



REAGENT DESCRIPTION

Ig Class IgG₁
Immunogen Recombinant Human MCM2 and TOP2A

1. INTENDED USE

For *in vitro* diagnostic use.

For use with manual staining or automated staining using the Dako Envision[®]+ detection chemistry.

The ProEx[™] C Immunohistochemical Test is intended for the qualitative evaluation of aberrant S-Phase induction in formalin-fixed paraffin-embedded tissue biopsies. Results interpretation must be made by a certified professional within the context of the patient's history and other diagnostic tests.

2. SUMMARY AND EXPLANATION

Minichromosome maintenance (MCM) and topoisomerase II alpha (TOP2A) proteins play an important regulatory role in eukaryotic DNA replication. For example, the HPV oncoproteins E6 and E7 bypass of critical cell-cycle checkpoints resulting in a prolonged and aberrant S-Phase induction cycle. During the transcriptional activation of the aberrant cell cycle, levels of MCM2 and TOP2A proteins increase in the proliferating cells.

Both the MCM2 and TOP2A proteins have been shown to be over-expressed in a number of different dysplastic and malignant tissues including cervical neoplasia^{1,5}. The over-expression of these proteins in morphologically abnormal cells, as demonstrated by a moderate-to-intense nuclear staining pattern using immunohistochemical (IHC) techniques, is indicative of the presence of aberrant S-Phase induction.

3. REAGENT PROVIDED

ProEx[™] C Antibody Reagent contains mouse monoclonal anti-MCM2 and anti-TOP2A purified from tissue culture supernatant and diluted in buffered saline solution containing protein stabilizers and 0.09% sodium azide.

4. PRINCIPLES OF PROCEDURE

Formalin-fixed paraffin-embedded tissue specimens are sectioned, deposited onto glass slides and deparaffinized. The sectioned specimens are pretreated with a buffer to expose antigenic sites. Blocking agents are added to minimize background staining caused by endogenous peroxidase. The sample is then incubated with the ProEx[™] C Antibody Reagent. The addition of an enzyme-linked antibody chromogen system results in the formation of a visible chromogenic product localized at the antigen-antibody binding sites. The specimen is then counterstained with hematoxylin and the slide is coverslipped. Results are interpreted by a trained professional using a light microscope.

ProEx[™] C Immunohistochemical Test is applicable for both manual and automated staining.

5. MATERIALS AND REAGENTS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED (for Manual Procedure)

- EDTA 5X – Cat #CB9172 (BioCare)
- EnVision[®]+ Kit – Cat # K4007 (Dako)
- Mayer's Hematoxylin – Cat # S3309 (Dako)
- Wash Buffer 10X – Cat # S3006 (Dako)
- Universal Mouse Negative Control – Cat # N1698 (Dako)
- Pressure Cooker
- Glass Slides (SuperFrost[®] Plus or equivalent)
- Mounting Media (ShurMount[®] or equivalent)
- Pipettes and Pipette Tips (capable of delivering 20µL, 200µL and 1000µL volumes)
- Timer (capable of 1-60 minute intervals)
- Deionized Water
- Ethanol 95%, 100%
- Glass Coverslips
- Lab Marker
- 10L Carboy (Nalgene[®] or equivalent)
- Sterile Disposable Bottles

- Slide Dryer
- Slide Rack with Staining Dishes
- Xylene or Xylene Substitutes
- Light Microscope (10x, 20x [optional], 40x objectives)

6. PRECAUTIONS

- 6.1. For *in vitro* diagnostic use.
- 6.2. Slide clearing steps requiring xylene must be performed in a certified, chemical fume hood.
- 6.3. DAB (3,3'-Diaminobenzidine) is classified as a suspected carcinogen. Avoid physical contact and prolonged or repeated exposure. Use in a certified, chemical fume hood.
- 6.4. The ProEx[™] C Antibody Reagent 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.
- 6.5. Specimens and all materials exposed to specimens should be handled as if capable of transmitting infection and disposed of with proper precautions. Never pipette reagents by mouth and avoid contacting the skin and mucous membranes with reagents and specimens. If reagents come in contact with sensitive areas, wash with copious amounts of water.
- 6.6. Minimize microbial contamination of reagents to avoid nonspecific staining.
- 6.7. Incubation times, temperatures or methods other than those specified may give erroneous results.
- 6.8. Do not use the ProEx[™] C Antibody Reagent after the expiration date stamped on the package. The user must validate conditions if reagents are stored under any conditions other than those specified in the package insert.
- 6.9. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid reagent contact with eyes and skin. Refer to the Material Safety Data Sheet (MSDS) for additional information.

7. INSTRUCTIONS FOR USE

7.1. Specimen Preparation

- 7.1.1. Cut 4 µm sections from the tissue block and place the sections on SuperFrost[®] Plus glass slides.
- 7.1.2. Label the slides.
- 7.1.3. Bake the slides in a forced air oven for 20 minutes.

7.2. Reagent Preparation

- 7.2.1. 1X Wash Buffer, 10L
 - 7.2.1.1. Combine 9 liters of deionized H₂O with 1 liter of 10X Wash Buffer.
 - 7.2.1.2. Cap and mix by inverting several times.
 - 7.2.1.3. Label with an expiration date of 5 days from the date of preparation.
 - 7.2.1.4. Store at room temperature (20-25 °C).
- 7.2.2. 1X EDTA (prepare fresh daily)
 - 7.2.2.1. Add 40 mL of 5X EDTA to a clean 250 mL beaker.
 - 7.2.2.2. Add 160 mL deionized H₂O.
 - 7.2.2.3. Mix by gently stirring.
- 7.2.3. Hematoxylin (prepare fresh daily)
 - 7.2.3.1. Add 20 mL of distilled H₂O to a 25 mL test tube.
 - 7.2.3.2. Add 1 mL of Mayer's Hematoxylin.
 - 7.2.3.3. Cap the test tube and mix by inverting several times.

8. STAINING PROTOCOL (Manual or Automated)

8.1. Staining Procedure Notes

- 8.1.1. This protocol can be used with manual staining or automated staining using the Dako Envision[®]+ detection chemistry.
- 8.1.2. All reagents should be equilibrated to room temperature (20-25°C) prior to immunostaining.
- 8.1.3. All incubations should be performed at room temperature unless noted.
- 8.1.4. Do not allow slides to dry out during the staining procedure. Dried preparations may display increased non-specific staining. Slides should be placed in a humid chamber for prolonged incubations.

8.2. Epitope Retrieval

- 8.2.1. De-paraffinize slides in 3 changes of xylene (five minutes each) followed by 3 changes of 100% alcohol (five minutes each).
- 8.2.2. Rehydrate the slides by rinsing in deionized H₂O.
- 8.2.3. Submerge slides in prepared 1X EDTA buffer solution and place the container into a pressure cooker. Heat the slides in the pressure cooker for 30 seconds.
- 8.2.4. When the heating time point is complete, allow slides to remain in the buffer in the pressure cooker and cool down for 10 minutes.
- 8.2.5. Rinse the slides with deionized H₂O and transfer to a clean coplin jar containing 1X Wash Buffer.

8.3. Peroxidase Blocking Reagent

- 8.3.1. Tap off excess Wash Buffer.
- 8.3.2. Load slides into a prepared humidity chamber (filled with water moistened paper towels or gauze).
- 8.3.3. Apply 200 μ L Peroxidase Block reagent to cover the tissue section.
- 8.3.4. Incubate 5 minutes (\pm 1 minute).
- 8.3.5. Rinse slides in 1X Wash Buffer, 3 changes, 2 minutes each.

8.4. Primary Antibody Reagent

- 8.4.1. Tap off excess Wash Buffer.
- 8.4.2. Load the slides into the prepared humidity chamber (filled with water moistened paper towels or gauze).
- 8.4.3. Apply 200 μ L ProEx™ C Antibody Reagent to completely cover tissue section.
- 8.4.4. Incubate 40 minutes at room temperature (20-25°C).
- 8.4.5. Rinse each slide individually with Wash Buffer using a wash bottle (do not focus the flow directly on the tissue section).
- 8.4.6. Rinse slides in Wash Buffer, 3 changes, 2 minutes each.

8.5. Detection Chemistry (using EnVision®+ Reagents)

- 8.5.1. Tap off excess Wash Buffer.
- 8.5.2. Load slides into prepared humidity chamber (filled with water moistened paper towels or gauze).
- 8.5.3. Apply 200 μ L HRP-Polymer reagent to completely cover tissue section.
- 8.5.4. Incubate 30 minutes (\pm 1 minute).
- 8.5.5. Rinse slides in Wash Buffer, 3 changes, 2 minutes each.
- 8.5.6. Tap off excess buffer.
- 8.5.7. Load slides into prepared humidity chamber (filled with water moistened paper towels or gauze).
- 8.5.8. Apply 200 μ L of DAB working solution Reagent to cover tissue section.
- 8.5.9. Incubate for 5 minutes (\pm 1 minute).
- 8.5.10. Rinse slides in running distilled H₂O for 5 minutes.
- 8.5.11. Rinse slides in Wash Buffer, 1 changes for 2 minutes.

8.6. Counterstain

- 8.6.1. Load slides into prepared humidity chamber (filled with water moistened paper towels or gauze).
- 8.6.2. Apply 200 μ L of Hematoxylin counterstain to completely cover tissue section.
- 8.6.3. Incubate for 5 minutes (\pm 10 seconds).
- 8.6.4. Rinse slides for 3 minutes in running H₂O.

8.7. Mounting

- 8.7.1. Immerse slides in 95% ethanol, 1 minute or 25 dips.
- 8.7.2. Immerse slides in absolute alcohol, 4 changes, 1 minute each or 25 dips.
- 8.7.3. Clear with xylene, 3 changes, 1 minute each or 25 dips.
- 8.7.4. Coverslip slides with non-aqueous, permanent mounting media using glass coverslips.

9. STABILITY

- 9.1. When stored at recommended temperatures, unopened reagent vials are stable until the expiration date indicated on the vial.
- 9.2. Once opened, reagents are stable for ninety (90) days when stored at recommended temperatures.

