

ROS1 (MRQ-68) Rabbit Monoclonal Antibody

Zur Verwendung In Der In Vitro Diagnostik (IVD)

Produktbezeichnung

REF	Beschreibung
469R-94	0,1 ml Konzentrat
469R-95	0,5 ml Konzentrat
469R-96	1,0 ml Konzentrat
469R-97	1,0 ml vorverdünnt einsatzbereit
469R-98	7,0 ml vorverdünnt einsatzbereit

Definition der Symbole

KEY-CODE	Balkencode
P	Vorverdünnung
C	Konzentrat
A	Aszites
E	Überstand
S	Serum
DIL	Verdünnungsbereich des Konzentrats

Verwendungszweck

Dieser Antikörper ist für die Verwendung in der *In Vitro*-Diagnostik bestimmt.

ROS1 (MRQ-68) Rabbit Monoclonal Antibody ist für den Einsatz im Labor zum Nachweis des Proteins ROS1 in formalinfixiertem, paraffineingebettetem Gewebe vorgesehen, das im Rahmen von qualitativen immunhistochemischen (IHC) Tests gefärbt wurde.

Die Ergebnisse, die mithilfe dieses Produkts erlangt werden, müssen von einem qualifizierten Pathologen zusammen mit der relevanten Patienten-Anamnese, anderen Diagnosetests und entsprechenden Protokollen interpretiert werden.

Zusammenfassung und Erklärung

ROS1 (MRQ-68) ist ein Antikörper, der auf die c-terminale Region des ROS1-Proteins abzielt. ROS1 kodiert ein membranöses Protein mit einer einzigen Transmembrandomäne, das eine intrazellulär gerichtete Rezeptor-Tyrosinkinase an der c-terminalen Region sowie eine N-terminale Domäne mit Fibronectin-ähnlichen Wiederholungen umfasst.¹ Es wird angenommen, dass ROS1 während der Entwicklung exprimiert wird; seine normale Aufgabe und Funktionalität wurde jedoch nicht eindeutig festgelegt.² Eine hochregulierte ROS1-Expression tritt in Läsionen infolge einer chromosomalen Neuordnung von ROS1 auf, das an einem von mehreren möglichen charakterisierten Genpartnern andockt, die

konstitutiv exprimiert werden.^{3,4} Von allen charakterisierten Gen-Neuordnungen, die auftreten können, wird die Rezeptor-Tyrosinkinase-Region in der Regel konserviert, wenn sie mit einem vorgelagerten Genpartner gepaart wird.^{3,4} Die Visualisierung von ROS1 hängt vom vorgelagerten Partnergen ab und kann in Plasmamembran, Cytosol oder im Golgi-Apparat beobachtet werden.^{4,5,6} Die Identifizierung der ROS1-Neuordnung könnte bei der Charakterisierung des nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms hilfreich sein.^{2,4,6,7,8} Aufgrund der Hochregulierung der ROS1-Expression bei Translokation kann der immunhistochemische Nachweis von ROS1 als vielversprechende erste Screening-Methode zur Identifizierung von ROS1-Translokationen dienen.⁸

Prinzipien und Verfahren

Der angegebene primäre Antikörper kann als primärer Antikörper für die immunhistochemische Färbung von formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebeabschnitten verwendet werden. Im Allgemeinen erlaubt die immunhistochemische Färbung in Verbindung mit einem an HRP oder alkalische Phosphatase gekoppelten Nachweissystem die Visualisierung von Antigenen durch die aufeinanderfolgende Verwendung eines spezifischen Antikörpers (Primärantikörper) gegen das Antigen, eines Sekundärantikörpers (Link-Antikörper) gegen den Primärantikörper, eines Enzymkomplexes und eines chromogenen Substrats mit dazwischen liegenden Waschschritten. Die enzymatische Aktivierung des Chromogens resultiert in einem sichtbaren Reaktionsprodukt an der Antigenstelle. Die Probe kann dann gegengefärbt und es kann ein Coverslip angewandt werden. Danach kann die Probe gegengefärbt und mit einem Deckglas abgedeckt werden. Das Ergebnis wird unter dem Lichtmikroskop interpretiert.

