos pertinentes.

Limitaciones

- El color del anticuerpo no afecta lo funcionamiento.
- Este reactivo es "de exclusivo uso profesional", ya que la inmunohistoquímica es un proceso diagnóstico de varias etapas que requiere una formación especializada en la selección de los reactivos, tejidos, fijación y procesamiento apropiados; la preparación del portaobjetos de inmunohistoquímica y la interpretación de los resultados de la tinción.
- Para uso exclusivo de laboratorio.
- Para diagnóstico *in vitro*.
- La tinción de los tejidos depende de la manipulación y el procesamiento de los mismos antes de la tinción. Una fijación, congelación, descongelación, lavado, secado, calentado o corte inadecuados o la contaminación con otros tejidos o líquidos puede producir artefactos, bloqueo del anticuerpo o resultados falsos negativos. Los resultados inconsistentes pueden ser consecuencia de las variaciones en los métodos de fijación y embebido, así como de irregularidades inherentes dentro del tejido.
- Una contratinción excesiva o incompleta puede comprometer la interpretación adecuada de los resultados.
- La interpretación clínica de una tinción positiva o de su ausencia debe evaluarse en el contexto de la historia clínica, la morfología, otros criterios histopatológicos, así como otras pruebas diagnósticas. Este anticuerpo está diseñado para utilizarlo en un panel de anticuerpos si fuera pertinente. Es responsabilidad de un patólogo cualificado familiarizarse con los anticuerpos, reactivos, paneles de diagnóstico y métodos usados para obtener una preparación con tinción. La tinción se debe realizar en un laboratorio certificado con la supervisión de un anatomopatólogo responsable de la revisión de los portaobjetos teñidos y de la verificación de la idoneidad de los controles negativos y positivos.
- Cell Marque provee anticuerpos y reactivos en una dilución óptima para usar como se indica. Cualquier desviación de los procedimientos recomendados del método puede invalidar los resultados esperados. Se deben utilizar y documentar los controles apropiados. Los usuarios deben asumir en cualquier caso la responsabilidad de la interpretación de los resultados del paciente.
- Cell Marque provee los anticuerpos primarios en formato concentrado de manera que el usuario pueda diluirlos después óptimamente para usarlos según determine y observando las técnicas de validación adecuadas. Los usuarios deben validar el uso de cualquier disolvente que no se recomiende en este documento. Una vez que el anticuerpo primario haya sido validado como adecuado para usar, cualquier desviación de los procedimientos

de prueba recomendados puede invalidar los resultados esperados. Se deben utilizar y documentar los controles apropiados. Los usuarios deben asumir en cualquier caso la responsabilidad de la interpretación de los resultados del paciente.

- Este producto no está diseñado para utilizarlo en citometría de flujo.
- Los reactivos pueden mostrar reacciones inesperadas en tejidos no estudiados previamente. No puede excluirse completamente la posibilidad de reacciones inesperadas, incluso en grupos de tejidos analizados, debido a la variabilidad biológica de la expresión del antígeno en neoplasmas u otros tejidos patológicos. Póngase en contacto con el servicio técnico de Cell Marque si sospecha que ha habido una reacción inesperada documentada.
- Los tejidos de personas infectadas con el virus de la hepatitis B y que contengan antígeno de superficie (HBsAg) pueden mostrar una tinción no específica con peroxidasa de rábano.
- Cuando se utilizan en pasos de bloqueo, los sueros normales procedentes del mismo origen animal que los antisueros secundarios pueden provocar resultados de falsos negativos o falsos positivos debido al efecto de los autoanticuerpos o anticuerpos naturales.
- Pueden verse resultados de falsos positivos debido a la unión de proteínas o productos de reacción del sustrato por mecanismos no inmunológicos. También pueden estar causados por la actividad de la pseudoperoxidasa (eritrocitos), actividad de la peroxidasa endógena (citocromo C) o biotina endógena (ejemplo: hígado, cerebro, mama, riñón) dependiendo del tipo de técnica de inmunotinción empleada.
- Como en cualquier prueba de inmunohistoquímica, un resultado negativo significa que el antígeno no se ha detectado, no que el antígeno esté ausente de las células o del tejido analizado.
- Los productos de anticuerpo prediluidos están optimizados como productos listos para usar. Debido a la posibilidad de variaciones en la fijación y procesamiento del tejido, puede ser necesario aumentar o reducir el tiempo de incubación del anticuerpo primario en muestras individuales.
- El anticuerpo, en combinación con sistemas de detección y sus accesorios, detecta los antígenos que sobreviven al proceso habitual de fijación con formol, procesado y corte del tejido. Los usuarios que se desvíen de los procedimientos de prueba recomendados son responsables, como lo serían en cualquier caso, de la interpretación y validación de los resultados del paciente.

Sumario de Resultados Esperados

Consulte las siguientes tablas de reactividad:

Estudio Normal			
Tejido	N.º Teñido (+)	N.º Total	Notas
Cerebro	0	1	
Córtex adrenal	0	1	
Ovarios	0	1	
Páncreas	1	1	
Paratiroides	1	1	
Pituitaria	1	1	
Testículos	0	1	

Estudio Normal			
Tejido	N.º Teñido (+)	N.º Total	Notas
Tiroides	1	1	
Pecho	2	2	
Bazo	0	1	
Amígdalas	0	1	
Timo	1	1	Corpúsculos de Hassall +
Médula ósea	0	1	
Pulmones	2	2	
Corazón	0	1	
Esófago	0	1	
Estómago	1	1	
Intestino delgado	0	1	
Colon	0	1	
Hígado	1	1	Conductos biliares +
Glándula salival	1	1	
Vesícula biliar	1	1	
Riñones	1	1	Conductos colectores +
Vejiga	1	1	
Próstata	1	1	Células basales +
Útero	1	1	Glándulas endometriales +
Trompas de Falopio	1	1	
Uréter	1	1	
Cérvix	1	1	
Músculos del esqueleto	0	1	
Músculo liso	0	1	
Piel	1	1	Glándulas sebáceas +
Nervios periféricos	0	1	
Mesotelio	1	1	
Grasa	0	1	
Placenta	1	1	

Este anticuerpo tiñe tejidos normales como está indicado en la literatura.

Estudio de la Enfermedad del Tejido			
Tejido	N.º Teñido (+)	N.º Total	Notas
Carcinoma ductal invasivo de mama	20	22	
Adenocarcinoma de colon	5	16	
Adenocarcinoma pulmonar	3	3	
Mesotelioma	1	1	

Este anticuerpo tiñe tumores como está indicado en la literatura.

Resolución de Problemas

1. Si el control positivo muestra una tinción más débil de la esperada, deben analizarse otros controles positivos realizados en la misma tinción para determinar si se debe al anticuerpo primario o a uno de los reactivos secundarios comunes.
2. Si el control positivo da negativo, se deben analizar otros controles positivos usados en la misma ejecución para determinar si se debe al anticuerpo primario o a uno de los reactivos secundarios comunes. Los tejidos pueden haberse recogido, fijado o desparafinado de manera inadecuada. Deberá seguirse el procedimiento adecuado para la recogida, la conservación y la fijación.
3. Si se produce una tinción de fondo excesiva, pueden haber niveles altos de biotina endógena. Se deberá incluir una etapa de bloqueo con biotina a no ser que se esté utilizando un sistema de detección sin biotina, en cuyo caso ninguna biotina presente sería un factor que contribuyera a la tinción de fondo.
4. Si no se ha eliminado toda la parafina deberá repetirse el procedimiento de desparafinación.
5. Si los cortes de tejido lavan el portaobjetos, deben comprobarse los mismos para garantizar que tienen carga positiva. Otras posibilidades que podrían afectar adversamente a la adhesión del tejido incluyen un secado insuficiente del corte de tejido en el portaobjetos antes de la tinción o fijación en formol que no fuera neutralizado con tampón apropiadamente. El grosor del tejido también puede ser un factor causante.

Para conocer la acción correctiva, consulte la sección de las instrucciones de uso o contacte con el servicio técnico de Cell Marque a través de techsupport@cellmarque.com.

Bibliografía

1. Jerome MV, et al. Expression of TTF-1 and Cytokeratins in Primary and Secondary Epithelial Lung Tumours: Correlation with Histological Type and Grade. *Histopathology*. 2004; 45:125-34.
2. Murray SK, et al. Spread of Prostate Carcinoma to the Perirectal Lymph Node Basin: Analysis of 112 Rectal Resections over a 10-year Span for Primary Rectal Adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2004; 28:1154-62.
3. Chu P, et al. Cytokeratin 7 and Cytokeratin 20 Expression in Epithelial Neoplasms: a Survey of 435 Cases. *Mod Pathol*. 2000; 13:962-72.
4. Logani S, et al. Immunoprofile of Ovarian Tumors with Putative Transitional Cell (Urothelial) Differentiation using Novel Urothelial Markers: Histogenetic and Diagnostic Implications. *Am J Surg Pathol*. 2003; 27:1434-41.

5. Ramalingam P, et al. Invasive Micropapillary Carcinoma of the Breast Metastatic to the Urinary Bladder and Endometrium: Diagnostic Pitfalls and Review of the Literature of Tumors with Micropapillary Features. *Ann Diagn Pathol.* 2003; 7:112-9.
6. Roy S, et al. Adenocarcinoma of the Urinary Bladder. *Arch Pathol Lab Med.* 2011; 135:1601-5.
7. Han AC, et al. Coexpression of Cytokeratins 7 and 20 Confirms Urothelial Carcinoma Presenting as an Intrarenal Tumor. *Cancer.* 1999; 86:2327-30.
8. McCluggage WG, et al. Metastatic Neoplasms Involving the Ovary: a Review with an Emphasis on Morphological and Immunohistochemical Features. *Histopathology.* 2005; 47:231-247.

Limitaciones de Responsabilidad

*TWEEN es una marca registrada de Croda International PLC.

©2019 Sigma-Aldrich Co. LLC. Todos los derechos reservados. SIGMA-ALDRICH es una marca comercial de Sigma-Aldrich Co. LLC, registrada en EE. UU. y en otros países. Cell Marque, Trilogy, Declere y HiDef Detection son marcas comerciales de Sigma-Aldrich Co. LLC o de sus filiales.



www.cellmarque.com



6600 Sierra College Blvd. • Rocklin, CA 95677 USA • 916-746-8900



EMERGO EUROPE

Prinsessegracht 20, 2514 AP The Hague, The Netherlands



CM Template #2.4

Implementation date 6 Feb 2019

Chromogranin A (LK2H10) Mouse Monoclonal Antibody

Para Diagnóstico In Vitro (IVD)

Identificación del Producto

REF	Descripción
238M-94	0,1 ml concentrado
238M-95	0,5 ml concentrado
238M-96	1,0 ml concentrado
238M-97	1,0 ml prediluido listo para usar
238M-98	7,0 ml prediluido listo para usar
238M-90	25,0 ml prediluido listo para usar

Definiciones de los Símbolos

KEY-CODE	código
P	prediluir
C	concentrado
A	ascitis
E	suero
S	sobrenadante
DIL	rango de dilución del concentrado

Uso Previsto

Este anticuerpo está destinado para uso diagnóstico *in vitro* (IVD).

Chromogranin A (LK2H10) Mouse Monoclonal Primary Antibody está diseñado para el uso en la detección de la proteína cromogranina A en tejido fijado con formol e incluido en parafina teñido en una prueba de inmunohistoquímica (IHC) cualitativa.

Los resultados obtenidos con el uso de este producto junto con la historia clínica relevante del paciente, otras pruebas diagnósticas y controles adecuados debe interpretarlos un patólogo cualificado.

Resumen y Explicación

Los métodos inmunohistoquímicos han localizado la cromogranina en una amplia variedad de tejidos endócrinos incluyendo pituitaria, páncreas, tiroides y paratiroides.¹⁻³ Las células neuroendócrinas muestran una fina y granular inmunoreactividad con la cromogranina.¹⁻³ En general es aceptado que la coexpresión de ciertas queratinas y cromogranina está relacionada con un linaje neuroendócrino. La presencia de una tinción fuerte con cromogranina y la

ausencia de tinción con queratina podría indicar la posibilidad de un paraganglioma. La coexpresión de cromogranina y EEN es típica de las neoplasias neuroendócrinas.

Principios y Procedimientos

El anticuerpo primario indicado puede utilizarse como anticuerpo primario para la tinción inmunohistoquímica de cortes de tejido fijado con formol y embebido en parafina. En general, la tinción inmunohistoquímica junto con el sistema de detección mediante unión con peroxidasa de rábano (HRP) o fosfatasa alcalina permite la visualización de antígenos a través de la aplicación secuencial de un anticuerpo específico (anticuerpo primario) al antígeno, un anticuerpo secundario (anticuerpo de unión) al anticuerpo primario, un complejo enzimático y un sustrato cromogénico con etapas de lavado intermedias. La activación enzimática del cromógeno da lugar a un producto de reacción visible en el sitio del antígeno. La muestra puede entonces contrateñirse y aplicarse un cubreportaobjetos. Los resultados se interpretan con un microscopio óptico.

Materiales y Métodos

Reactivos Suministrados

Composición del Producto	
Prediluir: diluido en	Amortiguador Tris, pH 7,3-7,7, con un 1% de BSA y <0,1% de azida de sodio
Concentrado: diluido en	Amortiguador Tris, pH 7,3-7,7, con un 1% de BSA y <0,1% de azida de sodio
Host	ratón
Isotipo	IgG ₁ /k
Intervalo de dilución de trabajo recomendado	1:100-1:500
Fuente	sobrenadante

Vea la etiqueta del producto para información específica sobre el lote acerca de lo siguiente:

1. Concentración de anticuerpos de inmunoglobulina
2. Detalles de la fuente

Reconstitución, Mezcla, Dilución y Titulación

El anticuerpo prediluido está listo para usar y optimizado para la tinción. El anticuerpo concentrado está optimizado para diluirlo en el rango de dilución con Cell Marque Diamond: Antibody Diluent.

Materiales y Reactivos Necesarios No Suministrados

Los siguientes reactivos y materiales pueden ser necesarios para la tinción, pero no se incluyen con el anticuerpo primario:

1. Tejido de control positivo y negativo
2. Portaobjetos para microscopio con carga positiva
3. Horno de secado capaz de mantener una temperatura de 53-65 °C
4. Cubetas o baños de tinción
5. Cronómetro
6. Xileno o sustituto de xileno
7. Alcohol reactivo o etanol

Nota: El tratamiento previo de un paso de Cell Marque, Trilogy™ (N.º de catálogo 920P-06), puede sustituir los elementos de los puntos 6 y 7 anteriores.

8. Agua desionizada o destilada
9. Equipo de calentamiento, como la olla de presión eléctrica para el paso del tratamiento previo del tejido
10. Sistema de detección como HiDef Detection™ HRP Polymer System (N.º de catálogo 954D-20) o HiDef Detection™ Alk Phos Polymer System (N.º de catálogo 962D-20)
11. Cromógeno, como DAB Substrate Kit (N.º de catálogo 957D-20) o Permanent Red Chromogen Kit (N.º de catálogo 960D-10)
12. TBS IHC Wash Buffer + Tween® 20 (N.º de catálogo 935B-09)
13. Hematoxylin u otra contratinción
14. Diluyentes de anticuerpo, como Diamond: Antibody Diluent (N.º de catálogo 938B-05) o Emerald: Antibody Diluent (N.º de catálogo 936B-08)
15. Peroxide Block (N.º de catálogo 925B-05) para usar con HRP
16. Avidin-Biotin Blocking Reagents para usar con detección con estreptavidina-biotina
17. Negative Control Reagent (N.º de catálogo 939B-02 para universal)
18. Mounting Medium
19. Cubreobjetos
20. Microscopio óptico (40-400x)

Conservación y Manipulación

Almacenar a 2-8 °C. No congelar.

Para garantizar la dispensación adecuada del reactivo y la estabilidad del anticuerpo, tras cada utilización se debe volver a poner el tapón y almacenar el frasco inmediatamente en la nevera, en posición vertical.

Todos los reactivos de anticuerpo tienen una fecha de caducidad. El reactivo es estable hasta la fecha indicada en la etiqueta siempre que se almacene correctamente. No usar el reactivo después de la fecha de caducidad para el método de almacenamiento descrito.

No hay signos definitivos que indiquen la inestabilidad de este producto, por lo que los controles positivos y negativos deben analizarse simultáneamente con muestras desconocidas. Contacte con el servicio técnico de Cell Marque si tiene sospechas sobre la inestabilidad del reactivo.

Extracción y Preparación de la Muestra para su Análisis

Cuando se utiliza el procedimiento habitual, los tejidos fijados en formol en tampón neutro y embebidos en parafina resultan adecuados para el uso con este anticuerpo primario cuando se utiliza con los kits de detección de Cell Marque (consulte la sección Materiales y reactivos necesarios no suministrados). Nota: Cell Marque evalúa el resultado solo en tejidos humanos. El fijador de tejido recomendado es formalina tamponada neutral 10%. Pueden tener lugar resultados variables como consecuencia de una fijación prolongada o procesos especiales tales como la descalcificación en la preparación de la médula ósea.

Cada sección debe cortarse con el grosor apropiado (aproximadamente 3 µm) y colocarse en un portaobjetos de vidrio con carga positiva. Los portaobjetos que contienen el corte de tejido pueden secarse durante al menos 2 horas (pero no más de 24 horas) en un horno a una temperatura de 53-65 °C.

Advertencias y Precauciones

1. Adopte las precauciones adecuadas cuando se manipulen los reactivos. Usar guantes y batas de laboratorio desechables cuando se manipulen materiales potencialmente carcinógenos o tóxicos (como xileno).
2. Evite el contacto de los reactivos con los ojos y las membranas mucosas. Si se produce el contacto con áreas sensibles, lávese con agua abundante.
3. Las muestras del paciente y todos los materiales en contacto con ellas deben tratarse como si fuesen materiales potencialmente infecciosos y desecharse con las precauciones adecuadas. Nunca pipetear con la boca.
4. Evitar la contaminación microbiana de los reactivos, ya que podrían producirse resultados incorrectos.
5. El usuario debe validar los tiempos y temperaturas de incubación.
6. Los reactivos prediluidos listos para usar están diluidos óptimamente por lo que una dilución adicional podría producir la pérdida de tinción del antígeno.
7. Los reactivos concentrados pueden diluirse óptimamente en base a la determinación del usuario. El usuario deberá validar igualmente tanto la compatibilidad como el efecto en la estabilidad de cualquier disolvente utilizado que no esté recomendado específicamente en este documento.
8. Este producto no se clasifica como sustancia peligrosa cuando se usa según las instrucciones. El conservante del reactivo es inferior al 0,1% de ácido sódico y no cumple los criterios de la OSHA para sustancias peligrosas a la concentración indicada. Consulte la hoja de datos de seguridad de los materiales.
9. El usuario debe validar cualquier condición de almacenamiento que no sea una de las especificadas en el prospecto.
10. El disolvente puede incluir albúmina de suero bovino y el sobrenadante puede contener suero bovino. Los productos que contienen suero fetal bovino y los productos que contienen albúmina de suero bovino se compran a los proveedores comerciales. Los certificados de origen de la fuente animal utilizada en estos productos obran en el archivo de Cell Marque. Los certificados aseguran que las fuentes bovinas provienen de países con riesgo mínimo de BSE y relacionan como fuentes de bovinos EE. UU. y Canadá.
11. Como con cualquier producto proveniente de fuentes biológicas, deberán emplearse procedimientos de manipulación apropiados.

Instrucciones de Uso

Protocolos de tinción recomendados para el anticuerpo primario indicado:

HiDef HRP:

HiDef Detection™ HRP Polymer System (N.º de catálogo 954D-20)

1. Técnica de recuperación del epítipo: HIER, Reactivo para la recuperación del epítipo: Trilogy
2. Tiempo de incubación de anticuerpo (minutos): 10-30
3. Tiempo de incubación de HiDef Detection Amplifier (minutos): 10
4. Tiempo de incubación de HiDef Detection Polymer Detector (minutos): 10
5. Tiempo de incubación de DAB (minutos): 1-10
6. Deshidrate y cubra el portaobjetos.

HiDef Alk Phos:

HiDef Detection™ Alk Phos Polymer System (N.º de catálogo 962D-20)

1. Técnica de recuperación del epítipo: HIER, Reactivo para la recuperación del epítipo: Trilogy
2. Tiempo de incubación de anticuerpo (minutos): 10-30
3. Tiempo de incubación de HiDef Detection Amplifier (minutos): 10
4. Tiempo de incubación de HiDef Detection Polymer Detector (minutos): 10
5. Tiempo de incubación de Permanent Red (minutos): 15-30
6. Deshidrate y cubra el portaobjetos.

Procedimientos de Control de Calidad

Control de Tejido Positivo

Cada vez que se realice el procedimiento de tinción, debe procesarse un control positivo del tejido. Este tejido puede contener células o componentes del tejido de tinción positiva y negativa y servir como tejido de control positivo y negativo. Los tejidos de control deben ser muestras frescas de autopsia, biopsia o cirugía preparadas o fijadas con la mayor brevedad con un proceso idéntico al de los cortes en estudio. El uso de un corte de tejido fijado o procesado de forma diferente a la muestra en estudio servirá para el control de todos los reactivos y pasos del método excepto la fijación y el procesamiento del tejido.

Un tejido con una tinción positiva débil es más adecuado para un control de calidad óptimo y para detectar niveles pequeños de degradación del reactivo. El control de tejido positivo para el anticuerpo primario indicado puede incluir lo siguiente:

Control de Tejido Positivo	
Tejido	Visualización
Páncreas	Citoplasmática

Los controles de tejido positivos conocidos solo se deben usar para monitorizar el comportamiento correcto de los tejidos procesados y los reactivos de la prueba, y no como ayuda para establecer un diagnóstico específico de las muestras del paciente. Si los controles positivos del tejido no muestran una tinción positiva apropiada, los resultados de las muestras en estudio se deben considerar no válidos.

Control de Tejido Negativo

El mismo tejido utilizado para el control de tejido positivo se puede utilizar en el control de tejido negativo. La variedad de tipos de células presentes en la mayoría de los cortes de tejidos ofrece sitios de control negativo internos, pero esto debe verificarlo el usuario. Los componentes que no se tiñen deben demostrar la ausencia de tinción específica y proporcionar una indicación de tinción de fondo no específica. Si se produce una tinción específica en los sitios de control de tejido negativo, los resultados obtenidos con las muestras del paciente deben considerarse no válidas.

Discrepancias Inexplicables

Las discrepancias inexplicables de los controles deben remitirse de inmediato al servicio técnico de Cell Marque. Si los resultados del control de calidad no cumplen las especificaciones, los resultados del paciente no son válidos. Véase la sección Resolución de problemas de este prospecto. Identifique y corrija el problema; a continuación, repita todo el procedimiento con las muestras del paciente.

Reactivo de Control Negativo

Se debe utilizar un reactivo de control negativo para cada muestra para ayudar a interpretar los resultados. Para evaluar una tinción no específica se utiliza un reactivo de control negativo en lugar del anticuerpo primario. Se deberá tratar el portaobjetos con el reactivo de control negativo haciendo coincidir las especies huéspedes del anticuerpo primario e idéneamente con la misma concentración de IgG. El periodo de incubación para el reactivo de control negativo deberá ser igual que el periodo de incubación del anticuerpo primario.

Interpretación de los Resultados

El procedimiento de inmunotinción causa la precipitación de un producto de reacción coloreado en los sitios del antígeno localizados por el anticuerpo primario. Consulte en el prospecto correspondiente del sistema de detección las reacciones de color esperadas. Un patólogo cualificado experimentado en procedimientos de inmunohistoquímica debe evaluar los controles de tejido positivos y negativos antes de interpretar los resultados.

Control de Tejido Positivo

El control de tejido positivo teñido debe examinarse primero para determinar que todos los reactivos funcionan adecuadamente. La presencia de un producto de reacción con el color adecuado dentro de las células diana es indicativa de una reactividad positiva. Consulte en el prospecto del sistema de detección utilizado las reacciones de color esperadas. Según sea la duración de la incubación y la potencia de la hematoxilina empleada, la contratinción dará como resultado una coloración azul de pálida a oscura de los núcleos celulares. Una contratinción excesiva o incompleta puede comprometer la interpretación adecuada de los resultados. Si los controles de tejidos positivos no muestran una tinción positiva apropiada, los resultados de las muestras en estudio se deben considerar no válidos.

Control de Tejido Negativo

El control de tejido negativo debe examinarse después del control de tejido positivo para verificar la marcación específica del antígeno diana por el anticuerpo primario. La ausencia de tinción específica en el control de tejido negativo confirma la ausencia de reactividad cruzada del anticuerpo con las células o los componentes celulares. Si se produce una tinción específica en el control de tejido negativo, los resultados obtenidos con la muestra del paciente se consideran no válidos. La tinción no específica, si la hay, tendrá un aspecto difuso. También se puede observar una ligera tinción específica esporádica del tejido conjuntivo en cortes de tejidos que no estén fijados óptimamente. Para la interpretación de los resultados de

la tinción deben usarse células intactas. Las células necróticas o degeneradas muestran una tinción no específica.

Tejido del Paciente

Las muestras del paciente se deben examinar al final. La intensidad de la tinción positiva se debe valorar en el contexto de cualquier tinción de fondo del control de reactivo negativo. Como en cualquier prueba de inmunohistoquímica, un resultado negativo significa que el antígeno en cuestión no se ha detectado, no que el antígeno esté ausente de las células o del tejido analizado. Un panel de anticuerpos puede ayudar a identificar reacciones negativas falsas (consulte la sección Sumario de resultados esperados). La morfología de cada muestra del tejido también debe examinarse utilizando un corte con tinción de hematoxilina y eosina al interpretar cualquier resultado de inmunohistoquímica. Un patólogo cualificado debe interpretar los resultados morfológicos del paciente y sus datos clínicos pertinentes.