10. QUALITY CONTROL

- 10.1. Variability in results is often derived from differences in specimen handling which deviates from recommended test procedures. Consult the quality control guidelines of the College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry for additional information.
- 10.2. A positive tissue control should be included with each stain run to verify the assay performance. If the positive tissue control does not exhibit positive staining, the results with the other test specimens should be considered suspect or invalid.
- 10.3. A negative tissue control should be included with each stain run to verify the specificity of the primary antibody and to provide an indication of background staining. If the negative tissue control exhibits positive specific staining, the results with the other test specimens should be considered suspect or invalid.
- 10.4. A non-specific negative control reagent may also be used in place of the primary antibody to evaluate non-specific or background staining.

11. INTERPRETATION

Moderate-to-intense brown staining in the nucleus of cells indicates the presence of aberrant S-Phase induction. A pathologist should evaluate the stained slides using a light microscope. Results interpretation must be made by a certified professional within the context of the patient's history and other diagnostic tests.

12. LIMITATIONS

- 12.1. Immunohistochemical staining requires specialized training in the selection and application of reagents.
- 12.2. This reagent will perform 25 tests assuming 200 μ L of reagent is applied per slide.
- 12.3. Some normal cells may stain positive for aberrant S-Phase induction.
- 12.4. Optimal tissue staining is dependent upon fixation and processing of the specimen.
- 12.5. Non-specific or increased background staining may occur due to, but not limited to, variations in procedure, inadequate rinsing between assay steps, and/or inadequately processed specimens.










13. TROUBLESHOOTING

Problem	Possible Cause	Action
No staining on positive control slides	Reagents applied in improper order.	Review staining protocol.
	Omission of any reagent.	Repeat staining protocol.
	Incorrect preparation of DAB.	Prepare according to manufacturer's specifications, and repeat staining protocol.
Weak staining on positive control slides	Insufficient antigen retrieval.	Check incubation times and temperature of antigen/epitope retrieval buffer (refer to section 8.2).
	Incorrect antigen retrieval buffer used.	Review staining protocol and prepare buffer according to manufacturer's directions.
	Inadequate incubation of primary antibody.	Review staining protocol and adjust incubation times accordingly.
	Primary antibody has been diluted.	Use primary antibody according to manufacturer's directions.
Excessive background staining	Excessive wash buffer remaining on slide prior to application of next reagent.	Repeat staining protocol. Tap and wipe away excess wash buffer.
	Inadequate rinsing between assay steps.	Repeat staining protocol. Add additional wash buffer rinse steps.
	Excessive incubation times with key reagents.	Review staining protocol and adjust incubation times accordingly.
	Slides drying out during the assay incubation or rinsing steps.	Repeat staining protocol. Check humidity chamber.

14. REFERENCES

1. Kastan M and Bartec J. Cell cycle checkpoints and cancer. Nature, 2004. Vol 432:316-323.
2. Massague J. G1 cell-cycle control and cancer. Nature, 2004. Vol 432:298-306.
3. Freeman A, Morris LS, Millis AD, Stoeber K, Laskey RA, Williams GH and Coleman N. Minichromosome Maintenance Proteins as Biological Markers of Dysplasia and Malignancy. *CI Cancer Research*, 1999. Vol 5:2121-2132.
4. Ishimi Y, Okayasu I, Kato C, Kwon H, Kimura H, Yamada K and Song S. Enhanced expression of MCM proteins in cancer cells derived from uterine cervix. *Eur. J. Biochem* 2003. 270:1089-1101.
5. Lei M and Tye BK. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM Complex. *J Cell Science* 2001. Vol. 114 (8): 1447-1454.

15. GLOSSARY OF SYMBOLS

	Catalog number
	For <i>in vitro</i> diagnostic use
	Consult instructions for use
	Contains 7 mL
	Caution, consult accompanying document
	Storage Temperature Limitations
	Batch Code
	Use by YYYY-MM-DD or YYYY-MM
	Manufacturer

TECHNICAL INFORMATION

USA
Telephone: 1-877-822-7771
Fax: 1-336-290-8333

Europe
Telephone: +32 (0)53 720 673
Fax: +32 (0)53 720 678



TriPath Imaging, Inc.
780 Plantation Drive
Burlington, NC 27215 USA

EC REP


Benex Limited
Rineanna House
Shannon Free Zone
Shannon, County Clare
Ireland



Australian Representative:
Becton Dickinson Pty Ltd.
4 Research Park Drive,
Macquarie University Research Park,
North Ryde,
NSW 2113 Australia

Developed with technology from Millennium Pharmaceuticals, Inc.

 **MILLENNIUM**

 and **MILLENNIUM** are trademarks of Millennium Pharmaceuticals, Inc.

Millennium Pharmaceuticals, Inc.
40 Landsdowne Street
Cambridge, MA 02139 USA
www.millennium.com

ProEx is a product and trademark of TriPath Imaging, Inc.



BESCHREIBUNG DES REAGENZES:

Ig-Klasse IgG₁
Immunogen Rekombinantes humanes MCM2 und TOP2A

1. VERWENDUNGSZWECK

Zur *In-vitro*-Diagnostik.

Zur manuellen oder automatischen Färbung mit Dako Envision[®]+ Nachweischemie.

Der immunhistochemische Test ProEx[™] C dient bestimmungsgemäß zur qualitativen Beurteilung einer abweichenden S-Phasen-Induktion in formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebebiopsien. Die Auswertung der Ergebnisse muss durch eine entsprechend qualifizierte Person im Rahmen der Patienten-Anamnese und anderer diagnostischer Tests erfolgen.

2. ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

Die Proteine Minichromosome Maintenance (MCM) und Topoisomerase II alpha (TOP2A) spielen eine wichtige Rolle bei der Regelung der DNS-Replikation in den Eukaryoten. Beispielsweise umgehen die HPV-Onkoproteine E6 und E7 wichtige Prüfstellen im Zellzyklus, woraus sich ein verlängerter und abweichender S-Phasen-Induktionszyklus ergibt. Bei der transkriptionalen Aktivierung des abnormen Zellzyklus erhöhen sich die Spiegel der Proteine MCM2 und TOP2A in den proliferierenden Zellen.

Die Überexpression der Proteine MCM2 und TOP2A ist für eine Reihe von dysplastischen und malignen Geweben nachgewiesen, darunter auch zervikale Neoplasie¹⁻⁵. Diese Überexpression in morphologisch abnormen Zellen, die sich bei immunhistochemischer (IHC) Untersuchung in mäßigen bis intensiven nukleären Färbungsmustern äußert, ist ein Indiz für abweichende S-Phasen-Induktion.

3. GELIEFERTES REAGENZ

Das ProEx[™] C Antikörperreagenz enthält gereinigtes, monoklonales Anti-MCM2 und Anti-TOP2A (Maus) aus Gewebekulturüberstand in einer Verdünnung aus gepufferter Kochsalzlösung mit Proteinstabilisatoren und 0,09 % Natriumazid.

4. PRINZIPIEN DES VERFAHRENS

Formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Gewebeproben werden geschnitten, auf Glas-Objektträger aufgebracht und entparaffiniert. Die geschnittenen Proben werden mit Puffer vorbehandelt, um die Antigenstellen freizulegen. Blocker werden zugegeben, um die Hintergrundfärbung durch endogene Peroxidase zu minimieren. Dann wird die Probe mit dem ProEx[™] C Antikörperreagenz inkubiert. Durch Zugabe eines enzymgebundenen Antikörper-Chromogen-Systems bildet sich ein sichtbares chromogenes Produkt an den Antigen-Antikörper-Bindungsstellen. Anschließend wird die Probe mit Hämatoxylin gegengefärbt und der Objektträger mit einem Deckglas versehen. Die Ergebnisse werden von einer entsprechend qualifizierten Person unter einem Lichtmikroskop ausgewertet.

Der immunhistochemische Test ProEx[™] C eignet sich für manuelle und automatische Färbeverfahren.

5. ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERT REAGENZEN (für manuelles Verfahren)

- EDTA 5x – Kat.-Nr. CB9172 (BioCare)
- EnVision[®]+ Kit – Kat.-Nr. K4007 (Dako)
- Mayer's Hämatoxylin – Kat.-Nr. S3309 (Dako)
- Waschpuffer 10x – Kat.-Nr. S3006 (Dako)
- Universal Mouse Negative Control – Kat.-Nr. N1698 (Dako)
- Dampfdrucktopf
- Glas-Objektträger (SuperFrost[®] Plus oder Äquivalent)
- Eindeckmittel (ShurMount[®] oder Äquivalent)
- Pipetten und Pipettenspitzen (geeignet für die Abgabe von Volumina von 20 µl, 200 µl und 1000 µl)
- Stoppuhr (1–60 Minuten)
- Entionisiertes Wasser
- Äthanol, 95 % und 100 %
- Deckgläser
- Labormarkierstift
- 10-Liter-Ballonflasche (Nalgene[®] oder Äquivalent)
- Sterile Einwegflaschen
- Objektträger-Trockner
- Objektträgergestell mit Färbeschalen
- Xylol oder Xylol-Ersatz

- Lichtmikroskop (Vergrößerung 10x, 20x [optional], 40x)

6. SICHERHEITSHINWEISE

- 6.1. Zur *In-vitro*-Diagnostik.
- 6.2. Die Reinigung von Objektträgern mit Xylol darf nur unter einer zugelassenen chemischen Abzugshaube erfolgen.
- 6.3. DAB (3,3'-Diaminobenzidin) ist als vermutliches Karzinogen eingestuft. Körperkontakt und längere oder wiederholte Exposition vermeiden. Unter einer zugelassenen chemischen Abzugshaube anwenden.
- 6.4. Das ProEx[™] C Antikörperreagenz enthält Natriumazid (NaN₃), eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. Auch wenn das Natriumazid in diesem Produkt so gering konzentriert ist, dass es als gefahrlos eingestuft ist, kann Natriumazid mit Blei- oder Kupferrohren reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Deshalb beim Ausgießen mit reichlich Wasser spülen, um eine Ansammlung von Metallaziden in den Rohrleitungen zu verhindern.
- 6.5. Proben und alle mit Proben in Berührung kommenden Gegenstände müssen als potenziell infektiös behandelt und entsprechend entsorgt werden. Reagenzien niemals mit dem Mund pipettieren und jeden Kontakt der Haut und Schleimhäute mit Reagenzien und Proben vermeiden. Bei Kontakt von Reagenzien mit empfindlichen Bereichen mit reichlich Wasser waschen.
- 6.6. Mikrobielle Kontamination von Reagenzien minimieren, um unspezifische Färbung zu vermeiden.
- 6.7. Von den Angaben abweichende Inkubationszeiten, -temperaturen oder -methoden können zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
- 6.8. Das ProEx[™] C Antikörperreagenz nicht nach dem auf der Verpackung aufgedruckten Verfalldatum verwenden. Werden Reagenzien unter anderen als in der Verpackungsbeilage angegebenen Bedingungen aufbewahrt, müssen diese vom Anwender validiert werden.
- 6.9. Geeignete Schutzausrüstung tragen, um Kontakt des Reagenzes mit Haut und Augen zu vermeiden. Weitere Hinweise sind dem Material Sicherheitsdatenblatt (MSDS) zu entnehmen.