Materialien und Verfahren

Im Lieferumfang enthaltene Reagenzien

Produktzusammensetzung	
Vorverdünnung: Verdünnt mit	Tris-Puffer, pH 7,3 - 7,7, mit 1% BSA und <0,1% Natriumazid
Konzentrat: Verdünnt mit	Tris-Puffer, pH 7,3 - 7,7, mit 1% BSA und <0,1% Natriumazid
Host	Kaninchen
Isotype	IgG
Empfohlener Verdünnungsbereich für die Arbeitslösung	1:25-1:100
Quelle	Überstand

Auf dem Produktetikett finden Sie chargenspezifische Informationen über folgende Punkte:

1. Antikörper-Immunglobulinkonzentration
2. Quelldetails

Rekonstitution, Mischung, Verdünnung, Titrierung

Der vorverdünnte Antikörper ist gebrauchsfertig und wurde für die Färbung optimiert. Es ist keine Rekonstitution, Mischung, Verdünnung oder Titrierung erforderlich. Der konzentrierte Antikörper wurde für eine Verdünnung mit dem Cell Marque Diamond: Antibody Diluent innerhalb des auf dem Produktetikett angegebenen Verdünnungsbereichs optimiert.

Benötigte, jedoch nicht gelieferte Materialien und Reagenzien

Die folgenden Reagenzien und Materialien können für das Färbeverfahren erforderlich sein, sind aber nicht im Lieferumfang des Primäntikörpers enthalten:

1. Positive und negative Kontrollgewebe
2. Mikroskop-Objekträger, positiv geladen
3. Trockenschrank mit der Leistung zur Aufrechterhaltung einer Temperatur von 53–65 °C
4. Färbeschalen oder Wannen
5. Timer
6. Xylol oder Xylolersatz
7. Ethanol oder Reagenzalkohol
Hinweis: Cell Marques einstufige Vorbehandlung, Trilogy™ (Kat.-Nr. 920P-06) kann die Schritte 6 und 7 oben ersetzen.
8. Deionisiertes oder destilliertes Wasser
9. Gerät zum Erhitzen, z. B. elektrischer Drucktopf zur Gewebevorbehandlung
10. Nachweissystem, z. B. HiDef Detection™ HRP Polymer System (Kat.-Nr. 954D-20) oder HiDef Detection™ Alk Phos Polymer System (Kat.-Nr. 962D-20)
11. Chromogen, z. B. DAB Substrate Kit (Kat.-Nr. 957D-20) oder Permanent Red Chromogen Kit (Kat.-Nr. 960D-10)
12. TBS IHC Wash Buffer + Tween® 20 (Kat.-Nr. 935B-09)
13. Hematoxylin oder Gegenfärbung
14. Verdünnungsmittel für Antikörper, z. B. Diamond: Antibody Diluent (Kat.-Nr. 938B-05) oder Emerald: Antibody Diluent (Kat.-Nr. 936B-08)
15. Peroxide Block (Kat.-Nr. 925B-05) zum Gebrauch mit HRP
16. Avidin-Biotin Blocking Reagents zum Gebrauch mit Streptavidin-Biotin Nachweis
17. Negatives Kontrollreagenz (Kat.-Nr. 939B-02 universell)
18. Mounting Medium
19. Deckgläser
20. Lichtmikroskop (40–400 fache Vergrößerung)

Lagerung und Handhabung

Bei 2–8 °C lagern. Nicht einfrieren.

Um die ordnungsgemäße Abgabe der Reagenzien und die Stabilität des Antikörpers zu erhalten, nach jedem Durchlauf Spender-Verschlusskappe wieder aufsetzen und die Flasche sofort in aufrechter Position in den Kühlschrank stellen.

Jedes Antikörper-Reagenz ist mit einem Verfallsdatum versehen. Bei korrekter Aufbewahrung ist das Reagenz bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil. Reagenz nach Ablauf des Verfallsdatums für die angegebene Lagermethode nicht mehr verwenden.

Es gibt keine offensichtlichen Anzeichen bei Instabilität der Reagenzien. Aus diesem Grund müssen immer gleichzeitig positive und negative Kontrollgewebe zusammen mit

unbekannten Proben gefärbt werden. Kontaktieren Sie den Technischen Support von Cell Marque, wenn der Verdacht einer A1 Reagenzieninstabilität besteht.

