

**FLEX
Monoclonal Mouse
Anti-Human
E-Cadherin
Clone NCH-38
Ready-to-Use
(Dako Autostainer/Autostainer Plus)**

**English
Code IS059**

Intended use	For in vitro diagnostic use. FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human E-Cadherin, Clone NCH-38, Ready-to-Use, (Dako Autostainer/Autostainer Plus), is intended for use in immunohistochemistry (IHC) together with Dako Autostainer/Autostainer Plus instruments. This antibody is useful for the identification of E-cadherin-expressing cells in normal and neoplastic tissues (1-3, 5-10). Results aid in the classification of ductal breast carcinoma. 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	E-CD, uvomorulin, L-CAM, Arc-1, or cell-CAM 120/180 (1-3)
Summary and explanation	<p>E-cadherin is a 120 kDa transmembrane cell adhesion molecule. The gene has been localized on chromosome 16q22.1. In its extracellular domain, E-cadherin is involved in cell-cell adhesion through calcium-regulated homophilic interactions, whereas in its intracellular domain, E-cadherin connects to the actin cytoskeleton via catenins. E-cadherin has a significant function in intercellular adhesion of epithelial cells, the establishment of epithelial polarization, glandular differentiation, and stratification. It is localized mainly in the adherens junctions and concentrates the urokinase plasminogen and the epidermal growth factor receptor to cell contact sites (5,6).</p> <p>Refer to <i>Dako General Instructions for Immunohistochemical Staining</i> 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.</p>
Reagent provided	Ready-to-use monoclonal mouse antibody provided in liquid form in a buffer containing stabilizing protein and 0.015 mol/L NaN ₃ . <u>Clone:</u> NCH-38 <u>Isotype:</u> IgG1, kappa
Immunogen	E-cadherin (uvomorulin) and GST recombinant protein (4)
Specificity	Anti-E-cadherin, NCH-38 recognizes the 120 kDa mature form and 82 kDa fragment of E-cadherin in Western blots of A431 cells lysates (4).
Precautions	<ol style="list-style-type: none">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. Do not use after expiration date stamped on vial. 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.

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

Pre-treatment with heat-induced epitope retrieval (HIER) is required. Optimal results are obtained by pretreating tissues using EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code K8004).

Deparaffinized sections: Pre-treatment of deparaffinized formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections is recommended using Dako PT Link. For details, please refer to the PT Link User Guide. The following parameters should be used for PT Link: Pre-heat temperature: 65 °C; epitope retrieval temperature and time: 97 °C for 20 (±1) minutes; cool down to 65 °C. Rinse sections with diluted room temperature EnVision FLEX Wash Buffer (20x) (Code K8007).

Paraffin-embedded sections: As alternative specimen preparation, both deparaffinization and epitope retrieval can be performed in the PT Link using a modified procedure. See the PT Link User Guide for instructions. After the staining procedure has been completed, the sections must be dehydrated, cleared and mounted using a permanent mounting method.

The tissue sections should not dry out during the treatment or during the following immunohistochemical staining procedure. For greater adherence of tissue sections to glass slides, the use of Dako Silanized Slides (Code S3003) is recommended.

Staining procedure The recommended visualization system is EnVision FLEX+, Mouse, High pH (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K8012). The staining steps and incubation times are pre-programmed into the software of Dako Autostainer/Autostainer Plus instruments, using the following protocols:

Template protocol: FLEXRTU2 (200 uL dispense volume) or FLEXRTU3 (300 uL dispense volume)

Autoprogram (without counterstaining): E-Cad or Autoprogram (with counterstaining): E-CadH

The Auxiliary step should be set to “rinse buffer” in staining runs with ≤10 slides. For staining runs with >10 slides the Auxiliary step should be set to “none.” This ascertains comparable wash times.

All incubation steps should be performed at room temperature. For details, please refer to the Operator’s Manual for the dedicated instrument. If the protocols are not available on the used Dako Autostainer instrument, please contact Dako Technical Support.

Optimal conditions may vary depending on specimen and preparation methods, and should be determined by each individual laboratory. Counterstaining in hematoxylin is recommended using EnVision FLEX Hematoxylin (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K8018).

Positive and negative controls as well as negative control reagent should be run simultaneously using the same protocol as the patient specimens. The positive control tissue should include epithelial cells and the cells/structures should display reaction patterns as described for this tissue in “Performance characteristics”. The recommended negative control reagent is FLEX Negative Control, Mouse (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code IS750).

Staining interpretation The cellular staining pattern is membranous and/or cytoplasmic.