7. GEBRAUCHSANWEISUNG

7.1. Präparation der Proben

- 7.1.1. Vom Gewebe 4 µm dicke Schnitte abschneiden und diese auf SuperFrost[®] Plus Glas-Objektträgern aufbringen.
- 7.1.2. Die Objektträger etikettieren.
- 7.1.3. Die Objektträger in einem Umluftofen 20 Minuten erhitzen.

7.2. Ansetzen der Reagenzien

- 7.2.1. 1x Waschpuffer, 10 l
 - 7.2.1.1. 9 Liter entionisiertes H₂O mit 1 Liter 10x Waschpuffer kombinieren.
 - 7.2.1.2. Verschließen und durch mehrmaliges Wenden vermischen.
 - 7.2.1.3. Mit einem Etikett versehen und ein Verfallsdatum 5 Tage vom Datum der Ansetzung eintragen.
 - 7.2.1.4. Bei Raumtemperatur (20–25 °C) aufbewahren.
- 7.2.2. 1x EDTA (täglich frisch ansetzen)
 - 7.2.2.1. 40 ml 5x EDTA in einen sauberen 250-ml-Zylinder geben.
 - 7.2.2.2. 160 ml entionisiertes H₂O zugeben.
 - 7.2.2.3. Zum Mischen leicht umrühren.
- 7.2.3. Hämatoxylin (täglich frisch ansetzen)
 - 7.2.3.1. 20 ml destilliertes Wasser in ein Teströhrchen geben.
 - 7.2.3.2. 1 ml Hämatoxylin nach Mayer zugeben.
 - 7.2.3.3. Das Röhrchen verschließen und durch mehrmaliges Wenden vermischen.

8. FÄRBEPROTOKOLL (manuell und automatisch)

8.1. Hinweise zum Färbeverfahren

- 8.1.1. Dieses Protokoll gilt gleichermaßen für manuelles und automatisches Färben mit Dako Envision[®]+ Nachweischemie.
- 8.1.2. Alle Reagenzien vor der Immunfärbung Raumtemperatur (20–25 °C) annehmen lassen.
- 8.1.3. Sofern nicht anders angegeben, alle Inkubationen ebenfalls bei Raumtemperatur durchführen.
- 8.1.4. Die Objektträger während des Färbeverfahrens nicht austrocknen lassen. Eintrocknete Präparate können eine erhöhte unspezifische Färbung aufweisen. Bei längeren Inkubationen die Objektträger in eine Feuchtigkeitskammer stellen.

- 8.2. Epitopdemaskierung**
- 8.2.1. Objektträger in frischem Xylol (jeweils 5 Minuten, 3 Wechsel) und anschließend in 100%igem Alkohol (jeweils 5 Minuten, 3 Wechsel) entparaffinieren.
- 8.2.2. Objektträger durch Spülen in entionisiertem H₂O rehydrieren.
- 8.2.3. Objektträger in die angesetzte 1x EDTA-Pufferlösung eintauchen und den Behälter in den Dampfdrucktopf stellen. Objektträger im Dampfdrucktopf 30 Sekunden erhitzen.
- 8.2.4. Nach Ende der Heizzeit die Objektträger im Dampfdrucktopf in der Pufferlösung 10 Minuten abkühlen lassen.
- 8.2.5. Objektträger mit entionisiertem H₂O spülen und in eine saubere Coplin-Küvette mit 1x Waschpuffer geben.
- 8.3. Peroxidase-Blockierungsreagenz**
- 8.3.1. Überschüssigen Waschpuffer abklopfen.
- 8.3.2. Objektträger in eine vorbereitete Feuchtigkeitskammer stellen, die mit Wasser angefeuchtete Papiertücher oder Gaze enthält.
- 8.3.3. 200 µl Peroxidase-Blockierungsreagenz zugeben, um den Gewebeschnitt zu bedecken.
- 8.3.4. 5 Minuten (± 1 Minute) inkubieren.
- 8.3.5. Objektträger jeweils 2 Minuten (3 Wechsel) in frischem 1x Waschpuffer spülen.
- 8.4. Primäres Antikörperreagenz**
- 8.4.1. Überschüssigen Waschpuffer abklopfen.
- 8.4.2. Objektträger in eine vorbereitete Feuchtigkeitskammer stellen, die mit Wasser angefeuchtete Papiertücher oder Gaze enthält.
- 8.4.3. 200 µl ProEx™ C Antikörperreagenz zugeben, um den Gewebeschnitt komplett zu bedecken.
- 8.4.4. 40 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (20–25 °C).
- 8.4.5. Jeden Objektträger einzeln mit Waschpuffer aus einer Waschflasche spülen (den Strahl nicht direkt auf den Gewebeschnitt richten).
- 8.4.6. Objektträger jeweils 2 Minuten (3 Wechsel) in frischem Waschpuffer spülen.
- 8.5. Nachweischemie (bei Verwendung von EnVision®+ Reagenzien)**
- 8.5.1. Überschüssigen Puffer abklopfen.
- 8.5.2. Objektträger in eine vorbereitete Feuchtigkeitskammer stellen, die mit Wasser angefeuchtete Papiertücher oder Gaze enthält.
- 8.5.3. 200 µl HRP-Polymer-Reagenz zugeben, um den Gewebeschnitt vollständig zu bedecken.
- 8.5.4. 30 Minuten (±1 Minute) inkubieren.
- 8.5.5. Objektträger jeweils 2 Minuten (3 Wechsel) in frischem Waschpuffer spülen.
- 8.5.6. Überschüssigen Puffer abklopfen.
- 8.5.7. Objektträger in eine vorbereitete Feuchtigkeitskammer stellen, die mit Wasser angefeuchtete Papiertücher oder Gaze enthält.
- 8.5.8. 200 µl DAB-Reagenz-Arbeitslösung zugeben, um den Gewebeschnitt zu bedecken.
- 8.5.9. 5 Minuten (±1 Minute) inkubieren.
- 8.5.10. Objektträger 5 Minuten unter fließendem destilliertem H₂O spülen.
- 8.5.11. Objektträger jeweils 2 Minuten (1 Wechsel) in frischem Waschpuffer spülen.
- 8.6. Gegenfärbung**
- 8.6.1. Objektträger in eine vorbereitete Feuchtigkeitskammer stellen, die mit Wasser angefeuchtete Papiertücher oder Gaze enthält.
- 8.6.2. 200 µl Hämatoxylin-Gegenfärbung zugeben, um den Gewebeschnitt vollständig zu bedecken.
- 8.6.3. 5 Minuten (±10 Sekunden) inkubieren.
- 8.6.4. Objektträger 3 Minuten unter fließendem Wasser spülen.
- 8.7. Fixieren**
- 8.7.1. Objektträger in 95%iges Äthanol eintauchen (1 Minute bzw. 25 Mal).
- 8.7.2. Objektträger in reinen Alkohol eintauchen (4 Wechsel, je 1 Minute bzw. 25 Mal).
- 8.7.3. Mit Xylol klarspülen (3 Wechsel, je 1 Minute bzw. 25 Mal).
- 8.7.4. Objektträger mit nicht-wässrigem, permanentem Eindeckmittel und Deckgläsern eindecken.
- 9. STABILITÄT**
- 9.1. Bei Einhaltung der empfohlenen Lagertemperaturen sind ungeöffnete Reagenzflakons bis zu dem auf dem Flakon angegebenen Verfallsdatum stabil.
- 9.2. Nach dem Öffnen sind Reagenzien neunzig (90) Tage stabil, wenn die empfohlenen Lagertemperaturen eingehalten werden.
- 10. QUALITÄTSKONTROLLE**
- 10.1. Schwankungen der Ergebnisse ergeben sich häufig aus einer Probenhandhabung, die von den empfohlenen Testverfahren abweicht. Weitere Hinweise hierzu sind den Richtlinien zur Qualitätskontrolle des „College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry“ zu entnehmen.
- 10.2. Bei jedem Färbedurchlauf sollte zur Überprüfung der Testleistung eine positive Gewebekontrolle mitlaufen. Weist die positive Gewebekontrolle keine positive Färbung auf, müssen die Ergebnisse der anderen Proben als fragwürdig oder ungültig betrachtet werden.
- 10.3. Bei jedem Färbedurchlauf sollte zur Überprüfung der Spezifität des primären Antikörpers und als Anhaltspunkt für die Hintergrundfärbung eine negative Gewebekontrolle mitlaufen. Weist die negative Gewebekontrolle eine positive Färbung auf, müssen die Ergebnisse der anderen Proben als fragwürdig oder ungültig betrachtet werden.
- 10.4. Zur Beurteilung der unspezifischen bzw. Hintergrundfärbung kann anstelle des primären Antikörpers ein unspezifisches negatives Kontrollreagenz verwendet werden.
- 11. AUSWERTUNG**
- Eine mäßige bis intensive Braunfärbung der Zellkerne zeigt das Vorhandensein einer abweichenden S-Phasen-Induktion an. Die gefärbten Objektträger sollten von einem Pathologen unter einem Lichtmikroskop beurteilt werden. Die Auswertung der Ergebnisse muss durch eine entsprechend qualifizierte Person im Rahmen der Patienten-Anamnese und anderer diagnostischer Tests erfolgen.
- 12. BESCHRÄNKUNGEN**
- 12.1. Immunhistochemische Färbeverfahren erfordern eine spezielle Ausbildung bzgl. der Auswahl und Anwendung von Reagenzien.
- 12.2. Das Reagenz reicht für 25 Tests, wenn 200 µl Reagenz pro Objektträger appliziert werden.
- 12.3. Einige normale Zellen können sich positiv für abweichende S-Phasen-Induktion verfärben.
- 12.4. Optimale Gewebefärbung hängt von der Fixierung und Einbettung der Probe ab.
- 12.5. Unspezifische bzw. erhöhte Hintergrundfärbung kann u. A. bei abweichender Vorgehensweise, ungenügender Spülung zwischen den Schritten bzw. unsachgemäß verarbeiteten Proben auftreten.