Entnahme und Vorbereitung der Proben zur Analyse

Entsprechend der Laborroutinemethode aufgearbeitete, neutral-gepufferte formalinfixierte, paraffineingebettete Gewebeproben sind zur Verwendung mit diesem Primäntikörper geeignet, wenn sie in Verbindung mit Cell Marque-Nachweisskits eingesetzt werden (siehe Abschnitt „Nicht im Lieferumfang enthaltene erforderliche Materialien und Reagenzien“). Hinweis: Mit Cell Marque kann nur die Leistung bei menschlichem Gewebe bewertet werden. Das empfohlene Gewebefixiermaterial ist 10 % neutral-gepuffertes Formalin. Infolge verlängerter Gewebefixierung oder besonderer Prozesse wie einer Dekalzifikation bei der Vorbereitung des Knochenmarks können unterschiedliche Ergebnisse auftreten.

Jeder Schnitt muss die geeignete Stärke aufweisen (ca. 3 µm) und auf einen positiv geladenen Glasobjekträger aufgebracht werden. Die mit Gewebeschnitten bestückten Objekträger können mindestens 2 Stunden (nicht länger als 24 Stunden) bei 53–65 °C im Ofen angebacken werden.

Warnhinweise und Vorsichtsmassnahmen

1. Treffen Sie beim Umgang mit den Reagenzien angemessene Vorsichtsmaßnahmen. Verwenden Sie beim Umgang mit mutmaßlichen Karzinogenen oder toxischen Materialien Einweg-Handschuhe und Laborkittel (Beispiel: Xylen).
2. Vermeiden Sie den Kontakt der Reagenzien mit den Augen oder Schleimhäuten. Bei Kontakt von Reagenzien mit empfindlichen Körperteilen mit reichlich Wasser ausspülen.
3. Patientenproben und alle Materialien, die mit diesen in Berührung gekommen sind, sind als biogefährliche Materialien zu behandeln und müssen unter Einhaltung der entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen entsorgt werden. Niemals mit dem Mund pipettieren.
4. Vermeiden Sie eine mikrobielle Kontamination der Reagenzien, da dies zu unkorrekten Ergebnissen führen könnte.
5. Der Benutzer muss Inkubationszeiten und Temperaturen überprüfen.
6. Die vorverdünnten, gebrauchsfertigen Reagenzien sind optimal verdünnt, so dass eine weitere Verdünnung zu einer geringeren Antigenfärbung führen könnte.
7. Die konzentrierten Reagenzien können auf der Grundlage der Validierung durch den Benutzer optimal verdünnt werden. Jedes verwendete Verdünnungsmittel, das hier nicht speziell empfohlen wird, muss ebenfalls durch den Benutzer sowohl hinsichtlich seiner Kompatibilität als auch seiner Auswirkungen auf die Stabilität validiert werden.
8. Bei anweisungsgemäßer Verwendung wird dieses Produkt nicht als Gefahrstoff eingestuft. Das Konservierungsmittel in dem Reagenz ist weniger als 0,1 % Natriumazid und erfüllt bei der angegebenen Konzentration nicht die Kriterien für einen Gefahrstoff gemäß OSHA (USA). Siehe SDS.
9. Der Benutzer muss jegliche von den in der Packungsbeilage angegeben abweichenden Lagerungsbedingungen validieren.
10. Das Verdünnungsmittel kann Rinderserumalbumin enthalten und der Überstand kann Rinderserum enthalten. Fötale Rinderserum enthaltende Produkte und Rinderserumalbumin enthaltende Produkte werden von kommerziellen Anbietern gekauft. Ursprungszertifikate der für diese Produkte verwendeten tierischen Quelle sind bei Cell Marque in den Akten. Die Zertifikate bestätigen, dass die Rinderquellen aus Ländern mit einem unerheblichen BSE-Risiko stammen und nennen Rinderquellen aus den USA und Kanada.

11. Wie bei allen von biologischen Quellen stammenden Produkten sind entsprechende Verfahren zu befolgen.

Gebrauchsanweisung

Empfohlene Färbeprotokolle für den angegebenen primären Antikörper:

HiDef HRP:

HiDef Detection™ HRP Polymer System (Kat.-Nr. 954D-20)

