

FLEX
Monoclonal Mouse
Anti-Human
Epithelial Antigen
 Clone Ber-EP4
Ready-to-Use
 (Dako Omnis)
Code GA637

ENGLISH

Intended use

For in vitro diagnostic use.

FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Epithelial Antigen, Clone Ber-EP4, Ready-to-Use (Dako Omnis), is intended for use in immunohistochemistry (IHC) together with the Dako Omnis instrument. This antibody labels most epithelial cells and is a useful aid in the classification of adenocarcinoma (1). The antibody may also aid in the classification of esophageal carcinoma (2) and basal and squamous cell carcinoma of the skin (3). Differential classification is aided by the results from a panel of antibodies. The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist. This antibody is intended to be used after the primary diagnosis of tumor has been made by conventional histopathology using nonimmunologic histochemical stains.

Synonyms for antigen

Ep-CAM

Summary and explanation

Epithelial antigen is a transmembrane glycoprotein functioning as a cellular adhesion molecule. This epithelium-specific antigen is broadly distributed in epithelial cells, and displays a highly conserved expression in carcinomas (4, 5). As exceptions to the general expression in normal epithelia, adult hepatocytes, in contrast to fetal hepatocytes, parietal cells in gastric glands, and apical cells in squamous epithelia are negative. Epithelial antigen may rarely be present in mesotheliomas (1, 4). It has been reported that epithelial antigen may play an important role as tumor-cell marker in lymph nodes from patients with esophageal carcinoma otherwise classified as node-negative (2).

Refer to *Dako General Instructions for Immunohistochemical Staining* or the detection system instructions of IHC procedures for: Principle of Procedure; Materials Required, Not Supplied; Storage; Specimen Preparation; Staining Procedure; Quality Control; Troubleshooting; Interpretation of Staining; General Limitations.

Reagent provided

Ready-to-use monoclonal mouse antibody provided in liquid form in a buffer containing stabilizing protein and 0.015 mol/L sodium azide.

Clone: Ber-EP4 (4). Isotype: IgG1, kappa.

Immunogen

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

Specificity

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

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

Of 37 cell lines tested, the antibody homogeneously labels all (10/10) carcinoma cell lines, whereas all non-epithelial cell lines (26/27) are not labeled except for the erythromyeloid cell line K562 (4).

Precautions

1. For in vitro diagnostic use.
2. For professional users.
3. This product contains sodium azide (NaN₃), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing.
4. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.
5. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.
6. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.

Storage

Store at 2-8 °C. During storage the cap should be closed. Do not use after expiration date stamped on vial. Onboard stability is 40 hours. Onboard time is tracked by the Dako Omnis software. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user. There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the antibody is suspected, contact Dako Technical Support.

Staining protocol overview*

Step		Comments
Fixation/embedding	Formalin-fixed, paraffin-embedded	Onboard deparaffinization
Pre-treatment	EnVision FLEX, Low pH (Code GV805)	30 min HIER
Antibody	Ready-to-use	20 min incubation
Negative Control	FLEX Negative Control, Mouse (Code GA750)	20 min incubation
Visualization	EnVision FLEX (Code GV800) + EnVision FLEX+ Mouse LINKER (Code GV821)	Block: 3 min; Link: 10 min; Polymer: 20 min; Chromogen: 5 min
Counterstain	Hematoxylin (Code GC808)	3 min incubation
Control Tissue	Colon, kidney	Cytoplasmic and membrane staining
Slides	FLEX IHC Microscope Slides (Code K8020)	Recommended for greater adherence of tissue sections to glass slides
Mounting	Non-aqueous, permanent mounting required	After staining, the sections must be dehydrated, cleared and mounted using a permanent mounting method
Instrumentation	Dako Omnis	Reagents are provided in instrument-specific vials

*The user must always read the package insert for detailed instructions of the staining procedure and handling of the product.

Specimen preparation

Paraffin sections: The antibody can be used for labeling formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. Tissue specimens should be cut into sections of 4 µm.