13. FEHLERBEHEBUNG

Problem	Mögliche Ursache	Abhilfe
Keine Färbung von positiven Kontrollobjektträgern	Reagenzien in falscher Reihenfolge angewendet.	Färbeprotokoll überprüfen.
	Auslassen eines Reagenzes.	Färbeprotokoll wiederholen.
	Fehlerhafte Zubereitung der DAB-Lösung.	Gemäß Herstelleranweisungen zubereiten und Färbeprotokoll wiederholen.
Schwache Färbung von positiven Objektträgern	Unzureichende Antigendemaskierung.	Inkubationszeit und -temperatur des Antigen-/Epitopdemaskierungspuffers prüfen (siehe Punkt 8.2).
	Falscher Antigendemaskierungspuffer verwendet.	Färbeprotokoll überprüfen und Puffer gemäß Herstelleranweisungen zubereiten.
	Unzureichende Inkubation des Primärantikörpers.	Färbeprotokoll überprüfen und Inkubationszeiten entsprechend anpassen.
	Primärer Antikörper wurde verdünnt.	Primärantikörper gemäß Herstelleranweisungen anwenden.
	Vor Zugabe des nächsten Reagenzes noch zu viel Waschpuffer auf Objektträger.	Färbeprotokoll wiederholen. Überschüssigen Puffer abklopfen und abwischen.
Zu starke Hintergrundfärbung	Unzureichendes Spülen zwischen Testschritten.	Färbeprotokoll wiederholen. Weitere Spülungen mit Waschpuffer in das Verfahren einbauen.
	Zu lange Inkubationszeiten bei Reagenzien.	Färbeprotokoll überprüfen und Inkubationszeiten entsprechend anpassen.
	Objektträger trocknen bei den Schritten Inkubation oder Spülen aus.	Färbeprotokoll wiederholen. Feuchtigkeitskammer überprüfen.

14. LITERATURANGABEN

1. Kastan M and Bartec J. Cell cycle checkpoints and cancer. Nature, 2004. Vol 432:316-323.
2. Massague J. G1 cell-cycle control and cancer. Nature, 2004. Vol 432:298-306.
3. Freeman A, Morris LS, Millis AD, Stoeber K, Laskey RA, Williams GH and Coleman N. Minichromosome Maintenance Proteins as Biological Markers of Dysplasia and Malignancy. *CI Cancer Research*, 1999. Vol 5:2121-2132.
4. Ishimi Y, Okayasu I, Kato C, Kwon H, Kimura H, Yamada K and Song S. Enhanced expression of MCM proteins in cancer cells derived from uterine cervix. *Eur. J. Biochem* 2003. 270:1089-1101.
5. Lei M and Tye BK. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM Complex. *J Cell Science* 2001. Vol. 114 (8): 1447-1454.

15. SYMBOLVERZEICHNIS

	Katalognummer
	Zur <i>In-vitro</i> -Diagnostik
	Gebrauchsanleitung beachten
	Inhalt 7 ml
	Vorsicht, Begleitpapiere beachten
	Zulässiger Temperaturbereich für die Aufbewahrung
	Chargencode
	Bis JJJJ-MM-TT oder JJJJ-MM verbrauchen
	Hersteller

TECHNISCHER KUNDENDIENST

USA
Telephone: 1-877-822-7771
Fax: 1-336-290-8333

Europe
Telephone: +32 (0)53 720 673
Fax: +32 (0)53 720 678



TriPath Imaging, Inc.
780 Plantation Drive
Burlington, NC 27215 USA



Benex Limited
Rineanna House
Shannon Free Zone
Shannon, County Clare
Ireland



Mit Technologie von Millennium Pharmaceuticals, Inc. entwickelt

 MILLENNIUM™

 und MILLENNIUM™ sind Warenzeichen von Millennium Pharmaceuticals, Inc.

Millennium Pharmaceuticals, Inc.
40 Landsdowne Street
Cambridge, MA 02139 USA
www.millennium.com

ProEx ist ein Produkt und Warenzeichen von TriPath Imaging, Inc.



DESCRIPTION DU RÉACTIF

Classe d'Ig IgG₁

Immunogène MCM2 et TOP2A humaines recombinantes

1. UTILISATION PRÉVUE

Utilisation diagnostique *in vitro*.

Utiliser dans le cadre d'une coloration manuelle ou automatique à l'aide du système de détection Dako Envision[®]+

Le test immunohistochimique ProEx[™] C est destiné à l'évaluation qualitative de l'induction aberrante de la phase S sur des biopsies tissulaires fixées au formol et incluses en paraffine. L'interprétation des résultats doit être faite par un professionnel agréé en tenant compte des antécédents du patient et des autres tests diagnostiques.

2. RÉSUMÉ ET EXPLICATION

Les protéines MCM (protéines de maintenance du minichromosome) et topoisomérase II alpha (TOP2A) jouent un rôle régulateur important dans la réplication de l'ADN eucaryote : par exemple, le contournement par les oncoprotéines E6 et E7 du PVH des points de contrôle du cycle cellulaire ce qui se traduit par un cycle d'induction prolongé et aberrant de la phase S. Pendant l'activation transcriptionnelle du cycle cellulaire aberrant, les niveaux des protéines MCM2 et TOP2A augmentent dans les cellules en mitose.

Il a été montré que les protéines MCM2 et TOP2A sont surexprimées dans de nombreux et divers tissus dysplasiques et malins dont les néoplasies cervicales¹⁻⁵. La surexpression de ces protéines dans des cellules morphologiquement anormales, démontrée par un profil de coloration nucléaire modérée à intense après emploi de techniques immunohistochimiques (IHC), est indicative de la présence d'une induction d'une phase S aberrante.

3. RÉACTIFS FOURNIS

Le réactif anticorps ProEx[™] C contient des anticorps monoclonaux de souris anti-MCM2 et anti-TOP2A purifiés à partir d'un surnageant de culture tissulaire et dilués dans une solution saline tamponnée contenant des agents de stabilisation protéiques et de l'azide de sodium à 0,09 %.

4. PRINCIPES DE LA PROCÉDURE

Des coupes d'échantillons tissulaires fixés au formol, inclus en paraffine, sont réalisées, déposées sur des lames de verre et déparaffinées. Les coupes d'échantillons sont prétraitées à l'aide d'un tampon afin de démasquer les sites antigéniques. Des agents de blocage sont ajoutés afin de minimiser le bruit de fond due aux peroxydases endogènes. L'échantillon est alors incubé avec le réactif anticorps ProEx[™] C. L'addition d'un système chromogène constitué d'une enzyme liée à un anticorps se traduit par la formation d'un produit coloré visible localisé au niveau des sites de liaison antigène-anticorps. L'échantillon fait alors l'objet d'une contre-coloration par l'hématoxyline, puis la lame est recouverte d'une lamelle. Les résultats sont interprétés par un professionnel expérimenté à l'aide d'un microscope optique.

Le test immunohistochimique ProEx[™] C est utilisable avec les colorations manuelles et automatiques.

5. MATÉRIELS ET RÉACTIFS NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS (pour la procédure manuelle)

- EDTA 5X – n° de cat. CB9172 (BioCare)
- Kit EnVision[®] + – n° de cat. K4007 (Dako)
- Hématoxyline de Mayer – n° de cat. S3309 (Dako)
- Tampon de lavage 10X – n° de cat. S3006 (Dako)
- Contrôle négatif universel de souris – n° de cat. N1698 (Dako)
- Autocuiseur
- Lames de verre (SuperFrost[®] Plus ou équivalent)
- Milieu de montage (ShurMount[®] ou équivalent)
- Pipettes et embouts de pipettes (capables de délivrer des volumes de 20 µl, 200 µl et 1000 µl)
- Horloge (capable de mesurer des durées de 1 à 60 minutes)
- Eau désionisée
- Éthanol 95 %, 100 %
- Lamelles de verre
- Marqueur de laboratoire
- Bonbonne de 10 litres (Nalgene[®] ou équivalent)

- Flacons stériles jetables
- Sécheur de lames
- Panier de lames avec bacs de coloration
- Xylène ou substituts du xylène
- Microscope optique (objectifs 10x, 20x (en option), 40x)

6. PRÉCAUTIONS

- 6.1. Utilisation diagnostique *in vitro*.
- 6.2. Les étapes de nettoyage des lames nécessitant du xylène doivent être mises en œuvre sous une hotte aspirante agréée.
- 6.3. Le DAB (3,3'-diaminobenzidine) est classé parmi les produits suspectés d'être cancérogènes. Éviter tout contact physique ou exposition prolongée ou répétée. Utiliser sous une hotte aspirante agréée.
- 6.4. Le réactif anticorps ProEx[™] C contient de l'azide de sodium (NaN₃), un produit chimique extrêmement toxique à l'état pur. Bien que non classé parmi les composés présentant un danger aux concentrations du produit, l'azide de sodium est susceptible de réagir avec le cuivre et le plomb des canalisations pour donner des azides métalliques hautement explosifs. Lors de l'élimination, rincer avec de grandes quantités d'eau pour éviter l'accumulation d'azides métalliques dans les canalisations.
- 6.5. Les échantillons et tous les matériels exposés aux échantillons doivent être manipulés comme s'ils pouvaient transmettre des infections et éliminés conformément aux précautions en vigueur. Ne jamais pipeter les réactifs avec la bouche et éviter de mettre en contact les réactifs et les échantillons avec la peau et les muqueuses. Laver à grande eau en cas de contact des réactifs avec des régions sensibles.
- 6.6. Minimiser la contamination microbienne de réactifs pour éviter les colorations non spécifiques.
- 6.7. Des durées d'incubation, des températures ou des méthodes autres que celles qui sont spécifiées peuvent conduire à des résultats erronés.
- 6.8. Ne pas utiliser le réactif anticorps ProEx[™] C au-delà de la date de péremption figurant sur le conditionnement. L'utilisateur doit valider les conditions si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles qui sont spécifiées dans la notice.
- 6.9. Porter des vêtements de protection appropriés pour éviter le contact avec les yeux et la peau. Pour plus d'informations, se référer aux Fiches de données de sécurité (MSDS).

