

HƯỚNG DẪN SỬ DỤNG BẰNG TIẾNG VIỆT

Tên cơ sở công bố lưu hành:

Công ty TNHH DH Holding Việt Nam

Địa chỉ: Phòng 037 (037D) - CENTEC BUSINESS CENTER, lầu 4, 72-74 đường Nguyễn Thị Minh Khai, Phường Xuân Hòa, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

Xác nhận tài liệu đính kèm.

Novocastra™ Lyophilized Mouse Monoclonal Antibody Utrophin (N-terminus)

Mã sản phẩm: NCL-DRP2

Mục đích sử dụng

Chỉ dùng cho các chẩn đoán *in vitro*.

NCL-DRP2 được sử dụng để định tính protein Utrophin (đầu N) bằng kính hiển vi quang học thông qua kỹ thuật hóa mô miễn dịch. Giải thích lâm sàng dựa trên sự hiện diện hoặc vắng mặt của kết quả nhuộm màu nên kết hợp với các nghiên cứu hình thái sử dụng các đối chứng thích hợp. Ngoài ra, nên đánh giá kết quả này cùng bối cảnh tiền sử lâm sàng của bệnh nhân và các xét nghiệm chẩn đoán khác bởi bác sĩ giải phẫu bệnh có chuyên môn.

Nguyên lý xét nghiệm

Kỹ thuật hóa mô miễn dịch (IHC) giúp quan sát kháng nguyên thông qua việc áp dụng tuần tự một kháng thể đặc hiệu liên kết kháng nguyên (kháng thể sơ cấp), sau đó, một kháng thể thứ cấp liên kết kháng thể sơ cấp và một phức hợp enzyme với cơ chất tạo màu, xen kẽ với các bước rửa. Vị trí của kháng nguyên có thể quan sát thông qua kết quả màu khi được hoạt hóa bởi enzyme. Mẫu sau đó có thể được nhuộm đổi màu và phủ phim kính. Kết quả được phân tích bằng kính hiển vi quang học và hỗ trợ chẩn đoán phân biệt các quá trình bệnh lý sinh lý, có thể liên quan hoặc không liên quan đến một kháng nguyên cụ thể.

Kháng thể dòng

DRP3/20C5

Chất sinh miễn dịch

Protein dung hợp chứa 261 axit amin đầu tiên của trình tự gen DMDL đã được công bố.

Tính đặc hiệu

Kháng thể nhận biết vùng đầu N của protein utrophin (còn được gọi là protein liên quan dystrophin hay "DRP") - là đồng đẳng của dystrophin ở người. Kháng thể cũng có phản ứng chéo với utrophin trong mẫu mô của chuột và chó. Các loài động vật khác chưa được thử nghiệm.

Thành phần thuốc thử

NCL-DRP2 là dịch nuôi cấy mô đông khô chứa chất bảo quản là natri azide. Kỹ thuật viên cần hoàn nguyên với đúng thể tích nước cất vô trùng được ghi trên nhãn lọ.

Lớp kháng thể

IgG1

Nồng độ Protein tổng số

Protein tổng số

Tham khảo nhãn lọ để biết nồng độ protein tổng số cụ thể theo lô.

Nồng độ kháng thể

Lớn hơn hoặc bằng 126,0 mg/L được xác định bằng phương pháp ELISA. Tham khảo nhãn lọ để biết nồng độ kháng thể cụ thể theo lô.

Khuyến nghị Sử dụng

Hóa mô miễn dịch (xem **Phương pháp**) cho các lát cắt mô đông lạnh. Nồng độ pha loãng đề xuất: 1:2–1:10 trong 60 phút ở 25 °C. Thông tin này chỉ mang tính chất tham khảo. Vì vậy, kỹ thuật viên nên tự xác định nồng độ pha loãng tối ưu cho phòng xét nghiệm.