Pre-treatment: Pre-treatment of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections with heat-induced epitope retrieval (HIER) is required. Pretreating tissues with HIER using diluted EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Dako Omnis), Code GV805, is recommended. Deparaffinization, rehydration and target retrieval are performed onboard Dako Omnis. Please refer to Dako Omnis Basic User Guide.

Dako Omnis ensures that the tissue sections do not dry out during the pre-treatment process or during the following immunohistochemical staining procedure. For greater adherence of tissue sections to glass slides, the use of FLEX IHC Microscope Slides, Code K8020 is recommended.

Staining procedure

Program: The staining steps and incubation times are pre-programmed into the Dako Omnis software. Please refer to the Dako Omnis Basic User Guide for detailed instructions on loading slides and reagents. If the protocols are not available in the Dako Omnis system, please contact Dako Technical Support. All incubation steps are performed at 32 °C onboard Dako Omnis.

Visualization: The recommended visualization system is EnVision FLEX, High pH (Dako Omnis), Code GV800 in combination with EnVision FLEX+ Mouse (LINKER) (Dako Omnis), Code GV821. The visualization is performed onboard Dako Omnis.

Note: Use EnVision FLEX Target Retrieval Solution, **Low pH** (50x) (Dako Omnis), Code GV805, for HIER.

Counterstaining: The recommended counterstain is Hematoxylin (Dako Omnis), Code GC808. The counterstaining is performed onboard Dako Omnis.

Mounting: After staining onboard Dako Omnis the sections must be dehydrated, cleared and mounted using a permanent mounting method.

Quality control: Positive and negative control tissues as well as negative control reagent should be run simultaneously using the same protocol as the patient specimens. The positive control tissue should include colon and kidney and the cells/structures should display reaction patterns as described for this tissue in the "Performance characteristics" section. The recommended negative control reagent is FLEX Universal Negative Control, Mouse (Dako Omnis), Code GA750.

Staining interpretation

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

Performance characteristics

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

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

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

FRANÇAIS

Utilisation prévue

Pour utilisation diagnostique in vitro.

L'anticorps FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Epithelial Antigen, Clone Ber-EP4, Ready-to-Use (Dako Omnis) est destiné à une utilisation en immunohistochimie (IHC) avec l'appareil Dako Omnis. Cet anticorps marque la plupart des cellules épithéliales et facilite la classification des adénocarcinomes (1). L'anticorps peut également faciliter la classification des carcinomes de l'œsophage (2) et des carcinomes à cellules squameuses et basales de la peau (3). La classification différentielle est facilitée par les résultats provenant d'un panel d'anticorps. L'interprétation clinique de toute coloration ou son absence doit être complétée par des études morphologiques en utilisant des contrôles appropriés et doit être évaluée en fonction des antécédents cliniques du patient et d'autres tests diagnostiques par un pathologiste qualifié. Cet anticorps est destiné à être utilisé après un diagnostic primaire de tumeur par histopathologie traditionnelle utilisant des colorations histochimiques non immunologiques.

Synonymes de l'antigène

Ep-CAM

Résumé et explication

L'antigène épithélial est une glycoprotéine transmembranaire fonctionnant comme une molécule d'adhésion cellulaire. Cet antigène spécifique de l'épithélium est largement réparti dans les cellules épithéliales et présente une expression hautement conservée dans les carcinomes (4, 5). Faisant exception à l'expression générale dans les épithéliums sains, les hépatocytes adultes, contrairement aux hépatocytes fœtaux, les cellules pariétales des glandes gastriques et les cellules apicales des épithéliums squameux sont négatifs. L'antigène épithélial est rarement présent dans les mésothéliomes (1, 4). On a rapporté que l'antigène épithélial peut jouer un rôle important comme marqueur de cellule cancéreuse dans les ganglions lymphatiques de patients atteints de carcinome de l'œsophage classés autrement comme ganglion-négatifs (2).

Consulter le document *General Instructions for Immunohistochemical Staining* (Instructions générales de coloration immunohistochimique) de Dako ou les instructions du système de détection pour les procédures IHC : Principe de la procédure, Matériel requis mais non fourni, Conservation, Préparation des échantillons, Procédure de coloration, Contrôle de qualité, Dépannage, Interprétation de la coloration, Limites générales.