Limitaciones

1. El color del anticuerpo no afecta lo funcionamiento.
2. Este reactivo es "de exclusivo uso profesional", ya que la inmunohistoquímica es un proceso diagnóstico de varias etapas que requiere una formación especializada en la selección de los reactivos, tejidos, fijación y procesamiento apropiados; la preparación del portaobjetos de inmunohistoquímica y la interpretación de los resultados de la tinción.
3. Para uso exclusivo de laboratorio.
4. Para diagnóstico *in vitro*.
5. La tinción de los tejidos depende de la manipulación y el procesamiento de los mismos antes de la tinción. Una fijación, congelación, descongelación, lavado, secado, calentado o corte inadecuados o la contaminación con otros tejidos o líquidos puede producir artefactos, bloqueo del anticuerpo o resultados falsos negativos. Los resultados inconsistentes pueden ser consecuencia de las variaciones en los métodos de fijación y embebido, así como de irregularidades inherentes dentro del tejido.
6. Una contratinción excesiva o incompleta puede comprometer la interpretación adecuada de los resultados.
7. La interpretación clínica de una tinción positiva o de su ausencia debe evaluarse en el contexto de la historia clínica, la morfología, otros criterios histopatológicos, así como otras pruebas diagnósticas. Este anticuerpo está diseñado para utilizarlo en un panel de anticuerpos si fuera pertinente. Es responsabilidad de un patólogo cualificado familiarizarse con los anticuerpos, reactivos, paneles de diagnóstico y métodos usados para obtener una preparación con tinción. La tinción se debe realizar en un laboratorio certificado con la supervisión de un anatomopatólogo responsable de la revisión de los portaobjetos teñidos y de la verificación de la idoneidad de los controles negativos y positivos.
8. Cell Marque provee anticuerpos y reactivos en una dilución óptima para usar como se indica. Cualquier desviación de los procedimientos recomendados del método puede invalidar los resultados esperados. Se deben utilizar y documentar los controles apropiados. Los usuarios deben asumir en cualquier caso la responsabilidad de la interpretación de los resultados del paciente.
9. Cell Marque provee los anticuerpos primarios en formato concentrado de manera que el usuario pueda diluirlos después óptimamente para usarlos según determine y observando las técnicas de validación adecuadas. Los usuarios deben validar el uso de cualquier disolvente que no se recomiende en este documento. Una vez que el anticuerpo primario haya sido validado como adecuado para usar, cualquier desviación de los procedimientos de prueba recomendados puede invalidar los resultados esperados. Se deben utilizar y

documentar los controles apropiados. Los usuarios deben asumir en cualquier caso la responsabilidad de la interpretación de los resultados del paciente.

10. Este producto no está diseñado para utilizarlo en citometría de flujo.
11. Los reactivos pueden mostrar reacciones inesperadas en tejidos no estudiados previamente. No puede excluirse completamente la posibilidad de reacciones inesperadas, incluso en grupos de tejidos analizados, debido a la variabilidad biológica de la expresión del antígeno en neoplasmas u otros tejidos patológicos. Póngase en contacto con el servicio técnico de Cell Marque si sospecha que ha habido una reacción inesperada documentada.
12. Los tejidos de personas infectadas con el virus de la hepatitis B y que contengan antígeno de superficie (HBsAg) pueden mostrar una tinción no específica con peroxidasa de rábano.
13. Cuando se utilizan en pasos de bloqueo, los sueros normales procedentes del mismo origen animal que los antisueros secundarios pueden provocar resultados de falsos negativos o falsos positivos debido al efecto de los autoanticuerpos o anticuerpos naturales.
14. Pueden verse resultados de falsos positivos debido a la unión de proteínas o productos de reacción del sustrato por mecanismos no inmunológicos. También pueden estar causados por la actividad de la pseudoperoxidasa (eritrocitos), actividad de la peroxidasa endógena (citocromo C) o biotina endógena (ejemplo: hígado, cerebro, mama, riñón) dependiendo del tipo de técnica de inmunotinción empleada.
15. Como en cualquier prueba de inmunohistoquímica, un resultado negativo significa que el antígeno no se ha detectado, no que el antígeno esté ausente de las células o del tejido analizado.
16. Los productos de anticuerpo prediluidos están optimizados como productos listos para usar. Debido a la posibilidad de variaciones en la fijación y procesamiento del tejido, puede ser necesario aumentar o reducir el tiempo de incubación del anticuerpo primario en muestras individuales.
17. El anticuerpo, en combinación con sistemas de detección y sus accesorios, detecta los antígenos que sobreviven al proceso habitual de fijación con formol, procesado y corte del tejido. Los usuarios que se desvíen de los procedimientos de prueba recomendados son responsables, como lo serían en cualquier caso, de la interpretación y validación de los resultados del paciente.

Sumario de Resultados Esperados

Consulte las siguientes tablas de reactividad:

Estudio Normal			
Tejido	N.º Teñido (+)	N.º Total	Notas
Cerebro	1	1	
Córtex adrenal	1	1	
Ovarios	0	1	
Páncreas	4	4	
Paratiroides	1	1	
Pituitaria	1	1	

Estudio Normal			
Tejido	N.º Teñido (+)	N.º Total	Notas
Testículos	0	1	
Tiroides	2	2	
Pecho	0	2	
Bazo	0	1	
Amígdalas	0	1	
Timo	0	1	
Médula ósea	0	1	
Pulmones	0	2	
Corazón	0	1	
Esófago	0	1	
Estómago	0	1	
Intestino delgado	0	1	
Colon	0	2	
Hígado	0	1	
Glándula salival	0	1	
Vesícula biliar	0	1	
Riñones	0	1	
Vejiga	0	1	
Próstata	2	2	
Útero	0	2	
Trompas de Falopio	1	1	
Uréter	0	1	
Cérvix	0	1	
Músculos del esqueleto	0	2	
Músculo liso	0	4	
Piel	0	1	
Nervios periféricos	0	1	
Mesotelio	0	1	
Grasa	0	1	
Placenta	0	1	

Este anticuerpo tiñe tejidos normales como está indicado en la literatura.

Estudio de la Enfermedad del Tejido			
Tejido	N.º Teñido (+)	N.º Total	Notas
Tumor carcinoide	1	1	
Carcinoma neuroendocrino de pulmón	1	1	
Carcinoma medular tiroideo	1	1	
Carcinoma neuroendocrino	1	1	
Tumor neuroendocrino pancreático	1	1	
Paraganglioma	1	1	
Feocromocitoma	1	1	
Carcinoma de pulmón de células pequeñas	1	1	

Este anticuerpo tiñe tumores como está indicado en la literatura.

Resolución de Problemas

1. Si el control positivo muestra una tinción más débil de la esperada, deben analizarse otros controles positivos realizados en la misma tinción para determinar si se debe al anticuerpo primario o a uno de los reactivos secundarios comunes.
2. Si el control positivo da negativo, se deben analizar otros controles positivos usados en la misma ejecución para determinar si se debe al anticuerpo primario o a uno de los reactivos secundarios comunes. Los tejidos pueden haberse recogido, fijado o desparafinado de manera inadecuada. Deberá seguirse el procedimiento adecuado para la recogida, la conservación y la fijación.
3. Si se produce una tinción de fondo excesiva, pueden haber niveles altos de biotina endógena. Se deberá incluir una etapa de bloqueo con biotina a no ser que se esté utilizando un sistema de detección sin biotina, en cuyo caso ninguna biotina presente sería un factor que contribuyera a la tinción de fondo.
4. Si no se ha eliminado toda la parafina deberá repetirse el procedimiento de desparafinación.
5. Si los cortes de tejido lavan el portaobjetos, deben comprobarse los mismos para garantizar que tienen carga positiva. Otras posibilidades que podrían afectar adversamente a la adhesión del tejido incluyen un secado insuficiente del corte de tejido en el portaobjetos antes de la tinción o fijación en formol que no fuera neutralizado con tampón apropiadamente. El grosor del tejido también puede ser un factor causante.

Para conocer la acción correctiva, consulte la sección de las instrucciones de uso o contacte con el servicio técnico de Cell Marque a través de techsupport@cellmarque.com.

Bibliografía

1. Fischer-Colbrie R, et al. Immunological studies on the distribution of chromogranin A and B in endocrine and nervous tissues. *Neuroscience*. 1985; 16:547-55.
2. Hearn SA. Electron microscopic localization of chromogranin A in osmium-fixed neuroendocrine cells with a protein A-gold technique. *J Histochem Cytochem*. 1987; 35:795-801.

3. Wilson BS, et al. Detection of chromogranin in neuroendocrine cells with a monoclonal antibody. Am J Pathol. 1984; 115:458-68.

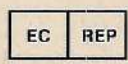
Limitaciones de Responsabilidad

*TWEEN es una marca registrada de Croda International PLC.

©2017 Sigma-Aldrich Co. LLC. Todos los derechos reservados. SIGMA-ALDRICH es una marca comercial de Sigma-Aldrich Co. LLC, registrada en EE. UU. y en otros países. Cell Marque, Trilogy, Declere y HiDef Detection son marcas comerciales de Sigma-Aldrich Co. LLC o de sus filiales.

 www.cellmarque.com

 6600 Sierra College Blvd. • Rocklin, CA 95677 USA • 916-746-8900

 EMERGO EUROPE
Prinsessegracht 20, 2514 AP The Hague, The Netherlands



CM Template #2.4

Implementation date 7 Nov 2017

Cytokeratin (34betaE12)

Mouse Monoclonal Antibody



DISPONIBILIDAD DEL PRODUCTO

N.º de ref.	Descripción
334M-84	0,1 ml, concentrado
334M-85	0,5 ml, concentrado
334M-86	1,0 ml, concentrado
334M-87	1,0 ml, prediluido listo para usar
334M-88	7,0 ml, prediluido listo para usar
334M-80	25,0 ml, prediluido listo para usar
334S	Portaobjetos de control positivo, 5 portaobjetos/paquete

DEFINICIONES DE LOS SÍMBOLOS

P	prediluir	E	suero
C	concentrado	DIL	rango de dilución del concentrado
A	ascitis	KEY-CODE	código
S	sobrenadante		

USO PREVISTO

Este anticuerpo está destinado para uso diagnóstico *in vitro* (IVD).

El anticuerpo Cytokeratin (34betaE12) de Cell Marque está previsto para que laboratorios cualificados identifiquen, mediante microscopía óptica, la presencia de antígenos asociados en cortes de tejidos embebidos en parafina y fijados con formol utilizando métodos de pruebas IHC (inmunohistoquímica). El uso de este anticuerpo está indicado, después de un diagnóstico diferencial clínico de enfermedades, como ayuda en la identificación de carcinomas dentro del contexto de paneles de anticuerpos, el historial clínico del paciente y otras pruebas de diagnóstico evaluadas por un patólogo cualificado.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Anti-Cytokeratin, 34betaE12 es un anticuerpo para citoqueratina de alto peso molecular, que reacciona con todas las manchas de carcinomas y epitelio escamoso y ductal. Este anticuerpo reconoce citoqueratinas 1,5,10 y 14 que se encuentran en el epitelio complejo. Anti-Cytokeratin, 34betaE12 no muestra reactividad con hepatocitos, células acinares pancreáticas, túbulos renales proximales o glándulas endometriales; no ha habido reactividad con células derivadas de epitelio simple. Los tumores mesenquimales, linfomas, melanomas y los tumores neurológicos no reaccionan con este anticuerpo, salvo algunas excepciones. Anti-Cytokeratin, 34betaE12 marca las células mioepiteliales y ha demostrado ser útil en la distinción del adenocarcinoma prostático de la hiperplasia de próstata. Este anticuerpo también ha sido útil para separar las proliferaciones intraductales de la mama benignas de las malignas.¹⁻⁶

PRINCIPIOS Y PROCEDIMIENTOS

El anticuerpo primario indicado (serie 334M) puede utilizarse como anticuerpo primario para la tinción inmunohistoquímica de cortes de tejido fijado con formol y embebido en parafina. En general, la tinción inmunohistoquímica junto con el sistema de detección con estreptavidina-biotina permite la visualización de antígenos a través de la aplicación secuencial de un anticuerpo específico (anticuerpo primario) al antígeno, un anticuerpo secundario (anticuerpo de unión) al anticuerpo primario, un complejo enzimático y un sustrato cromogénico con etapas de lavado intermedias. Alternativamente se puede utilizar un sistema de detección polimérico sin biotina. La activación enzimática del cromógeno da lugar a un producto de reacción visible en el sitio del antígeno. La muestra puede entonces contrateñirse y aplicarse un cubreportaobjetos. Los resultados se interpretan utilizando un microscopio óptico y ayuda en el diagnóstico diferencial de los procesos patofisiológicos que pueden estar asociados o no a un antígeno en particular.

Los productos prediluidos de Cell Marque han sido diluidos de forma óptima para ser utilizados con los kits de detección de Cell Marque, aunque habitualmente se utilizan satisfactoriamente con una amplia variedad de kits de detección ofrecidos por otros fabricantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Vea la etiqueta del producto para información específica sobre el lote acerca de lo siguiente:

1. Concentración de anticuerpos de inmunoglobulina
2. Detalles de la fuente

Reactivos suministrados

Prediluido El producto de anticuerpo primario indicado (334M-87, 334M-88, 334M-80) contiene reactivo listo para usar.

El rango de concentración de inmunoglobulina prediluida para este producto es 1 - 10 µg/ml.

Concentrado El producto de anticuerpo primario indicado (334M-84, 334M-85, 334M-86) contiene reactivo concentrado.

Los formatos prediluido y concentrado de este anticuerpo están diluidos en tampón Tris, pH 7,3-7,7, con 1% BSA y <0,1% de azida de sodio.

El rango de concentración de inmunoglobulina concentrada para este producto es 100 - 1000 µg/ml.

El rango de dilución útil recomendado para el producto concentrado es de **1:100 - 1:500** y se puede encontrar en la etiqueta del producto.

Isotipo: IgG,_k

Reconstitución, mezcla, dilución y titulación

El anticuerpo prediluido está listo para usar y optimizado para la tinción. No se requiere su reconstitución, mezcla, dilución ni titulación. El anticuerpo concentrado está optimizado para diluirlo en el rango de dilución.

El usuario deberá comprobar la dilución práctica del producto concentrado. Las diferencias en el procesamiento del tejido y en los procedimientos técnicos en el laboratorio pueden producir una variabilidad significativa en los resultados y requerir consecuentemente el uso regular de controles. (Consulte la sección Procedimientos de control de calidad).

Materiales y reactivos necesarios no suministrados

Los siguientes reactivos y materiales pueden ser necesarios para la tinción, pero no se incluyen con el anticuerpo primario:

- | | |
|---|---|
| 1. Tejido de control positivo y negativo | <i>Nota: El tratamiento previo de un paso de Cell Marque, Trilogy™ (N.º de ref. 920P-06), puede sustituir los elementos de los puntos 6 y 7 anteriores.</i> |
| 2. Portaobjetos para microscopio con carga positiva | |
| 3. Horno de secado capaz de mantener una temperatura de 58-60 °C ± 5 °C | 8. Agua desionizada o destilada |
| 4. Cubetas o baños de tinción | 9. Olla de presión eléctrica (N.º de ref. 976L) para el paso del tratamiento previo del tejido |
| 5. Cronómetro | |
| 6. Xileno o sustituto de xileno | 10. Sistema de detección (como N.º de ref. 954D-20) y cromógeno (como N.º de ref. 957D-20) |
| 7. Alcohol reactivo o etanol | |

- | | |
|--|--|
| 11. Soluciones de lavado (N.º de ref. 935B-09) | 15. Bloque de avidina-biotina (N.º de ref. 928B-02 para usar con detección con estreptavidina-biotina) |
| 12. Hematoxilina (N.º de ref. 930B-05) u otra contratinción | |
| 13. Diluyentes de anticuerpo (como N.º de ref. 938B-05) | 16. Reactivo de control negativo (N.º de ref. 932B-02 para ratón; N.º de ref. 933B-02 para conejo) |
| 14. Bloque de peróxido (N.º de ref. 925B-05) para usar con HRP | 17. Medio de montaje (N.º de ref. 931B-03) |
| | 18. Cubreobjetos |
| | 19. Microscopio óptico (40-400x) |

Conservación y manipulación

Almacenar a 2-8 °C. No congelar.

Para garantizar la dispensación adecuada del reactivo y la estabilidad del anticuerpo, tras cada utilización se debe volver a poner el tapón y almacenar el frasco inmediatamente en la nevera, en posición vertical.

Todos los reactivos de anticuerpo tienen una fecha de caducidad. El reactivo es estable hasta la fecha indicada en la etiqueta siempre que se almacene correctamente. No usar el reactivo después de la fecha de caducidad para el método de almacenamiento descrito.

No hay signos definitivos que indiquen la inestabilidad de este producto, por lo que los controles positivos y negativos deben analizarse simultáneamente con muestras desconocidas. Póngase en contacto con el servicio de atención al cliente de Cell Marque si encuentra algún indicio sospechoso de inestabilidad del reactivo.

Extracción y preparación de la muestra para su análisis

Cuando se utiliza el procedimiento habitual, los tejidos fijados en formol en tampón neutro y embebidos en parafina resultan adecuados para el uso con este anticuerpo primario cuando se utiliza con los kits de detección de Cell Marque (consulte la sección Materiales y reactivos necesarios no suministrados). Nota: Cell Marque evalúa el resultado solo en tejidos humanos. El fijador de tejido recomendado es formalina tamponada neutral 10%. Pueden tener lugar resultados variables como consecuencia de una fijación prolongada o procesos especiales tales como la descalcificación en la preparación de la médula ósea.

Cada sección debe cortarse con el grosor apropiado (aproximadamente 3 µm) y colocarse en un portaobjetos de vidrio con carga positiva. Los portaobjetos que contienen el corte de tejido pueden secarse durante al menos 2 horas (pero no más de 24 horas) en un horno a una temperatura de 58-60 °C ± 5 °C.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Adopte las precauciones adecuadas cuando se manipulen los reactivos. Usar guantes y batas de laboratorio desechables cuando se manipulen materiales potencialmente carcinógenos o tóxicos (como xileno).
2. Evite el contacto de los reactivos con los ojos y las membranas mucosas. Si se produce el contacto con áreas sensibles, lávese con agua abundante.
3. Las muestras del paciente y todos los materiales en contacto con ellas deben tratarse como si fuesen materiales potencialmente infecciosos y desecharse con las precauciones adecuadas. Nunca pipetear con la boca.
4. Evitar la contaminación microbiana de los reactivos, ya que podrían producirse resultados incorrectos.
5. El usuario debe validar los tiempos y temperaturas de incubación.
6. Los reactivos prediluidos listos para usar están diluidos óptimamente por lo que una dilución adicional podría producir la pérdida de tinción del antígeno.
7. Los reactivos concentrados pueden diluirse óptimamente en base a la determinación del usuario. El usuario deberá validar igualmente tanto la compatibilidad como el efecto en la estabilidad de cualquier disolvente utilizado que no esté recomendado específicamente en este documento.
8. Este producto no se clasifica como sustancia peligrosa cuando se usa según las instrucciones. El conservante del reactivo es inferior al 0,1% de acida sódica y no cumple los criterios de la OSHA para sustancias peligrosas a la concentración indicada. Consulte la hoja de datos de seguridad de los materiales.
9. El usuario debe validar cualquier condición de almacenamiento que no sea una de las especificadas en el prospecto.
10. El disolvente puede incluir albúmina de suero bovino y el sobrenadante puede contener suero bovino. Los productos que contienen suero fetal bovino y los productos que contienen albúmina de suero bovino se compran a los proveedores comerciales. Los certificados de origen de la fuente animal utilizada en estos productos obran en el archivo de Cell Marque. Los certificados aseguran que las fuentes bovinas provienen de países con riesgo mínimo de BSE y relacionan como fuentes de bovinos EE. UU. y Canadá.
11. Como con cualquier producto proveniente de fuentes biológicas, deberán emplearse procedimientos de manipulación apropiados.

INSTRUCCIONES DE USO
Procedimiento detallado

Protocolos de tinción recomendados para el anticuerpo primario indicado (serie 334M):

Sistema HiDef Detection™:

1. Desparafinizar, rehidratar y recuperar epítipo, el método preferido es el uso de las técnicas de recuperación de epítipo por calor inducido (HIER) usando Trilogy™ de Cell Marque junto con una olla a presión. El método preferido permite una desparafinización, rehidratación y recuperación de epítipo simultáneos. Una vez se haya completado, enjuagar con 5 cambios de agua desionizada o destilada.
2. Si está usando el sistema de detección HRP, coloque los portaobjetos en un bloque de peróxido durante 10 minutos y enjuague. Si está usando el sistema de detección AP, omita este paso.
3. Aplique el anticuerpo, incube durante 10 - 30 minutos y enjuague.
4. Aplique el amplificador conejo/ratón HiDef Detection™ durante 10 minutos; enjuague.
5. Aplique el polímero detector durante 10 minutos; enjuague.
6. Aplique una cantidad amplia de cromógeno, incube durante 1 - 10 minutos y enjuague.
7. Deshidrate y cubra el portaobjetos.

PROCEDIMIENTOS DE CONTROL DE CALIDAD
Control de tejido positivo

Cada vez que se realice el procedimiento de tinción, debe procesarse un control positivo del tejido. Este tejido puede contener células o componentes del tejido de tinción positiva y negativa y servir como tejido de control positivo y negativo. Los tejidos de control deben ser muestras frescas de autopsia, biopsia o cirugía preparadas o fijadas con la mayor brevedad con un proceso idéntico al de los cortes en estudio. El uso de un corte de tejido fijado o procesado de forma diferente a la muestra en estudio servirá para el control de todos los reactivos y pasos del método excepto la fijación y el procesamiento del tejido.

Un tejido con una tinción positiva débil es más adecuado para un control de calidad óptimo y para detectar niveles pequeños de degradación del reactivo. El control de tejido positivo para el anticuerpo primario indicado (serie 334M) puede incluir lo siguiente:

Próstata	Citoplasmática
----------	----------------

Los controles de tejido positivos conocidos solo se deben usar para monitorizar el comportamiento correcto de los tejidos procesados y los reactivos de la prueba, y no como ayuda para establecer un diagnóstico específico de las muestras del paciente. Si los controles positivos del tejido no muestran una tinción positiva apropiada, los resultados de las muestras en estudio se deben considerar no válidos.

Control de tejido negativo

El mismo tejido utilizado para el control de tejido positivo se puede utilizar en el control de tejido negativo. La variedad de tipos de células presentes en la mayoría de los cortes de tejidos ofrece sitios de control negativo internos, pero esto debe verificarlo el usuario. Los componentes que no se tiñen deben demostrar la ausencia de tinción específica y proporcionar una indicación de tinción de fondo no específica. Si se produce una tinción específica en los sitios de control de tejido negativo, los resultados obtenidos con las muestras del paciente deben considerarse no válidas.

Discrepancias inexplicables

Las discrepancias inexplicables de los controles se deben comunicar inmediatamente al servicio de atención al cliente de Cell Marque. Si los resultados del control de calidad no cumplen las especificaciones, los resultados del paciente no son válidos. Véase la sección Resolución de problemas de este prospecto. Identifique y corrija el problema; a continuación, repita todo el procedimiento con las muestras del paciente.

Reactivo de control negativo

Se debe utilizar un reactivo de control negativo para cada muestra para ayudar a interpretar los resultados. Para evaluar una tinción no específica se utiliza un reactivo de control negativo en lugar del anticuerpo primario. Se deberá tratar el portaobjetos con el reactivo de control negativo haciendo coincidir las especies huéspedes del anticuerpo primario e idéneamente con la misma concentración de IgG. El periodo de incubación para el reactivo de control negativo deberá ser igual que el periodo de incubación del anticuerpo primario.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El procedimiento de inmunotinción causa la precipitación de un producto de reacción coloreado en los sitios del antígeno localizados por el anticuerpo primario. Consulte en el prospecto correspondiente del sistema de detección las reacciones de color esperadas. Un patólogo cualificado experimentado en procedimientos de inmunohistoquímica debe evaluar los controles de tejido positivos y negativos antes de interpretar los resultados.

Control de tejido positivo

El control de tejido positivo teñido debe examinarse primero para determinar que todos los reactivos funcionan adecuadamente. La presencia de un producto de reacción con el color adecuado dentro de las células diana es indicativa de una reactividad positiva. Consulte en el prospecto del sistema de detección utilizado las reacciones de color esperadas. Según sea la duración de la incubación y la potencia de la hematoxilina empleada, la contratinción dará como resultado una coloración azul de pálida a oscura de los núcleos celulares. Una contratinción excesiva o incompleta puede comprometer la interpretación adecuada de los resultados. Si los controles de tejidos positivos no muestran una tinción positiva apropiada, los resultados de las muestras en estudio se deben considerar no válidos.

Control de tejido negativo

El control de tejido negativo debe examinarse después del control de tejido positivo para verificar la marcación específica del antígeno diana por el anticuerpo primario. La ausencia de tinción específica en el control de tejido negativo confirma la ausencia de reactividad cruzada del anticuerpo con las células o los componentes celulares. Si se produce una tinción específica en el control de tejido negativo, los resultados obtenidos con la muestra del paciente se consideran no válidos. La tinción no específica, si la hay, tendrá un aspecto difuso. También se puede observar una ligera tinción específica esporádica del tejido conjuntivo en cortes de tejidos que no estén fijados óptimamente. Para la interpretación de los resultados de la tinción deben usarse células intactas. Las células necróticas o degeneradas muestran una tinción no específica.