1. Technik der Epitopdemaskierung: Heat induced epitope retrieval (HIER) in einem Druckkocher. Temperatur des Druckkochers (°C): 110. Druckkocher Zeit (Minuten): 15. Reagenz für die Epitopdemaskierung: Trilogy
2. Mit deionisiertem Wasser spülen
3. Mit TBS-T-Puffer spülen
4. Peroxid-Block Inkubationszeit (Minuten): 10
5. Mit deionisiertem Wasser spülen
6. Mit TBS-T-Puffer spülen
7. Inkubationszeit für antikörper (Minuten): 10
8. Mit deionisiertem Wasser spülen
9. 3 Mal wiederholen: Mit TBS-T-Puffer waschen (Minuten): 5
10. HiDef HRP Detection Amplifier Inkubationszeit (Minuten): 10
11. Mit deionisiertem Wasser spülen
12. 3 Mal wiederholen: Mit TBS-T-Puffer waschen (Minuten): 5
13. HiDef HRP Detection Polymer Detector Inkubationszeit (Minuten): 10
14. Mit deionisiertem Wasser spülen
15. 3 Mal wiederholen: Mit TBS-T-Puffer waschen (Minuten): 5
16. Mit deionisiertem Wasser spülen
17. Inkubationszeit für DAB (Minuten): 5
18. Gegenfärbung mit Hämatoxylin
19. Dehydrieren und Deckglas auflegen

HiDef Alk Phos:

HiDef Detection™ Alk Phos Polymer System (Kat.-Nr. 962D-20)

1. Technik der Epitopdemaskierung: Heat induced epitope retrieval (HIER) in einem Druckkocher. Temperatur des Druckkochers (°C): 110. Druckkocher Zeit (Minuten): 15. Reagenz für die Epitopdemaskierung: Trilogy
2. Mit deionisiertem Wasser spülen
3. Mit TBS-T-Puffer spülen
4. Inkubationszeit für antikörper (Minuten): 10
5. Mit deionisiertem Wasser spülen
6. 3 Mal wiederholen: Mit TBS-T-Puffer waschen (Minuten): 5
7. HiDef AP Detection Amplifier Inkubationszeit (Minuten): 10
8. Mit deionisiertem Wasser spülen

9. 3 Mal wiederholen: Mit TBS-T-Puffer waschen (Minuten): 5
10. HiDef AP Detection Polymer Detector Inkubationszeit (Minuten): 10
11. Mit deionisiertem Wasser spülen
12. 3 Mal wiederholen: Mit TBS-T-Puffer waschen (Minuten): 5
13. Mit deionisiertem Wasser spülen
14. Permanent Red Inkubationszeit (Minuten): 15
15. Gegenfärbung mit Hämatoxylin
16. Dehydrieren und Deckglas auflegen

Verfahren Zur Qualitätskontrolle

Positive Gewebekontrolle

Zusammen mit jedem Färbedurchlauf muss eine positive Gewebekontrolle mitlaufen. In diesem Gewebe können Zell- oder Gewebestandteile enthalten sein, die sich sowohl positiv als auch negativ färben und damit als Positiv- wie auch als Negativkontrolle verwendet werden können. Die Kontrollprobe muss aus frischem Gewebe einer Autopsie, Biopsie oder einem chirurgischen Eingriff bestehen und so schnell wie möglich auf identische Weise wie die Probenschnitte präpariert oder fixiert werden. Die Verwendung eines Kontrollschnitts, der auf andere Weise als das Testpräparat fixiert oder präpariert worden ist, dient der Kontrolle für alle Reagenzien und Verfahrensschritte, mit Ausnahme der Fixierung und Gewebepreparierung.

Eine Probe mit schwach positiver Färbung ist zur optimalen Qualitätskontrolle und zur Erkennung von geringfügigerem Reagenzienabbau besser geeignet. Eine positive Gewebekontrolle für den angegebenen primären Antikörper kann folgendes umfassen:

Positive Gewebekontrolle	
Gewebe	Visualisierung
ROS1+ Lungenadenokarzinome	Zytoplasmatisch, Zellmembran

Nachweislich positive Gewebekontrollen dürfen nur zur Kontrolle der korrekten Leistung von verarbeitetem Gewebe und Testreagenzien verwendet werden und nicht als Hilfe bei der Erstellung einer spezifischen Diagnose von Patientenproben. Wenn mit der positiven Gewebekontrolle keine angemessene positive Färbung nachgewiesen werden kann, müssen die Ergebnisse mit den Testpräparaten als ungültig gewertet werden.

Negative Gewebekontrolle

Für die negative Gewebekontrolle kann das gleiche Gewebe verwendet werden wie für die Positivkontrolle. Die Vielzahl der in den meisten Gewebeschnitten vorkommenden Zellarten bietet Stellen zur internen Negativkontrolle, die allerdings vom Benutzer überprüft werden müssen. Aufgabe der nichtfärbenden Komponenten ist es, das Fehlen spezifischer Färbungen nachzuweisen und auf unspezifische Hintergrundfärbungen hinzuweisen. Bei spezifischer Färbung der negativen Gewebekontrolle müssen die mit den Patientenproben erzielten Ergebnisse als ungültig gewertet werden.