Réactif fourni

Anticorps monoclonal de souris prêt à l'emploi fourni sous forme liquide dans un tampon contenant une protéine stabilisante et 0,015 mol/L d'azide de sodium.

Clone : Ber-EP4 (4). Isotype : IgG1, kappa.

Immunogène

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

Spécificité

L'analyse des immunocomplexes entre l'anticorps et le lysat de cellules MCF-7 marquées en surface au ¹²⁵I, par SDS-PAGE dans des conditions réductrices, montre que l'anticorps marque deux polypeptides de 34 kDa et 39 kDa, respectivement, correspondant à l'antigène épithélial. Dans des conditions non réductrices, les polypeptides apparaissent comme faisant 39 kDa et 41 kDa, tandis que la déglycosylation réduit la taille à 31 kDa et 36 kDa.

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

Sur 37 lignées cellulaires testées, l'anticorps marque de manière homogène toutes (10/10) les lignées cellulaires des carcinomes, alors que toutes les lignées cellulaires non épithéliales (26/27) ne sont pas marquées à l'exception de la lignée cellulaire érythrocytaire K562 (4).

Précautions d'emploi

1. Pour utilisation diagnostique in vitro.
2. Pour utilisateurs professionnels.
3. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN₃), un produit chimique hautement toxique à l'état pur. Aux concentrations du produit, bien que non classé comme dangereux, l'azide de sodium peut réagir avec le cuivre et le plomb des canalisations et former des accumulations d'azides métalliques hautement explosives. Lors de l'élimination, rincer abondamment à l'eau pour éviter toute accumulation d'azide métallique dans les canalisations.
4. Comme avec tout produit d'origine biologique, des procédures de manipulation appropriées doivent être respectées.
5. Porter un équipement de protection individuelle approprié pour éviter tout contact avec les yeux et la peau.
6. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales, nationales et européennes.

Conservation

Conservé entre 2 et 8 °C. Pendant la conservation, le bouchon doit être fermé. Ne pas utiliser après la date de péremption imprimée sur le flacon. La stabilité sur l'appareil est de 40 heures. La stabilité sur l'appareil est suivie par le logiciel Dako Omnis. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles indiquées, celles-ci doivent être validées par l'utilisateur. Il n'existe pas de signe particulier pour indiquer l'instabilité de ce produit. Par conséquent, des contrôles positifs et négatifs doivent être testés en même temps que les échantillons de patient. Si une coloration inattendue est observée, qui ne peut pas être expliquée par des différences dans les procédures du laboratoire et qu'un problème lié à l'anticorps est suspecté, contacter l'assistance technique Dako.

Vue d'ensemble du protocole de coloration*

Étape		Commentaires
Fixation/inclusion	Fixation au formol, inclusion en paraffine	Déparaffinage intégré
Prétraitement	EnVision FLEX, Low pH (réf. GV805)	HIER de 30 minutes
Anticorps	Prêt à l'emploi	Incubation de 20 minutes
Contrôle négatif	FLEX Negative Control, Mouse (réf. GA750)	Incubation de 20 minutes
Visualisation	EnVision FLEX (réf. GV800) + EnVision FLEX+ Mouse LINKER (réf. GV821)	Bloc : 3 min ; Link : 10 min ; Polymère : 20 min ; Chromogène : 5 min
Contre-coloration	Hematoxylin (réf. GC808)	Incubation de 3 minutes
Tissu de contrôle	Côlon, rein	Coloration cytoplasmique et membranaire
Lames	FLEX IHC Microscope Slides (réf. K8020)	Recommandées pour une meilleure adhérence des coupes de tissus aux lames de verre
Montage	Milieu de montage permanent non aqueux requis	Une fois la procédure de coloration terminée, les coupes doivent être déshydratées, éclaircies et montées selon une méthode de montage permanent
Appareillage	Dako Omnis	Les réactifs sont fournis dans des flacons propres à l'appareil

*L'utilisateur doit toujours lire la notice pour obtenir des instructions détaillées sur la procédure de coloration et sur la manipulation du produit.