Tejido del paciente

Las muestras del paciente se deben examinar al final. La intensidad de la tinción positiva se debe valorar en el contexto de cualquier tinción de fondo del control de reactivo negativo. Como en cualquier prueba de inmunohistoquímica, un resultado negativo significa que el antígeno en cuestión no se ha detectado, no que el antígeno esté ausente de las células o del tejido analizado. Un panel de anticuerpos puede ayudar a identificar reacciones negativas falsas (consulte la sección Sumario de resultados esperados). La morfología de cada muestra del tejido también debe examinarse utilizando un corte con tinción de hematoxilina y eosina al interpretar cualquier resultado de inmunohistoquímica. Un patólogo cualificado debe interpretar los resultados morfológicos del paciente y sus datos clínicos pertinentes.

LIMITACIONES

1. Este reactivo es "de exclusivo uso profesional", ya que la inmunohistoquímica es un proceso diagnóstico de varias etapas que requiere una formación especializada en la selección de los reactivos, tejidos, fijación y procesamiento apropiados; la preparación del portaobjetos de inmunohistoquímica y la interpretación de los resultados de la tinción.
2. Para uso exclusivo de laboratorio.
3. Para diagnóstico *in vitro*.
4. La tinción de los tejidos depende de la manipulación y el procesamiento de los mismos antes de la tinción. Una fijación, congelación, descongelación, lavado, secado, calentado o corte inadecuados o la contaminación con otros tejidos o líquidos puede producir artefactos, bloqueo del anticuerpo o resultados falsos negativos. Los resultados inconsistentes pueden ser consecuencia de las variaciones en los métodos de fijación y embebido, así como de irregularidades inherentes dentro del tejido.
5. Una contratinción excesiva o incompleta puede comprometer la interpretación adecuada de los resultados.
6. La interpretación clínica de una tinción positiva o de su ausencia debe evaluarse en el contexto de la historia clínica, la morfología, otros criterios histopatológicos, así como otras pruebas diagnósticas. Este anticuerpo está diseñado para utilizarlo en un panel de anticuerpos si fuera pertinente. Es responsabilidad de un patólogo

cualificado familiarizarse con los anticuerpos, reactivos, paneles de diagnóstico y métodos usados para obtener una preparación con tinción. La tinción se debe realizar en un laboratorio certificado con la supervisión de un anatomopatólogo responsable de la revisión de los portaobjetos teñidos y de la verificación de la idoneidad de los controles negativos y positivos.

7. Cell Marque provee anticuerpos y reactivos en una dilución óptima para usar como se indica. Cualquier desviación de los procedimientos recomendados del método puede invalidar los resultados esperados. Se deben utilizar y documentar los controles apropiados. Los usuarios deben asumir en cualquier caso la responsabilidad de la interpretación de los resultados del paciente.
8. Cell Marque provee los anticuerpos primarios en formato concentrado de manera que el usuario pueda diluirlos después óptimamente para usarlos según determine y observando las técnicas de validación adecuadas. Los usuarios deben validar el uso de cualquier disolvente que no se recomienda en este documento. Una vez que el anticuerpo primario haya sido validado como adecuado para usar, cualquier desviación de los procedimientos de prueba recomendados puede invalidar los resultados esperados. Se deben utilizar y documentar los controles apropiados. Los usuarios deben asumir en cualquier caso la responsabilidad de la interpretación de los resultados del paciente.
9. Este producto no está diseñado para utilizarlo en citometría de flujo.
10. Los reactivos pueden mostrar reacciones inesperadas en tejidos no estudiados previamente. No puede excluirse completamente la posibilidad de reacciones inesperadas, incluso en grupos de tejidos analizados, debido a la variabilidad biológica de la expresión del antígeno en neoplasmas u otros tejidos patológicos. Póngase en contacto con el servicio de atención al cliente de Cell Marque ante cualquier sospecha de reacción inesperada documentada.
11. Los tejidos de personas infectadas con el virus de la hepatitis B y que contengan antígeno de superficie (HBsAg) pueden mostrar una tinción no específica con peroxidasa de rábano.
12. Cuando se utilizan en pasos de bloqueo, los sueros normales procedentes del mismo origen animal que los antisueros secundarios pueden provocar resultados de falsos negativos o falsos positivos debido al efecto de los autoanticuerpos o anticuerpos naturales.
13. Pueden verse resultados de falsos positivos debido a la unión de proteínas o productos de reacción del sustrato por mecanismos no inmunológicos. También pueden estar causados por la actividad de la pseudoperoxidasa (eritrocitos), actividad de la peroxidasa endógena (citocromo C) o biotina endógena (ejemplo: hígado, cerebro, mama, riñón) dependiendo del tipo de técnica de inmunotinción empleada.
14. Como en cualquier prueba de inmunohistoquímica, un resultado negativo significa que el antígeno no se ha detectado, no que el antígeno esté ausente de las células o del tejido analizado.

Limitaciones específicas

1. Los productos de anticuerpo prediluidos están optimizados como productos listos para usar. Debido a la posibilidad de variaciones en la fijación y procesamiento del tejido, puede ser necesario aumentar o reducir el tiempo de incubación del anticuerpo primario en muestras individuales.
2. El anticuerpo, en combinación con sistemas de detección y sus accesorios, detecta los antígenos que sobreviven al proceso habitual de fijación con formol, procesamiento y corte del tejido. Los usuarios que se desvíen de los procedimientos de prueba recomendados son responsables, como lo serían en cualquier caso, de la interpretación y validación de los resultados del paciente.

Sumario de resultados esperados

Consulte las siguientes tablas de reactividad:

Estudio normal			
Tejido	N.º Teñido	N.º Total	Notas
Cerebro	0	1	
Córtex adrenal	0	1	
Ovarios	0	1	
Páncreas	1	1	
Paratiroides	1	1	
Pituitaria	0	1	
Testículos	0	1	
Tiroides	1	1	
Pecho	1	1	
Bazo	0	1	
Amígdalas	0	1	Escamosas +
Tímo	1	1	Epitelio +
Médula ósea	0	1	
Pulmones	1	1	
Corazón	0	1	
Esófago	1	1	
Estómago	1	1	
Intestino delgado	1	1	
Colon	1	1	
Hígado	1	1	
Glándula salival	1	1	
Vesícula biliar	1	1	
Riñones	1	1	Túbulos +
Vejiga	1	1	
Próstata	1	1	
Útero	1	1	
Trompas de Falopio	1	1	
Uréter	1	1	
Cérvix	1	1	
Músculos del esqueleto	0	1	

Estudio normal			
Músculo liso	0	1	
Piel	1	1	
Nervios periféricos	0	1	
Mesotelio	1	1	
Grasa	0	1	
Placenta	1	1	

Este anticuerpo mancha las células epiteliales en diferentes órganos.

Estudio de la enfermedad del tejido			
Tejido	N.º Teñido	N.º Total	Notas
Carcinoma de próstata	7	7	
Adenocarcinoma pulmonar	2	2	
"Carcinoma escamoso de pulmón"	2	2	
Mesotelioma	2	2	
Carcinoma de colorectal	1	1	
Carcinoma de células renales	1	2	

Este anticuerpo muestra una tinción positiva en el carcinoma de tiroides papilar.

RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

- Si el control positivo muestra una tinción más débil de la esperada, deben analizarse otros controles positivos realizados en la misma tinción para determinar si se debe al anticuerpo primario o a uno de los reactivos secundarios comunes.
- Si el control positivo da negativo, se deben analizar otros controles positivos usados en la misma ejecución para determinar si se debe al anticuerpo primario o a uno de los reactivos secundarios comunes. Los tejidos pueden haberse recogido, fijado o desparafinado de manera inadecuada. Deberá seguirse el procedimiento adecuado para la recogida, la conservación y la fijación.
- Si se produce una tinción de fondo excesiva, pueden haber niveles altos de biotina endógena. Se deberá incluir una etapa de bloqueo con biotina a no ser que se esté utilizando un sistema de detección sin biotina, en cuyo caso ninguna biotina presente sería un factor que contribuyera a la tinción de fondo.

- Si no se ha eliminado toda la parafina deberá repetirse el procedimiento de desparafinación.
- Si los cortes de tejido lavan el portaobjetos, deben comprobarse los mismos para garantizar que tienen carga positiva. Otras posibilidades que podrían afectar adversamente a la adhesión del tejido incluyen un secado insuficiente del corte de tejido en el portaobjetos antes de la tinción o fijación en formol que no fuera neutralizado con tampón apropiadamente. El grosor del tejido también puede ser un factor causante.

Consulte las medidas correctoras en la sección Procedimiento detallado o póngase en contacto con el servicio de atención al cliente de Cell Marque.

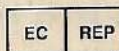
BIBLIOGRAFÍA

- Gown, AM et al. Monoclonal antibodies to human intermediate filament proteins. II. Distribution of filament proteins in normal human tissues. *Am J Pathol* 1984; 114:309.
- O'Malley, FP et al. Usefulness of immunoperoxidase staining with high-molecular-weight cytokeratin in the differential diagnosis of small-acinar lesions of the prostate gland. *Virch Arch A* 1990; 417:191.
- Amin, MB. Analysis of cribriform morphology in prostatic neoplasia using antibody to high-molecular-weight cytokeratins. *Arch Pathol Lab Med* March 1994; 118:260-264.
- Wojno, KJ et al. The utility of basal cell-specific anti-cytokeratin antibody (34betaE12) in the diagnosis of prostate cancer. A review of 228 cases. *Am J Surg Pathol* 1995; 19:251-60.
- Moinfar, F et al. Use of keratin 35betaE12 as an adjunct in the diagnosis of mammary intraepithelial neoplasia-ductal type--benign and malignant intraductal proliferations. *Am J Surg Pathol* 1999; 23:1048-58.
- Yang, XJ et al. Rare expression of high-molecular-weight cytokeratin in adenocarcinoma of the prostate gland: a study of 100 cases of metastatic and locally advanced prostate cancer. *Am J Surg Pathol* 1999; 23:147-52.

LIMITACIONES DE RESPONSABILIDAD



www.cellmarque.com



EMERGO EUROPE
Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague, NL.



CM Template #1.3 v.1

Desmin (EP15) Rabbit Monoclonal Primary Antibody

Para Diagnóstico In Vitro (IVD)

Identificación del Producto

REF	Descripción
243R-14	0,1 ml concentrado
243R-15	0,5 ml concentrado
243R-16	1,0 ml concentrado
243R-17	1,0 ml prediluido listo para usar
243R-18	7,0 ml prediluido listo para usar

Definiciones de los Símbolos

KEY-CODE	código
P	prediluir
C	concentrado
A	ascitis
E	suero
S	sobrenadante
DIL	rango de dilución del concentrado

Uso Previsto

Este anticuerpo está destinado para uso diagnóstico *in vitro* (IVD).

El Desmin (EP15) Rabbit Monoclonal Primary Antibody está diseñado para utilizarse en un laboratorio para detectar la proteína desmina en tejidos embebidos en parafina, fijados con formalina y teñidos en inmunohistoquímica cualitativa (IHC).

Los resultados obtenidos con el uso de este producto junto con la historia clínica relevante del paciente, otras pruebas diagnósticas y controles adecuados debe interpretarlos un patólogo cualificado.

Resumen y Explicación

La anti-desmin detecta una proteína que expresan las células de los músculos lisos, esqueléticos y cardíacos normales. Se ha sugerido que la desmina se encuentra principalmente en o cerca de la periferia de las líneas Z de las fibrillas del músculo estriado. En el músculo liso, la desmina conecta los cuerpos citoplásmicos densos con placas densas unidas a la membrana. La anti-desmin reacciona con leiomiomas, leiomiomasarcomas, rabdomiomas, rabdomiosarcomas y las células perivasculares de tumores glómicos de la piel.

Este anticuerpo se usa para demostrar los componentes miogénicos/derivación de tumores.^{1,2} La desmina también puede presentarse en los miofibroblastos y ser focalmente positiva en fibromatosis desmoides.³

Principios y Procedimientos

El anticuerpo primario indicado puede utilizarse como anticuerpo primario para la tinción inmunohistoquímica de cortes de tejido fijado con formol y embebido en parafina. En general, la tinción inmunohistoquímica junto con el sistema de detección mediante unión con peroxidasa de rábano (HRP) o fosfatasa alcalina permite la visualización de antígenos a través de la aplicación secuencial de un anticuerpo específico (anticuerpo primario) al antígeno, un anticuerpo secundario (anticuerpo de unión) al anticuerpo primario, un complejo enzimático y un sustrato cromogénico con etapas de lavado intermedias. La activación enzimática del cromógeno da lugar a un producto de reacción visible en el sitio del antígeno. La muestra puede entonces contrateñirse y aplicarse un cubreobjetos. Los resultados se interpretan con un microscopio óptico.

Materiales y Métodos

Reactivos Suministrados

Composición del Producto	
Prediluir: diluido en	Amortiguador Iris, pH 7,3-7,7, con un 1% de BSA y <0,1% de azida de sodio
Concentrado: diluido en	Tampón fosfato salino, pH 7,2, con un 1% de BSA y <0,1% de azida de sodio
Host	conejo
Isotipo	IgG
Intervalo de dilución de trabajo recomendado	1:100-1:500
Fuente	sobrenadante

Vea la etiqueta del producto para información específica sobre el lote acerca de lo siguiente:

1. Concentración de anticuerpos de inmunoglobulina
2. Detalles de la fuente

Reconstitución, Mezcla, Dilución y Titulación

El anticuerpo prediluido está listo para usar y optimizado para la tinción. El anticuerpo concentrado está optimizado para diluirlo en el rango de dilución con Cell Marque Diamond Antibody Diluent.

Materiales y Reactivos Necesarios No Suministrados

Los siguientes reactivos y materiales pueden ser necesarios para la tinción, pero no se incluyen con el anticuerpo primario:

1. Tejido de control positivo y negativo
2. Portaobjetos para microscopio con carga positiva
3. Horno de secado capaz de mantener una temperatura de 53-65 °C
4. Cubetas o baños de tinción
5. Cronómetro
6. Xileno o sustituto de xileno
7. Alcohol reactivo o etanol

Nota: El tratamiento previo de un paso de Cell Marque, Trilogy™ (N.º de catálogo 920P-06), puede sustituir los elementos de los puntos 6 y 7 anteriores.

8. Agua desionizada o destilada
9. Equipo de calentamiento, como la olla de presión eléctrica para el paso del tratamiento previo del tejido
10. Sistema de detección como HiDef Detection™ HRP Polymer System (N.º de catálogo 954D-20) o HiDef Detection™ Alk Phos Polymer System (N.º de catálogo 962D-20)
11. Cromógeno, como DAB Substrate Kit (N.º de catálogo 957D-20) o Permanent Red Chromogen Kit (N.º de catálogo 960D-10)
12. TBS IHC Wash Buffer + Tween®* 20 (N.º de catálogo 935B-09)
13. Hematoxylin u otra contratinción
14. Diluyentes de anticuerpo, como Diamond: Antibody Diluent (N.º de catálogo 938B-05) o Emerald: Antibody Diluent (N.º de catálogo 936B-08)
15. Peroxide Block (N.º de catálogo 925B-05) para usar con HRP
16. Avidin-Biotin Blocking Reagents para usar con detección con estreptavidina-biotina
17. Negative Control Reagent (N.º de catálogo 939B-02 para universal)
18. Mounting Medium
19. Cubreobjetos
20. Microscopio óptico (40-400x)

Conservación y Manipulación

Almacenar a 2-8 °C. No congelar.

Para garantizar la dispensación adecuada del reactivo y la estabilidad del anticuerpo, tras cada utilización se debe volver a poner el tapón y almacenar el frasco inmediatamente en la nevera, en posición vertical.

Todos los reactivos de anticuerpo tienen una fecha de caducidad. El reactivo es estable hasta la fecha indicada en la etiqueta siempre que se almacene correctamente. No usar el reactivo después de la fecha de caducidad para el método de almacenamiento descrito.

No hay signos definitivos que indiquen la inestabilidad de este producto, por lo que los controles positivos y negativos deben analizarse simultáneamente con muestras desconocidas. Contacte con el servicio técnico de Cell Marque si tiene sospechas sobre la inestabilidad del reactivo.

Extracción y Preparación de la Muestra para su Análisis

Cuando se utiliza el procedimiento habitual, los tejidos fijados en formol en tampón neutro y embebidos en parafina resultan adecuados para el uso con este anticuerpo primario cuando se utiliza con los kits de detección de Cell Marque (consulte la sección Materiales y reactivos necesarios no suministrados). Nota: Cell Marque evalúa el resultado solo en tejidos humanos. El fijador de tejido recomendado es formalina tamponada neutral 10%. Pueden tener lugar resultados variables como consecuencia de una fijación prolongada o procesos especiales tales como la descalcificación en la preparación de la médula ósea.

Cada sección debe cortarse con el grosor apropiado (aproximadamente 3 µm) y colocarse en un portaobjetos de vidrio con carga positiva. Los portaobjetos que contienen el corte de tejido pueden secarse durante al menos 2 horas (pero no más de 24 horas) en un horno a una temperatura de 53-65 °C.

Advertencias y Precauciones

1. Adopte las precauciones adecuadas cuando se manipulen los reactivos. Usar guantes y batas de laboratorio desechables cuando se manipulen materiales potencialmente carcinógenos o tóxicos (como xileno).
2. Evite el contacto de los reactivos con los ojos y las membranas mucosas. Si se produce el contacto con áreas sensibles, lávese con agua abundante.
3. Las muestras del paciente y todos los materiales en contacto con ellas deben tratarse como si fuesen materiales potencialmente infecciosos y desecharse con las precauciones adecuadas. Nunca pipetear con la boca.
4. Evitar la contaminación microbiana de los reactivos, ya que podrían producirse resultados incorrectos.
5. El usuario debe validar los tiempos y temperaturas de incubación.
6. Los reactivos prediluidos listos para usar están diluidos óptimamente por lo que una dilución adicional podría producir la pérdida de tinción del antígeno.
7. Los reactivos concentrados pueden diluirse óptimamente en base a la determinación del usuario. El usuario deberá validar igualmente tanto la compatibilidad como el efecto en la estabilidad de cualquier disolvente utilizado que no esté recomendado específicamente en este documento.
8. Este producto no se clasifica como sustancia peligrosa cuando se usa según las instrucciones. El conservante del reactivo es inferior al 0,1% de ácido sódico y no cumple los criterios de la OSHA para sustancias peligrosas a la concentración indicada. Consulte la hoja de datos de seguridad de los materiales.
9. El usuario debe validar cualquier condición de almacenamiento que no sea una de las especificadas en el prospecto.
10. El disolvente puede incluir albúmina de suero bovino y el sobrenadante puede contener suero bovino. Los productos que contienen suero fetal bovino y los productos que contienen albúmina de suero bovino se compran a los proveedores comerciales. Los certificados de origen de la fuente animal utilizada en estos productos obran en el archivo de Cell Marque. Los certificados aseguran que las fuentes bovinas provienen de países con riesgo mínimo de BSE y relacionan como fuentes de bovinos EE. UU. y Canadá.
11. Como con cualquier producto proveniente de fuentes biológicas, deberán emplearse procedimientos de manipulación apropiados.

Instrucciones de Uso

Protocolos de tinción recomendados para el anticuerpo primario indicado:

HiDef HRP:

HiDef Detection™ HRP Polymer System (N.º de catálogo 954D-20)

1. Técnica de recuperación del epítipo: HIER, Reactivo para la recuperación del epítipo: Trilogy
2. Tiempo de incubación de anticuerpo (minutos): 10-30
3. Tiempo de incubación de HiDef Detection Amplifier (minutos): 10
4. Tiempo de incubación de HiDef Detection Polymer Detector (minutos): 10
5. Tiempo de incubación de DAB (minutos): 1-10
6. Deshidrate y cubra el portaobjetos.

HiDef Alk Phos:

HiDef Detection™ Alk Phos Polymer System (N.º de catálogo 962D-20)

1. Técnica de recuperación del epítipo: HIER, Reactivo para la recuperación del epítipo: Trilogy
2. Tiempo de incubación de anticuerpo (minutos): 10-30
3. Tiempo de incubación de HiDef Detection Amplifier (minutos): 10
4. Tiempo de incubación de HiDef Detection Polymer Detector (minutos): 10
5. Tiempo de incubación de Permanent Red (minutos): 15-30
6. Deshidrate y cubra el portaobjetos.

Procedimientos de Control de Calidad

Control de Tejido Positivo

Cada vez que se realice el procedimiento de tinción, debe procesarse un control positivo del tejido. Este tejido puede contener células o componentes del tejido de tinción positiva y negativa y servir como tejido de control positivo y negativo. Los tejidos de control deben ser muestras frescas de autopsia, biopsia o cirugía preparadas o fijadas con la mayor brevedad con un proceso idéntico al de los cortes en estudio. El uso de un corte de tejido fijado o procesado de forma diferente a la muestra en estudio servirá para el control de todos los reactivos y pasos del método excepto la fijación y el procesamiento del tejido.

Un tejido con una tinción positiva débil es más adecuado para un control de calidad óptimo y ayuda para establecer un diagnóstico específico de las muestras del paciente. Si los controles positivos del tejido no muestran una tinción positiva apropiada, los resultados de las muestras en estudio se deben considerar no válidos.

Control de Tejido Positivo	
Tejido	Visualización
Músculos del esqueleto	Citoplasmática

Los controles de tejido positivos conocidos solo se deben usar para monitorizar el comportamiento correcto de los tejidos procesados y los reactivos de la prueba, y no como ayuda para establecer un diagnóstico específico de las muestras del paciente. Si los controles positivos del tejido no muestran una tinción positiva apropiada, los resultados de las muestras en estudio se deben considerar no válidos.

Control de Tejido Negativo

El mismo tejido utilizado para el control de tejido positivo se puede utilizar en el control de tejido negativo. La variedad de tipos de células presentes en la mayoría de los cortes de tejidos ofrece sitios de control negativo internos, pero esto debe verificarlo el usuario. Los componentes que no se tiñen deben demostrar la ausencia de tinción específica y proporcionar una indicación de tinción de fondo no específica. Si se produce una tinción específica en los sitios de control de tejido negativo, los resultados obtenidos con las muestras del paciente deben considerarse no válidos.

Discrepancias Inexplicables

Las discrepancias inexplicables de los controles deben remitirse de inmediato al servicio técnico de Cell Marque. Si los resultados del control de calidad no cumplen las especificaciones, los resultados del paciente no son válidos. Véase la sección Resolución de problemas de este prospecto. Identifique y corrija el problema; a continuación, repita todo el procedimiento con las muestras del paciente.

Reactivo de Control Negativo

Se debe utilizar un reactivo de control negativo para cada muestra para ayudar a interpretar los resultados. Para evaluar una tinción no específica se utiliza un reactivo de control negativo en lugar del anticuerpo primario. Se deberá tratar el portaobjetos con el reactivo de control negativo haciendo coincidir las especies huéspedes del anticuerpo primario e idéneamente con la misma concentración de IgG. El periodo de incubación para el reactivo de control negativo deberá ser igual que el periodo de incubación del anticuerpo primario.

Interpretación de los Resultados

El procedimiento de inmunotinción causa la precipitación de un producto de reacción coloreado en los sitios del antígeno localizados por el anticuerpo primario. Consulte en el prospecto correspondiente del sistema de detección las reacciones de color esperadas. Un patólogo cualificado experimentado en procedimientos de inmunohistoquímica debe evaluar los controles de tejido positivos y negativos antes de interpretar los resultados.

Control de Tejido Positivo

El control de tejido positivo teñido debe examinarse primero para determinar que todos los reactivos funcionan adecuadamente. La presencia de un producto de reacción con el color adecuado dentro de las células diana es indicativa de una reactividad positiva. Consulte en el prospecto del sistema de detección utilizado las reacciones de color esperadas. Según sea la duración de la incubación y la potencia de la hematoxilina empleada, la contratinción dará como resultado una coloración azul de pálida a oscura de los núcleos celulares. Una contratinción excesiva o incompleta puede comprometer la interpretación adecuada de los resultados. Si los controles de tejidos positivos no muestran una tinción positiva apropiada, los resultados de las muestras en estudio se deben considerar no válidos.

Control de Tejido Negativo

El control de tejido negativo debe examinarse después del control de tejido positivo para verificar la marcación específica del antígeno diana por el anticuerpo primario. La ausencia de tinción específica en el control de tejido negativo confirma la ausencia de reactividad cruzada del anticuerpo con las células o los componentes celulares. Si se produce una tinción específica en el control de tejido negativo, los resultados obtenidos con la muestra del paciente se consideran no válidos. La tinción no específica, si la hay, tendrá un aspecto difuso. También se puede observar una ligera tinción específica esporádica del tejido conjuntivo en cortes de tejidos que no estén fijados óptimamente. Para la interpretación de los resultados de

la tinción deben usarse células intactas. Las células necróticas o degeneradas muestran una tinción no específica.

Tejido del Paciente

Las muestras del paciente se deben examinar al final. La intensidad de la tinción positiva se debe valorar en el contexto de cualquier tinción de fondo del control de reactivo negativo. Como en cualquier prueba de inmunohistoquímica, un resultado negativo significa que el antígeno en cuestión no se ha detectado, no que el antígeno esté ausente de las células o del tejido analizado. Un panel de anticuerpos puede ayudar a identificar reacciones negativas falsas (consulte la sección Sumario de resultados esperados). La morfología de cada muestra del tejido también debe examinarse utilizando un corte con tinción de hematoxilina y eosina al interpretar cualquier resultado de inmunohistoquímica. Un patólogo cualificado debe interpretar los resultados morfológicos del paciente y sus datos clínicos pertinentes.