Bảo quản và Độ ổn định

Bảo quản lọ kháng thể chưa mở nắp ở nhiệt độ 2–8 °C. Trong những điều kiện này, hiệu năng của thuốc thử không bị suy giảm đáng kể cho đến ngày hết hạn ghi trên nhãn lọ. Không sử dụng kháng thể sau ngày hết hạn. Kháng thể sau khi hoàn nguyên ổn định ít nhất hai tháng khi được bảo quản ở nhiệt độ 2–8 °C. Để bảo quản lâu dài, nên chia kháng thể đã hoàn nguyên thành các phần nhỏ (aliquots) và bảo quản đông ở -20°C (Lưu ý không sử dụng tủ đông có chế độ tự động xả đông). Tránh thực hiện bước đông và rã đông nhiều lần. Chuẩn bị dung dịch pha loãng vào ngày sử dụng. Bảo quản về nhiệt độ 2–8 °C ngay sau khi sử dụng. Kỹ thuật viên phải kiểm tra và chịu trách nhiệm nếu các điều kiện bảo quản khác với những điều kiện nêu trên.

Chuẩn bị mẫu

Bảo quản các mẫu mô trong isopentan được làm lạnh bằng nitơ lỏng ở ngăn đông (xem Cảnh báo và Thận trọng). Các mẫu bệnh phẩm không cần cố định thêm nhưng nên được nhúng vào hợp chất OCT™ (Sakura, Mã sản phẩm: Tissue-Tek 4583).

Cảnh báo và Thận trọng

Các kháng thể đồng khô Novocastra

Chứa hỗn hợp:
Natri azit (<10%), Natri benzylpenicillin (<10%), Streptomycin sulfat (<10%).
Các từ tín hiệu: Nguy hiểm.

H302: Có hại nếu nuốt phải.
H317: Có thể gây phản ứng dị ứng da.
H334: Có thể gây dị ứng, hen suyễn hoặc khó thở nếu hít phải.
H411: Gây độc lâu dài đối với sinh vật thủy sinh.
EUH032: Tiếp xúc với axit sẽ giải phóng khí rất độc.

P261: Tránh hít phải bụi/khói/khí/sương/hoi/giọt lỏng.
P264: Rửa tay kỹ sau khi thao tác.
P270: Không ăn, uống hoặc hút thuốc khi thao tác với thuốc thử này.
P272: Không mang quần áo bảo hộ nhiễm bẩn ra khỏi nơi thao tác.
P273: Tránh thải ra môi trường.
P280: Đeo găng tay/quần áo bảo hộ/kính bảo hộ/mặt nạ.
P284: Dùng trường hợp thông gió không đủ, hãy đeo thiết bị bảo vệ đường hô hấp.
P301+312: NẾU NUỐT PHẢI: Liên hệ TRUNG TÂM KIỂM SOÁT CHẤT ĐỘC/bác sĩ/nếu kỹ thuật viên cảm thấy không khỏe.
P302+352: NẾU ĐÍNH VÀO DA: Rửa sạch bằng nhiều xà phòng và nước.
P304+340: NẾU HÍT PHẢI: Đưa nạn nhân ra nơi thoáng khí và giữ tư thế thoải mái để thở.
P330: Súc miệng.
P333+313: Nếu bị kích ứng da hoặc phát ban: Tìm kiếm tư vấn/chăm sóc y tế.
P342+311: Nếu gặp các triệu chứng về đường hô hấp: Liên hệ TRUNG TÂM KIỂM SOÁT CHẤT ĐỘC/bác sĩ.
P362+364: Cởi bỏ quần áo bị nhiễm bẩn và giặt sạch trước khi sử dụng lại.
P391: Thu gom thuốc thử bị đổ.
P501: Vứt bỏ thuốc thử/lọ thuốc thử ở điểm thu gom chất thải nguy hại hoặc chất thải đặc biệt.

Thuốc thử này được điều chế từ dịch nuôi cấy tế bào và là sản phẩm có nguồn gốc sinh học, do đó cần được xử lý với các biện pháp phòng ngừa thích hợp. Sản phẩm có chứa sodium azide. Phiếu an toàn hóa chất (MSDS) có sẵn khi yêu cầu hoặc có thể tải về từ trang web www.LeicaBiosystems.com. Cần tuân thủ các quy định của liên bang, tiểu bang hoặc địa phương về việc xử lý các thành phần có khả năng độc hại.