Unerklärliche Abweichungen

Unerklärliche Abweichungen bei Kontrollen sollten unverzüglich dem Technischen Support von Cell Marque mitgeteilt werden. Wenn die Ergebnisse der Qualitätskontrolle die Spezifikationen nicht erfüllen, sind die Patientenergebnisse ungültig. Siehe Abschnitt

„Fehlerbehebung“ in dieser Packungsbeilage. Identifizieren und korrigieren Sie das Problem, und wiederholen Sie anschließend das gesamte Verfahren mit den Patientenproben.

Negatives Kontrollreagenz

Für jede Probe muss ein negatives Kontrollreagenz mitlaufen, um die Interpretation der Ergebnisse zu unterstützen. Ein negatives Kontrollreagenz wird anstelle der Primärantikörperkontrolle zur Bewertung von unspezifischer Färbung durchgeführt. Der Objektträger sollte mit negativem Kontrollreagenz behandelt werden, das den Wirtsspezies des Primärantikörpers entspricht und idealerweise über dieselbe IgG-Konzentration verfügt. Die Inkubationszeit des negativen Kontrollreagenzes sollte der Inkubationszeit des primären Antikörpers entsprechen.

Interpretation der Ergebnisse

Das Immunfärbeverfahren hat ein gefärbtes Reaktionsprodukt zur Folge, das an den vom Primärantikörper lokalisierten Antigenstellen zu Präzipitat führt. Weitere Informationen zu den zu erwartenden Farbreaktionen sind der Packungsbeilage des entsprechenden Detektionssystems zu entnehmen. Ein mit immunohistochemischen Verfahren vertrauter qualifizierter Pathologe muss vor der Interpretation der Ergebnisse die positiven und negativen Gewebekontrollen evaluieren.

Positive Gewebekontrolle

Die gefärbte positive Gewebekontrolle muss zuerst untersucht werden, um zu gewährleisten, dass alle Reagenzien ordnungsgemäß funktionieren. Ein ordnungsgemäß gefärbtes Reaktionsprodukt in den Zielzellen ist Anzeichen für eine positive Reaktionsfähigkeit. Weitere Informationen zu den zu erwartenden Farbreaktionen sind der Packungsbeilage des Detektionssystems zu entnehmen. In Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der Wirkungsstärke des verwendeten Hämatoxylins führt die Gegenfärbung zu einer hell- bis dunkelblauen Färbung der Zellkerne. Übermäßige oder unvollständige Gegenfärbung kann die korrekte Interpretation der Ergebnisse beeinträchtigen. Wenn mit der positiven Gewebekontrolle keine angemessene positive Färbung nachgewiesen werden kann, müssen die Ergebnisse mit den Testpräparaten als ungültig bewertet werden.

Negative Gewebekontrolle

Die negative Gewebekontrolle wird nach der positiven Gewebekontrolle untersucht, um zu überprüfen, ob die spezifische Anfärbung des Zielantigens mit dem Primärantikörper korrekt erfolgt ist. Nicht vorhandene spezifische Färbung in der negativen Gewebekontrolle bestätigt die fehlende unspezifische Kreuzreaktivität mit Zellen oder Zellkomponenten. Bei spezifischer Färbung der negativen Gewebekontrolle müssen die mit den Patientenproben erzielten Ergebnisse als ungültig bewertet werden. Bei Auftreten von unspezifischer Färbung ist das Erscheinungsbild diffus. In Gewebeschnitten, die nicht optimal fixiert wurden, kann es auch zum sporadischen Auftreten von leichter Färbung von Bindegewebe kommen. Zur Interpretation der Färbegergebnisse sollten intakte Zellen verwendet werden. Nekrotische oder degenerierte Zellen weisen eine unspezifische Färbung auf.