Préparation des échantillons

Coupes en paraffine : L'anticorps peut être utilisé pour le marquage des coupes de tissus incluses en paraffine et fixées au formol. L'épaisseur des coupes d'échantillons tissulaires doit être de 4 µm.

Prétraitement : Le prétraitement des coupes de tissus fixées au formol et incluses en paraffine par restauration d'épitope induite par la chaleur (HIER) est nécessaire. Il est recommandé de prétraiter les tissus par la méthode HIER à l'aide de la solution diluée EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Dako Omnis), réf. GV805. Le déparaffinage, la réhydratation et la restauration des cibles sont effectués sur l'appareil Dako Omnis. Se reporter au Guide d'utilisation de base du Dako Omnis.

Le Dako Omnis s'assure que les coupes de tissus ne sèchent pas lors du prétraitement ni lors de la procédure de coloration immunohistochimique suivante. Pour une meilleure adhérence des coupes de tissu sur les lames de verre, il est recommandé d'utiliser les lames FLEX IHC Microscope Slides (réf. K8020).

Procédure de coloration

Programme : Les étapes de coloration et les temps d'incubation sont préprogrammés dans le logiciel Dako Omnis. Se reporter au Guide d'utilisation de base du Dako Omnis pour plus de détails sur le chargement des lames et des réactifs. Si les protocoles ne sont pas disponibles sur le système Dako Omnis, contacter l'assistance technique Dako. Toutes les étapes d'incubation sont effectuées à 32 °C sur l'appareil Dako Omnis.

Visualisation : Le système de visualisation recommandé est le système EnVision FLEX, High pH (Dako Omnis), réf. GV800, associé au système EnVision FLEX+ Mouse LINKER (Dako Omnis), réf. GV821. La visualisation est effectuée sur l'appareil Dako Omnis.

Remarque : Utiliser la solution EnVision FLEX Target Retrieval Solution, **Low pH** (50x) (Dako Omnis), réf. GV805, pour la méthode HIER.

Contre-coloration : Le contre-colorant recommandé est le produit Hematoxylin (Dako Omnis), réf. GC808. La contre-coloration est effectuée sur l'appareil Dako Omnis.

Montage : Après la coloration sur l'appareil Dako Omnis, les coupes doivent être déshydratées, éclaircies et montées à l'aide d'une méthode de montage permanent.

Contrôle de qualité : Les tissus de contrôle positifs et négatifs, ainsi que le réactif de contrôle négatif, doivent être testés en parallèle selon le même protocole que pour les échantillons de patients. Le tissu de contrôle positif doit comprendre le côlon et le rein et les cellules/structures doivent présenter des schémas de réaction tels que ceux décrits pour ce tissu à la section "Performances". Le réactif de contrôle négatif recommandé est le FLEX Universal Negative Control, Mouse (Dako Omnis), réf. GA750.

Interprétation de la coloration Les cellules marquées par l'anticorps présentent une coloration cytoplasmique et membranaire. La coloration membranaire est plutôt basolatérale (4).

Performances

Tissus sains : Tous les tissus épithéliaux sains ont été marqués par l'anticorps. Les cellules épithéliales d'origines différentes affichent des niveaux de coloration variés, mais la plupart des épithéliums sont fortement positifs. Seuls les cellules pariétales des glandes gastriques, les cellules apicales des épithéliums squameux et les hépatocytes adultes sont négatifs (4). L'anticorps ne marque pas les tissus non épithéliaux, notamment la rate, le sang périphérique, la moelle osseuse, le cerveau, le tissu conjonctif, les muscles lisses et striés, le cœur, les endothéliums et les myoépithéliums. En outre, les cellules tapissant la plèvre et le péritoine sont négatives mais les cellules couvrant l'ovaire présentent une légère coloration (4). Dans le côlon, les cellules épithéliales présentent une coloration modérée à forte. Dans le rein, les cellules épithéliales tapissant la capsule de Bowman présentent une coloration faible à modérée.