Limitaciones

- El color del anticuerpo no afecta lo funcionamiento.
- Este reactivo es "de exclusivo uso profesional", ya que la inmunohistoquímica es un proceso diagnóstico de varias etapas que requiere una formación especializada en la selección de los reactivos, tejidos, fijación y procesamiento apropiados; la preparación del portaobjetos de inmunohistoquímica y la interpretación de los resultados de la tinción.
- Para uso exclusivo de laboratorio.
- Para diagnóstico *in vitro*.
- La tinción de los tejidos depende de la manipulación y el procesamiento de los mismos antes de la tinción. Una fijación, congelación, descongelación, lavado, secado, calentado o corte inadecuados o la contaminación con otros tejidos o líquidos puede producir artefactos, bloqueo del anticuerpo o resultados falsos negativos. Los resultados inconsistentes pueden ser consecuencia de las variaciones en los métodos de fijación y embebido, así como de irregularidades inherentes dentro del tejido.
- Una contratinción excesiva o incompleta puede comprometer la interpretación adecuada de los resultados.
- La interpretación clínica de una tinción positiva o de su ausencia debe evaluarse en el contexto de la historia clínica, la morfología, otros criterios histopatológicos, así como otras pruebas diagnósticas. Este anticuerpo está diseñado para utilizarlo en un panel de anticuerpos si fuera pertinente. Es responsabilidad de un patólogo cualificado familiarizarse con los anticuerpos, reactivos, paneles de diagnóstico y métodos usados para obtener una preparación con tinción. La tinción se debe realizar en un laboratorio certificado con la supervisión de un anatomopatólogo responsable de la revisión de los portaobjetos teñidos y de la verificación de la idoneidad de los controles negativos y positivos.
- Cell Marque provee anticuerpos y reactivos en una dilución óptima para usar como se indica. Cualquier desviación de los procedimientos recomendados del método puede invalidar los resultados esperados. Se deben utilizar y documentar los controles apropiados. Los usuarios deben asumir en cualquier caso la responsabilidad de la interpretación de los resultados del paciente.
- Cell Marque provee los anticuerpos primarios en formato concentrado de manera que el usuario pueda diluirlos después óptimamente para usarlos según determine y observando las técnicas de validación adecuadas. Los usuarios deben validar el uso de cualquier disolvente que no se recomiende en este documento. Una vez que el anticuerpo primario haya sido validado como adecuado para usar, cualquier desviación de los procedimientos de prueba recomendados puede invalidar los resultados esperados. Se deben utilizar y documentar los controles apropiados. Los usuarios deben asumir en cualquier caso la responsabilidad de la interpretación de los resultados del paciente.
- Este producto no está diseñado para utilizarlo en citometría de flujo.
- Los reactivos pueden mostrar reacciones inesperadas en tejidos no estudiados previamente. No puede excluirse completamente la posibilidad de reacciones inesperadas, incluso en grupos de tejidos analizados, debido a la variabilidad biológica de la expresión del antígeno en neoplasmas u otros tejidos patológicos. Póngase en contacto con el servicio técnico de Cell Marque si sospecha que ha habido una reacción inesperada documentada.
- Los tejidos de personas infectadas con el virus de la hepatitis B y que contengan antígeno de superficie (HBsAg) pueden mostrar una tinción no específica con peroxidasa de rábano.
- Cuando se utilizan en pasos de bloqueo, los sueros normales procedentes del mismo origen animal que los antisueros secundarios pueden provocar resultados de falsos negativos o falsos positivos debido al efecto de los autoanticuerpos o anticuerpos naturales.
- Pueden verse resultados de falsos positivos debido a la unión de proteínas o productos de reacción del sustrato por mecanismos no inmunológicos. También pueden estar causados por la actividad de la pseudoperoxidasa (eritrocitos), actividad de la peroxidasa endógena (citocromo C) o biotina endógena (ejemplo: hígado, cerebro, mama, riñón) dependiendo del tipo de técnica de inmunotinción empleada.
- Como en cualquier prueba de inmunohistoquímica, un resultado negativo significa que el antígeno no se ha detectado, no que el antígeno esté ausente de las células o del tejido analizado.
- Los productos de anticuerpo prediluidos están optimizados como productos listos para usar. Debido a la posibilidad de variaciones en la fijación y procesamiento del tejido, puede ser necesario aumentar o reducir el tiempo de incubación del anticuerpo primario en muestras individuales.
- El anticuerpo, en combinación con sistemas de detección y sus accesorios, detecta los antígenos que sobreviven al proceso habitual de fijación con formol, procesamiento y corte del tejido. Los usuarios que se desvían de los procedimientos de prueba recomendados son responsables, como lo serían en cualquier caso, de la interpretación y validación de los resultados del paciente.

Sumario de Resultados Esperados

Consulte las siguientes tablas de reactividad:

Estudio Normal			
Tejido	N.º Teñido (+)	N.º Total	Notas
Cerebro	3	3	
Córtex adrenal	0	1	
Ovarios	0	1	
Páncreas	0	1	
Paratiroides	0	1	
Pituitaria	0	1	

Estudio Normal

Tejido	N.º Teñido (+)	N.º Total	Notas
Testículos	0	1	
Tiroides	0	1	
Pecho	2	2	
Bazo	0	1	
Amígdalas	0	1	
Timo	0	1	
Médula ósea	0	1	
Pulmones	0	2	
Corazón	1	1	
Esófago	0	1	
Estómago	0	1	
Intestino delgado	0	1	
Colon	0	1	
Hígado	0	1	
Glándula salival	1	1	
Vesícula biliar	0	1	
Riñones	0	1	
Vejiga	0	1	
Próstata	0	1	
Útero	0	1	
Trompas de Falopio	0	1	
Uréter	0	1	
Cérvix	0	1	
Músculos del esqueleto	3	3	
Músculo liso	7	7	
Piel	0	1	
Nervios periféricos	0	1	
Mesotelio	0	1	
Grasa	0	1	
Placenta	0	1	

Este anticuerpo tiñe tejidos normales como está indicado en la literatura.

Estudio de la Enfermedad del Tejido

Tejido	N.º Teñido (+)	N.º Total	Notas
Leiomioma	12	12	
Rabdomiosarcoma	8	8	
Leiomiomasarcoma	5	5	

Este anticuerpo tiñe tumores como está indicado en la literatura.

Resolución de Problemas

1. Si el control positivo muestra una tinción más débil de la esperada, deben analizarse otros controles positivos realizados en la misma tinción para determinar si se debe al anticuerpo primario o a uno de los reactivos secundarios comunes.
2. Si el control positivo da negativo, se deben analizar otros controles positivos usados en la misma ejecución para determinar si se debe al anticuerpo primario o a uno de los reactivos secundarios comunes. Los tejidos pueden haberse recogido, fijado o desparafinado de manera inadecuada. Deberá seguirse el procedimiento adecuado para la recogida, la conservación y la fijación.
3. Si se produce una tinción de fondo excesiva, pueden haber niveles altos de biotina endógena. Se deberá incluir una etapa de bloqueo con biotina a no ser que se esté utilizando un sistema de detección sin biotina, en cuyo caso ninguna biotina presente sería un factor que contribuyera a la tinción de fondo.
4. Si no se ha eliminado toda la parafina deberá repetirse el procedimiento de desparafinación.
5. Si los cortes de tejido lavan el portaobjetos, deben comprobarse los mismos para garantizar que tienen carga positiva. Otras posibilidades que podrían afectar adversamente a la adhesión del tejido incluyen un secado insuficiente del corte de tejido en el portaobjetos antes de la tinción o fijación en formol que no fuera neutralizado con tampón apropiadamente. El grosor del tejido también puede ser un factor causante.

Para conocer la acción correctiva, consulte la sección de las instrucciones de uso o contacte con el servicio técnico de Cell Marque a través de techsupport@cellmarque.com.

Bibliografía

1. Altmannberger M, et al. Desmin is a specific marker for rhabdomyosarcomas of human and rat origin. *Am J Pathol* 1985; 118:85-95.
2. Debus E, et al. Monoclonal antibodies to desmin, the muscle-specific intermediate filament protein. *EMBO J*. 1983; 2:2305-2312.
3. Yamaguchi U, et al. Differential diagnosis of gastrointestinal stromal tumor and other spindle cell tumors in the gastrointestinal tract based on immunohistochemical analysis. *Virchows Arch*. 2004; 2:142-50.

Limitaciones de Responsabilidad

Cell Marque es el fabricante legal de los anticuerpos de diagnóstico *in vitro* de la marca Cell Marque + RabMAb. Cell Marque utiliza la tecnología RabMAb de Abcam PLC para esta marca. La tecnología monoclonal de conejo está patentada y RabMAb es una marca registrada de Abcam PLC.

*TWEEN es una marca registrada de Croda International PLC.

©2017 Sigma-Aldrich Co. LLC. Todos los derechos reservados. SIGMA-ALDRICH es una marca comercial de Sigma-Aldrich Co. LLC, registrada en EE. UU. y en otros países. Cell Marque, Trilogy, Declere y HiDef Detection son marcas comerciales de Sigma-Aldrich Co. LLC o de sus filiales.

 www.cellmarque.com

 6600 Sierra College Blvd. • Rocklin, CA 95677 USA • 916-746-8900

EC **REP** EMERGO EUROPE
Prinsessegracht 20, 2514 AP The Hague, The Netherlands



CM Template #2.4
Implementation date 13 Nov 2017

EMA (E29) Mouse Monoclonal Antibody

Para Diagnóstico In Vitro (IVD)

Identificación del Producto

REF	Descripción
247M-94	0,1 ml concentrado
247M-95	0,5 ml concentrado
247M-96	1,0 ml concentrado
247M-97	1,0 ml prediluido listo para usar
247M-98	7,0 ml prediluido listo para usar
247M-90	25,0 ml prediluido listo para usar

Definiciones de los Símbolos

KEY-CODE	código
P	prediluir
C	concentrado
A	ascitis
E	suero
S	sobrenadante
DIL	rango de dilución del concentrado

Uso Previsto

Este anticuerpo está destinado para uso diagnóstico *in vitro* (IVD).

EMA (E29) Mouse Monoclonal Primary Antibody está diseñado para el uso en la detección de EMA en tejido fijado con formol e incluido en parafina teñido en una prueba de inmunohistoquímica (IHC) cualitativa.

Los resultados obtenidos con el uso de este producto junto con la historia clínica relevante del paciente, otras pruebas diagnósticas y controles adecuados debe interpretarlos un patólogo cualificado.

Resumen y Explicación

El anticuerpo anti-EMA es un marcador de utilidad para la tinción de numerosos carcinomas. Este anticuerpo tiñe células normales y neoplásicas de diferentes tejidos como epitelio de mama, glándulas sudoríparas y carcinoma colorrectal. Los carcinomas hepatocelulares, carcinomas adrenales y carcinomas embrionarios son consistentemente EMA-negativos, de manera que los tejidos positivos para queratina y negativos para EMA favorecen el diagnóstico

de estos tumores. EMA es frecuentemente positivo en meningiomas, lo que puede ser útil cuando se quiere diferenciar esta condición de otras neoplasias intracraneales, como por ejemplo Schwannomas.¹⁸

Principios y Procedimientos

El anticuerpo primario indicado puede utilizarse como anticuerpo primario para la tinción inmunohistoquímica de cortes de tejido fijado con formol y embebido en parafina. En general, la tinción inmunohistoquímica junto con el sistema de detección mediante unión con peroxidasa de rábano (HRP) o fosfatasa alcalina permite la visualización de antígenos a través de la aplicación secuencial de un anticuerpo específico (anticuerpo primario) al antígeno, un anticuerpo secundario (anticuerpo de unión) al anticuerpo primario, un complejo enzimático y un sustrato cromogénico con etapas de lavado intermedias. La activación enzimática del cromógeno da lugar a un producto de reacción visible en el sitio del antígeno. La muestra puede entonces contrateñirse y aplicarse un cubreportaobjetos. Los resultados se interpretan con un microscopio óptico.

Materiales y Métodos

Reactivos Suministrados

Composición del Producto	
Prediluir: diluido en	Amortiguador Tris, pH 7,3-7,7, con un 1% de BSA y <0,1% de azida de sodio
Concentrado: diluido en	Amortiguador Tris, pH 7,3-7,7, con un 1% de BSA y <0,1% de azida de sodio
Host	ratón
Isotipo	IgG _{2a} /k
Intervalo de dilución de trabajo recomendado	1:100-1:500
Fuente	sobrenadante

Vea la etiqueta del producto para información específica sobre el lote acerca de lo siguiente:

1. Concentración de anticuerpos de inmunoglobulina
2. Detalles de la fuente

Reconstitución, Mezcla, Dilución y Titulación

El anticuerpo prediluido está listo para usar y optimizado para la tinción. El anticuerpo concentrado está optimizado para diluirlo en el rango de dilución con Cell Marque Diamond Antibody Diluent.

Materiales y Reactivos Necesarios No Suministrados

Los siguientes reactivos y materiales pueden ser necesarios para la tinción, pero no se incluyen con el anticuerpo primario:

1. Tejido de control positivo y negativo
2. Portaobjetos para microscopio con carga positiva
3. Horno de secado capaz de mantener una temperatura de 53-65 °C
4. Cubetas o baños de tinción
5. Cronómetro
6. Xileno o sustituto de xileno
7. Alcohol reactivo o etanol

Nota: El tratamiento previo de un paso de Cell Marque, Trilogy[™] (N.º de catálogo 920P-06), puede sustituir los elementos de los puntos 6 y 7 anteriores.

8. Agua desionizada o destilada
9. Equipo de calentamiento, como la olla de presión eléctrica para el paso del tratamiento previo del tejido
10. Sistema de detección como HiDef Detection[™] HRP Polymer System (N.º de catálogo 954D-20) o HiDef Detection[™] Alk Phos Polymer System (N.º de catálogo 962D-20)
11. Cromógeno, como DAB Substrate Kit (N.º de catálogo 957D-20) o Permanent Red Chromogen Kit (N.º de catálogo 960D-10)
12. TBS IHC Wash Buffer + Tween[®] 20 (N.º de catálogo 935B-09)
13. Hematoxylin u otra contratinción
14. Diluyentes de anticuerpo, como Diamond: Antibody Diluent (N.º de catálogo 938B-05) o Emerald: Antibody Diluent (N.º de catálogo 936B-08)
15. Peroxide Block (N.º de catálogo 925B-05) para usar con HRP
16. Avidin-Biotin Blocking Reagents para usar con detección con estreptavidina-biotina
17. Negative Control Reagent (N.º de catálogo 939B-02 para universal)
18. Mounting Medium
19. Cubreobjetos
20. Microscopio óptico (40-400x)

Conservación y Manipulación

Almacenar a 2-8 °C. No congelar.

Para garantizar la dispensación adecuada del reactivo y la estabilidad del anticuerpo, tras cada utilización se debe volver a poner el tapón y almacenar el frasco inmediatamente en la nevera, en posición vertical.

Todos los reactivos de anticuerpo tienen una fecha de caducidad. El reactivo es estable hasta la fecha indicada en la etiqueta siempre que se almacene correctamente. No usar el reactivo después de la fecha de caducidad para el método de almacenamiento descrito.

No hay signos definitivos que indiquen la inestabilidad de este producto, por lo que los controles positivos y negativos deben analizarse simultáneamente con muestras desconocidas. Contacte con el servicio técnico de Cell Marque si tiene sospechas sobre la inestabilidad del reactivo.

Extracción y Preparación de la Muestra para su Análisis

Cuando se utiliza el procedimiento habitual, los tejidos fijados en formol en tampón neutro y embebidos en parafina resultan adecuados para el uso con este anticuerpo primario cuando se utiliza con los kits de detección de Cell Marque (consulte la sección Materiales y reactivos necesarios no suministrados). Nota: Cell Marque evalúa el resultado solo en tejidos humanos. El fijador de tejido recomendado es formalina tamponada neutral 10%. Pueden tener lugar resultados variables como consecuencia de una fijación prolongada o procesos especiales tales como la descalcificación en la preparación de la médula ósea.

Cada sección debe cortarse con el grosor apropiado (aproximadamente 3 µm) y colocarse en un portaobjetos de vidrio con carga positiva. Los portaobjetos que contienen el corte de tejido pueden secarse durante al menos 2 horas (pero no más de 24 horas) en un horno a una temperatura de 53-65 °C.

Advertencias y Precauciones

1. Adopte las precauciones adecuadas cuando se manipulen los reactivos. Usar guantes y batas de laboratorio desechables cuando se manipulen materiales potencialmente carcinógenos o tóxicos (como xileno).
2. Evite el contacto de los reactivos con los ojos y las membranas mucosas. Si se produce el contacto con áreas sensibles, lávese con agua abundante.
3. Las muestras del paciente y todos los materiales en contacto con ellas deben tratarse como si fuesen materiales potencialmente infecciosos y desecharse con las precauciones adecuadas. Nunca pipetear con la boca.
4. Evitar la contaminación microbiana de los reactivos, ya que podrían producirse resultados incorrectos.
5. El usuario debe validar los tiempos y temperaturas de incubación.
6. Los reactivos prediluidos listos para usar están diluidos óptimamente por lo que una dilución adicional podría producir la pérdida de tinción del antígeno.
7. Los reactivos concentrados pueden diluirse óptimamente en base a la determinación del usuario. El usuario deberá validar igualmente tanto la compatibilidad como el efecto en la estabilidad de cualquier disolvente utilizado que no esté recomendado específicamente en este documento.
8. Este producto no se clasifica como sustancia peligrosa cuando se usa según las instrucciones. El conservante del reactivo es inferior al 0,1% de ácido sódico y no cumple los criterios de la OSHA para sustancias peligrosas a la concentración indicada. Consulte la hoja de datos de seguridad de los materiales.
9. El usuario debe validar cualquier condición de almacenamiento que no sea una de las especificadas en el prospecto.
10. El disolvente puede incluir albúmina de suero bovino y el sobrenadante puede contener suero bovino. Los productos que contienen suero fetal bovino y los productos que contienen albúmina de suero bovino se compran a los proveedores comerciales. Los certificados de origen de la fuente animal utilizada en estos productos obran en el archivo de Cell Marque. Los certificados aseguran que las fuentes bovinas provienen de países con riesgo mínimo de BSE y relacionan como fuentes de bovinos EE. UU. y Canadá.
11. Como con cualquier producto proveniente de fuentes biológicas, deberán emplearse procedimientos de manipulación apropiados.

Instrucciones de Uso

Protocolos de tinción recomendados para el anticuerpo primario indicado:

HiDef HRP:

HiDef Detection™ HRP Polymer System (N.º de catálogo 954D-20)

1. Técnica de recuperación del epítipo: HIER, Reactivo para la recuperación del epítipo: Trilogy
2. Tiempo de incubación de anticuerpo (minutos): 10-30
3. Tiempo de incubación de HiDef Detection Amplifier (minutos): 10
4. Tiempo de incubación de HiDef Detection Polymer Detector (minutos): 10
5. Tiempo de incubación de DAB (minutos): 1-10
6. Deshidrate y cubra el portaobjetos.

HiDef Alk Phos:

HiDef Detection™ Alk Phos Polymer System (N.º de catálogo 962D-20)

1. Técnica de recuperación del epítipo: HIER, Reactivo para la recuperación del epítipo: Trilogy
2. Tiempo de incubación de anticuerpo (minutos): 10-30
3. Tiempo de incubación de HiDef Detection Amplifier (minutos): 10
4. Tiempo de incubación de HiDef Detection Polymer Detector (minutos): 10
5. Tiempo de incubación de Permanent Red (minutos): 15-30
6. Deshidrate y cubra el portaobjetos.

Procedimientos de Control de Calidad

Control de Tejido Positivo

Cada vez que se realice el procedimiento de tinción, debe procesarse un control positivo del tejido. Este tejido puede contener células o componentes del tejido de tinción positiva y negativa y servir como tejido de control positivo y negativo. Los tejidos de control deben ser muestras frescas de autopsia, biopsia o cirugía preparadas o fijadas con la mayor brevedad con un proceso idéntico al de los cortes en estudio. El uso de un corte de tejido fijado o procesado de forma diferente a la muestra en estudio servirá para el control de todos los reactivos y pasos del método excepto la fijación y el procesamiento del tejido.

Un tejido con una tinción positiva débil es más adecuado para un control de calidad óptimo y para detectar niveles pequeños de degradación del reactivo. El control de tejido positivo para el anticuerpo primario indicado puede incluir lo siguiente:

Control de Tejido Positivo	
Tejido	Visualización
Pecho	Citoplasmática, Membranoso
Piel	Citoplasmática, Membranoso
Carcinoma de pecho	Citoplasmática, Membranoso
Meningioma	Citoplasmática, Membranoso

Los controles de tejido positivos conocidos solo se deben usar para monitorizar el comportamiento correcto de los tejidos procesados y los reactivos de la prueba, y no como ayuda para establecer un diagnóstico específico de las muestras del paciente. Si los controles positivos del tejido no muestran una tinción positiva apropiada, los resultados de las muestras en estudio se deben considerar no válidos.

Control de Tejido Negativo

El mismo tejido utilizado para el control de tejido positivo se puede utilizar en el control de tejido negativo. La variedad de tipos de células presentes en la mayoría de los cortes de tejidos ofrece sitios de control negativo internos, pero esto debe verificarlo el usuario. Los componentes que no se tienen deben demostrar la ausencia de tinción específica y proporcionar una indicación de tinción de fondo no específica. Si se produce una tinción específica en los sitios de control de tejido negativo, los resultados obtenidos con las muestras del paciente deben considerarse no válidas.

Discrepancias Inexplicables

Las discrepancias inexplicables de los controles deben remitirse de inmediato al servicio técnico de Cell Marque. Si los resultados del control de calidad no cumplen las especificaciones, los resultados del paciente no son válidos. Véase la sección Resolución de problemas de este prospecto. Identifique y corrija el problema; a continuación, repita todo el procedimiento con las muestras del paciente.

Reactivo de Control Negativo

Se debe utilizar un reactivo de control negativo para cada muestra para ayudar a interpretar los resultados. Para evaluar una tinción no específica se utiliza un reactivo de control negativo en lugar del anticuerpo primario. Se deberá tratar el portaobjetos con el reactivo de control negativo haciendo coincidir las especies huéspedes del anticuerpo primario e idéneamente con la misma concentración de IgG. El periodo de incubación para el reactivo de control negativo deberá ser igual que el periodo de incubación del anticuerpo primario.

Interpretación de los Resultados

El procedimiento de inmunotinción causa la precipitación de un producto de reacción coloreado en los sitios del antígeno localizados por el anticuerpo primario. Consulte en el prospecto correspondiente del sistema de detección las reacciones de color esperadas. Un patólogo cualificado experimentado en procedimientos de inmunohistoquímica debe evaluar los controles de tejido positivos y negativos antes de interpretar los resultados.

Control de Tejido Positivo

El control de tejido positivo teñido debe examinarse primero para determinar que todos los reactivos funcionan adecuadamente. La presencia de un producto de reacción con el color adecuado dentro de las células diana es indicativa de una reactividad positiva. Consulte en el prospecto del sistema de detección utilizado las reacciones de color esperadas. Según sea la duración de la incubación y la potencia de la hematoxilina empleada, la contratinción dará como resultado una coloración azul de pálida a oscura de los núcleos celulares. Una contratinción excesiva o incompleta puede comprometer la interpretación adecuada de los resultados. Si los controles de tejidos positivos no muestran una tinción positiva apropiada, los resultados de las muestras en estudio se deben considerar no válidos.

Control de Tejido Negativo

El control de tejido negativo debe examinarse después del control de tejido positivo para verificar la marcación específica del antígeno diana por el anticuerpo primario. La ausencia de tinción específica en el control de tejido negativo confirma la ausencia de reactividad

cruzada del anticuerpo con las células o los componentes celulares. Si se produce una tinción específica en el control de tejido negativo, los resultados obtenidos con la muestra del paciente se consideran no válidos. La tinción no específica, si la hay, tendrá un aspecto difuso. También se puede observar una ligera tinción específica esporádica del tejido conjuntivo en cortes de tejidos que no estén fijados óptimamente. Para la interpretación de los resultados de la tinción deben usarse células intactas. Las células necróticas o degeneradas muestran una tinción no específica.

Tejido del Paciente

Las muestras del paciente se deben examinar al final. La intensidad de la tinción positiva se debe valorar en el contexto de cualquier tinción de fondo del control de reactivo negativo. Como en cualquier prueba de inmunohistoquímica, un resultado negativo significa que el antígeno en cuestión no se ha detectado, no que el antígeno esté ausente de las células o del tejido analizado. Un panel de anticuerpos puede ayudar a identificar reacciones negativas falsas (consulte la sección Sumario de resultados esperados). La morfología de cada muestra del tejido también debe examinarse utilizando un corte con tinción de hematoxilina y eosina al interpretar cualquier resultado de inmunohistoquímica. Un patólogo cualificado debe interpretar los resultados morfológicos del paciente y sus datos clínicos pertinentes.