Các mẫu, trước và sau khi cố định, và tất cả các vật liệu tiếp xúc với chúng, phải được xử lý như thành phần có khả năng lây nhiễm và phải được xử lý bằng các biện pháp phòng ngừa thích hợp.¹ Không hút thuốc thử bằng pipet và tránh để thuốc thử và mẫu tiếp xúc với da và niêm mạc. Rửa sạch bằng nhiều nước nếu thuốc thử hoặc mẫu tiếp xúc với vùng nhạy cảm. Tham vấn y tế.

Có thể xảy ra hiện tượng nhuộm không đặc hiệu nếu thuốc thử nhiễm khuẩn.

Thời gian ủ hoặc nhiệt độ ủ không đúng chỉ dẫn có thể cho kết quả sai lệch. **Bắt cứ sự thay đổi nào như vậy cần phải được xác minh bởi kỹ thuật viên.**

Nitơ lỏng với nhiệt độ cực thấp có thể gây bỏng lạnh, do đó cần sử dụng trang phục bảo hộ bao gồm găng tay và tấm che mặt khi thao tác.

Isopectan rất dễ cháy và có hại khi nuốt phải hoặc hít phải. Chất này cũng gây kích ứng da và mắt, và là chất gây mê ở nồng độ cao.

Kiểm soát chất lượng

Sự khác biệt trong quy trình xử lý mô và quy trình kỹ thuật tại phòng xét nghiệm có thể tạo ra sự khác biệt đáng kể về kết quả, đòi hỏi phải thực hiện thường xuyên các biện pháp kiểm soát nội bộ bên cạnh các quy trình sau.

Mẫu đối chứng nên là mẫu từ thí/sinh thiết/phẫu thuật mới và được đông lạnh càng sớm càng tốt theo cách đã xử lý mẫu bệnh phẩm.

Mẫu mô chứng dương

Dùng để xác nhận rằng mô được chuẩn bị đúng cách và kỹ thuật nhuộm phù hợp

Nên sử dụng một mẫu mô chứng dương cho mỗi điều kiện xét nghiệm trong mỗi lần nhuộm.

Mô có biểu hiện dương yếu phù hợp hơn so với mô có biểu hiện dương mạnh để đảm bảo kiểm soát chất lượng tối ưu và phát hiện các mức độ suy giảm nhỏ của thuốc thử.²

Mẫu mô chứng dương tính được khuyến nghị là phần giữa của cơ soleus chuột, nơi các mô nổi thần kinh cơ có thể được đánh dấu bằng cách sử dụng phương pháp nhuộm kép với alpha-bungarotoxin huỳnh quang để xác định vị trí cụ thể của utrophin.

Nếu mẫu mô chứng dương không cho kết quả nhuộm dương, kết quả với các mẫu xét nghiệm là không hợp lệ.

Mẫu mô chứng âm

Cần kiểm tra sau mẫu mô chứng dương để xác minh tính đặc hiệu của việc đánh dấu kháng nguyên đích bởi kháng thể chính. Mẫu mô chứng âm được khuyến nghị sử dụng nên chưa được đánh giá.

Ngoài ra, sự đa dạng của các loại tế bào khác nhau hiện diện trong hầu hết các lát cắt mô thường cung cấp các vị trí chứng âm, nhưng điều này cần được kỹ thuật viên xác minh.

Kết quả nhuộm không đặc hiệu thường có dạng lan tỏa. Nhuộm rải rác mô liên kết cũng có thể được quan sát thấy trên các lát cắt từ các mô được cố định quá mức bằng formalin. Sử dụng tế bào nguyên vẹn để diễn giải kết quả nhuộm. Các tế bào hoại tử hoặc thoái hóa thường cho kết quả nhuộm không đặc hiệu.³ Kết quả dương tính giả có thể xuất hiện do sự liên kết không theo nguyên lý miễn dịch của protein hoặc các sản phẩm phản ứng với cơ chất.