Performance characteristics Normal tissues: E-cadherin expression has been demonstrated by immunohistochemistry in (40/40) normal urothelium specimens (frozen and paraffin) (8). Normal human mammary gland has been found to strongly express E-cadherin in the intercellular borders of the luminal cells of both the interlobular ducts and the intralobular terminal ducts and ductules but expression was much weaker in myoepithelial cells of ducts and ductules (frozen and paraffin) (10). Squamous epithelial cells in esophagus were found to be strongly immunoreactive (15/15) on cell-cell boundaries, except in the most superficial keratinizing layer. Also, E-cadherin was immunolocalized in normal gastric mucosa at the cell-cell boundaries of the foveolar epithelia as well as in gastric crypts and deep gastric glands (paraffin) (1,2). E-cadherin immunoreactivity has been localized in normal skin along the lateral and upper surfaces of basal keratinocytes at intercellular borders but was absent at the basal cell surface. In the suprabasal layers of skin, E-cadherin expression was localized uniformly around the periphery of the cells, however no expression was seen the superficial corneal layer. The adnexal structures of skin also demonstrated E-cadherin immunoreactivity including membrane staining of the outer root sheath cells (the inner sheath cells were negative), acinar germinative cells in the sebaceous glands and sweat gland cells of skin. No E-cadherin expression was demonstrated in the dermis of normal skin (paraffin) (5).

Abnormal tissues: E-cadherin immunoreactivity has been demonstrated in a variety of abnormal cell types (1-3, 5-10). Table 1 summarizes expression of E-cadherin in abnormal tissues.

Table 1. Abnormal Tissue Reactivity

<i>Tissue Type</i>	<i>Labeled and Unlabeled Tissue Element Staining and Staining Pattern</i>
Bladder: Primary transitional cell carcinoma of the bladder ^{a,b}	13/40 labeled, homogenous (membranous) 13/40 labeled, heterogeneous 14/40 unlabeled High Grade (grade IIb and III): 10/24 labeled

	Low Grade (grade I and IIa): 16/16 labeled Superficial stage (Ta and T1): 21/22 labeled Invasive stage (T2, T3 and T4): 5/18 labeled
Breast cancer: Node negative ^b (without chemotherapy or hormonal therapy)	136/168 labeled
Breast carcinoma: Ductal ^{a,b}	55/87 ^a strong labeled, majority of cells 29/87 ^a weaker labeled, heterogeneous 14/24 ^b strong labeled, majority of cells 10/24 ^b weaker labeled, heterogeneous
Breast carcinoma: Lobular ^{a,b}	3/21 ^a labeled focal—very sparse intercellular membrane—or weak cytoplasmic 3/14 ^b labeled, focal—very sparse intercellular membrane—or weak cytoplasmic
Esophagus: Squamous cell carcinoma ^a	4/15 labeled 10/15 labeled, heterogeneous or weak
Gastric carcinoma ^b	108/413 labeled, homogenous linear expression and comparable to normal gastric mucosa 95/413 labeled, moderately reduced linear or dotted intercellular staining in 20–60% tumor cells 86/413 labeled, highly reduced finely dotted intercellular staining in <20% cells 124/413 unlabeled or weak dotted immunoreactivity <5% cells Special pattern of E-cadherin expression was present in a small percentage of signet ring-cell carcinomas and of undifferentiated carcinomas, where a strong intracytoplasmic “plaque-like” expression of E-cadherin could be demonstrated, sometimes in combination with a very weak immuno-reactivity at tumor-cell membrane.
Endometriosis ^a	3/9 labeled 6/9 labeled, heterogeneous
Skin: Melanocytic naevi ^b	20/20 labeled membranous, superficial compartment of naevi and at the borders between naevus cell nests and keratinocytes of the surrounding epidermis. Junctional naevus cell nests were more heterogeneous than in the epidermal component or diffusely cytoplasmic. Melanocytic cells in the papillary dermis were unlabeled.
Skin: Malignant melanoma ^b	13/70 labeled, membranous 30/70 labeled, heterogeneous 11/70 cytoplasmic 16/70 unlabeled <i>Immunoreactivity associated with histological types of melanomas:</i> 1/34 superficial spreading melanoma-labeled, membranous 18/34 superficial spreading melanoma-labeled, heterogeneous 8/34 superficial spreading melanoma-cytoplasmic 7/34 superficial spreading melanoma-unlabeled 3/8 nodular melanoma-labeled, heterogeneous 2/8 nodular melanoma-cytoplasmic 3/8 nodular melanoma-unlabeled 4/9 lentigo malignant melanoma-labeled, heterogeneous 1/9 lentigo malignant melanoma-cytoplasmic 4/9 lentigo malignant melanoma-unlabeled 1/8 lentiginous melanoma-labeled, membranous 5/8 lentiginous melanoma-labeled, heterogeneous 2/8 lentiginous melanoma-unlabeled 11/11 metastatic melanoma-labeled, membranous
Prostate cancer: Primary tumors ^a	44/84 labeled, homogeneous 27/84 labeled, heterogeneous 13/84 unlabeled
Metastatic lesions ^a	2/8 positive, homogeneous 5/8 positive, heterogeneous 1/8 negative Most differentiated cancers demonstrated strong and uniformly labeled immunoreactivity at the cell-cell boundaries, whereas an increasing percentage of less well differentiated to poorly differentiated tumors demonstrated heterogeneous or unlabeled immunoreactivity.