Limitaciones

1. El color del anticuerpo no afecta lo funcionamiento.
2. Este reactivo es "de exclusivo uso profesional", ya que la inmunohistoquímica es un proceso diagnóstico de varias etapas que requiere una formación especializada en la selección de los reactivos, tejidos, fijación y procesamiento apropiados; la preparación del portaobjetos de inmunohistoquímica y la interpretación de los resultados de la tinción.
3. Para uso exclusivo de laboratorio.
4. Para diagnóstico *in vitro*.
5. La tinción de los tejidos depende de la manipulación y el procesamiento de los mismos antes de la tinción. Una fijación, congelación, descongelación, lavado, secado, calentado o corte inadecuados o la contaminación con otros tejidos o líquidos puede producir artefactos, bloqueo del anticuerpo o resultados falsos negativos. Los resultados inconsistentes pueden ser consecuencia de las variaciones en los métodos de fijación y embebido, así como de irregularidades inherentes dentro del tejido.
6. Una contratinción excesiva o incompleta puede comprometer la interpretación adecuada de los resultados.
7. La interpretación clínica de una tinción positiva o de su ausencia debe evaluarse en el contexto de la historia clínica, la morfología, otros criterios histopatológicos, así como otras pruebas diagnósticas. Este anticuerpo está diseñado para utilizarlo en un panel de anticuerpos si fuera pertinente. Es responsabilidad de un patólogo cualificado familiarizarse con los anticuerpos, reactivos, paneles de diagnóstico y métodos usados para obtener una preparación con tinción. La tinción se debe realizar en un laboratorio certificado con la supervisión de un anatomopatólogo responsable de la revisión de los portaobjetos teñidos y de la verificación de la idoneidad de los controles negativos y positivos.
8. Cell Marque provee anticuerpos y reactivos en una dilución óptima para usar como se indica. Cualquier desviación de los procedimientos recomendados del método puede invalidar los resultados esperados. Se deben utilizar y documentar los controles apropiados. Los usuarios deben asumir en cualquier caso la responsabilidad de la interpretación de los resultados del paciente.
9. Cell Marque provee los anticuerpos primarios en formato concentrado de manera que el usuario pueda diluirlos después óptimamente para usarlos según determine y observando

las técnicas de validación adecuadas. Los usuarios deben validar el uso de cualquier disolvente que no se recomiende en este documento. Una vez que el anticuerpo primario haya sido validado como adecuado para usar, cualquier desviación de los procedimientos de prueba recomendados puede invalidar los resultados esperados. Se deben utilizar y documentar los controles apropiados. Los usuarios deben asumir en cualquier caso la responsabilidad de la interpretación de los resultados del paciente.

10. Este producto no está diseñado para utilizarlo en citometría de flujo.
11. Los reactivos pueden mostrar reacciones inesperadas en tejidos no estudiados previamente. No puede excluirse completamente la posibilidad de reacciones inesperadas, incluso en grupos de tejidos analizados, debido a la variabilidad biológica de la expresión del antígeno en neoplasmas u otros tejidos patológicos. Póngase en contacto con el servicio técnico de Cell Marque si sospecha que ha habido una reacción inesperada documentada.
12. Los tejidos de personas infectadas con el virus de la hepatitis B y que contengan antígeno de superficie (HBsAg) pueden mostrar una tinción no específica con peroxidasa de rábano.
13. Cuando se utilizan en pasos de bloqueo, los sueros normales procedentes del mismo origen animal que los antisueros secundarios pueden provocar resultados de falsos negativos o falsos positivos debido al efecto de los autoanticuerpos o anticuerpos naturales.
14. Pueden verse resultados de falsos positivos debido a la unión de proteínas o productos de reacción del sustrato por mecanismos no inmunológicos. También pueden estar causados por la actividad de la pseudoperoxidasa (eritrocitos), actividad de la peroxidasa endógena (citocromo C) o biotina endógena (ejemplo: hígado, cerebro, mama, riñón) dependiendo del tipo de técnica de inmunotinción empleada.
15. Como en cualquier prueba de inmunohistoquímica, un resultado negativo significa que el antígeno no se ha detectado, no que el antígeno esté ausente de las células o del tejido analizado.
16. Los productos de anticuerpo prediluidos están optimizados como productos listos para usar. Debido a la posibilidad de variaciones en la fijación y procesamiento del tejido, puede ser necesario aumentar o reducir el tiempo de incubación del anticuerpo primario en muestras individuales.
17. El anticuerpo, en combinación con sistemas de detección y sus accesorios, detecta los antígenos que sobreviven al proceso habitual de fijación con formol, procesamiento y corte del tejido. Los usuarios que se desvíen de los procedimientos de prueba recomendados son responsables, como lo serían en cualquier caso, de la interpretación y validación de los resultados del paciente.

Sumario de Resultados Esperados

Consulte las siguientes tablas de reactividad:

Estudio Normal			
Tejido	N.º Teñido (+)	N.º Total	Notas
Cerebro	0	1	
Córtex adrenal	0	1	
Ovarios	0	1	

Estudio Normal			
Tejido	N.º Teñido (+)	N.º Total	Notas
Páncreas	1	1	
Paratiroides	0	1	
Pituitaria	0	1	
Testículos	0	1	
Tiroides	0	1	
Pecho	2	2	
Bazo	0	1	
Amígdalas	0	1	
Timo	1	1	
Médula ósea	0	1	
Pulmones	2	2	
Corazón	0	1	
Esófago	1	1	
Estómago	1	1	
Intestino delgado	1	1	
Colon	1	1	
Hígado	1	1	
Glándula salival	1	1	
Vesícula biliar	1	1	
Riñones	1	1	
Vejiga	1	1	
Próstata	0	2	
Útero	1	1	
Trompas de Falopio	1	1	
Uréter	1	1	
Cérvix	1	1	
Músculos del esqueleto	0	2	
Músculo liso	0	3	
Piel	1	1	
Nervios periféricos	0	1	
Mesotelio	0	1	
Grasa	0	1	
Placenta	0	1	

Este anticuerpo tiñe tejidos normales como está indicado en la literatura.

Estudio de la Enfermedad del Tejido			
Tejido	N.º Teñido (++)	N.º Total	Notas
Carcinoma ductal invasivo	24	24	
Carcinoma de colorectal	20	21	
Meningioma	3	4	
Linfoma anaplásico de células grandes	1	1	
Carcinoma ductal in situ de mama	1	1	
Carcinoma suprarrenal	0	5	
Carcinoma embrionario	0	3	
Carcinoma hepatocelular	0	6	
Schwannoma	0	5	

Este anticuerpo tiñe tumores como está indicado en la literatura.

Resolución de Problemas

1. Si el control positivo muestra una tinción más débil de la esperada, deben analizarse otros controles positivos realizados en la misma tinción para determinar si se debe al anticuerpo primario o a uno de los reactivos secundarios comunes.
2. Si el control positivo da negativo, se deben analizar otros controles positivos usados en la misma ejecución para determinar si se debe al anticuerpo primario o a uno de los reactivos secundarios comunes. Los tejidos pueden haberse recogido, fijado o desparafinado de manera inadecuada. Deberá seguirse el procedimiento adecuado para la recogida, la conservación y la fijación.
3. Si se produce una tinción de fondo excesiva, pueden haber niveles altos de biotina endógena. Se deberá incluir una etapa de bloqueo con biotina a no ser que se esté utilizando un sistema de detección sin biotina, en cuyo caso ninguna biotina presente sería un factor que contribuyera a la tinción de fondo.
4. Si no se ha eliminado toda la parafina deberá repetirse el procedimiento de desparafinación.
5. Si los cortes de tejido lavan el portaobjetos, deben comprobarse los mismos para garantizar que tienen carga positiva. Otras posibilidades que podrían afectar adversamente a la adhesión del tejido incluyen un secado insuficiente del corte de tejido en el portaobjetos antes de la tinción o fijación en formol que no fuera neutralizado con tampón apropiadamente. El grosor del tejido también puede ser un factor causante.

Para conocer la acción correctiva, consulte la sección de las instrucciones de uso o contacte con el servicio técnico de Cell Marque a través de techsupport@cellmarque.com.

Bibliografía

1. Pinkus GS, et al. Epithelial membrane antigen--a diagnostic discriminant in surgical pathology: immunohistochemical profile in epithelial, mesenchymal, and hematopoietic neoplasms using paraffin sections and monoclonal antibodies. *Hum Pathol.* 1985; 16:929-40.



2. Pinkus GS, et al. Are keratin proteins a better tumor marker than epithelial membrane antigen? A comparative immunohistochemical study of various paraffin-embedded neoplasms using monoclonal and polyclonal antibodies. *Am J Clin Pathol.* 1986; 77:269-77.
3. Dearnaly DP, et al. Increased detection of mammary carcinoma cells in marrow smears using antisera to epithelial membrane antigen. *Br J Cancer.* 1981; 44:85-90.
4. Redding WH, et al. Detection of micrometastases in patients with primary breast cancer. *Lancet* 1983; 1271-4.
5. Attanoos RL, et al. The use of immunohistochemistry in distinguishing reactive from neoplastic mesothelium. A novel use for desmin and comparative evaluation with epithelial membrane antigen, p53, platelet-derived growth factor-receptor, P-glycoprotein and Bcl-2. *Histopathology.* 2003; 43:231-8.
6. Beer TW, et al. Ber EP4 and epithelial membrane antigen aid distinction of basal cell, squamous cell and basosquamous carcinomas of the skin. *Histopathology.* 2000; 37:218-23.
7. Lee JS, et al. Immunohistochemical panel for distinguishing between carcinoma and reactive mesothelial cells in serous effusions. *Acta Cytol.* 1996; 40:631-6.
8. Fraga M, et al. Bone marrow involvement in anaplastic large cell lymphoma. Immunohistochemical detection of minimal disease and its prognostic significance. *Am J Clin Pathol.* 1995; 103:82-9.

Limitaciones de Responsabilidad

Cell Marque es el fabricante legal de los anticuerpos de diagnóstico *in vitro* de la marca Cell Marque + RabMab. Cell Marque utiliza la tecnología RabMab de Abcam PLC para esta marca. La tecnología monoclonal de conejo está patentada y RabMab es una marca registrada de Abcam PLC.

*TWEEN es una marca registrada de Croda International PLC.

©2017 Sigma-Aldrich Co. LLC. Todos los derechos reservados. SIGMA-ALDRICH es una marca comercial de Sigma-Aldrich Co. LLC, registrada en EE. UU. y en otros países. Cell Marque, Trilogy, Declere y HiDef Detection son marcas comerciales de Sigma-Aldrich Co. LLC o de sus filiales.

 www.cellmarque.com

 6600 Sierra College Blvd. • Rocklin, CA 95677 USA • 916-746-8900

EC	REP	EMERGO EUROPE Prinsessegracht 20, 2514 AP The Hague, The Netherlands
----	-----	---



CM Template #2.4
Implementation date 22 Nov 2017

GATA3 (L50-823) Mouse Monoclonal Antibody

Para Diagnóstico In Vitro (IVD)

Identificación del Producto

REF	Descripción
390M-14	0,1 ml concentrado
390M-15	0,5 ml concentrado
390M-16	1,0 ml concentrado
390M-17	1,0 ml prediluido listo para usar
390M-18	7,0 ml prediluido listo para usar
390M-10	25,0 ml prediluido listo para usar

Definiciones de los Símbolos

KEY-CODE	código
P	prediluir
C	concentrado
A	ascitis
E	suero
S	sobrenadante
DIL	rango de dilución del concentrado

Uso Previsto

Este anticuerpo está destinado para uso diagnóstico *in vitro* (IVD).

El anticuerpo primario monoclonal de ratón GATA3 (L50-823) está diseñado para utilizarse en un laboratorio para detectar la proteína GATA3 en tejidos embebidos en parafina, fijados con formalina y teñidos en inmunohistoquímica cualitativa (IHC).

Los resultados obtenidos con el uso de este producto junto con la historia clínica relevante del paciente, otras pruebas diagnósticas y controles adecuados debe interpretarlos un patólogo cualificado.

Resumen y Explicación

La proteína de unión GATA 3 o GATA3 es un factor de transcripción de los dedos de cinc y desempeña una función importante en la promoción y dirección de la proliferación, desarrollo y diferenciación celular en numerosos tejidos y tipos de células.¹⁻⁴ El gen humano GATA3 se ha asignado al cromosoma 10p15.³ La expresión de GATA3 se ve principalmente en el carcinoma de mama y en el carcinoma urotelial.¹⁻² El anti-GATA3 también puede resultar útil

para identificar el carcinoma primario desconocido cuando existe la posibilidad de que haya carcinomas de mama o de vejiga.

Principios y Procedimientos

El anticuerpo primario indicado puede utilizarse como anticuerpo primario para la tinción inmunohistoquímica de cortes de tejido fijado con formol y embebido en parafina. En general, la tinción inmunohistoquímica junto con el sistema de detección mediante unión con peroxidasa de rábano (HRP) o fosfatasa alcalina permite la visualización de antígenos a través de la aplicación secuencial de un anticuerpo específico (anticuerpo primario) al antígeno, un anticuerpo secundario (anticuerpo de unión) al anticuerpo primario, un complejo enzimático y un sustrato cromogénico con etapas de lavado intermedias. La activación enzimática del cromógeno da lugar a un producto de reacción visible en el sitio del antígeno. La muestra puede entonces contrateñirse y aplicarse un cubreobjetos. Los resultados se interpretan con un microscopio óptico.

Materiales y Métodos

Reactivos Suministrados

Composición del Producto	
Prediluir: diluido en	Amortiguador Tris, pH 7,3-7,7, con un 1% de BSA y <0,1% de azida de sodio
Concentrado: diluido en	Amortiguador Tris, pH 7,3-7,7, con un 1% de BSA y <0,1% de azida de sodio
Host	ratón
Isotipo	IgG ₁ /k
Intervalo de dilución de trabajo recomendado	1:100-1:500
Fuente	sobrenadante

Vea la etiqueta del producto para información específica sobre el lote acerca de lo siguiente:

1. Concentración de anticuerpos de inmunoglobulina
2. Detalles de la fuente

Reconstitución, Mezcla, Dilución y Titulación

El anticuerpo prediluido está listo para usar y optimizado para la tinción. El anticuerpo concentrado está optimizado para diluirlo en el rango de dilución con Cell Marque Diamond Antibody Diluent.

Materiales y Reactivos Necesarios No Suministrados

Los siguientes reactivos y materiales pueden ser necesarios para la tinción, pero no se incluyen con el anticuerpo primario:

1. Tejido de control positivo y negativo
2. Portaobjetos para microscopio con carga positiva
3. Horno de secado capaz de mantener una temperatura de 53–65 °C
4. Cubetas o baños de tinción
5. Cronómetro
6. Xileno o sustituto de xileno
7. Alcohol reactivo o etanol

Nota: El tratamiento previo de un paso de Cell Marque, Trilogy™ (N.º de catálogo 920P-06), puede sustituir los elementos de los puntos 6 y 7 anteriores.

8. Agua desionizada o destilada
9. Equipo de calentamiento, como la olla de presión eléctrica para el paso del tratamiento previo del tejido
10. Sistema de detección como HiDef Detection™ HRP Polymer System (N.º de catálogo 954D-20) o HiDef Detection™ Alk Phos Polymer System (N.º de catálogo 962D-20)
11. Cromógeno, como DAB Substrate Kit (N.º de catálogo 957D-20) o Permanent Red Chromogen Kit (N.º de catálogo 960D-10)
12. TBS IHC Wash Buffer + Tween® 20 (N.º de catálogo 935B-09)
13. Hematoxylin u otra contratinción
14. Diluyentes de anticuerpo, como Diamond: Antibody Diluent (N.º de catálogo 938B-05) o Emerald: Antibody Diluent (N.º de catálogo 936B-08)
15. Peroxide Block (N.º de catálogo 925B-05) para usar con HRP
16. Avidin-Biotin Blocking Reagents para usar con detección con estreptavidina-biotina
17. Negative Control Reagent (N.º de catálogo 939B-02 para universal)
18. Mounting Medium
19. Cubreobjetos
20. Microscopio óptico (40–400x)

Conservación y Manipulación

Almacenar a 2–8 °C. No congelar.

Para garantizar la dispensación adecuada del reactivo y la estabilidad del anticuerpo, tras cada utilización se debe volver a poner el tapón y almacenar el frasco inmediatamente en la nevera, en posición vertical.

Todos los reactivos de anticuerpo tienen una fecha de caducidad. El reactivo es estable hasta la fecha indicada en la etiqueta siempre que se almacene correctamente. No usar el reactivo después de la fecha de caducidad para el método de almacenamiento descrito.

No hay signos definitivos que indiquen la inestabilidad de este producto, por lo que los controles positivos y negativos deben analizarse simultáneamente con muestras desconocidas. Contacte con el servicio técnico de Cell Marque si tiene sospechas sobre la inestabilidad del reactivo.

Extracción y Preparación de la Muestra para su Análisis

Cuando se utiliza el procedimiento habitual, los tejidos fijados en formol en tampón neutro y embebidos en parafina resultan adecuados para el uso con este anticuerpo primario cuando se utiliza con los kits de detección de Cell Marque (consulte la sección Materiales y reactivos necesarios no suministrados). Nota: Cell Marque evalúa el resultado solo en tejidos humanos. El fijador de tejido recomendado es formalina tamponada neutral 10%. Pueden tener lugar resultados variables como consecuencia de una fijación prolongada o procesos especiales tales como la descalcificación en la preparación de la médula ósea.

Cada sección debe cortarse con el grosor apropiado (aproximadamente 3 µm) y colocarse en un portaobjetos de vidrio con carga positiva. Los portaobjetos que contienen el corte de tejido pueden secarse durante al menos 2 horas (pero no más de 24 horas) en un horno a una temperatura de 53–65 °C.

Advertencias y Precauciones

1. Adopte las precauciones adecuadas cuando se manipulen los reactivos. Usar guantes y batas de laboratorio desechables cuando se manipulen materiales potencialmente carcinógenos o tóxicos (como xileno).
2. Evite el contacto de los reactivos con los ojos y las membranas mucosas. Si se produce el contacto con áreas sensibles, lávese con agua abundante.
3. Las muestras del paciente y todos los materiales en contacto con ellas deben tratarse como si fuesen materiales potencialmente infecciosos y desecharse con las precauciones adecuadas. Nunca pipetear con la boca.
4. Evitar la contaminación microbiana de los reactivos, ya que podrían producirse resultados incorrectos.
5. El usuario debe validar los tiempos y temperaturas de incubación.
6. Los reactivos prediluidos listos para usar están diluidos óptimamente por lo que una dilución adicional podría producir la pérdida de tinción del antígeno.
7. Los reactivos concentrados pueden diluirse óptimamente en base a la determinación del usuario. El usuario deberá validar igualmente tanto la compatibilidad como el efecto en la estabilidad de cualquier disolvente utilizado que no esté recomendado específicamente en este documento.
8. Este producto no se clasifica como sustancia peligrosa cuando se usa según las instrucciones. El conservante del reactivo es inferior al 0,1% de ácido sódico y no cumple los criterios de la OSHA para sustancias peligrosas a la concentración indicada. Consulte la hoja de datos de seguridad de los materiales.
9. El usuario debe validar cualquier condición de almacenamiento que no sea una de las especificadas en el prospecto.
10. El disolvente puede incluir albúmina de suero bovino y el sobrenadante puede contener suero bovino. Los productos que contienen suero fetal bovino y los productos que contienen albúmina de suero bovino se compran a los proveedores comerciales. Los certificados de origen de la fuente animal utilizada en estos productos obran en el archivo de Cell Marque. Los certificados aseguran que las fuentes bovinas provienen de países con riesgo mínimo de BSE y relacionan como fuentes de bovinos EE. UU. y Canadá.
11. Como con cualquier producto proveniente de fuentes biológicas, deberán emplearse procedimientos de manipulación apropiados.

Instrucciones de Uso

Protocolos de tinción recomendados para el anticuerpo primario indicado:

HiDef HRP:

HiDef Detection™ HRP Polymer System (N.º de catálogo 954D-20)

1. Técnica de recuperación del epítipo: HIER, Reactivo para la recuperación del epítipo: Trilogy
2. Tiempo de incubación de anticuerpo (minutos): 10-30
3. Tiempo de incubación de HiDef Detection Amplifier (minutos): 10
4. Tiempo de incubación de HiDef Detection Polymer Detector (minutos): 10
5. Tiempo de incubación de DAB (minutos): 1-10
6. Deshidrate y cubra el portaobjetos.

HiDef Alk Phos:

HiDef Detection™ Alk Phos Polymer System (N.º de catálogo 962D-20)

1. Técnica de recuperación del epítipo: HIER, Reactivo para la recuperación del epítipo: Trilogy
2. Tiempo de incubación de anticuerpo (minutos): 10-30
3. Tiempo de incubación de HiDef Detection Amplifier (minutos): 10
4. Tiempo de incubación de HiDef Detection Polymer Detector (minutos): 10
5. Tiempo de incubación de Permanent Red (minutos): 15-30
6. Deshidrate y cubra el portaobjetos.

Procedimientos de Control de Calidad

Control de Tejido Positivo

Cada vez que se realice el procedimiento de tinción, debe procesarse un control positivo del tejido. Este tejido puede contener células o componentes del tejido de tinción positiva y negativa y servir como tejido de control positivo y negativo. Los tejidos de control deben ser muestras frescas de autopsia, biopsia o cirugía preparadas o fijadas con la mayor brevedad con un proceso idéntico al de los cortes en estudio. El uso de un corte de tejido fijado o procesado de forma diferente a la muestra en estudio servirá para el control de todos los reactivos y pasos del método excepto la fijación y el procesamiento del tejido.

Un tejido con una tinción positiva débil es más adecuado para un control de calidad óptimo y para detectar niveles pequeños de degradación del reactivo. El control de tejido positivo para el anticuerpo primario indicado puede incluir lo siguiente:

Control de Tejido Positivo	
Tejido	Visualización
Carcinoma de pecho	Nuclear
Carcinoma urotelial	Nuclear

Los controles de tejido positivos conocidos solo se deben usar para monitorizar el comportamiento correcto de los tejidos procesados y los reactivos de la prueba, y no como ayuda para establecer un diagnóstico específico de las muestras del paciente. Si los controles

positivos del tejido no muestran una tinción positiva apropiada, los resultados de las muestras en estudio se deben considerar no válidos.

Control de Tejido Negativo

El mismo tejido utilizado para el control de tejido positivo se puede utilizar en el control de tejido negativo. La variedad de tipos de células presentes en la mayoría de los cortes de tejidos ofrece sitios de control negativo internos, pero esto debe verificarlo el usuario. Los componentes que no se tiñen deben demostrar la ausencia de tinción específica y proporcionar una indicación de tinción de fondo no específica. Si se produce una tinción específica en los sitios de control de tejido negativo, los resultados obtenidos con las muestras del paciente deben considerarse no válidas.

Discrepancias Inexplicables

Las discrepancias inexplicables de los controles deben remitirse de inmediato al servicio técnico de Cell Marque. Si los resultados del control de calidad no cumplen las especificaciones, los resultados del paciente no son válidos. Véase la sección Resolución de problemas de este prospecto. Identifique y corrija el problema; a continuación, repita todo el procedimiento con las muestras del paciente.

Reactivo de Control Negativo

Se debe utilizar un reactivo de control negativo para cada muestra para ayudar a interpretar los resultados. Para evaluar una tinción no específica se utiliza un reactivo de control negativo en lugar del anticuerpo primario. Se deberá tratar el portaobjetos con el reactivo de control negativo haciendo coincidir las especies huéspedes del anticuerpo primario e idéneamente con la misma concentración de IgG. El periodo de incubación para el reactivo de control negativo deberá ser igual que el periodo de incubación del anticuerpo primario.

Interpretación de los Resultados

El procedimiento de inmunotinción causa la precipitación de un producto de reacción coloreado en los sitios del antígeno localizados por el anticuerpo primario. Consulte en el prospecto correspondiente del sistema de detección las reacciones de color esperadas. Un patólogo cualificado experimentado en procedimientos de inmunohistoquímica debe evaluar los controles de tejido positivos y negativos antes de interpretar los resultados.

Control de Tejido Positivo

El control de tejido positivo teñido debe examinarse primero para determinar que todos los reactivos funcionan adecuadamente. La presencia de un producto de reacción con el color adecuado dentro de las células diana es indicativa de una reactividad positiva. Consulte en el prospecto del sistema de detección utilizado las reacciones de color esperadas. Según sea la duración de la incubación y la potencia de la hematoxilina empleada, la contratinción dará como resultado una coloración azul de pálida a oscura de los núcleos celulares. Una contratinción excesiva o incompleta puede comprometer la interpretación adecuada de los resultados. Si los controles de tejidos positivos no muestran una tinción positiva apropiada, los resultados de las muestras en estudio se deben considerar no válidos.

Control de Tejido Negativo

El control de tejido negativo debe examinarse después del control de tejido positivo para verificar la marcación específica del antígeno diana por el anticuerpo primario. La ausencia de tinción específica en el control de tejido negativo confirma la ausencia de reactividad cruzada del anticuerpo con las células o los componentes celulares. Si se produce una tinción específica en el control de tejido negativo, los resultados obtenidos con la muestra del paciente se consideran no válidos. La tinción no específica, si la hay, tendrá un aspecto difuso.

También se puede observar una ligera tinción específica esporádica del tejido conjuntivo en cortes de tejidos que no estén fijados óptimamente. Para la interpretación de los resultados de la tinción deben usarse células intactas. Las células necróticas o degeneradas muestran una tinción no específica.