Patientengewebe

Die Untersuchung der Patientenproben erfolgt zum Schluss. Die Intensität der positiven Färbung muss unter Berücksichtigung der Hintergrundfärbungen der negativen Reagenzkontrolle bewertet werden. Wie bei jedem immunohistochemischen Test bedeutet ein negatives Ergebnis lediglich, dass das fragliche Antigen nicht nachgewiesen wurde, nicht jedoch, dass das Antigen in den untersuchten Zellen/Geweben nicht vorhanden ist. Eventuell kann zur Unterstützung bei der Identifikation von falsch-negativen Reaktionen ein Antikörper-Panel verwendet werden (siehe Abschnitt „Zusammenfassung der erwarteten Ergebnisse“). Bei der Interpretation aller immunohistochemischen Ergebnisse sollte die

Morphologie aller Gewebeproben zusätzlich auch mit Hilfe eines mit Hämatoxylin und Eosin gefärbten Schnittes untersucht werden. Die morphologischen Befunde der Patientenproben und die dazugehörigen klinischen Daten müssen von einem qualifizierten Pathologen interpretiert werden.

Einschränkungen

1. Die antikörperfarbe hat keinen einfluss auf das ergebnis.
2. Dieses Reagenz ist nur für den professionellen Gebrauch, da Immunhistochemie ein aus mehreren Schritten bestehendes Verfahren ist, das eine spezielle Schulung bei der Auswahl der geeigneten Reagenzien, Gewebe, Fixierung und Aufbereitung, der richtigen Vorbereitung des immunhistochemischen Objektträgers und Interpretation der Färbungsergebnisse erfordert.
3. Nur für den Laborgebrauch.
4. Nur für die Verwendung in der *In vitro*-Diagnostik.
5. Die Gewebefärbung hängt von der Handhabung und Aufbereitung des Gewebes vor dem Färben ab. Unsachgemäßes Fixieren, Einfrieren, Auftauen, Waschen, Trocknen, Erhitzen, Schneiden oder Kontamination mit anderen Geweben oder Flüssigkeiten kann zu Artefakten, zum Einschluss von Antikörpern oder zu falsch-negativen Ergebnissen führen. Inkonsistente Ergebnisse können die Folge von Abweichungen bei Fixierungs- und Einbettungsmethoden sowie von dem Gewebe inhärenten Unregelmäßigkeiten sein.
6. Übermäßige oder unvollständige Gegenfärbung kann die korrekte Interpretation der Ergebnisse beeinträchtigen.
7. Die klinische Interpretation jeglicher positiven Färbung oder Nichtfärbung muss unter Berücksichtigung der klinischen Anamnese, Morphologie, anderer histopathologischer Kriterien sowie weiterer diagnostischer Tests evaluiert werden. Dieser Antikörper ist für den Gebrauch in einem Antikörper-Panel, falls zutreffend, bestimmt. Es liegt in der Verantwortung eines qualifizierten Pathologen, mit dem Färbeverfahren und der Vorbereitung der Objektträger (einschließlich Antikörper, Reagenzien und Diagnose-Panels) vertraut zu sein. Die Färbung muss in einem zertifizierten und lizenzierten Labor unter Aufsicht eines Pathologen vorgenommen werden, der für die Überprüfung der gefärbten Objektträger sowie die Gewährleistung der adäquaten positiven und negativen Kontrollen verantwortlich ist.
8. Cell Marque Antikörper und Reagenzien werden in der optimalen Konzentration zur Verwendung entsprechend der Gebrauchsanweisung geliefert. Abweichungen von den empfohlenen Testverfahren können die erwarteten Ergebnisse ungültig machen. Es müssen entsprechende Kontrollen durchgeführt und protokolliert werden. Die Benutzer tragen unter allen Umständen unbedingt die Verantwortung für die Interpretation der Patientenergebnisse.
9. Cell Marque bietet Primärantikörper in konzentrierter Form an, damit der Benutzer diese später entsprechend seiner Entscheidung für und unter Einhaltung der geeigneten Validierungstechniken optimal für den jeweiligen Gebrauch verdünnen kann. Die Verwendung von anderen als den hier empfohlenen Verdünnungsmitteln muss von den Benutzern validiert werden. Nach erfolgter Validierung des Primärantikörpers kann jede Abweichung von den empfohlenen Testverfahren die erwarteten Ergebnisse ungültig machen. Es müssen entsprechende Kontrollen durchgeführt und protokolliert werden. Die Benutzer tragen unter allen Umständen unbedingt die Verantwortung für die Interpretation der Patientenergebnisse.
10. Dieses Produkt ist nicht für die Verwendung bei der Durchflusszytometrie bestimmt.
11. Bei Geweben, die im Vorfeld nicht getestet wurden, können unerwartete Reaktionen mit den verwendeten Reagenzien auftreten. Aufgrund der biologischen Schwankungen bei Antigenexpression in Neoplasmen oder anderen pathologischen Geweben können

unerwartete Reaktionen auch bei getesteten Gewebegruppen nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Wenden Sie sich mit einer Dokumentation mutmaßlicher, unerwarteter Reaktionen an den Technischen Support von Cell Marque.