^aTesting was performed on frozen sections

^bTesting was performed on paraffin-embedded formalin-fixed tissue sections

Français
Réf. IS059

Utilisation prévue	Pour utilisation diagnostique in vitro. L'anticorps FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human E-Cadherin, Clone NCH-38, Ready-to-Use (Dako Autostainer/Autostainer Plus), est destiné à une utilisation en immunohistochimie (IHC) avec les instruments Dako Autostainer/Autostainer Plus. Cet anticorps est utile pour l'identification des cellules exprimant la E-cadhérine dans les tissus sains et néoplasiques (1-3, 5-10). Les résultats facilitent la classification du carcinome mammaire canalaire. 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	E-CD, uvomoruline, L-CAM, Arc-1, ou CAM cellulaire 120/180 (1-3)
Résumé et explication	<p>La E-cadhérine est une molécule d'adhésion cellulaire transmembranaire de 120 kDa. Le gène a été localisé sur le chromosome 16q22.1. Dans son domaine extracellulaire, la E-cadhérine est impliquée dans l'adhésion cellule-cellule via des interactions homophiliques régulées par le calcium tandis que, dans son domaine intracellulaire, la E-cadhérine se connecte au cytosquelette d'actine via des caténines. La E-cadhérine a une fonction importante dans l'adhésion intercellulaire des cellules épithéliales, l'établissement de la polarisation épithéliale, la différenciation glandulaire et la stratification. Elle est localisée principalement dans les jonctions adhérentes et elle concentre le plasminogène urokinase et le récepteur du facteur de croissance épidermique dans les sites de contacts cellulaires (5,6).</p> <p>Consulter le document <i>General Instructions for Immunohistochemical Staining</i> (Instructions générales de coloration immunohistochimique) de Dako ou les instructions du kit 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.</p>
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 de NaN ₃ . <u>Clone</u> : NCH-38 <u>Isotype</u> : IgG1, kappa
Immunogène	E-cadhérine (uvomoruline) et protéine recombinante GST (4)
Spécificité	L'anti-E-cadhérine, NCH-38 reconnaît la forme mature de 120 kDa et le fragment de 82 kDa de E-cadhérine dans les Western blots de lysats de cellules A431 (4).
Précautions d'emploi	<ol style="list-style-type: none">1. Pour utilisation diagnostique in vitro.2. Pour utilisateurs professionnels.3. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN₃), produit chimique hautement toxique dans sa forme pure. 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, respecter les procédures de manipulation appropriées.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	Conserver entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption imprimée sur le flacon. 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 être expliquée par des différences dans les procédures du laboratoire et qu'un problème lié à l'anticorps est suspecté, contacter l'assistance technique de Dako.
Préparation des échantillons	<p>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 d'environ 4 µm.</p> <p>Le prétraitement avec une restauration d'épitope induite par la chaleur (HIER) est nécessaire. Des résultats optimaux sont obtenus en prétraitant les tissus à l'aide de la EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (réf. K8004).</p> <p><u>Coupes déparaffinées</u> : Le prétraitement des coupes tissulaires déparaffinées, fixées au formol et incluses en paraffine, est recommandé à l'aide du Dako PT Link. Pour plus de détails, se référer au Guide d'utilisation du PT Link. Les paramètres suivants doivent être utilisés pour le PT Link : Température de préchauffage : 65 °C ;</p>

température et durée de restauration de l'épitope : 97 °C pendant 20 minutes (±1 minute) ; laisser refroidir jusqu'à 65 °C. Rincer les coupes avec un tampon de lavage dilué à température ambiante EnVision FLEX (20x) (réf. K8007).

Coupes incluses en paraffine : Comme préparation alternative des échantillons, le déparaffinage et la restauration d'épitope peuvent être réalisés dans le PT Link à l'aide d'une procédure modifiée. Se référer aux instructions du Guide d'utilisation du PT Link. Une fois la procédure de coloration terminée, les coupes doivent être déshydratées, éclaircies et montées selon une méthode de montage permanent.

Les coupes de tissus ne doivent pas sécher lors du traitement ni lors de la procédure de coloration immunohistochimique suivante. Pour une meilleure adhérence des coupes de tissus sur les lames de verre, il est recommandé d'utiliser des lames Dako Silanized Slides (Réf. S3003).

Procédure de coloration

Le système de visualisation recommandé est le EnVision FLEX+, Mouse, High pH (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. K8012). Les étapes de coloration et les temps d'incubation sont préprogrammés dans le logiciel des instruments Dako Autostainer/Autostainer Plus, à l'aide des protocoles suivants :

Protocole modèle : FLEXRTU2 (volume d'application de 200 µL) ou FLEXRTU3 (volume d'application de 300 µL)

Programme automatique (sans contre-coloration) : E-Cad ou Programme automatique (avec contre-coloration) : E-CadH

L'étape Auxiliary doit être réglée sur "rinse buffer" lors des cycles de coloration avec ≤ 10 lames. Pour les cycles de coloration de plus de 10 lames, l'étape dite "Auxiliary" doit être réglée sur "none". Cela garantit des temps de lavage comparables.