Tissus anormaux : L'anticorps a marqué 142 échantillons de tumeurs épithéliales sur 144, indépendamment de leur différenciation, qu'elles soient dérivées du sein, de l'œsophage, de l'estomac, du côlon, du rectum, du pancréas, du rein, du foie, du poulmon, des glandes thyroïde ou salivaires, du vagin, de l'ovaire, du col utérin et du nasopharynx, reprenant le motif de coloration de leurs contreparties non malignes. Les carcinomes hépatocellulaires présentaient une coloration hétérogène et comprenaient les deux cas non marqués. Dans cette étude (4), 2 carcinomes à cellules squameuses sur 2, du poulmon et du col utérin respectivement, étaient marqués sur des échantillons fixés au formol, inclus dans de la paraffine, même si seules les couches de cellules basales étaient marquées dans les tissus sains. Dans certains carcinomes, comme celui de l'estomac, l'anticorps a montré un marquage plus fort que dans les tissus normaux, en particulier sur la membrane. Aucune des 88 tumeurs non épithéliales ni aucun des 20 cas de leucémie n'ont été marqués par l'anticorps (4).

Dans une étude de 83 adénocarcinomes et 115 mésothéliomes malins, 72 adénocarcinomes sur 83 étaient marqués par l'anticorps tandis que seul 1 mésothéliome malin sur 115 l'était (1). Dans une autre étude, 20 adénocarcinomes pulmonaires sur 20 et 4 mésothéliomes sur 46 ont été marqués. Sur les 4 mésothéliomes marqués, 2 ont présenté un marquage strictement focal (6). Dans les ganglions lymphatiques classés comme non tumoraux selon les catégories histopathologiques conventionnelles, l'anticorps a marqué des cellules tumorales micro-métastatiques chez 89 patients sur 126, dont les carcinomes de l'œsophage avaient été complètement réséqués (2). Dans une étude de 75 tumeurs cutanées, l'anticorps a marqué 39 carcinomes basocellulaires sur 39, 0 carcinome spinocellulaire sur 23 et 13 carcinomes basosquameux sur 13 présentaient une coloration sur certaines zones (3).

DEUTSCH

Verwendungszweck Zur In-vitro-Diagnostik.

FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Epithelial Antigen, Clone Ber-EP4, Ready-to-Use (Dako Omnis) ist zur Verwendung in der Immunhistochemie (IHC) in Verbindung mit dem Dako Omnis-Gerät bestimmt. Dieser Antikörper markiert die meisten epithelialen Zellen und unterstützt die Klassifizierung von Adenokarzinomen (1). Der Antikörper kann auch die Klassifizierung von Ösophaguskarzinomen (2) sowie von Basalzell- und Plattenzellkarzinomen der Haut unterstützen (3). Die Differenzialklassifikation wird durch die Ergebnisse eines Antikörper-Panels unterstützt. Die klinische Auswertung einer eintretenden oder ausbleibenden Färbung sollte durch morphologische Studien mit geeigneten Kontrollen ergänzt werden und von einem qualifizierten Pathologen unter Berücksichtigung der Krankengeschichte und anderer diagnostischer Tests des Patienten vorgenommen werden. Dieser Antikörper kommt nach der Primärdiagnose des Tumors durch konventionelle Histopathologie unter Verwendung von nicht immunologischen histochemischen Färbungen zum Einsatz.

Synonyme Bezeichnungen des Antigens Ep-CAM

Zusammenfassung und Erklärung Epitheliales Antigen ist ein transmembranes Glykoprotein, das als zelluläres Adhäsionsmolekül wirkt. Dieses epithelspezifische Antigen ist in Epithelzellen weit verbreitet und zeigt eine stark konservierte Expression in Karzinomen (4, 5). Ausnahmen bezüglich der verbreiteten Expression in normalen Epithelien stellen reife Hepatozyten (im Unterschied zu fötalen Hepatozyten), Parietalzellen in Magendrüsen und apikale Zellschichten in Plattenepithelen dar, die negativ sind. Epitheliales Antigen kann selten in Mesotheliomen vorkommen (1, 4). Es wurde gezeigt, dass epitheliales Antigen als Tumorzellmarker in Lymphknoten von Patienten mit Ösophaguskarzinomen, die andernfalls als Lymphknoten-negativ diagnostiziert wurden, eine wichtige Rolle spielen kann (2).