7. MODE D'EMPLOI

7.1. Préparation des échantillons

- 7.1.1. Réaliser des coupes de 4 µm dans le bloc de tissu et placer les coupes sur des lames de verre SuperFrost[®] Plus.
- 7.1.2. Étiqueter les lames
- 7.1.3. Placer les lames dans une étuve à circulation d'air pendant 20 minutes.

7.2. Préparation des réactifs

- 7.2.1. Tampon de lavage 1X, 10 litres
 - 7.2.1.1. Mélanger 9 litres d'H₂O désionisée avec 1 litre de tampon de lavage 10X.
 - 7.2.1.2. Boucher et mélanger par inversion plusieurs fois.
 - 7.2.1.3. Étiqueter avec une durée de péremption de 5 jours à partir de la date de préparation.
 - 7.2.1.4. Conserver à température ambiante (20 à 25 °C).
- 7.2.2. EDTA 1X (préparer chaque jour une solution fraîche)
 - 7.2.2.1. Ajouter 40 ml d'EDTA 5X dans un bêcher de 250 ml propre.
 - 7.2.2.2. Ajouter 160 ml d'H₂O désionisée.
 - 7.2.2.3. Mélanger doucement par agitation.
- 7.2.3. Hématoxyline (préparer chaque jour une solution fraîche)
 - 7.2.3.1. Ajouter 20 ml d'H₂O distillée dans un tube à essai de 25 ml.
 - 7.2.3.2. Ajouter 1 ml d'hématoxyline de Mayer.
 - 7.2.3.3. Boucher le tube à essai et mélanger par inversion plusieurs fois.

8. PROTOCOLE DE COLORATION (manuel ou automatique)

8.1. Remarques concernant la procédure de coloration

- 8.1.1. Utiliser dans le cadre d'une coloration manuelle ou automatique à l'aide du système de détection Dako Envision®+.
- 8.1.2. Tous les réactifs doivent s'équilibrer à température ambiante (20-25 °C) avant immunocoloration.
- 8.1.3. Toutes les incubations doivent se dérouler à température ambiante sauf mention contraire.
- 8.1.4. Ne pas laisser sécher les lames au cours de la procédure de coloration. Les préparations desséchées peuvent présenter une coloration non spécifique accrue. Les lames doivent être placées dans une chambre humide pour des incubations prolongées.

8.2. Restauration de l'épitope

- 8.2.1. Déparaffiner les lames par 3 bains successifs dans le xylène (d'une durée de 5 minutes chacun) suivis de 3 bains d'alcool à 100 % (d'une durée de 5 minutes chacun).
- 8.2.2. Réhydrater les lames par rinçage dans l'H₂O désionisée.
- 8.2.3. Immerger les lames dans la solution tampon EDTA 1X préalablement préparée et placer le récipient dans un autocuiseur. Chauffer les lames dans l'autocuiseur pendant 30 secondes.
- 8.2.4. Quand la période de chauffage est terminée, laisser les lames refroidir dans le tampon, à l'intérieur de l'autocuiseur, pendant 10 minutes.
- 8.2.5. Rincer les lames avec de l'H₂O désionisée et les transférer dans une cuve de Coplin propre contenant du tampon de lavage 1X.

8.3. Réactif de blocage de la peroxydase

- 8.3.1. Tapoter pour éliminer le tampon de lavage en excès.
- 8.3.2. Charger les lames dans une chambre humide préparée (remplie de serviettes en papier ou de tampons de gaze imprégnés d'eau).
- 8.3.3. Appliquer 200 µl de réactif de blocage de la peroxydase afin de recouvrir la coupe tissulaire.
- 8.3.4. Incuber pendant 5 ± 1 minutes.
- 8.3.5. Rincer les lames dans trois bains de tampon de lavage 1X, d'une durée de 2 minutes chacun.

8.4. Réactif Anticorps primaire

- 8.4.1. Tapoter pour éliminer le tampon de lavage en excès.
- 8.4.2. Charger les lames dans la chambre humide préparée (remplie de serviettes en papier ou de tampons de gaze imprégnés d'eau).
- 8.4.3. Appliquer 200 µl de réactif anticorps ProEx™ C afin de recouvrir complètement la coupe tissulaire.
- 8.4.4. Incuber pendant 40 minutes à température ambiante (20 à 25 °C).
- 8.4.5. Rincer chaque lame individuellement dans le tampon de lavage à l'aide d'un flacon pissette (ne pas diriger le jet directement sur la coupe tissulaire).
- 8.4.6. Rincer les lames dans trois bains de tampon de lavage, d'une durée de 2 minutes chacun.

8.5. Chimie de détection (à l'aide des réactifs EnVision®+)

- 8.5.1. Tapoter pour éliminer le tampon de lavage en excès.
- 8.5.2. Charger les lames dans une chambre humide préparée (remplie de serviettes en papier ou de tampons de gaze imprégnés d'eau).
- 8.5.3. Appliquer 200 µl de réactif HRP-Polymère afin de recouvrir complètement la coupe tissulaire.
- 8.5.4. Incuber pendant 30 ± 1 minutes.
- 8.5.5. Rincer les lames dans trois bains de tampon de lavage, d'une durée de 2 minutes chacun.
- 8.5.6. Tapoter pour éliminer le tampon en excès.
- 8.5.7. Charger les lames dans une chambre humide préparée (remplie de serviettes en papier ou de tampons de gaze imprégnés d'eau).
- 8.5.8. Appliquer 200 µl de réactif Solution de travail DAB afin de recouvrir la coupe tissulaire.
- 8.5.9. Incuber pendant 5 ± 1 minutes.
- 8.5.10. Rincer les lames sous l'H₂O distillée courante pendant 5 minutes.

- 8.5.11. Rincer les lames dans un bain de tampon de lavage, d'une durée de 2 minutes.

8.6. Coloration de contraste (ou contre-coloration)

- 8.6.1. Charger les lames dans une chambre humide préparée (remplie de serviettes en papier ou de tampons de gaze imprégnés d'eau).
- 8.6.2. Appliquer 200 µl de colorant de contraste, Hématoxyline, afin de recouvrir complètement la coupe tissulaire.
- 8.6.3. Incuber pendant 5 minutes (±10 secondes).
- 8.6.4. Rincer les lames pendant 3 minutes sous l'H₂O courante.

8.7. Montage

- 8.7.1. Immerger les lames dans de l'éthanol 95 % pendant 1 minute, ou à 25 reprises.
- 8.7.2. Immerger les lames dans l'alcool absolu à 4 reprises de 1 minute, ou 25 fois, chacune.
- 8.7.3. Nettoyer avec du xylène, à 3 reprises de 1 minute, ou 25 fois, chacune.
- 8.7.4. Recouvrir les lames d'une lamelle en verre avec un milieu de montage non aqueux permanent.

9. STABILITÉ

- 9.1. Quand ils sont conservés à la température recommandée, les flacons de réactifs non ouverts sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur le flacon.
- 9.2. Une fois ouverts, les réactifs sont stables pendant quatre vingt dix (90) jours s'ils sont conservés à la température recommandée.

10. CONTRÔLE QUALITÉ

- 10.1. La variabilité des résultats provient souvent de différences de manipulations des échantillons qui s'écartent des procédures de test recommandées. Pour plus d'informations, consulter les directives en matière de contrôle qualité du College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry.
- 10.2. Chaque cycle de coloration doit comporter un contrôle tissulaire positif afin de vérifier les performances du dosage. Si le contrôle tissulaire positif ne présente pas de coloration positive, les résultats obtenus pour les autres échantillons du test doivent être considérés comme suspects ou invalides.
- 10.3. Chaque cycle de coloration doit comporter un contrôle tissulaire négatif afin de vérifier la spécificité de l'anticorps primaire et de fournir une indication relative à la coloration de fond. Si le contrôle tissulaire négatif présente une coloration positive, les résultats obtenus pour les autres échantillons du test doivent être considérés comme suspects ou invalides.
- 10.4. Un réactif de contrôle négatif non spécifique peut également être utilisé à la place de l'anticorps primaire afin d'évaluer la coloration non spécifique ou la coloration de fond.

11. INTERPRÉTATION

Une coloration brune, modérée à intense, dans le noyau des cellules signale la présence d'une induction de la phase S aberrante. Un pathologiste doit évaluer les lames colorées à l'aide d'un microscope optique. L'interprétation des résultats doit être faite par un professionnel agréé en tenant compte des antécédents du patient et des autres tests diagnostiques.

12. LIMITES

- 12.1. La coloration immunohistochimique exige une formation spécialisée dans le domaine de la sélection et de l'application des réactifs.
- 12.2. Ce réactif permet de réaliser 25 tests en supposant que l'on applique 200 µl de réactif par lame.
- 12.3. Un certain nombre de cellules normales peuvent être colorées positivement vis-à-vis de l'induction d'une phase S aberrante.
- 12.4. La coloration optimale des tissus dépend de la fixation et du traitement de l'échantillon.
- 12.5. Une coloration non spécifique ou une coloration de fond accrue peuvent survenir en raison, mais se limiter à, des variations de la procédure, d'un rinçage inadéquat entre les étapes du dosage, et/ou d'un traitement inadéquat des échantillons.










13. RÉOLUTION DES PROBLÈMES

Problème	Cause possible	Action
Absence de coloration des lames de contrôle positives	Réactifs appliqués dans un ordre incorrect.	Revoir le protocole de coloration.
	Omission d'un réactif.	Recommencer le protocole de coloration.
	Préparation incorrecte de la DAB.	Préparer conformément aux instructions du fabricant et recommencer le protocole de coloration.
Faible coloration des lames de contrôle positives	Restauration de l'antigène insuffisante	Vérifier les durées d'incubation et les températures du tampon de restauration de l'antigène/épitope (consulter la section 8.2).
	Emploi d'un tampon de restauration de l'antigène incorrect.	Revoir le protocole de coloration et préparer le tampon conformément aux instructions du fabricant.
	Incubation inadéquate de l'anticorps primaire.	Revoir le protocole de coloration et ajuster les durées d'incubation en conséquence.
	L'anticorps primaire a été dilué.	Emploi de l'anticorps primaire conformément aux instructions du fabricant.
	Quantité excessive de tampon de lavage restant sur la lame avant l'application du réactif suivant.	Recommencer le protocole de coloration. Tapoter la lame et essuyer le tampon de lavage en excès.
Coloration de fond excessive	Rinçage inadéquat entre les étapes du dosage.	Recommencer le protocole de coloration. Ajouter des étapes supplémentaires de rinçage avec le tampon de lavage.
	Durées d'incubation excessives avec les réactifs clés.	Revoir le protocole de coloration et ajuster les durées d'incubation en conséquence.
	Lames soumises à un dessèchement pendant l'incubation ou les étapes de rinçage du dosage.	Recommencer le protocole de coloration. Vérifier la chambre humide.