Kết quả này cũng có thể do các enzyme nội sinh như pseudoperoxidase (hồng cầu), peroxidase nội sinh (cytochrome C) hoặc biotin nội sinh (ví dụ: gan, vú, não, thận) gây ra, tùy thuộc vào loại thuốc nhuộm miễn dịch được sử dụng. Để phân biệt hoạt động của enzyme nội sinh hoặc sự liên kết không đặc hiệu của enzyme với phản ứng miễn dịch đặc hiệu, các mẫu mô khác của bệnh nhân có thể được nhuộm riêng với cơ chất tạo màu hoặc phức hợp enzyme (avidin-biotin, streptavidin, polymer được đánh dấu) và liên hợp chất tạo màu-cơ chất tương ứng. Nếu kết quả nhuộm đặc hiệu xuất hiện ở mẫu chứng âm, kết quả trên mẫu bệnh phẩm là không hợp lệ.

Chứng thuốc thử âm

Sử dụng chứng thuốc thử âm không đặc hiệu thay cho kháng thể chính với một lát cắt của mỗi mẫu bệnh phẩm để đánh giá kết quả nhuộm không đặc hiệu và cho phép diễn giải tốt hơn về kết quả nhuộm đặc hiệu tại vị trí kháng nguyên.

Mô bệnh phẩm

Kiểm tra các mẫu bệnh phẩm đã được nhuộm bằng NCL-DRP2 sau cùng. (Diễn giải: Kiểm tra theo thứ tự - mẫu chứng trước, mẫu bệnh sau). Cường độ nhuộm dương nên được đánh giá trên nền nhuộm không đặc hiệu của mẫu mô chứng âm. Cũng như các kết quả hóa mô miễn dịch khác, kết quả âm tính nghĩa là kháng nguyên không được phát hiện, không có nghĩa là không có kháng nguyên trong các tế bào/mô được xét nghiệm. Hãy sử dụng bảng kháng thể để xác định các phản ứng âm tính giả nếu cần.

Kết quả mong đợi

Mô bình thường

Kháng thể dòng DRP3/20C5 phát hiện vùng đầu N của utrophin. Protein utrophin này là một protein đồng đẳng với dystrophin ở người, được mã hóa trên nhiễm sắc thể số 6, và còn được biết đến với tên gọi là protein liên quan dystrophin (dystrophin related protein) hay "DRP".

Trên cơ người trưởng thành bình thường, utrophin được đánh dấu tại các mối nối thần kinh cơ chứ không phải ở toàn bộ chu vi của các sợi cơ. Các mạch máu, mao mạch và dây thần kinh cũng được đánh dấu.

Đối với những sợi cơ thiếu dystrophin (ví dụ: từ bệnh nhân hoặc người mang gen bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne - DMD và loạn dưỡng cơ Becker - BMD), kháng thể cho thấy sự đánh dấu rộng hơn trên màng sợi cơ, khiến cho hầu hết các sợi đều có một số vùng được đánh dấu.

Utrophin cũng được biểu hiện trên màng của các sợi cơ nhỏ, đang tái tạo, những sợi này cũng đánh dấu với các kháng thể cho các protein như myosin sơ sinh.

Mô bất thường

Dòng kháng thể DRP3/20C5 đã được sử dụng trong các nghiên cứu hóa mô miễn dịch trên hơn 300 bệnh nhân để xác định biểu hiện của protein liên quan đến dystrophin, utrophin.

NCL-DRP2 được khuyến nghị sử dụng để xác định Utrophin ở người (đầu N) bằng phương pháp hóa mô miễn dịch.

Hạn chế chung

Hóa mô miễn dịch là quy trình chẩn đoán nhiều bước, bao gồm đào tạo chuyên sâu về lựa chọn thuốc thử phù hợp; lựa chọn, cố định và xử lý mô; chuẩn bị tiêu bản IHC; và giải thích kết quả nhuộm.

Quá trình nhuộm mô phụ thuộc vào việc xử lý và chuẩn bị mô trước khi nhuộm. Cố định, làm đông, rửa, sấy khô, làm nóng, cắt lát không đúng cách hoặc nhiễm bẩn với các mô hoặc dịch khác có thể tạo ra các hiện tượng nhuộm giả, bẫy kháng thể hoặc kết quả âm tính giả. Kết quả không nhất quán có thể do sự khác biệt trong phương pháp cố định và nhuộm, hoặc do các bất thường vốn có trong mô. 4 Việc nhuộm đổi màu quá mức hoặc không đầy đủ có thể ảnh hưởng đến độ chính xác khi diễn giải kết quả.