Toutes les étapes d'incubation doivent être effectuées à température ambiante. Pour plus de détails, se référer au Manuel de l'opérateur spécifique à l'instrument. Si les protocoles ne sont pas disponibles sur l'instrument Dako Autostainer utilisé, contacter l'assistance technique Dako.

Les conditions optimales peuvent varier en fonction de l'échantillon et des méthodes de préparation, et doivent être déterminées par chaque laboratoire individuellement.

Il est recommandé d'effectuer une contre-coloration à l'aide d'hématoxyline EnVision FLEX Hematoxylin, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (réf. K8018).

Les contrôles 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 les cellules épithéliales et les cellules/structures doivent présenter des schémas de réaction tels que ceux décrits pour ces tissus à la section "Performances". Le réactif de contrôle négatif recommandé est le FLEX Negative Control, Mouse, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (réf. IS750).

Interprétation de la coloration

Le motif de coloration cellulaire est membranaire et/ou cytoplasmique.

Performances

Tissus sains : L'expression de la E-cadhérine a été démontrée par immunohistochimie dans 40/40 échantillons sains d'urothélium (congelés et inclus en paraffine) (8). La glande mammaire humaine saine a fortement exprimé la E-cadhérine au niveau des bordures intercellulaires des cellules luminales à la fois des canaux interlobulaires et des canaux et ductules intralobulaires terminaux mais l'expression était nettement plus faible dans les cellules myoépithéliales des canaux et ductules (congelés et incluses en paraffine) (10). Les cellules épithéliales squameuses de l'œsophage se sont révélées fortement immunoréactives (15/15) sur les bordures cellule-cellule, excepté dans la couche kératinisante la plus superficielle. De même, la E-cadhérine a été immunolocalisée dans la muqueuse gastrique saine au niveau des bordures cellule-cellule de l'épithélium fovéolaire ainsi que dans les cryptes gastriques et les glandes gastriques profondes (paraffine) (1,2). L'immunoréactivité de la E-cadhérine a été localisée dans les tissus de peau sains le long des surfaces latérales et supérieures des kératinocytes basaux au niveau des bordures intercellulaires mais était absente de la surface basale de la cellule. Dans les couches suprabasales de la peau, l'expression de la E-cadhérine était localisée uniformément autour de la périphérie des cellules ; cependant, aucune expression n'a été observée sur la couche cornéenne superficielle. Les structures annexielles de la peau ont également démontré l'immunoréactivité de la E-cadhérine, incluant la coloration membranaire de l'enveloppe extérieure des cellules (les enveloppes intérieures des cellules étaient négatives), des cellules acinaires germinatives dans les glandes sébacées et des cellules des glandes sudoripares de la peau. Aucune expression de la E-cadhérine n'a été démontrée dans le derme de la peau saine (paraffine) (5).

Tissus anormaux : L'immunoréactivité de la E-cadhérine a été démontrée dans plusieurs types de cellules anormales (1-3,5-10). Le Tableau 1 résume l'expression de la E-cadhérine dans les tissus anormaux.

Tableau 1. Réactivité dans les tissus anormaux

Type de tissu	Éléments tissulaires marqués et non marqués et motif de coloration
Vessie : Carcinome primaire à cellules transitionnelles de la vessie ^{a,b}	13/40 marqués, coloration homogène (membranaire) 13/40 marqués, coloration hétérogène 14/40 non marqués Haute intensité (grades IIb et III) : 10/24 marqués Faible intensité (grades I et IIa) : 16/16 marqués Stade superficiel (Ta et Ti) : 21/22 marqués Stade invasif (T2, T3 et T4) : 5/18 marqués