12. Gewebe von mit dem Hepatitis B-Virus infizierten Personen und die das Hepatitis B-Oberflächenantigen (HBsAg) enthalten, können eine nichtspezifische Färbung mit Meerrettichperoxidase aufweisen.
13. Bei Verwendung in Verfahren zur Blockierung können normale Seren von derselben tierischen Quelle wie die Sekundäntisera aufgrund der Wirkung von Autoantikörpern oder natürlichen Antikörpern zu falsch-negativen oder falsch-positiven Ergebnissen führen.
14. Falsch-positive Ergebnisse können aufgrund der nichtimmunologischen Bindung von Proteinen oder Substratreaktionsprodukten sichtbar werden. Sie können auch durch die Aktivität der Pseudoperoxidase (Erythrozyten), endogenen Peroxidase (Cytochrom C) oder des endogenen Biotins verursacht werden (Beispiel: Leber, Gehirn, Brust, Niere), je nach Art der verwendeten Immunfärbetechnik.
15. Wie bei jedem immunhistochemischen Test bedeutet ein negatives Ergebnis lediglich, dass das fragliche Antigen nicht nachgewiesen wurde, nicht jedoch, dass das Antigen in den untersuchten Zellen/Geweben nicht vorhanden ist.
16. Die vorverdünnten Antikörperprodukte sind als gebrauchsfertige Produkte optimiert. Aufgrund möglicher Unterschiede bei der Gewebefixierung und -aufbereitung ist es ggf. erforderlich, die Inkubationszeit der Primäntikörper bei einzelnen Proben zu erhöhen oder zu senken.
17. Der Antikörper in Kombination mit Detektionssystemen und Zubehör erkennt Antigene, die die routinemäßige Formalinfixierung, Gewebepreparation und das Schneiden überleben. Benutzer, die von den empfohlenen Testverfahren abweichen, haften, wie das unter allen anderen Umständen auch der Fall wäre, selbst für die Interpretation und Validierung der Patientenergebnisse.

Zusammenfassung der erwarteten Ergebnisse

Siehe folgende Reaktionstabellen:

Normale Studie			
Gewebe	Anzahl gefärbt (+)	Gesamtzahl	Anmerkungen
Großhirn	0	3	
Kleinhirn	0	3	
Adrenaldrüse	3	3	Kortex: schwach zytoplasmatisch, fokal
Eierstock	0	3	
Bauchspeicheldrüse	0	3	
Nebenschilddrüse	0	3	
Hypophyse	0	3	
Hoden	0	3	
Schilddrüse	0	3	

Normale Studie			
Gewebe	Anzahl gefärbt (+)	Gesamtzahl	Anmerkungen
Brust	0	3	
Milz	0	3	
Tonsille	1	3	Interfollikuläre Zellen – seltene Makrophagen: schwach, zytoplasmatisch
Thymus	0	3	
Knochenmark	0	3	
Lunge	3	3	3/3 Bronchiolen: schwach bis mittelstark, zytoplasmatisch; 2/3 Alveolen: schwach bis mittelstark, zytoplasmatisch; 1/3 Makrophagen: schwach, zytoplasmatisch
Herz	0	3	
Speiseröhre	0	3	
Magen	0	3	
Dünndarm	0	3	
Darm	0	3	1/3 Mukosa – seltene Makrophagen: schwach zytoplasmatisch (nicht als positiv eingestuft)
Leber	0	3	
Speicheldrüse	0	3	
Niere	0	3	
Prostata	0	3	
Uterus	0	3	
Gebärmutterhals	0	3	
Skelettmuskel	0	3	
Haut	1	3	Talgdrüsen: schwach zytoplasmatisch
Periphere Nerven	0	3	
Mesothel	0	3	
Samenbläschen	0	1	
Lymphknoten	0	1	

Krankheitsgewebestudie			
Gewebe	Anzahl gefärbt (+)	Gesamtzahl	Anmerkungen
Lungenadenokarzinom	4	37	Starke, diffuse Färbung, die als positiv eingestuft wird

3 Fälle von Lungenadenokarzinomen wurden basierend auf der zuvor festgelegten ROS1-Positivität speziell für den Einschluss in diese Studie ausgewählt. 1/34 der Fälle war nach dem Screening ROS1-positiv, 4/37 der Fälle waren nach Einschluss der zuvor festgelegten ROS1-positiven Fälle positiv.