Folgende Angaben bitte den *General Instructions for Immunohistochemical Staining* (Allgemeine Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung) von Dako bzw. den Anweisungen des Detektionssystems für IHC-Verfahren entnehmen: Verfahrensprinzipien, Erfordernisse, aber nicht mitgelieferte Materialien, Lagerung, Gewebevorbereitung, Färbeverfahren, Qualitätskontrolle, Fehlerbehandlung, Auswertung der Färbung, Allgemeine Beschränkungen.

Geliefertes Reagenz Gebrauchsfertiger, monoklonaler Maus-Antikörper in flüssiger Form in einem Puffer, der stabilisierendes Protein und 0.015 mol/L Natriumazid enthält.
Klon: Ber-EP4 (4). **Isotyp:** IgG1, Kappa.

Immunogen MCF-7-Zellen (menschliche Brustkarzinom-Zelllinie) (4).

Spezifität Die Untersuchung von Immunkomplexen zwischen dem Antikörper und Lysat von ¹²⁵I-oberflächenmarkierten MCF-7-Zellen mit SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen zeigt, dass der Antikörper zwei Polypeptide mit 34 kDa bzw. 39 kDa markiert, die dem epithelialen Antigen entsprechen. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen erscheinen die Polypeptide als 39 kDa- bzw. 41 kDa-Proteine, während Deglykosylierung ihre Größe auf 31 kDa bzw. 36 kDa reduziert.

In Immunpräzipitations-Experimenten blockiert der Ber-EP4-Antikörper die Reaktion des HEA125-Antikörpers mit dem MCF-7-Zellysate und umgekehrt, was zeigt, dass beide Antikörper mit demselben Antigen reagieren. Beide Antikörper erzeugen auch identische Färbemuster in Zellen und Geweben (4).

Von 37 getesteten Zelllinien markierte der Antikörper einheitlich alle (10 von 10) Karzinomzelllinien, dagegen wurden alle nicht-epithelialen (26 von 27) Zelllinien nicht markiert, mit Ausnahme der erythromyeloïden Zelllinie K562 (4).

Vorsichtsmaßnahmen

- Zur In-vitro-Diagnostik.
- Für Fachpersonal.
- Dieses Produkt enthält Natriumazid (NaN₃), eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. Bei den in diesem Produkt verwendeten Konzentrationen kann Natriumazid, obwohl nicht als gefährlich klassifiziert, mit in Wasserleitungen vorhandenem Blei oder Kupfer reagieren und zur Bildung von hochexplosiven Metallazid-Anreicherungen führen. Nach der Entsorgung muss mit reichlich Wasser nachgespült werden, um Metall-Azid-Anreicherung zu vermeiden.
- Wie alle Produkte biologischen Ursprungs müssen auch diese entsprechend gehandhabt werden.
- Geeignete persönliche Schutzausrüstung (PSA) tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.
- Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, staatlichen und EU-rechtlichen Richtlinien zu entsorgen.

Lagerung Bei 2-8 °C lagern. Während der Lagerung ist der Deckel geschlossen zu halten. Nach Ablauf des auf dem Behälter aufgedruckten Verfallsdatums nicht mehr verwenden. Die Stabilität im Gerät beträgt 40 Stunden. Die Zeitdauer im Gerät wird durch die Dako Omnis Software erfasst. Werden die Reagenzien unter anderen als den angegebenen Bedingungen aufbewahrt, müssen diese Bedingungen vom Benutzer überprüft werden. Es gibt keine offensichtlichen Anhaltspunkte für die mögliche Instabilität dieses Produkts. Es sollten daher die Positiv- und Negativkontrollen gleichzeitig mit den Patientengewebepreparaten mitgeführt werden. Wenn eine unerwartete Anfärbung beobachtet wird, welche durch Änderungen in den Labormethoden nicht erklärt werden kann, und falls Verdacht auf ein Problem mit dem Antikörper besteht, ist Kontakt mit dem technischen Kundendienst von Dako aufzunehmen.