Cancer du sein : Sans atteinte ganglionnaire ^b (sans chimiothérapie ou traitement hormonal)	136/168 marqués
Carcinome mammaire : Canalair ^{a,b}	55/87 ^a fortement marqués, majorité des cellules 29/87 ^a plus faiblement marqués, coloration hétérogène 14/24 ^b fortement marqués, majorité des cellules 10/24 ^b plus faiblement marqués, coloration hétérogène
Carcinome mammaire : Lobulaire ^{a,b}	3/21 ^a marqués, localement : coloration de la membrane intercellulaire très peu dense ou cytoplasmique faible 3/14 ^a marqués, localement : coloration de la membrane intercellulaire très peu dense ou cytoplasmique faible
Œsophage : Carcinome à cellules squameuses ^a	4/15 marqués 10/15 marqués, coloration hétérogène ou faible
Carcinome gastrique ^b	108/413 marqués, expression linéaire homogène et comparable à la muqueuse gastrique normale 95/413 marqués, coloration intercellulaire linéaire modérément réduite ou à points de 20 à 60% des cellules tumorales 86/413 marqués, coloration intercellulaire hautement réduite à points fins dans < 20% des cellules 124/413 non marqués ou immunoréactivité faible à points (< 5% des cellules) Un schéma spécial de l'expression de la E-cadhérine a été observé dans un faible pourcentage de carcinomes à cellules en bague et de carcinomes indifférenciés, où une forte expression intracytoplasmique de type plaque de la E-cadhérine a pu être démontrée, parfois en association à une très faible immunoréactivité au niveau de la membrane cellulaire de la tumeur.
Endométriose ^a	3/9 marqués 6/9 marqués, coloration hétérogène
Peau : Nœvi mélanocytaires ^b	20/20 marqués, coloration membranaire, compartiments superficiels des nœvi et aux bordures entre les nids cellulaires de nœvus et les kératinocytes de l'épiderme environnant. Les nids cellulaires de naevus de jonction étaient plus hétérogènes que dans le composant épidermique ou cytoplasmiques diffus. Les cellules mélanocytaires dans le derme papillaire n'étaient pas marquées.
Peau : Mélanome malin ^b	13/70 marqués, coloration membranaire 30/70 marqués, coloration hétérogène 11/70 coloration cytoplasmique 16/70 non marqués <i>Immunoréactivité associée aux types histologiques de mélanomes :</i> 1/34 mélanome à extension superficielle marqué, coloration membranaire 18/34 mélanomes à extension superficielle marqués, coloration hétérogène 8/34 mélanomes à extension superficielle marqués, coloration cytoplasmique 7/34 mélanomes à extension superficielle non marqués 3/8 mélanomes nodulaires marqués, coloration hétérogène 2/8 mélanomes nodulaires, coloration cytoplasmique 3/8 mélanomes nodulaires non marqués 4/9 mélanomes à lentigo malin marqués, coloration hétérogène 1/9 mélanome à lentigo malin marqué, coloration cytoplasmique 4/9 mélanomes à lentigo malin non marqués 1/8 mélanome à lentigo marqué, coloration membranaire 5/8 mélanomes à lentigo marqués, coloration hétérogène 2/8 mélanomes à lentigo non marqués 11/11 mélanomes métastatiques marqués, coloration membranaire
Cancer de la prostate : Tumeurs primaires ^a	44/84 marqués, coloration homogène 27/84 marqués, coloration hétérogène 13/84 non marqués
Lésions métastatiques ^a	2/8 marqués, coloration homogène 5/8 marqués, coloration hétérogène 1/8 non marqué La plupart des cancers différenciés ont présenté une immunoréactivité forte et uniformément marquée aux bordures cellule-cellule, alors qu'un pourcentage en augmentation de tumeurs moins bien différenciées à mal différenciées a présenté une immunoréactivité hétérogène ou non marquée.

^aLes analyses ont été réalisées sur des coupes congelées

^bLes analyses ont été réalisées sur des coupes de tissu fixées au formol et incluses en paraffine

Deutsch
Code-Nr. IS059

Verwendungszweck Zur In-vitro-Diagnostik.

FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human E-Cadherin, Clone NCH-38, Ready-to-Use (Dako Autostainer/Autostainer Plus) ist zur Verwendung in der Immunhistochemie (IHC) in Verbindung mit Dako Autostainer-/Autostainer Plus-Geräten bestimmt. Dieser Antikörper dient zur Identifikation von Mammaglobin exprimierenden Zellen in normalem und neoplastischem Gewebe (1-3, 5-10). Die Ergebnisse unterstützen die Klassifizierung von duktalem Brustkarzinomen. 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** E-CD, Uvomorulin, L-CAM, Arc-1 oder Cell-CAM 120/180 (1-3)

**Zusammenfassung
und Erklärung** E-Cadherin ist ein 120-kDa-Transmembran-Zelladhäsionsmolekül. Das Gen wurde auf dem Chromosom 16q22.1 lokalisiert. In seiner extrazellulären Domäne ist E-Cadherin an der Zell-Zell-Adhäsion mittels kalziumregulierter homophiler Interaktionen beteiligt, während es sich in seiner intrazellulären Domäne mittels Cateninen an das Aktin-Zytoskelett bindet. E-Cadherin hat eine wesentliche Funktion bei der interzellulären Adhäsion von Epithelzellen, der Einrichtung der Epithelpolarisation sowie der Drüsendifferenzierung und Stratifizierung. Es ist hauptsächlich in den adhärenenten Verbindungen lokalisiert und konzentriert das Urokinase-Plasminogen und den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor an Zellkontaktstellen (5, 6).

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, Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien, Lagerung, Gewebepreparation, 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 NaN₃ enthält.
Klon: NCH-38 Isotyp: IgG1, Kappa

Immunogen E-Cadherin (Uvomorulin) und GST-rekombinantes Protein (4)

Spezifität Anti-E-Cadherin, NCH-38, erkennt die ausgereifte 120-kDa-Form und das 82-kDa-Fragment von E-Cadherin beim Western-Blot von A431-Zelllysaten (4).