14. BIBLIOGRAPHIE

- Kastan M and Bartec J. Cell cycle checkpoints and cancer. Nature, 2004. Vol 432:316-323.
- Massague J. G1 cell-cycle control and cancer. Nature, 2004. Vol 432:298-306.
- Freeman A, Morris LS, Millis AD, Stoeber K, Laskey RA, Williams GH and Coleman N. Minichromosome Maintenance Proteins as Biological Markers of Dysplasia and Malignancy. *CI Cancer Research*, 1999. Vol 5:2121-2132.
- Ishimi Y, Okayasu I, Kato C, Kwon H, Kimura H, Yamada K and Song S. Enhanced expression of MCM proteins in cancer cells derived from uterine cervix. *Eur. J. Biochem* 2003. 270:1089-1101.
- Lei M and Tye BK. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM Complex. *J Cell Science* 2001. Vol. 114 (8): 1447-1454.

15. GLOSSAIRE DE SYMBOLES

	Numéro de catalogue
	Utilisation diagnostique <i>in vitro</i> .
	Consulter les instructions d'emploi
	Contenu 7 ml
	Attention, consulter le manuel d'accompagnement
	Respecter la température d'entreposage
	Code de lot
	Utiliser avant AAAA-MM-JJ ou AAAA-MM
	Fabricant

INFORMATION TECHNIQUE

USA
Telephone: 1-877-822-7771
Fax: 1-336-290-8333

Europe
Telephone: +32 (0)53 720 673
Fax: +32 (0)53 720 678



TriPath Imaging, Inc.
780 Plantation Drive
Burlington, NC 27215 USA



Benex Limited
Rineanna House
Shannon Free Zone
Shannon, County Clare
Ireland



Développé avec la technologie de Millennium Pharmaceuticals, Inc.

 MILLENNIUM™

 et MILLENNIUM™ sont des marques commerciales de Millennium Pharmaceuticals, Inc.

Millennium Pharmaceuticals, Inc.
40 Landsdowne Street
Cambridge, MA 02139 USA
www.millennium.com

ProEx est un produit et une marque commerciale de TriPath Imaging, Inc.



DESCRIPCIÓN DEL REACTIVO

Clase Ig IgG₁

Inmunógeno Humano recombinante MCM2 y TOP2A

1. USO PREVISTO

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Para ser utilizado con el proceso de tinción manual o automático empleando el sistema de detección Envision[®]+ marca Dako.

La prueba inmunohistoquímica de ProEx[™] C tiene como fin realizar una evaluación cualitativa de las inducciones aberrantes de fase S en biopsias de tejidos incluidos en parafina y fijados en formalina. La interpretación de los resultados debe ser realizada por un profesional certificado en el contexto del historial del paciente y otras pruebas diagnósticas.

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Las proteínas de mantenimiento de minicromosomas (MCM) y topoisomerasa II alfa desempeñan un papel regulador importante en la replicación de ADN eucariota. Por ejemplo, la omisión de puntos críticos de control del ciclo celular, causado por las oncoproteínas de HPV E6 y E7, se deriva en un ciclo de inducción de fase S prolongado y aberrante. Durante la activación transcripcional del ciclo celular aberrante, los niveles de proteínas MCM2 y TOP2A aumenta en las células en proliferación.

Se ha demostrado que las proteínas MCM2 y TOP2A están sobreexpresadas en una serie de diferentes tejidos malignos y displásicos, incluyendo la neoplasia cervical¹⁻⁵. La sobreexpresión de estas proteínas en células morfológicamente anormales, tal y como lo demuestra un patrón de tinción nuclear de moderado a intenso utilizando técnicas inmunohistoquímicas (IHC), indica la presencia de una inducción aberrante de fase S.

3. REACTIVO SUMINISTRADO

El reactivo de Anticuerpos ProEx[™] C contiene anticuerpos de MCM2 y TOP2A monoclonales de ratón purificados a partir de cultivos de tejidos sobrenadantes y diluidos en una solución salina tamponada que contiene estabilizadores de proteína y 0,09% de azida de sodio.

4. PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Las muestras de tejido incluidas en parafina y fijadas en formalina, se cortan y colocan sobre portaobjetos de vidrio, luego se desparafinan.

Los tejidos cortados se tratan con un tampón para dejar expuestos los sitios antigénicos. Agentes bloqueadores se utilizan para reducir al mínimo la tinción de fondo causada por la peroxidasa endógena. Seguidamente las muestras se incuban con el reactivo de Anticuerpos ProEx C.

La aplicación de un sistema de detección (compuesto por un polímero conjugado enzima / anticuerpo secundario y el respectivo sustrato cromógeno), permite la formación de un producto visible que localiza los sitios de unión entre el antígeno y el anticuerpo. Finalmente la muestra se contratiñe con hematoxilina y se monta la lámina. Los resultados se pueden analizar por medio de un microscopio óptico y deben ser interpretados por un profesional calificado.

La prueba inmunohistoquímica ProEx[™] C se puede aplicar a la tinción manual y automática.

5. MATERIALES Y REACTIVOS NECESARIOS QUE NO VIENEN INCLUIDOS (para el procedimiento manual)

- EDTA 5X – Cat nº CB9172 (BioCare)
- EnVision[®]+ Kit – Cat nº K4007 (Dako)
- Hematoxilina de mayer Cat. Nº S3309 (Dako)
- Tampón de lavado 10X – Cat nº S3006 (Dako)
- Control negativo de ratón universal – Cat nº N1698 (Dako)
- Olla de presión
- Portaobjetos de vidrio (SuperFrost[®] Plus o su equivalente)
- Medio de montaje (ShurMount[®] o su equivalente)
- Pipetas y puntas de pipetas (con capacidades de 20µL, 200µL y 1000µL)
- Reloj de intervalos (con capacidad para intervalos de 1-60 minutos)
- Agua desionizada
- Etanol 95%, 100%
- Cubreobjetos de vidrio

- Lápiz o plumón para laboratorio (resistente al alcohol y xilol)
- Garrafa de 10 L (Nalgene[®] o equivalente)
- Botellas estériles desechables
- Secador de portaobjetos
- Canastilla y tren de tinción
- Xilol o sustituto de xilol
- Microscopio óptico (objetivos 10x, 20x [opcional], 40x)

6. PRECAUCIONES

6.1. Para uso diagnóstico *in vitro*.

6.2. Los pasos donde es necesario utilizar xilol se deben realizar en una campana de extracción certificada.

6.3. Se sospecha que DAB (3,3'-Diaminobenzidina) es un carcinógeno. Evite el contacto físico y la exposición prolongada o repetida a esta sustancia. Utilícela en una campana de extracción certificada.

6.4. El reactivo de Anticuerpos ProEx[™] C contiene azida de sodio (NaN₃), un producto químico altamente tóxico en forma pura. En concentraciones del producto, aunque no estén consideradas como peligrosas, la azida de sodio puede reaccionar con las tuberías de plomo y cobre y formar acumulaciones de azidas de metal altamente explosivas. Después de desecharla, lave con grandes volúmenes de agua para evitar la acumulación de azida de metal en los tubos.

6.5. Las muestras y todos los materiales que se expongan a ellas se deben tratar como si tuvieran la capacidad de transmitir infecciones, por lo que se deben desechar con las precauciones adecuadas. Nunca utilice la boca sobre pipetas para medir reactivos y evite el contacto de los reactivos y muestras con la piel y las membranas mucosas. Si los reactivos entran en contacto con zonas sensibles, lávelas con abundante agua.

6.6. Reduzca al mínimo la contaminación microbiana de los reactivos para evitar tinciones no específicas.

6.7. Cualquier tiempo de incubación, temperatura o método que no sea el especificado puede producir resultados erróneos.

6.8. No utilice el reactivo de Anticuerpos ProEx[™] C después de la fecha de caducidad impresa en la caja. El usuario debe validar las condiciones de almacenamiento de los reactivos si éstas no son las que se especifican en el folleto de la caja.

6.9. Lleve el equipo de protección personal adecuado para evitar el contacto de los reactivos con los ojos y la piel. Consulte las hojas de datos de seguridad de materiales (MSDS) para obtener información adicional.