Tejido del Paciente

Las muestras del paciente se deben examinar al final. La intensidad de la tinción positiva se debe valorar en el contexto de cualquier tinción de fondo del control de reactivo negativo. Como en cualquier prueba de inmunohistoquímica, un resultado negativo significa que el antígeno en cuestión no se ha detectado, no que el antígeno esté ausente de las células o del tejido analizado. Un panel de anticuerpos puede ayudar a identificar reacciones negativas falsas (consulte la sección Sumario de resultados esperados). La morfología de cada muestra del tejido también debe examinarse utilizando un corte con tinción de hematoxilina y eosina al interpretar cualquier resultado de inmunohistoquímica. Un patólogo cualificado debe interpretar los resultados morfológicos del paciente y sus datos clínicos pertinentes.

Limitaciones

1. El color del anticuerpo no afecta lo funcionamiento.
2. Este reactivo es "de exclusivo uso profesional", ya que la inmunohistoquímica es un proceso diagnóstico de varias etapas que requiere una formación especializada en la selección de los reactivos, tejidos, fijación y procesamiento apropiados; la preparación del portaobjetos de inmunohistoquímica y la interpretación de los resultados de la tinción.
3. Para uso exclusivo de laboratorio.
4. Para diagnóstico *in vitro*.
5. La tinción de los tejidos depende de la manipulación y el procesamiento de los mismos antes de la tinción. Una fijación, congelación, descongelación, lavado, secado, calentado o corte inadecuados o la contaminación con otros tejidos o líquidos puede producir artefactos, bloqueo del anticuerpo o resultados falsos negativos. Los resultados inconsistentes pueden ser consecuencia de las variaciones en los métodos de fijación y embebido, así como de irregularidades inherentes dentro del tejido.
6. Una contratinción excesiva o incompleta puede comprometer la interpretación adecuada de los resultados.
7. La interpretación clínica de una tinción positiva o de su ausencia debe evaluarse en el contexto de la historia clínica, la morfología, otros criterios histopatológicos, así como otras pruebas diagnósticas. Este anticuerpo está diseñado para utilizarlo en un panel de anticuerpos si fuera pertinente. Es responsabilidad de un patólogo cualificado familiarizarse con los anticuerpos, reactivos, paneles de diagnóstico y métodos usados para obtener una preparación con tinción. La tinción se debe realizar en un laboratorio certificado con la supervisión de un anatomopatólogo responsable de la revisión de los portaobjetos teñidos y de la verificación de la idoneidad de los controles negativos y positivos.
8. Cell Marque provee anticuerpos y reactivos en una dilución óptima para usar como se indica. Cualquier desviación de los procedimientos recomendados del método puede invalidar los resultados esperados. Se deben utilizar y documentar los controles apropiados. Los usuarios deben asumir en cualquier caso la responsabilidad de la interpretación de los resultados del paciente.
9. Cell Marque provee los anticuerpos primarios en formato concentrado de manera que el usuario pueda diluirlos después óptimamente para usarlos según determine y observando las técnicas de validación adecuadas. Los usuarios deben validar el uso de cualquier disolvente que no se recomienda en este documento. Una vez que el anticuerpo primario haya sido validado como adecuado para usar, cualquier desviación de los procedimientos

de prueba recomendados puede invalidar los resultados esperados. Se deben utilizar y documentar los controles apropiados. Los usuarios deben asumir en cualquier caso la responsabilidad de la interpretación de los resultados del paciente.

10. Este producto no está diseñado para utilizarlo en citometría de flujo.
11. Los reactivos pueden mostrar reacciones inesperadas en tejidos no estudiados previamente. No puede excluirse completamente la posibilidad de reacciones inesperadas, incluso en grupos de tejidos analizados, debido a la variabilidad biológica de la expresión del antígeno en neoplasmas u otros tejidos patológicos. Póngase en contacto con el servicio técnico de Cell Marque si sospecha que ha habido una reacción inesperada documentada.
12. Los tejidos de personas infectadas con el virus de la hepatitis B y que contengan antígeno de superficie (HBsAg) pueden mostrar una tinción no específica con peroxidasa de rábano.
13. Cuando se utilizan en pasos de bloqueo, los sueros normales procedentes del mismo origen animal que los antisueros secundarios pueden provocar resultados de falsos negativos o falsos positivos debido al efecto de los autoanticuerpos o anticuerpos naturales.
14. Pueden verse resultados de falsos positivos debido a la unión de proteínas o productos de reacción del sustrato por mecanismos no inmunológicos. También pueden estar causados por la actividad de la pseudoperoxidasa (eritrocitos), actividad de la peroxidasa endógena (citocromo C) o biotina endógena (ejemplo: hígado, cerebro, mama, riñón) dependiendo del tipo de técnica de inmunotinción empleada.
15. Como en cualquier prueba de inmunohistoquímica, un resultado negativo significa que el antígeno no se ha detectado, no que el antígeno esté ausente de las células o del tejido analizado.
16. Los productos de anticuerpo prediluidos están optimizados como productos listos para usar. Debido a la posibilidad de variaciones en la fijación y procesamiento del tejido, puede ser necesario aumentar o reducir el tiempo de incubación del anticuerpo primario en muestras individuales.
17. El anticuerpo, en combinación con sistemas de detección y sus accesorios, detecta los antígenos que sobreviven al proceso habitual de fijación con formal, procesamiento y corte del tejido. Los usuarios que se desvíen de los procedimientos de prueba recomendados son responsables, como lo serían en cualquier caso, de la interpretación y validación de los resultados del paciente.

Sumario de Resultados Esperados

Consulte las siguientes tablas de reactividad:

Estudio Normal			
Tejido	N.º Teñido (+)	N.º Total	Notas
Cerebro	1	1	Astrocitos dispersos +
Córtex adrenal	1	1	Médula +
Ovarios	0	1	
Páncreas	0	1	
Paratiroides	1	1	

Estudio Normal			
Tejido	N.º Teñido (+)	N.º Total	Notas
Pituitaria	0	1	
Testículos	0	1	
Tiroides	0	1	
Pecho	2	2	
Bazo	1	1	Células T pequeñas +
Amígdalas	1	1	Linfocitos T pequeños +
Timo	1	1	Células T precursoras +
Médula ósea	0	1	
Pulmones	0	2	
Corazón	0	1	
Esófago	0	1	
Estómago	0	1	
Intestino delgado	0	1	
Colon	0	1	
Hígado	0	1	
Glándula salival	1	1	Células mioepiteliales +
Vesícula biliar	0	1	
Riñones	1	1	Túbulos distales +
Vejiga	1	1	
Próstata	1	1	
Útero	0	1	
Trompas de Falopio	0	1	
Uréter	1	1	
Cérvix	1	1	capa basal +
Músculos del esqueleto	0	1	
Músculo liso	0	1	
Piel	2	2	Epidermis +
Nervios periféricos	0	1	
Mesotelio	0	1	
Grasa	0	1	
Placenta	1	1	

Este anticuerpo tiñe tejidos normales como está indicado en la literatura.

Estudio de la Enfermedad del Tejido			
Tejido	N.º Teñido (+)	N.º Total	Notas
Carcinoma ductal invasivo de mama	73	87	
Carcinoma de células transicionales	44	51	
Carcinoma ductal in situ de mama	10	10	
Carcinoma escamoso de pulmón	6	22	
Fibroadenoma de mama	4	4	
Carcinoma seroso de ovario	3	19	
Carcinoma de mama lobular invasivo	2	2	
Adenocarcinoma colorrectal	1	49	
Adenocarcinoma pulmonar	1	20	
Adenoma pleomorfo de glándulas salivales	1	1	
Astrocitoma	0	5	
Carcinoma folicular de tiroides	0	3	
Carcinoma hepatocelular	0	12	
Carcinoma medular tiroideo	0	6	
Adenocarcinoma ductal de páncreas	0	11	
Carcinoma papilar de tiroides	0	1	
Carcinoma de próstata	0	10	
Carcinoma de células renales	0	10	

Este anticuerpo tiñe tumores como está indicado en la literatura.

Resolución de Problemas

1. Si el control positivo muestra una tinción más débil de la esperada, deben analizarse otros controles positivos realizados en la misma tinción para determinar si se debe al anticuerpo primario o a uno de los reactivos secundarios comunes.
2. Si el control positivo da negativo, se deben analizar otros controles positivos usados en la misma ejecución para determinar si se debe al anticuerpo primario o a uno de los reactivos secundarios comunes. Los tejidos pueden haberse recogido, fijado o desparafinado de manera inadecuada. Deberá seguirse el procedimiento adecuado para la recogida, la conservación y la fijación.
3. Si se produce una tinción de fondo excesiva, pueden haber niveles altos de biotina endógena. Se deberá incluir una etapa de bloqueo con biotina a no ser que se esté utilizando un sistema de detección sin biotina, en cuyo caso ninguna biotina presente sería un factor que contribuyera a la tinción de fondo.

4. Si no se ha eliminado toda la parafina deberá repetirse el procedimiento de desparafinación.
5. Si los cortes de tejido lavan el portaobjetos, deben comprobarse los mismos para garantizar que tienen carga positiva. Otras posibilidades que podrían afectar adversamente a la adhesión del tejido incluyen un secado insuficiente del corte de tejido en el portaobjetos antes de la tinción o fijación en formol que no fuera neutralizado con tampón apropiadamente. El grosor del tejido también puede ser un factor causante.

Para conocer la acción correctiva, consulte la sección de las instrucciones de uso o contacte con el servicio técnico de Cell Marque a través de techsupport@cellmarque.com.

Bibliografía

1. Higgins JP, et al. Placental S100 (S100P) and GATA3: markers for transitional epithelium and urothelial carcinoma discovered by complementary DNA microarray. *Am J Surg Pathol.* 2007; 31:673-80.
2. Liu, H, et al. Immunohistochemical evaluation of GATA3 expression in tumors and normal tissues: a useful immunomarker for breast and urothelial carcinomas. *Am J Clin Pathol.* 2012; 138:57-64.
3. Joulin V, et al. A T-cell specific TCR delta DNA binding protein is a member of the human GATA family. *EMBO J.* 1991; 10: 1809-16.
4. Labastie M, et al. Structure and expression of the human GATA3 gene. *Genomics.* 21:1-6.

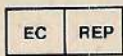
Limitaciones de Responsabilidad

*TWEEN es una marca registrada de Croda International PLC.

©2017 Sigma-Aldrich Co. LLC. Todos los derechos reservados. SIGMA-ALDRICH es una marca comercial de Sigma-Aldrich Co. LLC, registrada en EE. UU. y en otros países. Cell Marque, Trilogy, Declere y HiDef Detection son marcas comerciales de Sigma-Aldrich Co. LLC o de sus filiales.

 www.cellmarque.com

 6600 Sierra College Blvd. • Rocklin, CA 95677 USA • 916-746-8900

 EMERGO EUROPE
 Prinsessegracht 20, 2514 AP The Hague, The Netherlands



CM Template #2.4
 Implementation date 10 Nov 2017

Ki-67 (SP6) Rabbit Monoclonal Antibody

Para Diagnóstico In Vitro (IVD)

Identificación del Producto

REF	Descripción
275R-14	0,1 ml concentrado
275R-15	0,5 ml concentrado
275R-16	1,0 ml concentrado
275R-17	1,0 ml prediluido listo para usar
275R-18	7,0 ml prediluido listo para usar
275R-10	25,0 ml prediluido listo para usar

Definiciones de los Símbolos

KEY-CODE	código
P	prediluir
C	concentrado
A	ascitis
E	suero
S	sobrenadante
DIL	rango de dilución del concentrado

Uso Previsto

Este anticuerpo está destinado para uso diagnóstico *in vitro* (IVD).

El Ki-67 (SP6) Rabbit Monoclonal Primary Antibody está diseñado para utilizarse en un laboratorio para detectar el antígeno Ki-67 en tejidos embebidos en parafina, fijados con formalina y teñidos en inmunohistoquímica cualitativa (IHC).

Los resultados obtenidos con el uso de este producto junto con la historia clínica relevante del paciente, otras pruebas diagnósticas y controles adecuados debe interpretarlos un patólogo cualificado.

Resumen y Explicación

El antígeno Ki-67 es una proteína nuclear no histónica presente en las células proliferantes. En general, Ki-67 es un buen marcador de poblaciones de células proliferantes. Se ha demostrado que el índice de marcado del anti-Ki-67 es un buen marcador para calificar neoplasias como carcinoma de colon, carcinoma de mama y linfoma.¹⁻⁵

Principios y Procedimientos

El anticuerpo primario indicado puede utilizarse como anticuerpo primario para la tinción inmunohistoquímica de cortes de tejido fijado con formol y embebido en parafina. En general, la tinción inmunohistoquímica junto con el sistema de detección mediante unión con peroxidasa de rábano (HRP) o fosfatasa alcalina permite la visualización de antígenos a través de la aplicación secuencial de un anticuerpo específico (anticuerpo primario) al antígeno, un anticuerpo secundario (anticuerpo de unión) al anticuerpo primario, un complejo enzimático y un sustrato cromogénico con etapas de lavado intermedias. La activación enzimática del cromógeno da lugar a un producto de reacción visible en el sitio del antígeno. La muestra puede entonces contrateñirse y aplicarse un cubreobjetos. Los resultados se interpretan con un microscopio óptico.

Materiales y Métodos

Reactivos Suministrados

Composición del Producto	
Prediluir: diluido en	Amortiguador Tris, pH 7,3-7,7, con un 1% de BSA y <0,1% de azida de sodio
Concentrado: diluido en	Tampón fosfato salino, pH 7,6, con un 1% de BSA y <0,1% de azida de sodio
Host	conejo
Isotipo	IgG
Intervalo de dilución de trabajo recomendado	1:100-1:500
Fuente	sobrenadante

Vea la etiqueta del producto para información específica sobre el lote acerca de lo siguiente:

1. Concentración de anticuerpos de inmunoglobulina
2. Detalles de la fuente

Reconstitución, Mezcla, Dilución y Titulación

El anticuerpo prediluido está listo para usar y optimizado para la tinción. El anticuerpo concentrado está optimizado para diluirlo en el rango de dilución con Cell Marque Diamond: Antibody Diluent.

Materiales y Reactivos Necesarios No Suministrados

Los siguientes reactivos y materiales pueden ser necesarios para la tinción, pero no se incluyen con el anticuerpo primario:

1. Tejido de control positivo y negativo
2. Portaobjetos para microscopio con carga positiva
3. Horno de secado capaz de mantener una temperatura de 53-65 °C

4. Cubetas o baños de tinción
5. Cronómetro
6. Xileno o sustituto de xileno
7. Alcohol reactivo o etanol

Nota: El tratamiento previo de un paso de Cell Marque, Trilogy™ (N.º de catálogo 920P-06), puede sustituir los elementos de los puntos 6 y 7 anteriores.

8. Agua desionizada o destilada
9. Equipo de calentamiento, como la olla de presión eléctrica para el paso del tratamiento previo del tejido
10. Sistema de detección como HiDef Detection™ HRP Polymer System (N.º de catálogo 954D-20) o HiDef Detection™ Alk Phos Polymer System (N.º de catálogo 962D-20)
11. Cromógeno, como DAB Substrate Kit (N.º de catálogo 957D-20) o Permanent Red Chromogen Kit (N.º de catálogo 960D-10)
12. TBS IHC Wash Buffer + Tween® 20 (N.º de catálogo 935B-09)
13. Hematoxylin u otra contratinción
14. Diluyentes de anticuerpo, como Diamond Antibody Diluent (N.º de catálogo 938B-05) o Emerald Antibody Diluent (N.º de catálogo 936B-08)
15. Peroxide Block (N.º de catálogo 925B-05) para usar con HRP
16. Avidin-Biotin Blocking Reagents para usar con detección con estreptavidina-biotina
17. Negative Control Reagent (N.º de catálogo 939B-02 para universal)
18. Mounting Medium
19. Cubreobjetos
20. Microscopio óptico (40-400x)

Conservación y Manipulación

Almacenar a 2-8 °C. No congelar.

Para garantizar la dispensación adecuada del reactivo y la estabilidad del anticuerpo, tras cada utilización se debe volver a poner el tapón y almacenar el frasco inmediatamente en la nevera, en posición vertical.

Todos los reactivos de anticuerpo tienen una fecha de caducidad. El reactivo es estable hasta la fecha indicada en la etiqueta siempre que se almacene correctamente. No usar el reactivo después de la fecha de caducidad para el método de almacenamiento descrito.

No hay signos definitivos que indiquen la inestabilidad de este producto, por lo que los controles positivos y negativos deben analizarse simultáneamente con muestras desconocidas. Contacte con el servicio técnico de Cell Marque si tiene sospechas sobre la inestabilidad del reactivo.

Extracción y Preparación de la Muestra para su Análisis

Cuando se utiliza el procedimiento habitual, los tejidos fijados en formol en tampón neutro y embebidos en parafina resultan adecuados para el uso con este anticuerpo primario cuando se utiliza con los kits de detección de Cell Marque (consulte la sección Materiales y reactivos necesarios no suministrados). Nota: Cell Marque evalúa el resultado solo en tejidos humanos. El fijador de tejido recomendado es formalina tamponada neutral 10%. Pueden tener lugar resultados variables como consecuencia de una fijación prolongada o procesos especiales tales como la decalcificación en la preparación de la médula ósea.

Cada sección debe cortarse con el grosor apropiado (aproximadamente 3 µm) y colocarse en un portaobjetos de vidrio con carga positiva. Los portaobjetos que contienen el corte de

tejido pueden secarse durante al menos 2 horas (pero no más de 24 horas) en un horno a una temperatura de 53-65 °C.

Advertencias y Precauciones

1. Adopte las precauciones adecuadas cuando se manipulen los reactivos. Usar guantes y batas de laboratorio desechables cuando se manipulen materiales potencialmente carcinógenos o tóxicos (como xileno).
2. Evite el contacto de los reactivos con los ojos y las membranas mucosas. Si se produce el contacto con áreas sensibles, lávese con agua abundante.
3. Las muestras del paciente y todos los materiales en contacto con ellas deben tratarse como si fuesen materiales potencialmente infecciosos y desecharse con las precauciones adecuadas. Nunca pipetear con la boca.
4. Evitar la contaminación microbiana de los reactivos, ya que podrían producirse resultados incorrectos.
5. El usuario debe validar los tiempos y temperaturas de incubación.
6. Los reactivos prediluidos listos para usar están diluidos óptimamente por lo que una dilución adicional podría producir la pérdida de tinción del antígeno.
7. Los reactivos concentrados pueden diluirse óptimamente en base a la determinación del usuario. El usuario deberá validar igualmente tanto la compatibilidad como el efecto en la estabilidad de cualquier disolvente utilizado que no esté recomendado específicamente en este documento.
8. Este producto no se clasifica como sustancia peligrosa cuando se usa según las instrucciones. El conservante del reactivo es inferior al 0,1% de ácido fólico y no cumple los criterios de la OSHA para sustancias peligrosas a la concentración indicada. Consulte la hoja de datos de seguridad de los materiales.
9. El usuario debe validar cualquier condición de almacenamiento que no sea una de las especificadas en el prospecto.
10. El disolvente puede incluir albúmina de suero bovino y el sobrenadante puede contener suero bovino. Los productos que contienen suero fetal bovino y los productos que contienen albúmina de suero bovino se compran a los proveedores comerciales. Los certificados de origen de la fuente animal utilizada en estos productos obran en el archivo de Cell Marque. Los certificados aseguran que las fuentes bovinas provienen de países con riesgo mínimo de BSE y relacionan como fuentes de bovinos EE. UU. y Canadá.
11. Como con cualquier producto proveniente de fuentes biológicas, deberán emplearse procedimientos de manipulación apropiados.

Instrucciones de Uso

Protocolos de tinción recomendados para el anticuerpo primario indicado:

HiDef HRP:

HiDef Detection™ HRP Polymer System (N.º de catálogo 954D-20)

1. Técnica de recuperación del epítipo: HIER, Reactivo para la recuperación del epítipo: Trilogy
2. Tiempo de incubación de anticuerpo (minutos): 10-30
3. Tiempo de incubación de HiDef Detection Amplifier (minutos): 10
4. Tiempo de incubación de HiDef Detection Polymer Detector (minutos): 10
5. Tiempo de incubación de DAB (minutos): 1-10

6. Deshidrate y cubra el portaobjetos.

HiDef Alk Phos:

HiDef Detection™ Alk Phos Polymer System (N.º de catálogo 962D-20)

1. Técnica de recuperación del epitopo: HIER, Reactivo para la recuperación del epitopo: Trilogy
2. Tiempo de incubación de anticuerpo (minutos): 10-30
3. Tiempo de incubación de HiDef Detection Amplifier (minutos): 10
4. Tiempo de incubación de HiDef Detection Polymer Detector (minutos): 10
5. Tiempo de incubación de Permanent Red (minutos): 15-30
6. Deshidrate y cubra el portaobjetos.

Procedimientos de Control de Calidad

Control de Tejido Positivo

Cada vez que se realice el procedimiento de tinción, debe procesarse un control positivo del tejido. Este tejido puede contener células o componentes del tejido de tinción positiva y negativa y servir como tejido de control positivo y negativo. Los tejidos de control deben ser muestras frescas de autopsia, biopsia o cirugía preparadas o fijadas con la mayor brevedad con un proceso idéntico al de los cortes en estudio. El uso de un corte de tejido fijado o procesado de forma diferente a la muestra en estudio servirá para el control de todos los reactivos y pasos del método excepto la fijación y el procesamiento del tejido.

Un tejido con una tinción positiva débil es más adecuado para un control de calidad óptimo y para detectar niveles pequeños de degradación del reactivo. El control de tejido positivo para el anticuerpo primario indicado puede incluir lo siguiente:

Control de Tejido Positivo	
Tejido	Visualización
Amígdalas	Nuclear

Los controles de tejido positivos conocidos solo se deben usar para monitorizar el comportamiento correcto de los tejidos procesados y los reactivos de la prueba, y no como ayuda para establecer un diagnóstico específico de las muestras del paciente. Si los controles positivos del tejido no muestran una tinción positiva apropiada, los resultados de las muestras en estudio se deben considerar no válidos.

Control de Tejido Negativo

El mismo tejido utilizado para el control de tejido positivo se puede utilizar en el control de tejido negativo. La variedad de tipos de células presentes en la mayoría de los cortes de tejidos ofrece sitios de control negativo internos, pero esto debe verificarlo el usuario. Los componentes que no se tiñen deben demostrar la ausencia de tinción específica y proporcionar una indicación de tinción de fondo no específica. Si se produce una tinción específica en los sitios de control de tejido negativo, los resultados obtenidos con las muestras del paciente deben considerarse no válidas.

Discrepancias Inexplicables

Las discrepancias inexplicables de los controles deben remitirse de inmediato al servicio técnico de Cell Marque. Si los resultados del control de calidad no cumplen las especificaciones, los resultados del paciente no son válidos. Véase la sección Resolución de

problemas de este prospecto. Identifique y corrija el problema; a continuación, repita todo el procedimiento con las muestras del paciente.

Reactivo de Control Negativo

Se debe utilizar un reactivo de control negativo para cada muestra para ayudar a interpretar los resultados. Para evaluar una tinción no específica se utiliza un reactivo de control negativo en lugar del anticuerpo primario. Se deberá tratar el portaobjetos con el reactivo de control negativo haciendo coincidir las especies huéspedes del anticuerpo primario e idéneamente con la misma concentración de IgG. El periodo de incubación para el reactivo de control negativo deberá ser igual que el periodo de incubación del anticuerpo primario.

Interpretación de los Resultados

El procedimiento de inmunotinción causa la precipitación de un producto de reacción coloreado en los sitios del antígeno localizados por el anticuerpo primario. Consulte en el prospecto correspondiente del sistema de detección las reacciones de color esperadas. Un patólogo cualificado experimentado en procedimientos de inmunohistoquímica debe evaluar los controles de tejido positivos y negativos antes de interpretar los resultados.

Control de Tejido Positivo

El control de tejido positivo teñido debe examinarse primero para determinar que todos los reactivos funcionan adecuadamente. La presencia de un producto de reacción con el color adecuado dentro de las células diana es indicativa de una reactividad positiva. Consulte en el prospecto del sistema de detección utilizado las reacciones de color esperadas. Según sea la duración de la incubación y la potencia de la hematoxilina empleada, la contratinción dará como resultado una coloración azul de pálida a oscura de los núcleos celulares. Una contratinción excesiva o incompleta puede comprometer la interpretación adecuada de los resultados. Si los controles de tejidos positivos no muestran una tinción positiva apropiada, los resultados de las muestras en estudio se deben considerar no válidos.

Control de Tejido Negativo

El control de tejido negativo debe examinarse después del control de tejido positivo para verificar la marcación específica del antígeno diana por el anticuerpo primario. La ausencia de tinción específica en el control de tejido negativo confirma la ausencia de reactividad cruzada del anticuerpo con las células o los componentes celulares. Si se produce una tinción específica en el control de tejido negativo, los resultados obtenidos con la muestra del paciente se consideran no válidos. La tinción no específica, si la hay, tendrá un aspecto difuso. También se puede observar una ligera tinción específica esporádica del tejido conjuntivo en cortes de tejidos que no estén fijados óptimamente. Para la interpretación de los resultados de la tinción deben usarse células intactas. Las células necróticas o degeneradas muestran una tinción no específica.

Tejido del Paciente

Las muestras del paciente se deben examinar al final. La intensidad de la tinción positiva se debe valorar en el contexto de cualquier tinción de fondo del control de reactivo negativo. Como en cualquier prueba de inmunohistoquímica, un resultado negativo significa que el antígeno en cuestión no se ha detectado, no que el antígeno esté ausente de las células o del tejido analizado. Un panel de anticuerpos puede ayudar a identificar reacciones negativas falsas (consulte la sección Sumario de resultados esperados). La morfología de cada muestra del tejido también debe examinarse utilizando un corte con tinción de hematoxilina y eosina al interpretar cualquier resultado de inmunohistoquímica. Un patólogo cualificado debe interpretar los resultados morfológicos del paciente y sus datos clínicos pertinentes.

