

FLEX
Monoclonal Mouse
Anti-Human
Epithelial Antigen
 Clone Ber-EP4
Ready-to-Use
 (Dako Autostainer/Autostainer Plus)

Code IS637

ENGLISH

Intended use	For in vitro diagnostic use. FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Epithelial Antigen, Clone Ber-EP4, Ready-to-Use (Dako Autostainer/Autostainer Plus), is intended for use in immunohistochemistry (IHC) together with Dako Autostainer/Autostainer Plus instruments. 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.
Synonym 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 <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.
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. <u>Clone:</u> Ber-EP4 (4). <u>Isotype:</u> IgG1, kappa.
Immunogen	MCF-7 cells (human breast carcinoma cell line) (4).
Specificity	Analysis of immunocomplexes between the antibody and lysate of ¹²⁵ I 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	<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 using Dako PT Link. For details, please refer to the PT Link User Guide. Optimal results are obtained by pretreating tissues using EnVision FLEX, Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Code K8005). <u>Paraffin-embedded sections:</u> Pre-treatment of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections is recommended using the 3-in-1 specimen preparation procedure for Dako PT Link. After staining the sections must be dehydrated, cleared and mounted using a permanent mounting method. <u>Deparaffinized sections:</u> Pre-treatment of deparaffinized formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections is recommended using Dako PT Link and following the same procedure as described for paraffin-embedded sections. After staining the slides should be mounted using an aqueous or 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 FLEX IHC Microscope Slides (Code K8020) is recommended.
Staining procedure	The recommended visualization system is EnVision FLEX, High pH (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K8010), replacing the High pH Target Retrieval Solution from this kit with EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Code K8005). 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 µL dispense volume) or FLEXRTU3 (300 µL dispense volume) Autoprogram: BerEP4 (without counterstaining) or BerEP4H (with counterstaining) 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 control tissue 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 "Performance characteristics". The recommended negative control reagent is FLEX Negative Control, Mouse (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code IS750).

Staining interpretation	Cells labeled by the antibody display cytoplasmic and membranous staining. The membrane staining is preferentially basolateral (4).
Performance characteristics	<p>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 column 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.</p> <p>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).</p> <p>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).</p>

FRANÇAIS

Utilisation prévue	<p>Pour utilisation diagnostique in vitro.</p> <p>L'anticorps FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Epithelial Antigen, Clone Ber-EP4, Ready-to-Use (Dako Autostainer/Autostainer Plus), est destiné à une utilisation en immunohistochimie (IHC) avec les instruments Dako Autostainer/Autostainer Plus. 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 histo-chimiques non immunologiques.</p>
Synonyme de l'antigène	Ep-CAM
Résumé et explication	<p>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 normaux, les hépatocytes adultes, contrairement aux hépatocytes fœtaux, les cellules pariétales des glandes gastriques et les cellules apicales dans les 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).</p> <p>Consulter le document <i>General Instructions for Immunohistochemical Staining</i> (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.</p>
Réactif fourni	<p>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.</p> <p>Clone : Ber-EP4 (4). Isotype : IgG1, kappa.</p>
Immunogène	Cellules MCF-7 (lignée cellulaire de carcinome du sein humain) (4).
Spécificité	<p>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.</p> <p>Dans les expérimentations 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).</p> <p>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 érythromyéloïde K562 (4).</p>
Précautions d'emploi	<ol style="list-style-type: none"> Pour utilisation diagnostique in vitro. Pour utilisateurs professionnels. 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. Comme avec tout produit d'origine biologique, des procédures de manipulation appropriées doivent être respectées. Porter un équipement de protection individuelle approprié pour éviter tout contact avec les yeux et la peau. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales, nationales et européennes.
Conservation	<p>Conservé 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.</p>
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 à l'aide du Dako PT Link. Pour plus de détails, se référer au Guide d'utilisation du PT Link. Des résultats optimaux sont obtenus en prétraitant les tissus à l'aide de la EnVision FLEX, Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (réf. K8005).</p> <p>Coupes incluses en paraffine : Le prétraitement des coupes de tissus fixées au formol et incluses en paraffine est recommandé à l'aide de la procédure 3 en 1 de préparation des échantillons pour Dako PT Link. Une fois la procédure de coloration terminée, les coupes doivent être déshydratées, éclaircies et montées selon une méthode de montage permanent.</p> <p>Coupes déparaffinées : Le prétraitement des coupes tissulaires fixées au formol et incluses en paraffine puis déparaffinées est recommandé à l'aide du Dako PT Link en suivant la même procédure que pour les coupes incluses en paraffine, déjà décrite. Après coloration, un montage aqueux ou permanent des lames est recommandé.</p> <p>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 tissu sur les lames de verre, il est recommandé d'utiliser les lames FLEX IHC Microscope Slides (réf. K8020).</p>
Procédure de coloration	<p>Le système de visualisation recommandé est le système EnVision FLEX, High pH (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (réf. K8010), en remplaçant la High pH Target Retrieval Solution de ce kit par le produit EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (réf. K8005). 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 :</p> <p>Protocole modèle : FLEXRTU2 (volume d'application de 200 µL) ou FLEXRTU3 (volume d'application de 300 µL)</p> <p>Programme automatique : BerEP4 (sans contre-coloration) ou BerEP4H (avec contre-coloration)</p> <p>L'étape Auxiliaire doit être réglée sur "rinse buffer" lors des cycles de coloration comptant 10 lames ou moins de 10 lames. Pour les cycles de coloration de plus de 10 lames, l'étape dite "Auxiliary" doit être réglée sur "none". Cela confirme des temps de lavage comparables.</p> <p>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.</p> <p>Les conditions optimales peuvent varier en fonction de l'échantillon et des méthodes de préparation, et doivent être déterminées par chaque laboratoire individuellement.</p> <p>Il est recommandé d'effectuer une contre-coloration à l'aide d'hématoxyline EnVision FLEX Hematoxylin, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (réf. K8018).</p>