Fehlersuche

- Falls die positive Kontrolle eine schwächere Färbung als erwartet aufweist, sollten andere positive Kontrollen, die im selben Färbedurchlauf enthalten waren, überprüft werden, um zu bestimmen, ob dies auf den primären Antikörper oder auf eines der üblichen Sekundärreagenzien zurückzuführen ist.
- Falls die Positivkontrolle negativ ist, sollten andere Positivkontrollen aus demselben Durchlauf geprüft werden, um festzustellen, ob die Ursache im Zusammenhang mit dem Primärantikörper oder einem der üblichen Sekundärreagenzien steht. Gewebe können unsachgemäß gewonnen, fixiert oder entparaffiniert worden sein. Entnahme, Lagerung und Fixierung der Gewebeproben müssen sachgemäß ausgeführt werden.
- Wenn es zu einer übermäßigen Hintergrundfärbung kommt, können hohe Spiegel endogenen Biotins vorliegen. Es sollte ein Verfahren zur Blockierung von Biotin durchgeführt werden, es sei denn, dass ein Biotin-freies Detektionssystem verwendet wird. In diesem Fall würde jegliches vorhandenes Biotin nicht zu einer Hintergrundfärbung beitragen.
- Wenn nicht das gesamte Paraffin entfernt wurde, sollte das Entparaffinierungsverfahren wiederholt werden.
- Wenn die Gewebeschnitte vom Objektträger abgewaschen werden, sollten die Objektträger überprüft werden, um sicherzustellen, dass sie positiv geladen sind. Weitere Möglichkeiten, die sich negativ auf die Gewebefärbung auswirken könnten sind unzureichendes Trocknen des Gewebeschnittes auf dem Objektträger vor dem Färben oder eine Formalinfixierung, die nicht ordnungsgemäß neutral-gepuffert wurde. Auch die Dicke der Gewebeschnitte könnte dazu beitragen.

Zur Mängelbehebung ziehen Sie bitte die Gebrauchsanweisung heran oder kontaktieren Sie den Technischen Support von Cell Marque unter techsupport@cellmarque.com.

Literatur

- Matsushima H, et al. Human c-ros-1 gene homologous to the v-ros sequence of UR2 sarcoma virus encodes for a transmembrane receptorlike molecule. *Molecular and Cellular Biology* 1986 6(8):3000-3004.
- Bubendorf L, et al. Testing for ROS1 in non-small cell lung cancer: a review with recommendations. *Virchows Arch* 2016 469:489-503.
- Gainor JF, et al. Novel targets in non-small cell lung cancer: ROS1 and RET fusions. *Oncologist* 2013 18(7): 865-875.
- Rossi G, et al. Detection of ROS1 rearrangement in non-small cell lung cancer: current and future perspectives. *Dovepress* 2017;8 45-55.

- Charest A, et al. Oncogenic targeting of an activated tyrosine kinase to the Golgi apparatus in a glioblastoma. *PNAS* 2003 100(3):916-921.
- Sholl LM, et al. ROS1 Immunohistochemistry for detection of ROS1-rearranged lung adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 2013 37:1441-1449.
- Davare MA, et al. Foretinib is a potent inhibitor of oncogenic ROS1 fusion proteins. *PNAS* 2013 110(48):19519-19524.
- Viola P, et al. A validation study for the use of ROS1 Immunohistochemical staining in screening for ROS1 translocations. *Journal of Thoracic Oncology* 2016 11(7): 1029-1039.

Haftungsausschluss

*TWEEN ist eine eingetragene Handelsmarke der Croda International PLC.

©2020 Sigma-Aldrich Co. LLC. Alle Rechte vorbehalten. SIGMA-ALDRICH ist eine in den USA und anderen Ländern eingetragene Handelsmarke der Sigma-Aldrich Co. LLC. Cell Marque, Trilogy, Declere und HiDef Detection sind Handelsmarken der Sigma-Aldrich Co. LLC oder ihrer Tochtergesellschaften.



www.cellmarque.com



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



EMERGO EUROPE

Prinsessegracht 20, 2514 AP The Hague, The Netherlands



CM Template #2.4

Implementation date 29 Oct 2020