Vorsichtsmaßnahmen

1. Zur In-vitro-Diagnostik.
2. Für Fachpersonal.
3. 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.
4. Wie alle Produkte biologischen Ursprungs müssen auch diese entsprechend gehandhabt werden.
5. Geeignete persönliche Schutzausrüstung (PSA) tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.
6. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, staatlichen und EU-rechtlichen Richtlinien zu entsorgen.

Lagerung Bei 2-8 °C lagern. Nach Ablauf des auf dem Behälter aufgedruckten Verfallsdatums nicht mehr verwenden. 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 Patientengewebeprobe 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.

Gewebepreparation Der Antikörper eignet sich zur Markierung von formalinfixierten und paraffineingebetteten Gewebeschnitten. Gewebeprobe sollten in Schnitte von ca. 4 µm Stärke geschnitten werden.
Es ist eine Vorbehandlung durch hitzeinduzierte Epitopdemaskierung (HIER-Verfahren) erforderlich. Optimale Ergebnisse können durch Vorbehandlung der Gewebe mit EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code-Nr. K8004) erzielt werden.
Entparaffinierte Schnitte: Die Vorbehandlung der entparaffinierten, formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitte sollte mit Dako PT Link erfolgen. Weitere Informationen hierzu siehe PT Link-Benutzerhandbuch. Für PT Link sind die folgenden Parameter zu verwenden: Temperatur auf 65 °C vorwärmen;

Epitopdemaskierungstemperatur und -zeit: 97 °C für 20 (±1) Minuten; auf 65 °C abkühlen. Schnitte mit auf Raumtemperatur gebrachttem, verdünntem EnVision FLEX Wash Buffer (20x) (Code-Nr. K8007) spülen.

Paraffineingebettete Schnitte: Alternativ können Entparaffinierung und Epitopdemaskierung im PT Link unter Verwendung eines modifizierten Verfahrens durchgeführt werden. Weitere Informationen finden Sie im PT Link-Benutzerhandbuch. Nach Abschluss des Färbeverfahrens müssen die Schnitte dehydriert, geklärt und mit einer permanenten Eindeckmethode eingedeckt werden.

Während der Gewebepreparierung oder während des anschließenden immunhistochemischen Färbeverfahrens dürfen die Gewebeschnitte nicht austrocknen. Für eine bessere Haftung der Gewebeschnitte an den Glas-Objektträgern werden Dako Silanized Slides (Code-Nr. S3003) empfohlen.

Färbeverfahren

Das empfohlene Detektionssystem ist EnVision FLEX+, Mouse, High pH (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. K8012). Die Färbeschritte und Inkubationszeiten sind in der Software der Dako Autostainer-/Autostainer Plus-Geräte mit den folgenden Protokollen vorprogrammiert:

Matrix-Protokoll: FLEXRTU2 (200 µL Abgabevolumen) oder FLEXRTU3 (300 µL Abgabevolumen)

Autoprogram (ohne Gegenfärbung): E-Cad oder Autoprogram (mit Gegenfärbung): E-CadH

Bei Färbedurchläufen mit ≤ 10 Objektträgern sollte der Zusatz-Schritt auf „Pufferspülgang“ eingestellt werden. Für Färbedurchläufe mit mehr als 10 Objektträgern sollte der Zusatz-Schritt auf „Keine“ eingestellt werden. Dies gewährleistet vergleichbare Waschzeiten.

Alle Inkubationsschritte sollten bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Nähere Einzelheiten bitte dem Benutzerhandbuch für das jeweilige Gerät entnehmen. Wenn die Protokolle auf dem verwendeten Dako Autostainer-Gerät nicht verfügbar sind, bitte den technischen Kundendienst von Dako verständigen.

Optimale Bedingungen können je nach Gewebe und Präparationsverfahren unterschiedlich sein und sollten vom jeweiligen Labor selbst ermittelt werden.

Die Gegenfärbung in Hämatoxylin sollte mit EnVision FLEX Hematoxylin (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. K8018) ausgeführt werden.

Positiv- und Negativkontrolle sowie Negativkontrollreagenz sollten zur gleichen Zeit und mit demselben Protokoll wie die Patientengewebe getestet werden. Das Positivkontrollgewebe sollte glatte Epithelzellen enthalten, und die Zellen/Strukturen sollten die für dieses Gewebe im Abschnitt „Leistungseigenschaften“ beschriebenen Reaktionsmuster aufweisen. Das empfohlene Negativkontrollreagenz ist FLEX Negative Control, Mouse (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. IS750).

Auswertung der Färbung

Das zelluläre Färbemuster ist membranös und/oder zytoplasmatisch.