Limitaciones

- El color del anticuerpo no afecta lo funcionamiento.
- Este reactivo es "de exclusivo uso profesional", ya que la inmunohistoquímica es un proceso diagnóstico de varias etapas que requiere una formación especializada en la selección de los reactivos, tejidos, fijación y procesamiento apropiados; la preparación del portaobjetos de inmunohistoquímica y la interpretación de los resultados de la tinción.
- Para uso exclusivo de laboratorio.
- Para diagnóstico *in vitro*.
- La tinción de los tejidos depende de la manipulación y el procesamiento de los mismos antes de la tinción. Una fijación, congelación, descongelación, lavado, secado, calentado o corte inadecuados o la contaminación con otros tejidos o líquidos puede producir artefactos, bloqueo del anticuerpo o resultados falsos negativos. Los resultados inconsistentes pueden ser consecuencia de las variaciones en los métodos de fijación y embebido, así como de irregularidades inherentes dentro del tejido.
- Una contratinción excesiva o incompleta puede comprometer la interpretación adecuada de los resultados.
- La interpretación clínica de una tinción positiva o de su ausencia debe evaluarse en el contexto de la historia clínica, la morfología, otros criterios histopatológicos, así como otras pruebas diagnósticas. Este anticuerpo está diseñado para utilizarlo en un panel de anticuerpos si fuera pertinente. Es responsabilidad de un patólogo cualificado familiarizarse con los anticuerpos, reactivos, paneles de diagnóstico y métodos usados para obtener una preparación con tinción. La tinción se debe realizar en un laboratorio certificado con la supervisión de un anatomopatólogo responsable de la revisión de los portaobjetos teñidos y de la verificación de la idoneidad de los controles negativos y positivos.
- Cell Marque provee anticuerpos y reactivos en una dilución óptima para usar como se indica. Cualquier desviación de los procedimientos recomendados del método puede invalidar los resultados esperados. Se deben utilizar y documentar los controles apropiados. Los usuarios deben asumir en cualquier caso la responsabilidad de la interpretación de los resultados del paciente.
- Cell Marque provee los anticuerpos primarios en formato concentrado de manera que el usuario pueda diluirlos después óptimamente para usarlos según determine y observando las técnicas de validación adecuadas. Los usuarios deben validar el uso de cualquier disolvente que no se recomiende en este documento. Una vez que el anticuerpo primario haya sido validado como adecuado para usar, cualquier desviación de los procedimientos de prueba recomendados puede invalidar los resultados esperados. Se deben utilizar y documentar los controles apropiados. Los usuarios deben asumir en cualquier caso la responsabilidad de la interpretación de los resultados del paciente.
- Este producto no está diseñado para utilizarlo en citometría de flujo.
- Los reactivos pueden mostrar reacciones inesperadas en tejidos no estudiados previamente. No puede excluirse completamente la posibilidad de reacciones inesperadas, incluso en grupos de tejidos analizados, debido a la variabilidad biológica de la expresión del antígeno en neoplasmas u otros tejidos patológicos. Póngase en contacto con el servicio técnico de Cell Marque si sospecha que ha habido una reacción inesperada documentada.
- Los tejidos de personas infectadas con el virus de la hepatitis B y que contengan antígeno de superficie (HBsAg) pueden mostrar una tinción no específica con peroxidasa de rábano.
- Cuando se utilizan en pasos de bloqueo, los sueros normales procedentes del mismo origen animal que los antisueros secundarios pueden provocar resultados de falsos negativos o falsos positivos debido al efecto de los autoanticuerpos o anticuerpos naturales.
- Pueden verse resultados de falsos positivos debido a la unión de proteínas o productos de reacción del sustrato por mecanismos no inmunológicos. También pueden estar causados por la actividad de la pseudoperoxidasa (eritrocitos), actividad de la peroxidasa endógena (citocromo C) o biotina endógena (ejemplo: hígado, cerebro, mama, riñón) dependiendo del tipo de técnica de inmunotinción empleada.
- Como en cualquier prueba de inmunohistoquímica, un resultado negativo significa que el antígeno no se ha detectado, no que el antígeno esté ausente de las células o del tejido analizado.
- Los productos de anticuerpo prediluidos están optimizados como productos listos para usar. Debido a la posibilidad de variaciones en la fijación y procesamiento del tejido, puede ser necesario aumentar o reducir el tiempo de incubación del anticuerpo primario en muestras individuales.
- El anticuerpo, en combinación con sistemas de detección y sus accesorios, detecta los antígenos que sobreviven al proceso habitual de fijación con formol, procesamiento y corte del tejido. Los usuarios que se desvían de los procedimientos de prueba recomendados son responsables, como lo serían en cualquier caso, de la interpretación y validación de los resultados del paciente.

Sumario de Resultados Esperados

Consulte las siguientes tablas de reactividad:

Estudio Normal			
Tejido	N.º Teñido (+)	N.º Total	Notas
Cerebro	0	1	
Córtex adrenal	1	1	
Ovarios	1	1	
Páncreas	2	2	
Paratiroides	1	1	
Pituitaria	1	1	
Testículos	1	1	
Tiroides	0	1	
Pecho	2	2	
Bazo	1	1	
Amígdalas	2	2	
Timo	1	1	
Médula ósea	1	1	
Pulmones	2	2	
Corazón	1	1	
Esófago	1	1	Células basales
Estómago	1	1	
Intestino delgado	1	1	

Estudio Normal			
Tejido	N.º Teñido (+)	N.º Total	Notas
Colon	1	1	
Hígado	1	1	
Glándula salival	0	1	
Vesícula biliar	0	1	
Riñones	1	1	
Vejiga	1	1	
Próstata	2	2	
Útero	2	2	
Trompas de Falopio	1	1	
Uréter	0	1	
Cérvix	1	1	
Músculos del esqueleto	0	2	
Músculo liso	4	4	
Piel	1	1	
Nervios periféricos	0	1	
Mesotelio	1	1	
Grasa	0	1	
Placenta	1	1	

Este anticuerpo tiñe tejidos normales como está indicado en la literatura.

Estudio de la Enfermedad del Tejido			
Tejido	N.º Teñido (+)	N.º Total	Notas
Carcinoma ductal invasivo de mama	21	21	
Adenocarcinoma de colon	9	9	
Neoplasia intraepitelial cervical	2	2	
Carcinoma cervical	1	1	
Linfoma de Hodgkin	1	1	

Este anticuerpo tiñe tumores como está indicado en la literatura.

Resolución de Problemas

- Si el control positivo muestra una tinción más débil de la esperada, deben analizarse otros controles positivos realizados en la misma tinción para determinar si se debe al anticuerpo primario o a uno de los reactivos secundarios comunes.

- Si el control positivo da negativo, se deben analizar otros controles positivos usados en la misma ejecución para determinar si se debe al anticuerpo primario o a uno de los reactivos secundarios comunes. Los tejidos pueden haberse recogido, fijado o desparafinado de manera inadecuada. Deberá seguirse el procedimiento adecuado para la recogida, la conservación y la fijación.
- Si se produce una tinción de fondo excesiva, pueden haber niveles altos de biotina endógena. Se deberá incluir una etapa de bloqueo con biotina a no ser que se esté utilizando un sistema de detección sin biotina, en cuyo caso ninguna biotina presente sería un factor que contribuyera a la tinción de fondo.
- Si no se ha eliminado toda la parafina deberá repetirse el procedimiento de desparafinación.
- Si los cortes de tejido lavan el portaobjetos, deben comprobarse los mismos para garantizar que tienen carga positiva. Otras posibilidades que podrían afectar adversamente a la adhesión del tejido incluyen un secado insuficiente del corte de tejido en el portaobjetos antes de la tinción o fijación en formol que no fuera neutralizado con tampón apropiadamente. El grosor del tejido también puede ser un factor causante.

Para conocer la acción correctiva, consulte la sección de las instrucciones de uso o contacte con el servicio técnico de Cell Marque a través de techsupport@cellmarque.com.

Bibliografía

- McKeever P, et al. MIB-1 proliferation index predicts survival among patients with grade II astrocytoma. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1998; 57:931-6.
- Coons SW, et al. The prognostic significance of Ki-67 labeling indices for oligodendrogliomas. *Neurosurgery*. 1997; 41:878-84.
- Allegra CJ, et al. Prognostic value of thymidylate synthase, Ki-67, and p53 in patients with Dukes' B and C colon cancer: a National Cancer Institute-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project collaborative study. *J Clin Oncol*. 2003; 21:241-50.
- Pathmanathan N, et al. Ki-67 and proliferation in breast cancer. *J Clin Pathol*. 2013; 66:S12-6.
- Swerdlow SH, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th edition. 2008; p220.

Limitaciones de Responsabilidad

*TWEEN es una marca registrada de Croda International PLC.

©2017 Sigma-Aldrich Co. LLC. Todos los derechos reservados. SIGMA-ALDRICH es una marca comercial de Sigma-Aldrich Co. LLC, registrada en EE. UU. y en otros países. Cell Marque, Inlology, Declere y HiDef Detection son marcas comerciales de Sigma-Aldrich Co. LLC o de sus filiales.

 www.cellmarque.com

 6600 Sierra College Blvd. • Rocklin, CA 95677 USA • 916-746-8900

EC REP EMERGO EUROPE
Prinsessegracht 20, 2514 AP The Hague, The Netherlands



CM Template #2.4
Implementation date 15 Nov 2017



TOMO® Laminas de Adhesión para Microscopio

Referencias	Color	Angulo
TOM-11/90	Blanco	90°
TOM-11	Blanco	45°
TOM-12	Amarillo	45°
TOM-13	Rosado	45°
TOM-14	Azul	45°
TOM-15	Verde	45°



Los portaobjetos de adhesión hidrófila Matsunami TOMO® ofrecen una adhesión tisular superior, rendimiento de tinción y fluidez de la superficie del portaobjetos. El recubrimiento deslizante patentado garantiza un rendimiento constante incluso después de la exposición a estrés por calor y condiciones ambientales húmedas. Optimizado para su uso con impresoras térmicas.

Aplicación

Este producto profesional es un portaobjetos de vidrio recubierto para tinción con hematoxilina y eosina (HE) y tinción de inmunohistoquímica manual y automatizada de secciones de tejido fijadas con formalina e incluidas en parafina. Para otras aplicaciones, valide la conformidad del producto con los métodos de prueba y tinción respectivos que se utilizarán.

Componentes e información del producto

Los portaobjetos de microscopio Matsunami se fabrican en Japón utilizando vidrio ópticamente transparente, excepcionalmente plano y de baja fluorescencia, superficie de deslizamiento hidrofílica, tienen un acabado de 45° y 90°, esquinas recortadas, la dimensión mate del producto es de 20 mm., su peso es de 12 libras y las dimensiones de cada portaobjetos es de 75 mm x 25 mm x 1 mm.

Los portaobjetos se empacan 100 unidades por cada caja.

Instrucciones de manipulación para secciones de tejido fijadas con formalina e incluidas en parafina

- No manipule los portaobjetos de vidrio con las manos desnudas. No toque la superficie del vidrio y sostenga solo los bordes.
- Después de seccionar, consulte cualquiera de los dos métodos siguientes para adherir secciones de tejido. Para cualquier otro método de adhesión, valide la conformidad.
- Se puede sustituir el agua del grifo en el baño de flotación; pero valide primero (considere el agua destilada, el agua de intercambio iónico o el agua Milli-Q).
- Seque suficientemente y completamente después de adherir la sección de tejido (40 durante la noche o 60 durante 30 minutos o más) para evitar la delaminación.
- Utilice las muestras inmediatamente después de que se complete el secado.

Almacenamiento y manipulación

- Evite la temperatura y la humedad elevadas, así como la temperatura del cuarto de almacenamiento.
- Usa diapositivas en secuencia del lote anterior.
- En cualquier situación diferente de las condiciones de almacenamiento prescritas, verifique las condiciones en el uso.
- Abra el empaque del producto a la temperatura de la sala de laboratorio.
- Asegúrese de que haya señales claras de inestabilidad del producto.
- Siempre que se obtengan resultados inesperados o cuando un problema no pueda explicarse mediante un procedimiento de laboratorio o un reactivo, comuníquese con el servicio de asistencia técnica de Matsunami Glass Ind., Ltd.
- El producto debe eliminarse de procedimientos de manejo de desechos médicos inadecuados.

Método (1) Adherencia de la sección del baño de agua tibia

1. Corte una sección de tejido a 2-5 μm y flote en un baño de agua tibia (40°C a 45°C para parafina dura 50°C a 52°C considere la temperatura correcta).
2. Confirme que las arrugas se hayan suavizado para la sección de tejido flotando en el baño tibio y prepárese para colocar la sección de tejido en la posición prescrita del portaobjetos de vidrio.
Sostenga el portaobjetos en ángulo, contacte el extremo de la sección de tejido en el baño tibio con el extremo sumergido del portaobjetos y deslice la sección de tejido sobre el portaobjetos. Deténgase momentáneamente después de que el extremo o el centro de la sección de tejido haya aterrizado en el portaobjetos. Espere a que el agua entre el pañuelo y la superficie del portaobjetos se disipe y luego deslice la sección del tejido por completo sobre el portaobjetos para que se adhiera.
3. Coloque el portaobjetos con la sección de tejido adherida en ángulo y seque bien la superficie del portaobjetos. La sección de tejido del portaobjetos debe adherirse sin arrugas.

4. Seque completamente con una incubadora o secadora (40°C toda la noche o 60 °C por 30 minutos o más).

Método (2) Adherencia de la rodaja por flotación por agua utilizando una placa caliente

1. Corte una sección de tejido a 2-5 μm y flote en agua a temperatura ambiente (15°C a 30°C, considere la temperatura correcta).
2. Prepárese para colocar la sección de tejido flotada en agua en la posición prescrita del portaobjetos de vidrio. Sostenga el portaobjetos en ángulo, haga contacto entre el extremo de la sección de tejido en la superficie del agua con el extremo sumergido del portaobjetos y deslice la sección de tejido sobre el portaobjetos. Deténgase momentáneamente después de que el extremo o el centro de la sección de tejido haya aterrizado en el portaobjetos. Espere a que el agua entre el tejido y la superficie del portaobjetos se disipe y luego deslice la sección del tejido completamente sobre el portaobjetos para permitir la adherencia.
3. Caliente de antemano un plato caliente de 40°C a 48°C (considere la temperatura correcta). Coloque el portaobjetos en la placa caliente horizontalmente y manténgalo presionado hasta que se confirme que las arrugas de la sección de tejido se han suavizado por completo. Una vez que la sección de tejido esté fijada y seca en la superficie del portaobjetos de vidrio, coloque el vidrio en un ángulo y espere a que el agua de la superficie del portaobjetos se disipe. Coloque el portaobjetos con la sección de tejido adherida en ángulo y seque bien la superficie del portaobjetos. La sección de tejido del portaobjetos debe adherirse sin arrugas.
4. Seque completamente con una incubadora o secadora (40°C toda la noche o 60 °C por 30 minutos o más).

Vida útil

El límite de uso del producto almacenado a temperatura ambiente de 5°C a 30°C al 75% de HR o menos es de un año y medio (1,5) a partir de la fecha de fabricación. La fecha de fabricación está marcada a la izquierda del número de lote del producto ingresado con 5 dígitos, que representan la secuencia de año, mes y día.

Certificado ISO 13485. Marcado CE IVD.

MART-1 (Melan A) (A103) Mouse Monoclonal Antibody

Para Diagnóstico In Vitro (IVD)

Identificación del Producto

REF	Descripción
281M-84	0,1 ml concentrado
281M-85	0,5 ml concentrado
281M-86	1,0 ml concentrado
281M-87	1,0 ml prediluido listo para usar
281M-88	7,0 ml prediluido listo para usar

Definiciones de los Símbolos

KEY-CODE	código
P	prediluir
C	concentrado
A	ascitis
E	suero
S	sobrenadante
DIL	rango de dilución del concentrado

Uso Previsto

Este anticuerpo está destinado para uso diagnóstico *in vitro* (IVD).

El anticuerpo primario monoclonal de ratón MART-1 (Melan A) (A103) está diseñado para utilizarse en un laboratorio para detectar la proteína MART-1 en tejidos embebidos en parafina, fijados con formalina y teñidos en inmunohistoquímica cualitativa (IHC).

Los resultados obtenidos con el uso de este producto junto con la historia clínica relevante del paciente, otras pruebas diagnósticas y controles adecuados debe interpretarlos un patólogo cualificado.

Resumen y Explicación

MART-1 (también conocido como Melan A) es un antígeno de diferenciación del melanocito.^{1,2} MART-1 es una proteína transmembranaria presente en melanocitos de piel normal, retina, nevos y la mayoría de melanomas. MART-1 es un marcador muy útil para identificar melanomas metastásicos.³⁻¹¹

Principios y Procedimientos

El anticuerpo primario indicado puede utilizarse como anticuerpo primario para la tinción inmunohistoquímica de cortes de tejido fijado con formol y embebido en parafina. En general, la tinción inmunohistoquímica junto con el sistema de detección mediante unión con peroxidasa de rábano (HRP) o fosfatasa alcalina permite la visualización de antígenos a través de la aplicación secuencial de un anticuerpo específico (anticuerpo primario) al antígeno, un anticuerpo secundario (anticuerpo de unión) al anticuerpo primario, un complejo enzimático y un sustrato cromogénico con etapas de lavado intermedias. La activación enzimática del cromógeno da lugar a un producto de reacción visible en el sitio del antígeno. La muestra puede entonces contrateñirse y aplicarse un cubreportaobjetos. Los resultados se interpretan con un microscopio óptico.

Materiales y Métodos

Reactivos Suministrados

Composición del Producto	
Prediluir: diluido en	Amortiguador Tris, pH 7,3-7,7, con un 1% de BSA y <0,1% de azida de sodio
Concentrado: diluido en	Amortiguador Tris, pH 7,3-7,7, con un 1% de BSA y <0,1% de azida de sodio
Host	ratón
Isotipo	IgG ₁
Intervalo de dilución de trabajo recomendado	1:100-1:500
Fuente	sobrenadante

Vea la etiqueta del producto para información específica sobre el lote acerca de lo siguiente:

1. Concentración de anticuerpos de inmunoglobulina
2. Detalles de la fuente

Reconstitución, Mezcla, Dilución y Titulación

El anticuerpo prediluido está listo para usar y optimizado para la tinción. El anticuerpo concentrado está optimizado para diluirlo en el rango de dilución con Cell Marque Diamond: Antibody Diluent.

Materiales y Reactivos Necesarios No Suministrados

Los siguientes reactivos y materiales pueden ser necesarios para la tinción, pero no se incluyen con el anticuerpo primario:

1. Tejido de control positivo y negativo
2. Portaobjetos para microscopio con carga positiva
3. Horno de secado capaz de mantener una temperatura de 53-65 °C

4. Cubetas o baños de tinción
5. Cronómetro
6. Xileno o sustituto de xileno
7. Alcohol reactivo o etanol

Nota: El tratamiento previo de un paso de Cell Marque, Trilogy™ (N.º de catálogo 920P-06), puede sustituir los elementos de los puntos 6 y 7 anteriores.

8. Agua desionizada o destilada
9. Equipo de calentamiento, como la olla de presión eléctrica para el paso del tratamiento previo del tejido
10. Sistema de detección como HiDef Detection™ HRP Polymer System (N.º de catálogo 954D-20) o HiDef Detection™ Alk Phos Polymer System (N.º de catálogo 962D-20)
11. Cromógeno, como DAB Substrate Kit (N.º de catálogo 957D-20) o Permanent Red Chromogen Kit (N.º de catálogo 960D-10)
12. TBS IHC Wash Buffer + Tween** 20 (N.º de catálogo 935B-09)
13. Hematoxylin u otra contratinción
14. Diluyentes de anticuerpo, como Diamond: Antibody Diluent (N.º de catálogo 938B-05) o Emerald: Antibody Diluent (N.º de catálogo 936B-08)
15. Peroxide Block (N.º de catálogo 925B-05) para usar con HRP
16. Avidin-Biotin Blocking Reagents para usar con detección con estreptavidina-biotina
17. Negative Control Reagent (N.º de catálogo 939B-02 para universal)
18. Mounting Medium
19. Cubreobjetos
20. Microscopio óptico (40-400x)

Conservación y Manipulación

Almacenar a 2-8 °C. No congelar.

Para garantizar la dispensación adecuada del reactivo y la estabilidad del anticuerpo, tras cada utilización se debe volver a poner el tapón y almacenar el frasco inmediatamente en la nevera, en posición vertical.

Todos los reactivos de anticuerpo tienen una fecha de caducidad. El reactivo es estable hasta la fecha indicada en la etiqueta siempre que se almacene correctamente. No usar el reactivo después de la fecha de caducidad para el método de almacenamiento descrito.

No hay signos definitivos que indiquen la inestabilidad de este producto, por lo que los controles positivos y negativos deben analizarse simultáneamente con muestras desconocidas. Contacte con el servicio técnico de Cell Marque si tiene sospechas sobre la inestabilidad del reactivo.

Extracción y Preparación de la Muestra para su Análisis

Cuando se utiliza el procedimiento habitual, los tejidos fijados en formol en tampón neutro y embebidos en parafina resultan adecuados para el uso con este anticuerpo primario cuando se utiliza con los kits de detección de Cell Marque (consulte la sección Materiales y reactivos necesarios no suministrados). Nota: Cell Marque evalúa el resultado solo en tejidos humanos. El fijador de tejido recomendado es formalina tamponada neutral 10%. Pueden tener lugar resultados variables como consecuencia de una fijación prolongada o procesos especiales tales como la descalcificación en la preparación de la médula ósea.

Cada sección debe cortarse con el grosor apropiado (aproximadamente 3 µm) y colocarse en un portaobjetos de vidrio con carga positiva. Los portaobjetos que contienen el corte de

tejido pueden secarse durante al menos 2 horas (pero no más de 24 horas) en un horno a una temperatura de 53-65 °C.

Advertencias y Precauciones

1. Adopte las precauciones adecuadas cuando se manipulen los reactivos. Usar guantes y batas de laboratorio desechables cuando se manipulen materiales potencialmente carcinógenos o tóxicos (como xileno).
2. Evite el contacto de los reactivos con los ojos y las membranas mucosas. Si se produce el contacto con áreas sensibles, lávese con agua abundante.
3. Las muestras del paciente y todos los materiales en contacto con ellas deben tratarse como si fuesen materiales potencialmente infecciosos y desecharse con las precauciones adecuadas. Nunca pipetear con la boca.
4. Evitar la contaminación microbiana de los reactivos, ya que podrían producirse resultados incorrectos.
5. El usuario debe validar los tiempos y temperaturas de incubación.
6. Los reactivos prediluidos listos para usar están diluidos óptimamente por lo que una dilución adicional podría producir la pérdida de tinción del antígeno.
7. Los reactivos concentrados pueden diluirse óptimamente en base a la determinación del usuario. El usuario deberá validar igualmente tanto la compatibilidad como el efecto en la estabilidad de cualquier disolvente utilizado que no esté recomendado específicamente en este documento.
8. Este producto no se clasifica como sustancia peligrosa cuando se usa según las instrucciones. El conservante del reactivo es inferior al 0,1% de ácido fólico y no cumple los criterios de la OSHA para sustancias peligrosas a la concentración indicada. Consulte la hoja de datos de seguridad de los materiales.
9. El usuario debe validar cualquier condición de almacenamiento que no sea una de las especificadas en el prospecto.
10. El disolvente puede incluir albúmina de suero bovino y el sobrenadante puede contener suero bovino. Los productos que contienen suero fetal bovino y los productos que contienen albúmina de suero bovino se compran a los proveedores comerciales. Los certificados de origen de la fuente animal utilizada en estos productos obran en el archivo de Cell Marque. Los certificados aseguran que las fuentes bovinas provienen de países con riesgo mínimo de BSE y relacionan como fuentes de bovinos EE. UU. y Canadá.
11. Como con cualquier producto proveniente de fuentes biológicas, deberán emplearse procedimientos de manipulación apropiados.

Instrucciones de Uso

Protocolos de tinción recomendados para el anticuerpo primario indicado:

HiDef HRP:

HiDef Detection™ HRP Polymer System (N.º de catálogo 954D-20)

1. Técnica de recuperación del epítipo: HIER, Reactivo para la recuperación del epítipo: Trilogy
2. Tiempo de incubación de anticuerpo (minutos): 10-30
3. Tiempo de incubación de HiDef Detection Amplifier (minutos): 10
4. Tiempo de incubación de HiDef Detection Polymer Detector (minutos): 10
5. Tiempo de incubación de DAB (minutos): 1-10

6. Deshidrate y cubra el portaobjetos.

HiDef Alk Phos:

HiDef Detection™ Alk Phos Polymer System (N.º de catálogo 962D-20)

1. Técnica de recuperación del epítipo: HIER, Reactivo para la recuperación del epítipo: Trilogy
2. Tiempo de incubación de anticuerpo (minutos): 10-30
3. Tiempo de incubación de HiDef Detection Amplifier (minutos): 10
4. Tiempo de incubación de HiDef Detection Polymer Detector (minutos): 10
5. Tiempo de incubación de Permanent Red (minutos): 15-30
6. Deshidrate y cubra el portaobjetos.