7. INSTRUCCIONES DE USO

7.1. Preparación de la muestra

7.1.1. Corte secciones de 4 µm del bloque de tejido y colóquelas en los portaobjetos de vidrio SuperFrost[®] Plus.

7.1.2. Etiquete los portaobjetos.

7.1.3. Caliente los portaobjetos en un horno de laboratorio durante 20 minutos.

7.2. Preparación del reactivo

7.2.1. Tampón de lavado 1X, 10 L

7.2.1.1. Combine 9 litros de H₂O desionizada con 1 litro de tampón de lavado 10X.

7.2.1.2. Tápelos y mézclelo dándole vuelta varias veces.

7.2.1.3. Etiquételo con una fecha de caducidad de 5 días a partir de la fecha de preparación.

7.2.1.4. Guárdelo a temperatura ambiente (20-25 °C).

7.2.2. EDTA 1X (prepárelo diariamente)

7.2.2.1. Añada 40 mL de EDTA 5X en un vaso de precipitados de 250 mL limpio.

7.2.2.2. Añada 160 mL de H₂O desionizada.

7.2.2.3. Mezcle revolviendo lentamente.

7.2.3. Hematoxilina (prepárela diariamente)

7.2.3.1. Añada 20 mL de H₂O desionizada en un tubo de ensayo de 25 mL.

7.2.3.2. Añada 1 mL de hematoxilina de Mayer.

7.2.3.3. Tape el tubo de ensayo y mézclelo dándole la vuelta varias veces.

8. PROTOCOLO DE TINCIÓN (manual o automático)

8.1. Notas del procedimiento de tinción

- 8.1.1. Este protocolo se puede utilizar con la tinción manual o automática empleando el sistema de detección EnVision[®]+ marca Dako.
- 8.1.2. Hay que equilibrar todos los reactivos a la temperatura ambiente (20-25 °C) antes de la inmunotinción.
- 8.1.3. Todas las incubaciones se deben realizar a temperatura ambiente a menos que se indique lo contrario.
- 8.1.4. No deje que los portaobjetos se sequen durante el procedimiento de tinción. Las preparaciones secas pueden producir un aumento de la tinción no específica. Hay que colocar los portaobjetos en una cámara húmeda durante incubaciones prolongadas.
- 8.2. Recuperación de epitopes**
- 8.2.1. Desparafinice los portaobjetos en 3 cambios de xilol (cinco minutos cada uno) seguido por 3 cambios de alcohol 100% (cinco minutos cada uno).
- 8.2.2. Vuelva a hidratar los portaobjetos enjuagándolos en H₂O desionizada.
- 8.2.3. Sumerja los portaobjetos en una solución tamponada de EDTA preparada 1X y coloque el contenedor en una olla de presión. Caliente los portaobjetos en la olla a presión durante 30 segundos.
- 8.2.4. Cuando se alcance el punto de calentamiento, deje los portaobjetos con el tampón en la olla de presión y deje que se enfrien 10 minutos.
- 8.2.5. Enjuague los portaobjetos con H₂O desionizada y transfíralos a una jarra Coplin limpia que contenga tampón de lavado 1X.
- 8.3. Reactivo inhibidor de peroxidasa**
- 8.3.1. Vacíe el tampón de lavado sobrante.
- 8.3.2. Coloque los portaobjetos en una cámara de humedad preparada (llena de toallas o gasas humedecidas en agua).
- 8.3.3. Aplique 200µL de reactivo inhibidor de peroxidasa para cubrir la sección de tejido.
- 8.3.4. Incúbelo durante 5 minutos (\pm 1 minuto).
- 8.3.5. Enjuague los portaobjetos en el tampón de lavado 1X, con 3 cambios, de 2 minutos cada uno.
- 8.4. Reactivo Anticuerpo Primario**
- 8.4.1. Vacíe el tampón de lavado sobrante.
- 8.4.2. Coloque los portaobjetos en una cámara de humedad preparada (llena de toallas o gasas humedecidas en agua).
- 8.4.3. Aplique 200 µl del anticuerpo primario ProEx[™] C para cubrir por completo la sección de tejido.
- 8.4.4. Incúbelo durante 40 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C).
- 8.4.5. Enjuague cada portaobjetos de manera individual con el tampón de lavado utilizando una botella de lavado (no dirija el flujo directamente a la sección de tejido).
- 8.4.6. Enjuague los portaobjetos en el tampón de lavado, con 3 cambios, de 2 minutos cada uno.
- 8.5. Sistema de detección (EnVision[®]+)**
- 8.5.1. Vacíe el tampón de lavado sobrante.
- 8.5.2. Coloque los portaobjetos en una cámara de humedad preparada (llena de toallas o gasas humedecidas en agua).
- 8.5.3. Aplique 200µL de reactivo polímero HRP para cubrir por completo la sección de tejido.
- 8.5.4. Incúbelo durante 30 minutos (\pm 1 minuto).
- 8.5.5. Enjuague los portaobjetos en el tampón de lavado, con 3 cambios, de 2 minutos cada uno.
- 8.5.6. Vacíe el tampón sobrante.
- 8.5.7. Coloque los portaobjetos en una cámara de humedad preparada (llena de toallas o gasas humedecidas en agua).
- 8.5.8. Aplique 200µL de reactivo en solución de trabajo DAB para cubrir la sección de tejido.
- 8.5.9. Incúbelo durante 5 minutos (\pm 1 minuto).
- 8.5.10. Enjuague durante 5 minutos los portaobjetos con H₂O desionizada que esté corriendo.
- 8.5.11. Enjuague los portaobjetos en el tampón de lavado, con 1 cambio durante 2 minutos.
- 8.6. Contratinción**
- 8.6.1. Coloque los portaobjetos en una cámara de humedad preparada (llena de toallas o gasas humedecidas en agua).
- 8.6.2. Aplique 200µL de contratinción de hematoxilina para cubrir por completo la sección de tejido.
- 8.6.3. Incúbelo durante 5 minutos (\pm 10 minutos).
- 8.6.4. Enjuague los portaobjetos durante 3 minutos en H₂O del tubo.
- 8.7. Montaje**
- 8.7.1. Sumerja los portaobjetos en etanol de 95% durante 1 minuto o realice 25 inmersiones.
- 8.7.2. Sumerja los portaobjetos en alcohol absoluto, con 4 cambios, durante 1 minuto cada uno, o realice 25 inmersiones.
- 8.7.3. Aclare en xilol con 3 cambios, durante 1 minuto cada uno o realice 25 inmersiones.
- 8.7.4. Monte los portaobjetos con medio de montaje permanente no acuoso utilizando cubreobjetos de vidrio.
- 9. ESTABILIDAD**
- 9.1. Si se almacenan a las temperaturas recomendadas, los viales de los reactivos no abiertos son estables hasta la fecha de caducidad que se indica en el vial.
- 9.2. Una vez abiertos, los reactivos son estables durante noventa (90) días si se almacenan a las temperaturas recomendadas.
- 10. CONTROL DE CALIDAD**
- 10.1. Las variaciones en los resultados suelen deberse a diferencias en el tratamiento de las muestras con respecto a los procedimientos de prueba recomendados. Para obtener información adicional, consulte las directrices de control de calidad del programa de certificación para inmunohistoquímica del Colegio de Patología Norteamericano (CAP).
- 10.2. Con cada proceso de tinción se debería incluir un control de tejido positivo para verificar el ensayo. Si el control de tejidos positivo no indica que la tinción es positiva, los resultados de las otras muestras de prueba se deberían considerar sospechosos o no válidos.
- 10.3. Hay que incluir un control de tejido negativo con cada proceso de tinción para verificar la especificidad del anticuerpo primario y para obtener una indicación de la tinción de fondo. Si el control de tejido negativo indica que la tinción específica es positiva, los resultados de las otras muestras de prueba se deberían considerar sospechosos o no válidos.
- 10.4. También se puede utilizar un reactivo de control negativo no específico en lugar del anticuerpo primario para evaluar la tinción de fondo o no específica.
- 11. INTERPRETACIÓN**
- La tinción marrón / café de moderada a intensa en el núcleo de las células indica la presencia de una inducción aberrante de fase S. Los portaobjetos con tinción deberán ser evaluados por un patólogo con un microscopio óptico. La interpretación de los resultados debe ser realizada por un profesional certificado en el contexto del historial del paciente y otras pruebas diagnósticas.
- 12. LIMITACIONES**
- 12.1. La tinción inmunohistoquímica requiere de entrenamiento especializado para seleccionar y aplicar reactivos.
- 12.2. Este reactivo realizará 25 pruebas suponiendo que se aplican 200µL de reactivo por portaobjetos.
- 12.3. Algunas células normales pueden indicar una tinción positiva para la inducción aberrante de fase S.
- 12.4. La tinción óptima de tejidos depende de la fijación y el procesamiento de la muestra.
- 12.5. La tinción de fondo puede aumentar o ser no específica debido (aunque sin limitarse a estas causas) a variaciones en el procedimiento, a un enjuague incorrecto entre los pasos del ensayo y/o al procesamiento inadecuado de las muestras.










13. RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Problema	Posible causa	Acción
No hay tinción en los portaobjetos de control positivo	Los reactivos se han aplicado en el orden incorrecto.	Revise el protocolo de tinción.
	Se ha olvidado aplicar algún reactivo.	Repita el protocolo de tinción.
	El DAB se ha preparado incorrectamente.	Prepárelo de acuerdo con las especificaciones del fabricante y repita el protocolo de tinción.
Tinción débil en los portaobjetos de control positivos	La recuperación de antígenos es insuficiente.	Revise los tiempos de incubación y la temperatura del tampón de recuperación de los antígenos/epítipes (consulte la sección 8.2).
	Se ha utilizado un tampón de recuperación de antígenos incorrecto.	Revise el protocolo de tinción y prepare el tampón de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
	La incubación del anticuerpo primario es inadecuada.	Revise el protocolo de tinción y ajuste los tiempos de incubación de la manera correspondiente.
	El anticuerpo primario se ha diluido.	Utilice el anticuerpo primario de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
	Ha quedado demasiado tampón de lavado en el portaobjetos antes de aplicar el siguiente reactivo.	Repita el protocolo de tinción. Tápelos y limpie el exceso de tampón de lavado.
	La tinción de fondo es excesiva	El enjuague entre los pasos del ensayo es inadecuado.
Se han utilizado tiempos de incubación excesivos con reactivos clave.		Revise el protocolo de tinción y ajuste los tiempos de incubación de la manera correspondiente.
Los portaobjetos se secan durante la incubación del ensayo o los pasos de enjuague.		Repita el protocolo de tinción. Revise la cámara de humedad.

14. REFERENCIAS

- Kastan M and Bartec J. Cell cycle checkpoints and cancer. Nature, 2004. Vol 432:316-323.
- Massague J. G1 cell-cycle control and cancer. Nature, 2004. Vol 432:298-306.
- Freeman A, Morris LS, Millis AD, Stoeber K, Laskey RA, Williams GH and Coleman N. Minichromosome Maintenance Proteins as Biological Markers of Dysplasia and Malignancy. *CI Cancer Research*, 1999. Vol 5:2121-2132.
- Ishimi Y, Okayasu I, Kato C, Kwon H, Kimura H, Yamada K and Song S. Enhanced expression of MCM proteins in cancer cells derived from uterine cervix. *Eur. J. Biochem* 2003. 270:1089-1101.
- Lei M and Tye BK. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM Complex. *J Cell Science* 2001. Vol. 114 (8): 1447-1454.