Leistungseigenschaften

Normalgewebe: In (40/40) gesunden Urothelproben (gefroren und paraffineingebettet) wurde mit Immunhistochemie eine E-Cadherin-Expression nachgewiesen (8). In der gesunden menschlichen Brustdrüse wurde E-Cadherin stark in den interzellulären Grenzen der luminalen Zellen sowohl von interlobulären Gängen als auch intralobulären terminalen Gängen und Kanälen exprimiert. Dagegen war die Expression in Myoepithelzellen der Gänge und Kanäle (gefroren und paraffineingebettet) wesentlich schwächer (10). Plattenepithelzellen in der Speiseröhre zeigten eine starke Immunreaktivität (15/15) an Zell-Zell-Grenzen, ausgenommen in der oberflächlichsten keratinisierenden Schicht. Zudem wurde E-Cadherin mittels Immunfärbung in gesunder gastrischer Mukosa an den Zell-Zell-Grenzen der foveolaren Epithel sowie in gastrischen Einbuchtungen und tief liegenden gastrischen Drüsen (paraffineingebettet) nachgewiesen (1, 2). In gesunder Haut wurde entlang der lateralen und oberen Oberflächen basaler Keratinozyten an interzellulären Grenzen eine Immunreaktivität von E-Cadherin beobachtet, nicht jedoch an der Basalzell-Oberfläche. In den suprabasalen Hautschichten konnte eine E-Cadherin-Expression gleichmäßig um die Peripherie der Zellen lokalisiert werden, jedoch wurde keine Expression in der oberflächlichen Corneaschicht beobachtet. Die adnexen Strukturen der Haut zeigten ebenfalls eine Immunreaktivität des E-Cadherins, einschließlich einer Membranfärbung der äußeren Wurzelscheidenzellen (die inneren Scheidenzellen reagierten negativ) sowie der azinösen Keimzellen in den Talg- und Schweißdrüsenzellen der Haut. In der Dermis gesunder Haut (paraffineingebettet) wurde keine E-Cadherin-Expression nachgewiesen (5).

Anormale Gewebe: Eine E-Cadherin-Immunreaktivität wurde in einer Anzahl anormaler Zelltypen nachgewiesen (1-3, 5-10). Tabelle 1 fasst die Expression von E-Cadherin in pathologischen Geweben zusammen.

Tabelle 1. Reaktivität in anormalem Gewebe

Gewebetyp	Markierte und nicht markierte Anfärbung von Gewebeelementen und Färbemuster
Blase: primäres Übergangszell-Karzinom	13/40 markiert, homogen (membranös)
der Harnblase ^{a, b}	13/40 markiert, heterogen
	14/40 nicht markiert
	Hochgradig (Grad IIb und III): 10/24 markiert
	Niedriggradig (Grad I und IIa): 16/16 markiert
	Oberflächlich (Ta und Ti): 21/22 markiert
	Invasiv (T2, T3 und T4): 5/18 markiert

Brustkrebs: Knoten negativ ^b (ohne Chemotherapie oder Hormonbehandlung)	136/168 markiert
Mammakarzinom: duktal ^{a, b}	55/87 ^a stark markiert, Großteil der Zellen 29/87 ^a schwächer markiert, heterogen 14/24 ^b stark markiert, Großteil der Zellen 10/24 ^b schwächer markiert, heterogen
Mammakarzinom: lobulär ^{a, b}	3/21 ^a markiert, fokal – sehr spärlich an der interzellulären Membran – oder schwach zytoplasmatisch 3/14 ^b markiert, fokal – sehr spärlich an der interzellulären Membran – oder schwach zytoplasmatisch
Speiseröhre: Plattenepithelkarzinom ^a	4/15 markiert 10/15 markiert, heterogen oder schwach
Magenkarzinom ^b	108/413 markiert, homogene lineare Expression, mit gesunder gastrischer Mukosa vergleichbar 95/413 markiert, mäßig verringerte lineare oder gepunktete interzelluläre Färbung bei 20-60% der Tumorzellen 86/413 markiert, stark verringerte, fein gepunktete interzelluläre Färbung bei < 20% der Zellen 124/413 nicht markierte oder schwach gepunktete Immunreaktivität bei < 5% der Zellen Bei einem kleinen Prozentsatz von Siegelringzell-Karzinomen und undifferenzierten Karzinomen lag ein Spezialmuster der E-Cadherin-Expression vor, bei dem eine starke intrazytoplasmatische, plaqueähnliche Expression von E-Cadherin nachgewiesen werden konnte, manchmal in Kombination mit einer sehr schwachen Immunreaktivität an der Tumorzellmembran.
Endometriose ^a	3/9 markiert 6/9 markiert, heterogen
Haut: Melanozyten-Naevi ^b	20/20 markiert, membranös, oberflächliches Kompartiment der Naevi und an den Grenzen zwischen Naevuszellnestern und Keratinozyten der umgebenden Epidermis. Verbindende Naevuszellnester waren heterogener als in der epidermalen Komponente oder diffus zytoplasmatisch. Melanozytische Zellen in der papillären Dermis wurden nicht markiert.
Haut: malignes Melanom ^b	13/70 markiert, membranös 30/70 markiert, heterogen 11/70 zytoplasmatisch 16/70 nicht markiert Immunreaktivität <i>verschiedener histologischer Arten von Melanomen</i> : 1/34 oberflächlich ausbreitend, melanom-markiert, membranös 18/34 oberflächlich ausbreitend, melanom-markiert, heterogen 8/34 oberflächlich ausbreitend, melanom-zytoplasmatisch 7/34 oberflächlich ausbreitend, nicht melanom-markiert 3/8 nodulär, melanom-markiert, heterogen 2/8 nodulär, melanom-zytoplasmatisch 3/8 nodulär, nicht melanom-markiert 4/9 lentigo-maligne, melanom-markiert, heterogen 1/9 lentigo-maligne, melanom-zytoplasmatisch 4/9 lentigo-maligne, nicht melanom-markiert 1/8 lentiginös, melanom-markiert, membranös 5/8 lentiginös, melanom-markiert, heterogen 2/8 lentiginös, nicht melanom-markiert 11/11 metastatisch melanom-markiert, membranös
Prostatakarzinom: primäre Tumore ^a	44/84 markiert, homogen 27/84 markiert, heterogen 13/84 nicht markiert
Metastatische Läsionen ^a	2/8 positiv, homogen 5/8 positiv, heterogen 1/8 negativ Die meisten differenzierten Krebsarten zeigten eine starke und gleichförmig markierte Immunreaktivität an den Zell-Zell-Grenzen, wogegen ein zunehmender Anteil schwächer bis schwach differenzierter Tumore eine heterogene oder nicht markierte Immunreaktivität aufwies.