Procedimientos de Control de Calidad

Control de Tejido Positivo

Cada vez que se realice el procedimiento de tinción, debe procesarse un control positivo del tejido. Este tejido puede contener células o componentes del tejido de tinción positiva y negativa y servir como tejido de control positivo y negativo. Los tejidos de control deben ser muestras frescas de autopsia, biopsia o cirugía preparadas o fijadas con la mayor brevedad con un proceso idéntico al de los cortes en estudio. El uso de un corte de tejido fijado o procesado de forma diferente a la muestra en estudio servirá para el control de todos los reactivos y pasos del método excepto la fijación y el procesamiento del tejido.

Un tejido con una tinción positiva débil es más adecuado para un control de calidad óptimo y para detectar niveles pequeños de degradación del reactivo. El control de tejido positivo para el anticuerpo primario indicado puede incluir lo siguiente:

Control de Tejido Positivo	
Tejido	Visualización
Melanoma	Citoplasmática
Piel	Citoplasmática

Los controles de tejido positivos conocidos solo se deben usar para monitorizar el comportamiento correcto de los tejidos procesados y los reactivos de la prueba, y no como ayuda para establecer un diagnóstico específico de las muestras del paciente. Si los controles positivos del tejido no muestran una tinción positiva apropiada, los resultados de las muestras en estudio se deben considerar no válidos.

Control de Tejido Negativo

El mismo tejido utilizado para el control de tejido positivo se puede utilizar en el control de tejido negativo. La variedad de tipos de células presentes en la mayoría de los cortes de tejidos ofrece sitios de control negativo internos, pero esto debe verificarlo el usuario. Los componentes que no se tiñen deben demostrar la ausencia de tinción específica y proporcionar una indicación de tinción de fondo no específica. Si se produce una tinción específica en los sitios de control de tejido negativo, los resultados obtenidos con las muestras del paciente deben considerarse no válidos.

Discrepancias Inexplicables

Las discrepancias inexplicables de los controles deben remitirse de inmediato al servicio técnico de Cell Marque. Si los resultados del control de calidad no cumplen las especificaciones, los resultados del paciente no son válidos. Véase la sección Resolución de problemas de este prospecto. Identifique y corrija el problema; a continuación, repita todo el procedimiento con las muestras del paciente.

Reactivo de Control Negativo

Se debe utilizar un reactivo de control negativo para cada muestra para ayudar a interpretar los resultados. Para evaluar una tinción no específica se utiliza un reactivo de control negativo en lugar del anticuerpo primario. Se deberá tratar el portaobjetos con el reactivo de control negativo haciendo coincidir las especies huéspedes del anticuerpo primario e idéneamente con la misma concentración de IgG. El periodo de incubación para el reactivo de control negativo deberá ser igual que el periodo de incubación del anticuerpo primario.

Interpretación de los Resultados

El procedimiento de inmunotinción causa la precipitación de un producto de reacción coloreado en los sitios del antígeno localizados por el anticuerpo primario. Consulte en el prospecto correspondiente del sistema de detección las reacciones de color esperadas. Un patólogo cualificado experimentado en procedimientos de inmunohistoquímica debe evaluar los controles de tejido positivos y negativos antes de interpretar los resultados.

Control de Tejido Positivo

El control de tejido positivo teñido debe examinarse primero para determinar que todos los reactivos funcionan adecuadamente. La presencia de un producto de reacción con el color adecuado dentro de las células diana es indicativa de una reactividad positiva. Consulte en el prospecto del sistema de detección utilizado las reacciones de color esperadas. Según sea la duración de la incubación y la potencia de la hematoxilina empleada, la contratinción dará como resultado una coloración azul de pálida a oscura de los núcleos celulares. Una contratinción excesiva o incompleta puede comprometer la interpretación adecuada de los resultados. Si los controles de tejidos positivos no muestran una tinción positiva apropiada, los resultados de las muestras en estudio se deben considerar no válidos.

Control de Tejido Negativo

El control de tejido negativo debe examinarse después del control de tejido positivo para verificar la marcación específica del antígeno diana por el anticuerpo primario. La ausencia de tinción específica en el control de tejido negativo confirma la ausencia de reactividad cruzada del anticuerpo con las células o los componentes celulares. Si se produce una tinción específica en el control de tejido negativo, los resultados obtenidos con la muestra del paciente se consideran no válidos. La tinción no específica, si la hay, tendrá un aspecto difuso. También se puede observar una ligera tinción específica esporádica del tejido conjuntivo en cortes de tejidos que no estén fijados óptimamente. Para la interpretación de los resultados de la tinción deben usarse células intactas. Las células necróticas o degeneradas muestran una tinción no específica.

Tejido del Paciente

Las muestras del paciente se deben examinar al final. La intensidad de la tinción positiva se debe valorar en el contexto de cualquier tinción de fondo del control de reactivo negativo. Como en cualquier prueba de inmunohistoquímica, un resultado negativo significa que el antígeno en cuestión no se ha detectado, no que el antígeno esté ausente de las células o del tejido analizado. Un panel de anticuerpos puede ayudar a identificar reacciones negativas falsas (consulte la sección Sumario de resultados esperados). La morfología de cada muestra

del tejido también debe examinarse utilizando un corte con tinción de hematoxilina y eosina al interpretar cualquier resultado de inmunohistoquímica. Un patólogo cualificado debe interpretar los resultados morfológicos del paciente y sus datos clínicos pertinentes.

Limitaciones

1. El color del anticuerpo no afecta lo funcionamiento.
2. Este reactivo es "de exclusivo uso profesional", ya que la inmunohistoquímica es un proceso diagnóstico de varias etapas que requiere una formación especializada en la selección de los reactivos, tejidos, fijación y procesamiento apropiados; la preparación del portaobjetos de inmunohistoquímica y la interpretación de los resultados de la tinción.
3. Para uso exclusivo de laboratorio.
4. Para diagnóstico *in vitro*.
5. La tinción de los tejidos depende de la manipulación y el procesamiento de los mismos antes de la tinción. Una fijación, congelación, descongelación, lavado, secado, calentado o corte inadecuados o la contaminación con otros tejidos o líquidos puede producir artefactos, bloqueo del anticuerpo o resultados falsos negativos. Los resultados inconsistentes pueden ser consecuencia de las variaciones en los métodos de fijación y embebido, así como de irregularidades inherentes dentro del tejido.
6. Una contratinción excesiva o incompleta puede comprometer la interpretación adecuada de los resultados.
7. La interpretación clínica de una tinción positiva o de su ausencia debe evaluarse en el contexto de la historia clínica, la morfología, otros criterios histopatológicos, así como otras pruebas diagnósticas. Este anticuerpo está diseñado para utilizarlo en un panel de anticuerpos si fuera pertinente. Es responsabilidad de un patólogo cualificado familiarizarse con los anticuerpos, reactivos, paneles de diagnóstico y métodos usados para obtener una preparación con tinción. La tinción se debe realizar en un laboratorio certificado con la supervisión de un anatomopatólogo responsable de la revisión de los portaobjetos teñidos y de la verificación de la idoneidad de los controles negativos y positivos.
8. Cell Marque provee anticuerpos y reactivos en una dilución óptima para usar como se indica. Cualquier desviación de los procedimientos recomendados del método puede invalidar los resultados esperados. Se deben utilizar y documentar los controles apropiados. Los usuarios deben asumir en cualquier caso la responsabilidad de la interpretación de los resultados del paciente.
9. Cell Marque provee los anticuerpos primarios en formato concentrado de manera que el usuario pueda diluirlos después óptimamente para usarlos según determine y observando las técnicas de validación adecuadas. Los usuarios deben validar el uso de cualquier disolvente que no se recomiende en este documento. Una vez que el anticuerpo primario haya sido validado como adecuado para usar, cualquier desviación de los procedimientos de prueba recomendados puede invalidar los resultados esperados. Se deben utilizar y documentar los controles apropiados. Los usuarios deben asumir en cualquier caso la responsabilidad de la interpretación de los resultados del paciente.
10. Este producto no está diseñado para utilizarlo en citometría de flujo.
11. Los reactivos pueden mostrar reacciones inesperadas en tejidos no estudiados previamente. No puede excluirse completamente la posibilidad de reacciones inesperadas, incluso en grupos de tejidos analizados, debido a la variabilidad biológica de la expresión del antígeno en neoplasmas u otros tejidos patológicos. Póngase en contacto con el servicio técnico de Cell Marque si sospecha que ha habido una reacción inesperada documentada.
12. Los tejidos de personas infectadas con el virus de la hepatitis B y que contengan antígeno de superficie (HBsAg) pueden mostrar una tinción no específica con peroxidasa de rábano.
13. Cuando se utilizan en pasos de bloqueo, los sueros normales procedentes del mismo origen animal que los antisueros secundarios pueden provocar resultados de falsos negativos o falsos positivos debido al efecto de los autoanticuerpos o anticuerpos naturales.
14. Pueden verse resultados de falsos positivos debido a la unión de proteínas o productos de reacción del sustrato por mecanismos no inmunológicos. También pueden estar causados por la actividad de la pseudoperoxidasa (eritrocitos), actividad de la peroxidasa endógena (citocromo C) o biotina endógena (ejemplo: hígado, cerebro, mama, riñón) dependiendo del tipo de técnica de inmunotinción empleada.
15. Como en cualquier prueba de inmunohistoquímica, un resultado negativo significa que el antígeno no se ha detectado, no que el antígeno esté ausente de las células o del tejido analizado.
16. Los productos de anticuerpo prediluidos están optimizados como productos listos para usar. Debido a la posibilidad de variaciones en la fijación y procesamiento del tejido, puede ser necesario aumentar o reducir el tiempo de incubación del anticuerpo primario en muestras individuales.
17. El anticuerpo, en combinación con sistemas de detección y sus accesorios, detecta los antígenos que sobreviven al proceso habitual de fijación con formol, procesamiento y corte del tejido. Los usuarios que se desvían de los procedimientos de prueba recomendados son responsables, como lo serían en cualquier caso, de la interpretación y validación de los resultados del paciente.

Sumario de Resultados Esperados

Consulte las siguientes tablas de reactividad:

Estudio Normal			
Tejido	N.º Teñido (+)	N.º Total	Notas
Cerebro	0	1	
Córtex adrenal	1	1	
Ovarios	0	1	
Páncreas	0	1	
Paratiroides	0	1	
Pituitaria	0	1	
Testículos	0	1	
Tiroides	0	1	
Pecho	0	2	
Bazo	0	1	
Amígdalas	0	1	
Timo	0	1	
Médula ósea	0	1	
Pulmones	0	2	
Corazón	0	1	
Esófago	0	1	

Estudio Normal			
Tejido	N.º Teñido (+)	N.º Total	Notas
Estómago	0	1	
Intestino delgado	0	1	
Colon	0	1	
Hígado	0	1	
Glándula salival	0	1	
Vesícula biliar	0	1	
Riñones	0	1	
Vejiga	0	1	
Próstata	0	2	
Útero	0	1	
Trompas de Falopio	0	1	
Uréter	0	1	
Cérvix	0	1	
Músculos del esqueleto	0	1	
Músculo liso	0	1	
Piel	2	2	Melanocitos +
Nervios periféricos	0	1	
Mesotelio	0	1	
Grasa	0	1	
Placenta	0	1	

Este producto anticuerpo marca el melanoma, los melanocitos de la piel y la corteza suprarrenal. Esto está conforme con lo descrito en la literatura.

Estudio de la Enfermedad del Tejido			
Tejido	N.º Teñido (+)	N.º Total	Notas
Melanoma	10	10	
Carcinoma ductal invasivo de mama	0	24	
Adenocarcinoma de colon	0	17	

Este anticuerpo tiñe tumores como está indicado en la literatura.

Resolución de Problemas

- Si el control positivo muestra una tinción más débil de la esperada, deben analizarse otros controles positivos realizados en la misma tinción para determinar si se debe al anticuerpo primario o a uno de los reactivos secundarios comunes.

- Si el control positivo da negativo, se deben analizar otros controles positivos usados en la misma ejecución para determinar si se debe al anticuerpo primario o a uno de los reactivos secundarios comunes. Los tejidos pueden haberse recogido, fijado o desparafinado de manera inadecuada. Deberá seguirse el procedimiento adecuado para la recogida, la conservación y la fijación.
- Si se produce una tinción de fondo excesiva, pueden haber niveles altos de biotina endógena. Se deberá incluir una etapa de bloqueo con biotina a no ser que se esté utilizando un sistema de detección sin biotina, en cuyo caso ninguna biotina presente sería un factor que contribuyera a la tinción de fondo.
- Si no se ha eliminado toda la parafina deberá repetirse el procedimiento de desparafinación.
- Si los cortes de tejido lavan el portaobjetos, deben comprobarse los mismos para garantizar que tienen carga positiva. Otras posibilidades que podrían afectar adversamente a la adhesión del tejido incluyen un secado insuficiente del corte de tejido en el portaobjetos antes de la tinción o fijación en formol que no fuera neutralizado con tampón apropiadamente. El grosor del tejido también puede ser un factor causante.

Para conocer la acción correctiva, consulte la sección de las instrucciones de uso o contacte con el servicio técnico de Cell Marque a través de techsupport@cellmarque.com.

Bibliografía

- Kawakami Y, et al. Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 1994; 91: 3515-19.
- Couli PG, et al. A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med*. 1994; 180: 35-42.
- Kageshita T, et al. Differential expression of MART-1 in primary and metastatic melanoma lesions. *J Immunother*. 1997; 20:460-5.
- Fetsch PA, et al. Melanoma-associated antigen recognized by T cells (MART-1): the advent of a preferred immunocytochemical antibody for the diagnosis of metastatic malignant melanoma with fine-needle aspiration. *Cancer*. 1999; 87:37-42.
- Bergman R, et al. A comparative immunohistochemical study of MART-1 expression in Spitz nevi, ordinary melanocytic nevi, and malignant melanomas. *J Am Acad Dermatol*. 2000; 42:496-500.
- Orosz Z. Melan-A/Mart-1 expression in various melanocytic lesions and in non-melanocytic soft tissue tumours. *Histopathology*. 1999; 34:17-25.
- Yaziji H, et al. Immunohistochemical markers of melanocytic tumors. *Int J Surg Pathol*. 2003; 11:11-5.
- Suchak R et al. Evaluation of the role of routine melan-A immunohistochemistry for exclusion of microinvasion in 120 cases of lentigo maligna. *Am J Dermatopathol*. 2014; 36:387-91.
- Helm K et al. Immunohistochemistry of pigmented actinic keratoses, actinic keratoses, melanomas in situ and solar lentigines with Melan-A. *J Cutan Pathol*. 2008; 35:931-4.
- Kucher C et al. Expression of Melan-A and Ki-67 in desmoplastic melanoma and desmoplastic nevus. *Am J Dermatopathol*. 2004; 26:452-7.
- Nielsen PS, et al. Immunohistochemical double stains against Ki67/MART1 and HMB45/MITF: promising diagnostic tools in melanocytic lesions. *Am J Dermatopathol*. 2011; 33:361-70.

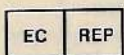
Limitaciones de Responsabilidad

*TWEEN es una marca registrada de Croda International PLC.

©2018 Sigma-Aldrich Co. LLC. Todos los derechos reservados. SIGMA-ALDRICH es una marca comercial de Sigma-Aldrich Co. LLC, registrada en EE. UU. y en otros países. Cell Marque, Trilogy, Declere y HiDef Detection son marcas comerciales de Sigma-Aldrich Co. LLC o de sus filiales.

 www.cellmarque.com

 6600 Sierra College Blvd. • Rocklin, CA 95677 USA • 916-746-8900

 EMERGO EUROPE
Prinsessegracht 20, 2514 AP The Hague, The Netherlands



CM Template #2.4

Implementation date 18 Sep 2018

MUM1 (MRQ-43) Rabbit Monoclonal Antibody

Para Diagnóstico In Vitro (IVD)

Identificación del Producto

REF	Descripción
358R-74	0,1 ml concentrado
358R-75	0,5 ml concentrado
358R-76	1,0 ml concentrado
358R-77	1,0 ml prediluido listo para usar
358R-78	7,0 ml prediluido listo para usar

Definiciones de los Símbolos

KEY-CODE	código
P	prediluir
C	concentrado
A	ascitis
E	suero
S	sobrenadante
DIL	rango de dilución del concentrado

Uso Previsto

Este anticuerpo está destinado para uso diagnóstico *in vitro* (IVD).

El anticuerpo primario monoclonal de conejo MUM1 (MRQ-43) está diseñado para utilizarse en un laboratorio para detectar la proteína MUM1 en tejidos embebidos en parafina, fijados con formalina y teñidos en pruebas de inmunohistoquímica (IHC) cualitativa.

Los resultados obtenidos con el uso de este producto junto con la historia clínica relevante del paciente, otras pruebas diagnósticas y controles adecuados debe interpretarlos un patólogo cualificado.

Resumen y Explicación

El anticuerpo anti-MUM1 marca una proteína 50 kDa, oncogén-1 del mieloma múltiple (MUM1). MUM1 es codificado por el gen MUM1/IRF-4, que es cartografiado para 6p23-p25 e identificado como un oncogén asociado a mieloma.^{1,2} Es miembro de la familia de factores reguladores del interferón de los factores de transcripción y desempeña un papel importante en la regulación de la manifestación genética en respuesta a la señalización por el interferón y otras citocinas. Las células positivas de MUM1 manifiestan la proteína en el núcleo en un

patrón difuso y microgranular. Sin embargo, también se observa una cierta positividad en el citoplasma de células con manifestación de MUM1. En tejidos linfáticos normales/reactivos, como el ganglio linfático, este anticuerpo tiñe las células plasmáticas, algunas células B en la zona clara de los centros germinales y un subconjunto de linfocitos T (linfocitos T en los centros germinales y áreas interfoliculares).^{1,2} La manifestación de MUM1 se ha descrito en el linfoma difuso de células B grandes (DLBCL).⁴ El anticuerpo anti-MUM1 puede teñir otros linfomas de células B como el linfoma linfoplasmático, la leucemia linfocítica crónica, el linfoma folicular, el linfoma de zona marginal, la leucemia/linfoma linfoblástico, el linfoma de efusión primaria, el DLBCL, el linfoma tipo Burkitt y el linfoma de Hodgkin clásico.³⁻⁵ Sin embargo, las células tumorales en el linfoma de Hodgkin predominante nodular de linfocitos son negativas o solo débilmente positivas.⁶ MUM1 también se expresa en el mieloma de células plasmáticas.⁷

Principios y Procedimientos

El anticuerpo primario indicado puede utilizarse como anticuerpo primario para la tinción inmunohistoquímica de cortes de tejido fijado con formol y embebido en parafina. En general, la tinción inmunohistoquímica junto con el sistema de detección mediante unión con peroxidasa de rábano (HRP) o fosfatasa alcalina permite la visualización de antígenos a través de la aplicación secuencial de un anticuerpo específico (anticuerpo primario) al antígeno, un anticuerpo secundario (anticuerpo de unión) al anticuerpo primario, un complejo enzimático y un sustrato cromogénico con etapas de lavado intermedias. La activación enzimática del cromógeno da lugar a un producto de reacción visible en el sitio del antígeno. La muestra puede entonces contrateñirse y aplicarse un cubreportaobjetos. Los resultados se interpretan con un microscopio óptico.

Materiales y Métodos

Reactivos Suministrados

Composición del Producto	
Prediluir: diluido en	Amortiguador Tris, pH 7,3-7,7, con un 1% de BSA y <0,1% de azida de sodio
Concentrado: diluido en	Amortiguador Tris, pH 7,3-7,7, con un 1% de BSA y <0,1% de azida de sodio
Host	conejo
Isotipo	IgG
Intervalo de dilución de trabajo recomendado	1:100-1:500
Fuente	sobrenadante

Vea la etiqueta del producto para información específica sobre el lote acerca de lo siguiente:

1. Concentración de anticuerpos de inmunoglobulina
2. Detalles de la fuente

Reconstitución, Mezcla, Dilución y Titulación

El anticuerpo prediluido está listo para usar y optimizado para la tinción. El anticuerpo concentrado está optimizado para diluirlo en el rango de dilución con Cell Marque Diamond Antibody Diluent.

Materiales y Reactivos Necesarios No Suministrados

Los siguientes reactivos y materiales pueden ser necesarios para la tinción, pero no se incluyen con el anticuerpo primario:

1. Tejido de control positivo y negativo
2. Portaobjetos para microscopio con carga positiva
3. Horno de secado capaz de mantener una temperatura de 53-65 °C
4. Cubetas o baños de tinción
5. Cronómetro
6. Xileno o sustituto de xileno
7. Alcohol reactivo o etanol

Nota: El tratamiento previo de un paso de Cell Marque, Trifogy™ (N.º de catálogo 920P-06), puede sustituir los elementos de los puntos 6 y 7 anteriores.

8. Agua desionizada o destilada
9. Equipo de calentamiento, como la olla de presión eléctrica para el paso del tratamiento previo del tejido
10. Sistema de detección como HiDef Detection™ HRP Polymer System (N.º de catálogo 954D-20) o HiDef Detection™ Alk Phos Polymer System (N.º de catálogo 962D-20)
11. Cromógeno, como DAB Substrate Kit (N.º de catálogo 957D-20) o Permanent Red Chromogen Kit (N.º de catálogo 960D-10)
12. TBS IHC Wash Buffer + Tween™ 20 (N.º de catálogo 935B-09)
13. Hematoxylin u otra contratinción
14. Diluyentes de anticuerpo, como Diamond Antibody Diluent (N.º de catálogo 938B-05) o Emerald Antibody Diluent (N.º de catálogo 936B-08)
15. Peroxide Block (N.º de catálogo 925B-05) para usar con HRP
16. Avidin-Biotin Blocking Reagents para usar con detección con estreptavidina-biotina
17. Negative Control Reagent (N.º de catálogo 939B-02 para universal)
18. Mounting Medium
19. Cubreobjetos
20. Microscopio óptico (40-400x)

Conservación y Manipulación

Almacenar a 2-8 °C. No congelar.

Para garantizar la dispensación adecuada del reactivo y la estabilidad del anticuerpo, tras cada utilización se debe volver a poner el tapón y almacenar el frasco inmediatamente en la nevera, en posición vertical.

Todos los reactivos de anticuerpo tienen una fecha de caducidad. El reactivo es estable hasta la fecha indicada en la etiqueta siempre que se almacene correctamente. No usar el reactivo después de la fecha de caducidad para el método de almacenamiento descrito.

No hay signos definitivos que indiquen la inestabilidad de este producto, por lo que los controles positivos y negativos deben analizarse simultáneamente con muestras

desconocidas. Contacte con el servicio técnico de Cell Marque si tiene sospechas sobre la inestabilidad del reactivo.

Extracción y Preparación de la Muestra para su Análisis

Cuando se utiliza el procedimiento habitual, los tejidos fijados en formol en tampón neutro y embebidos en parafina resultan adecuados para el uso con este anticuerpo primario cuando se utiliza con los kits de detección de Cell Marque (consulte la sección Materiales y reactivos necesarios no suministrados). Nota: Cell Marque evalúa el resultado solo en tejidos humanos. El fijador de tejido recomendado es formalina tamponada neutral 10%. Pueden tener lugar resultados variables como consecuencia de una fijación prolongada o procesos especiales tales como la descalcificación en la preparación de la médula ósea.

Cada sección debe cortarse con el grosor apropiado (aproximadamente 3 µm) y colocarse en un portaobjetos de vidrio con carga positiva. Los portaobjetos que contienen el corte de tejido pueden secarse durante al menos 2 horas (pero no más de 24 horas) en un horno a una temperatura de 53-65 °C.

Advertencias y Precauciones

1. Adopte las precauciones adecuadas cuando se manipulen los reactivos. Usar guantes y batas de laboratorio desechables cuando se manipulen materiales potencialmente carcinógenos o tóxicos (como xileno).
2. Evite el contacto de los reactivos con los ojos y las membranas mucosas. Si se produce el contacto con áreas sensibles, lávese con agua abundante.
3. Las muestras del paciente y todos los materiales en contacto con ellas deben tratarse como si fuesen materiales potencialmente infecciosos y desecharse con las precauciones adecuadas. Nunca pipetear con la boca.
4. Evitar la contaminación microbiana de los reactivos, ya que podrían producirse resultados incorrectos.
5. El usuario debe validar los tiempos y temperaturas de incubación.
6. Los reactivos prediluidos listos para usar están diluidos óptimamente por lo que una dilución adicional podría producir la pérdida de tinción del antígeno.
7. Los reactivos concentrados pueden diluirse óptimamente en base a la determinación del usuario. El usuario deberá validar igualmente tanto la compatibilidad como el efecto en la estabilidad de cualquier disolvente utilizado que no esté recomendado específicamente en este documento.
8. Este producto no se clasifica como sustancia peligrosa cuando se usa según las instrucciones. El conservante del reactivo es inferior al 0,1% de ácido sódico y no cumple los criterios de la OSHA para sustancias peligrosas a la concentración indicada. Consulte la hoja de datos de seguridad de los materiales.
9. El usuario debe validar cualquier condición de almacenamiento que no sea una de las especificadas en el prospecto.
10. El disolvente puede incluir albúmina de suero bovino y el sobrenadante puede contener suero bovino. Los productos que contienen suero fetal bovino y los productos que contienen albúmina de suero bovino se compran a los proveedores comerciales. Los certificados de origen de la fuente animal utilizada en estos productos obran en el archivo de Cell Marque. Los certificados aseguran que las fuentes bovinas provienen de países con riesgo mínimo de BSE y relacionan como fuentes de bovinos EE. UU. y Canadá.
11. Como con cualquier producto proveniente de fuentes biológicas, deberán emplearse procedimientos de manipulación apropiados.