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 Negative Control, Mouse (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (réf. IS750).

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 poumon, 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 poumon 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 basospinocellulaires 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 Autostainer/Autostainer Plus) ist zur Verwendung in der Immunhistochemie (IHC) in Verbindung mit Dako Autostainer-/Autostainer Plus-Geräten 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.

Synonym für das Antigen

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 Plattenepithelien 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, 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 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

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 Wasserlösungen 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 Patientengewebeproben 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. Gewebeproben sollten in Schnitte von ca. 4 µm Stärke geschnitten werden.

Es ist eine Vorbehandlung durch hitzeinduzierte Epitopdemaskierung (HIER-Verfahren) mit dem Dako PT Link erforderlich. Weitere Informationen hierzu siehe PT Link-Benutzerhandbuch. Optimale Ergebnisse können durch Vorbehandlung der Gewebe mit EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Code-Nr. K8005) erzielt werden.

Paraffineingebettete Schnitte: Die Vorbehandlung der formalinfixierten, paraffineingebetteten Schnitte mit dem 3-in-1-Gewebepreparationsverfahren für Dako PT Link wird empfohlen. Nach dem Färben müssen die Schnitte dehydriert, geklärt und unter Verwendung eines permanenten Eindeckmediums auf Objektträgern eingedeckt werden.

Entparaffinierte Schnitte: Eine Vorbehandlung der entparaffinierten, formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitte mit Dako PT Link und nach demselben Verfahren, wie für die paraffineingebetteten Schnitte beschrieben, wird empfohlen. Nach Durchführung des Färbeverfahrens müssen die Objektträger unter Verwendung eines geeigneten permanenten Eindeckmediums eingedeckt werden.

Während der Gewebepreparation oder während des anschließenden immunhistochemischen Färbeverfahrens dürfen die Gewebeschnitte nicht austrocknen. Für eine bessere Haftung der Gewebeschnitte an den Glas-Objektträgern werden FLEX IHC Microscope Slides (Code-Nr. K8020) empfohlen.

Färbeverfahren

Das empfohlene Visualisierungssystem ist EnVision FLEX, High pH (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. K8010), das die High pH Target Retrieval Solution dieses Systems durch EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Code-Nr. K8005), ersetzt. 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)

Autoprogramm: BerEP4 (ohne Gegenfärbung) oder BerEP4H (mit Gegenfärbung)

Bei Färbedurchläufen mit höchstens 10 Objektträgern sollte der „Zusatz“-Schritt auf „Pufferspülung“ eingestellt werden. Für Färbedurchläufe mit > 10 Objektträgern sollte der Zusatz-Schritt auf „Keine“ eingestellt werden. Dies sorgt für 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 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 Negative Control, Mouse, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. IS750).

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

Auswertung der Färbung

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 Magendrüsen, 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 widerspiegelt 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/ Références/ Literatur

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Momburg F, Moldenhauer G, Hämmerling GJ, Möller P. Immunohistochemical study of the expression of a M_r34,000 human epithelium-specific surface glycoprotein in normal and malignant tissues. Cancer Res 1987;47:2883-91.
6. 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	 Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich	 Use by Utiliser avant Verwendbar bis
	In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-vitro-Diagnostikum	 Contains sufficient for <n> tests Contenu suffisant pour <n> tests Inhalt ausreichend für <n> Tests	 Manufacturer Fabricant Hersteller
	Consult instructions for use Voir les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten	 Batch code Numéro de lot Chargenbezeichnung	

Revision 2017.04