^a Die Tests wurden auf Gefrierschnitten durchgeführt










^b Die Tests wurden auf paraffineingebetteten, formalinfixierten Gewebeschnitten durchgeführt

**References /
Bibliographie/
Literaturnachweise**

1. Shiozaki H, Tahara H, Oka H, Miyata M, Kobayashi K, Tamura S, Iihara K, Doki Y, Hirano S, Takeichi M, Mori T. Expression of Immunoreactive E-cadherin adhesion molecules in human cancers. Am J Pathol 1991; 139(1):17

2. Gabbert HE, Mueller W, Schneider A, Meier S, Moll R, Birchmeier W, Hommel G. Prognostic value of E-cadherin expression in 413 gastric carcinomas. *Int J Cancer* 1996; 69:184
3. Umbas R, Schalken JA, Aalders TW, Carter BS, Karthaus HFM, Schaafsma HE, Debruyne FMJ, Isaacs WB. Expression of the cellular adhesion molecule E-cadherin is reduced or absent in high-grade prostate cancer. *Canc Res* 1992; 52:5104
4. Antibody Certification 6/8/99. On file at Dako.
5. Silye R, Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Poole S, Van Noorden S, Batchelor W, Regele H, Sega W, Boesmueller H, Krausz T, Pignatelli M. E-cadherin/catenin complex in benign and malignant melanocytic lesions. *J Pathol* 1998; 186:350
6. Heimann R, Lan F, McBride R, Hellman S. Separating favorable from unfavorable prognostic markers in breast cancer: the role of E-cadherin. *Canc Res* 2000; 60:298
7. Bracke ME, Van Roy FM, Mareel MM. The E-cadherin/catenin complex in invasion and metastasis. *Cur Top Microbiol Immunol* 1996; 213 (Pt 1):123-61
8. Garcia del Muro X, Torregrosa A, Munoz J, Castellsague X, Condom E, Vignes F, Arance A, Fabra A, Germa JR. Prognostic value of the expression of E-cadherin and β -catenin in bladder cancer. *Eur J Cancer* 2000; 36:357
9. Moll R, Mitze M, Frixen UH, Birchmeier W. Differential loss of E-cadherin expression in infiltrating ductal and lobular breast carcinomas. *Am J Pathol* 1993; 143(6):1731
10. Gaetje R, Kotzian S, Herrmann G, Baumann R, Starzinski-Powitz A. Nonmalignant epithelial cells, potentially invasive in human endometriosis, lack the tumor suppressor molecule E-cadherin. *Am J Pathol* 1997; 150(2):461

Explanation of symbols/ Explication des symboles/ Erläuterung der Symbole

 REF	Catalogue number Référence catalogue Bestellnummer		Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich	 IVD	In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-vitro-Diagnostikum
	Manufacturer Fabricant Hersteller	 LOT	Batch code Code du lot Chargenbezeichnung		Contains sufficient for <n> tests Contenance suffisante pour <n> tests Ausreichend für <n> Tests
	Use by Utiliser avant Verwendbar bis		Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten	 EC REP	Authorized representative in the European Community Représentant Autorisé dans la Communauté Européenne Autorisierter Repräsentant in der EU



Dako North America, Inc.
6392 Via Real
Carpinteria, California 93013 USA

Tel 805 566 6655
Fax 805 566 6688
Technical Support 800 424 0021
Customer Service 800 235 5763



Dako Denmark A/S
Produktionsvej 42
DK-2600 Glostrup Denmark

Tel +45 4485 9500
Fax +45 4485 9595
www.agilent.com

PT0020/Rev D

Revision 2017.06