Übersicht über die Färbeprotokolle*

Schritt		Anmerkungen
Fixierung/Einbettung	Fixiert in Formalin, eingebettet in Paraffin	Entparaffinierung im Gerät
Vorbehandlung	EnVision FLEX, Low pH (Code-Nr. GV805)	30 min HIER
Antikörper	Ready-to-use	20 min Inkubation
Negativkontrolle	FLEX Negative Control, Mouse (Code-Nr. GA750)	20 min Inkubation
Detektionssystem	EnVision FLEX (Code-Nr. GV800) + EnVision FLEX+ Mouse LINKER (Code-Nr. GV821)	Block: 3 min; Link: 10 min; Polymer: 20 min; Chromogen: 5 min
Gegenfärbung	Hematoxylin (Code-Nr. GC808)	3 min Inkubation
Kontrollgewebe	Dickdarm, Niere	Färbung von Zytoplasma und Membran
Objekträger	FLEX IHC Microscope Slides (Code-Nr. K8020)	Empfohlen zur besseren Haftung der Gewebeschnitte an den Glasobjektträgern

Eindeckung	Nichtwässriges, permanentes Eindeckmedium erforderlich	Nach dem Färben müssen die Schnitte dehydriert, geklärt und unter Verwendung eines permanenten Eindeckmediums auf den Objektträger aufgebracht werden
Geräte	Dako Omnis	Reagenzien werden in gerätespezifischen Fläschchen geliefert

* Der Anwender muss stets die Packungsbeilage lesen, um sich über die detaillierten Anweisungen für das Färbeverfahren und die Handhabung des Produkts zu informieren.

Gewebevorbereitung

Paraffinschnitte: Der Antikörper eignet sich zur Markierung von formalinfixierten und paraffineingebetteten Gewebeschnitten. Gewebeproben sollten in Schnitte von ca. 4 µm Stärke geschnitten werden.

Vorbereitung: Es ist eine Vorbereitung der formalinfixierten und paraffineingebetteten Gewebeschnitte durch hitzeinduzierte Epitopdemaskierung (HIER) erforderlich. Die HIER-Vorbereitung der Gewebe mit EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Dako Omnis), Code-Nr. GV805, wird empfohlen. Entparaffinierung, Rehydrierung und Demaskierung werden im Dako Omnis Gerät selbst durchgeführt. Weitere Informationen finden Sie im Dako Omnis Benutzerhandbuch.

Dako Omnis gewährleistet, dass die Gewebeschnitte während der Vorbereitungsprozedur und während des anschließenden immunhistochemischen Färbeverfahrens nicht austrocknen. Für eine bessere Haftung der Gewebeschnitte an den Glasobjektträgern werden FLEX IHC Microscope Slides, Code-Nr. K8020, empfohlen.

Färbeverfahren

Programm: Die Färbeschritte und Inkubationszeiten sind in der Dako Omnis Software vorprogrammiert. Detaillierte Anweisungen zum Laden der Objektträger und Reagenzien sind dem Dako Omnis Benutzerhandbuch zu entnehmen. Wenn die Protokolle im Dako Omnis System nicht verfügbar sind, wenden Sie sich an den technischen Kundendienst von Dako. Alle Inkubationsschritte sind bei 32 °C im Dako Omnis Gerät durchzuführen.

Detektionssystem: Das empfohlene Detektionssystem ist EnVision FLEX, High pH (Dako Omnis), Code-Nr. GV800, in Verbindung mit EnVision FLEX+ Mouse (LINKER) (Dako Omnis), Code-Nr. GV821. Die Detektion wird im Dako Omnis Gerät durchgeführt.

Hinweis: EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Dako Omnis), Code-Nr. GV805, für HIER verwenden.

Gegenfärbung: Die empfohlene Gegenfärbung ist Hematoxylin (Dako Omnis), Code-Nr. GC808. Die Gegenfärbung wird im Dako Omnis Gerät durchgeführt.

Eindecken: Nach dem Färben im Dako Omnis Gerät müssen die Schnitte dehydriert, geklärt und mit einer permanenten Eindeckmethode auf den Objektträger aufgebracht werden.