Giải thích lâm sàng dựa trên sự hiện diện hoặc vắng mặt của kết quả nhuộm màu nên kết hợp với các nghiên cứu hình thái sử dụng các đối chứng thích hợp. Ngoài ra, nên đánh giá kết quả này cùng với cảnh tiền sử lâm sàng của bệnh nhân và các xét nghiệm chẩn đoán khác bởi bác sĩ giải phẫu bệnh có chuyên môn

Các kháng thể từ Leica Biosystems Newcastle Ltd sử dụng, như đã chỉ định, trên các lát cắt đông lạnh hoặc những nhuộm parafin với các yêu cầu cố định cụ thể. Sự biểu hiện kháng nguyên không mong muốn có thể xảy ra, đặc biệt là trong các khối u. Việc diễn giải lâm sàng bất kỳ lát cắt mô đã nhuộm nào phải bao gồm phân tích hình thái và đánh giá các mẫu chứng phù hợp.

Tài liệu tham khảo - Tổng quan

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavi M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Bornemann A and Anderson LVB. Diagnostic protein expression in human muscle biopsies. Brain Pathology. 2000; 10:193-214.
6. Bewick GS, Nicholson LVB, Young C, et al. Different distributions of dystrophin and related proteins at nerve-muscle junctions. NeuroReport. 1992; 3:857-860.
7. Hack AA, Ly CT, Jiang F, et al. Gamma-sarcoglycan deficiency leads to muscle membrane defects and apoptosis independent of dystrophin. Journal of Cell Biology. 1998; 142(5):1279-1287.

Những thay đổi so với phiên bản trước

Không áp dụng.

Ngày phát hành

17 tháng 10 năm 2018

Phương pháp hóa mô miễn dịch sử dụng kháng thể Novocastra™ trên mô cơ đông lạnh.

Thuốc thử cần thiết nhưng không được cung cấp

1. Dung môi chuẩn được sử dụng trong hóa mô miễn dịch.
2. Dung dịch đệm Tris 50 mM (TBS) pH 7,6.
3. Dung dịch pha loãng kháng thể - huyết thanh bình thường được pha loãng tối ưu trong TBS.
4. Huyết thanh bình thường từ loài có kháng thể thứ cấp được nuôi cấy.
5. Kháng thể liên hợp peroxidase thứ cấp - sử dụng theo khuyến cáo của nhà sản xuất.
6. 3,3' Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) - chuẩn bị và sử dụng theo khuyến cáo của nhà sản xuất.
7. Môi trường gắn lam kính - sử dụng theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

Thiết bị cần thiết nhưng không được cung cấp kèm theo

1. Tủ ủ được thiết lập ở 25 ° C.
2. Thiết bị phòng xét nghiệm hóa mô miễn dịch thông thường.
3. Quạt điện để làm khô lam kính bằng không khí.

Dung dịch phục hồi kháng nguyên (xem Khuyến nghị Sử dụng)

Không dùng cho lát cắt mô đông lạnh.

Phương pháp

Trước khi thực hiện phương pháp này, kỹ thuật viên phải được đào tạo về các kỹ thuật hóa mô miễn dịch.

Kỹ thuật viên nên xác định độ pha loãng tối ưu cho kháng thể. Trừ khi có chỉ định khác, tất cả các bước đều thực hiện ở 25 ° C.

1. Cắt và gắn các lát cắt dày 4–10 µm lên các lam kính được phủ keo dán mô phù hợp và để khô tự nhiên trong ít nhất một giờ.
2. Ủ các lát cắt với kháng thể sơ cấp được pha loãng tối ưu (xem Khuyến nghị Sử dụng).
3. Rửa trong đệm TBS trong 2 x 5 phút, lắc nhẹ.
4. Ủ các lát cắt với kháng thể thứ cấp liên kết peroxidase phù hợp.
5. Rửa trong đệm TBS trong 2 x 5 phút, lắc nhẹ.
6. Ủ các lát cắt trong DAB.
7. Tráng lam kính bằng nước sạch.
8. Khử nước, làm trong và gắn lam.

Những thay đổi so với phiên bản trước

Không áp dụng.

Ngày phát hành

Ngày 4 tháng 2 năm 2008 (Quy trình CE/Mô đông lạnh).