Qualitätskontrolle: Positiv- und Negativkontrollgewebe sowie Negativ-Kontrollreagenz sollten zur gleichen Zeit und mit demselben Protokoll wie die Patientengewebe getestet werden. Das Positivkontrollgewebe sollte Dickdarm- und Nierengewebe enthalten, und die Zellen/Strukturen sollten die für dieses Gewebe im Abschnitt „Leistungseigenschaften“ beschriebenen Reaktionsmuster aufweisen. Das empfohlene Negativkontrollreagenz ist FLEX Universal Negative Control, Mouse (Dako Omnis), Code-Nr. GA750.

Auswertung der Färbung

Mit diesem Antikörper markierte Zellen weisen eine zytoplasmatische und eine Membranfärbung auf. Die Membranfärbung ist vorzugsweise basolateral (4).

Leistungseigenschaften

Normalgewebe: Alle normalen epithelialen Gewebe werden durch den Antikörper markiert. Epitheliale Zellen unterschiedlicher Herkunft weisen unterschiedliche Intensitäten der Färbung auf, die meisten Epithelien sind aber stark positiv. Nur Parietalzellen in Magendrüssen, apikale Zellschichten in Plattenepithelien und reife Hepatozyten sind negativ (4). Der Antikörper markiert keine nicht-epithelialen Gewebe, darunter Milz, peripheres Blut, Knochenmark, Gehirn, Bindegewebe, glatte und gestreifte Muskeln, Herz, Endothel und Myoepithel. Weiterhin sind Pleurazellen und peritoneumauskleidende Zellen negativ, dagegen weisen die die Eierstöcke bedeckenden Zellen eine leichte Färbung auf (4). Die Säulenepithelzellen des Dickdarms weisen eine mäßige bis starke Färbung auf. Die Epithelzellen, die in der Niere die Bowmankapsel auskleiden, zeigen eine schwache bis mäßige Färbung.








Anormale Gewebe: Der Antikörper markierte, unabhängig von deren Differenzierungsgrad, 142 von 144 epithelialen Tumorproben von Brust, Speiseröhre, Magen, Dickdarm, Rektum, Pankreas, Niere, Leber, Lunge, Schilddrüse, Speicheldrüsen, Vagina, Eierstöcken, Gebärmutterhals und Nasopharynx, wobei die Färbemuster in den jeweiligen normalen Geweben widergespiegelt wurden. Hepatozelluläre Karzinome zeigten heterogene Färbung und schlossen die zwei nicht markierten Fälle ein. In dieser Studie (4) wurden 2 von 2 Plattenzellkarzinomen von Lunge bzw. Gebärmutterhals als formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Proben markiert, obwohl in normalen Geweben nur die basalen Zellschichten markiert waren. Bei einigen Karzinomen wie z. B. Magenkarzinomen zeigte der Antikörper eine stärkere Markierung als im normalen Gewebe, insbesondere an der Membran. Keiner der 88 nicht-epithelialen Tumore und keiner der 20 Leukämie-Fälle (4) wurde durch den Antikörper markiert.

In einer Studie mit 83 Adenokarzinomen und 115 malignen Mesotheliomen wurden 72 von 83 Adenokarzinomen durch den Antikörper markiert, dagegen nur 1 von 115 malignen Mesotheliomen (1). In einer weiteren Studie wurden 20 von 20 Adenokarzinomen der Lunge und 4 von 46 Mesotheliomen markiert. Von den 4 markierten Mesotheliomen zeigten 2 eine stark örtlich begrenzte Markierung (6). In Lymphknoten, die nach konventionellem histopathologischem Staging als tumorfrei eingestuft wurden, markierte der Antikörper bei 89 von 126 Patienten mit vollständig entferntem Ösophaguskarzinom mikrometastatische Tumorzellen (2). In einer Studie mit 75 Hauttumoren markierte der Antikörper 39 von 39 Basalzellkarzinomen und 0 von 23 Plattenzellkarzinomen und zeigte einige gefärbte Regionen in 13 von 13 basosquamösen Karzinomen (3).

References/ Bibliographie/ Literatur

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

Explanation of symbols/ Explication des symboles/ Erläuterung der Symbole

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

Revision 2017.04