15. GLOSARIO DE SÍMBOLOS

	Número de catálogo
	Para uso diagnóstico <i>in vitro</i>
	Consultar instrucciones de uso
	Contiene 7 mL
	Atención: consultar documentación incluida
	Límites de temperatura de almacenamiento
	Código de lote
	Utilizar antes de AAAA-MM-DD o AAAA-MM
	Fabricante

INFORMACIÓN TÉCNICA

USA
Telephone: 1-877-822-7771
Fax: 1-336-290-8333

Europe
Telephone: +32 (0)53 720 673
Fax: +32 (0)53 720 678



TriPath Imaging, Inc.
780 Plantation Drive
Burlington, NC 27215 USA



Benex Limited
Rineanna House
Shannon Free Zone
Shannon, County Clare
Ireland



Desarrollado con tecnología de Millennium Pharmaceuticals, Inc.



MILLENNIUM y MILLENNIUM son marcas comerciales de Millennium Pharmaceuticals, Inc.

Millennium Pharmaceuticals, Inc.
40 Landsdowne Street
Cambridge, MA 02139 USA
www.millennium.com

ProEx es un producto y una marca comercial de TriPath Imaging, Inc.



DESCRIZIONE DEI REAGENTI

Classe Ig IgG₁

Immunogeno TOP2A e MCM2 umani ricombinanti

1. USO PREVISTO

Per uso diagnostico *in vitro*.

Da utilizzare per la colorazione manuale o automatica impiegando le soluzioni di rilevazione Dako Envision[®]+

Il test immunostochimico ProEx[™] C è destinato alla valutazione qualitativa dell'induzione della fase S aberrante in biopsie fissate in formalina e incluse in paraffina. L'interpretazione dei risultati deve essere affidata ad un patologo e deve avvenire tenendo presente i risultati di altri test diagnostici e l'anamnesi del paziente.

2. RIEPILOGO E INFORMAZIONI DI BASE

Le proteine di mantenimento del minicromosoma (MCM) e la topoisomerasi 2 alfa (TOP2A) rivestono un ruolo importante nella replicazione del DNA eucariotico. Per esempio, le oncoproteine HPV E6 e E7 evitano il punto di controllo di un ciclo cellulare critico causando un ciclo di induzione della fase S prolungato e aberrante. Durante l'attivazione trascrizionale del ciclo cellulare aberrante, i livelli delle proteine MCM2 e TOP2A aumentano nelle cellule proliferanti.

E' stato dimostrato che entrambe le proteine MCM2 e TOP2A sono sovraesprese in diversi tessuti displasici e maligni, inclusa la neoplasia cervicale.^{1,5} La sovraespressione di queste proteine in cellule morfologicamente anomale, come dimostrato da una colorazione nucleare da moderata a intensa durante l'utilizzo di tecniche immunostochimiche (IHC), è indice dell'induzione della fase S aberrante.

3. REAGENTE FORNITO

Il reagente anticorpale ProEx[™] C contiene anticorpi monoclonali da topo anti-MCM2 e anti-TOP2A purificati da sovrantante di coltura tissutale diluito in soluzione salina tamponata con stabilizzatori delle proteine e sodio azide allo 0,09%.

4. PRINCIPI DELLA PROCEDURA

I campioni di tessuto fissati in formalina e inclusi in paraffina sono sezionati, depositati su vetrino e sparaffinati. I campioni sezionati sono trattati preliminarmente con un tampone al fine di smascherare i siti antigenici. Vengono aggiunti degli agenti bloccanti per minimizzare la colorazione di fondo causata da perossidasi endogene. Il campione viene quindi incubato con il reagente anticorpale C ProEx[™]. L'aggiunta di un sistema di rilevazione basato su anticorpi legati ad un enzima provoca la formazione di un prodotto cromogenico visibile, localizzato nei siti di legame antigene-anticorpo. Il campione viene sottoposto a colorazione di contrasto con ematossilina. Quindi, viene montato il coprioggetto. I risultati vengono interpretati al microscopio ottico da un patologo.

Il test immunostochimico ProEx[™] C è applicabile alla colorazione sia manuale che automatica.

5. MATERIALI E REAGENTI NECESSARI MA NON FORNITI (per la procedura manuale)

- EDTA 5X – Codice CB9172 (BioCare)
- EnVision[®]+ Kit – Codice K4007 (Dako)
- Ematossilina di Mayer – Codice S3309 (Dako)
- Tampone di lavaggio 10X – Codice S3006 (Dako)
- Controllo negativo universale di topo – Codice N1698 (Dako)
- Pentola a pressione
- Vetrini (SuperFrost[®] Plus o equivalenti)
- Mezzo di montaggio (ShurMount[®] o equivalenti)
- Pipette e punte per pipette (in grado di erogare volumi da 20 µl, 200 µl e 1000 µl)
- Timer (con intervalli di 1-60 minuti)
- Acqua deionizzata
- Etanolo (95% e 100%)
- Vetrini coprioggetti
- Pennarello da laboratorio
- Bottiglione da 10L (Nalgene[®] o equivalente)
- Flaconi monouso sterili

- Essiccatore per vetrini
- Rack per vetrini con vaschette di colorazione
- Xilene o sostituti dello xilene
- Microscopio ottico (obiettivi da 10x, 20x [opzionale], 40x)

6. PRECAUZIONI

- 6.1. Per uso diagnostico *in vitro*.
- 6.2. Le procedure di pulizia dei vetrini che richiedono xilene devono essere eseguite sotto una cappa certificata per l'abbattimento di vapori chimici.
- 6.3. Il DAB (3,3'-diaminobenzidina) è classificato come prodotto sospetto di essere cancerogeno. Evitare il contatto fisico ed esposizioni prolungate o ripetute. Da utilizzare con una cappa per l'abbattimento di vapori chimici.
- 6.4. Il reagente anticorpale C ProEx[™] contiene sodio azide (NaN₃), una sostanza chimica fortemente tossica in forma pura. Alle condizioni indicate, sebbene non sia classificata come prodotto a rischio, la sodio azide può reagire con il rame o il piombo delle tubature formando accumuli di azidi metalliche altamente esplosive. Durante lo smaltimento, sciacquare le tubature con abbondante acqua per prevenire l'eventuale accumulo di azidi metalliche.
- 6.5. I campioni e tutti i materiali che entrano in contatto con essi devono essere trattati come materiali potenzialmente infetti e pertanto devono essere smaltiti assumendo tutte le precauzioni necessarie. Non pipettare mai i reagenti con la bocca ed evitare che reagenti e campioni entrino in contatto con la pelle e le membrane mucose. In caso di contatto dei reagenti con zone sensibili, lavare con abbondante acqua.
- 6.6. Evitare la contaminazione batterica dei reagenti, onde evitare una colorazione aspecifica.
- 6.7. Tempi, temperature e modalità di incubazione diversi da quelli specificati possono generare risultati erronei.
- 6.8. Non utilizzare il reagente anticorpale C ProEx[™] dopo la data di scadenza indicata sulla confezione. Nel caso in cui i reagenti vengano conservati in condizioni diverse da quelle specificate nel foglietto illustrativo, l'utente dovrà convalidarne lo stato.
- 6.9. Per evitare il contatto del reagente con occhi e cute, indossare adeguati presidi di protezione individuale. Per ulteriori informazioni, consultare la scheda di sicurezza del materiale (MSDS).

7. ISTRUZIONI PER L'USO

7.1. Preparazione dei campioni

- 7.1.1. Tagliare dal blocco tissutale delle sezioni di 4 µm e posizionarle su vetrini SuperFrost[®] Plus.
- 7.1.2. Etichettare i vetrini.
- 7.1.3. Porre i vetrini in un forno a convezione d'aria forzata per 20 minuti.

7.2. Preparazione dei reagenti

- 7.2.1. Tampone di lavaggio 1X, 10L
 - 7.2.1.1. Unire 9 litri di H₂O deionizzata ad 1 litro di tampone di lavaggio 10X.
 - 7.2.1.2. Chiudere bene e miscelare capovolgendo più volte.
 - 7.2.1.3. Etichettare calcolando una data di scadenza di 5 giorni dalla data di preparazione.
 - 7.2.1.4. Conservare a temperatura ambiente (20-25 °C).
- 7.2.2. 1X EDTA (da preparare fresco quotidianamente)
 - 7.2.2.1. Aggiungere 40 mL di 5X EDTA ad una beuta pulita da 250 mL.
 - 7.2.2.2. Aggiungere 160 mL di H₂O deionizzata.
 - 7.2.2.3. Miscelare mescolando delicatamente.
- 7.2.3. Ematossilina (da preparare fresca quotidianamente)
 - 7.2.3.1. Aggiungere 20 mL di H₂O distillata ad una provetta da 25 mL.
 - 7.2.3.2. Aggiungere 1 mL di ematossilina Mayer.
 - 7.2.3.3. Chiudere bene la provetta e miscelare capovolgendola più volte.

8. PROTOCOLLO DI COLORAZIONE (manuale o automatica)

8.1. Note sulla procedura di colorazione

- 8.1.1. Questo protocollo può essere utilizzato con colorazione manuale o automatica impiegando le soluzioni di rilevamento Dako Envision[®]+
- 8.1.2. Tutti i reagenti devono essere equilibrati a temperatura ambiente (20-25°C) prima dell'immunocolorazione.
- 8.1.3. Tutte le incubazioni devono essere eseguite a temperatura ambiente se non diversamente specificato.
- 8.1.4. Evitare l'essiccamento dei vetrini durante la procedura di colorazione. Preparazioni essiccate possono presentare una maggiore colorazione aspecifica. Per incubazioni prolungate, porre i vetrini in una camera umidificata.

8.2. Smascheramento degli epitopi

- 8.2.1. Sparaffinare i vetrini con 3 cambi di xilene (cinque minuti ciascuno) seguiti da 3 cambi di alcol al 100% (cinque minuti ciascuno).
- 8.2.2. Reidratare i vetrini con un risciacquo in H₂O deionizzata.
- 8.2.3. Immergere i vetrini nella soluzione tampone 1X EDTA e sistemare il contenitore in una pentola a pressione. Scaldare i vetrini nella pentola a pressione per 30 secondi.
- 8.2.4. Al termine, lasciare i vetrini nella soluzione tampone nella pentola a pressione e farli raffreddare per 10 minuti.
- 8.2.5. Sciacquare i vetrini con acqua deionizzata e trasferirli in una vaschetta portavetrini pulita contenente il tampone di lavaggio 1X.

8.3. Reagente bloccante della perossidasi

- 8.3.1. Scuotere per eliminare il tampone di lavaggio in eccesso.
- 8.3.2. Caricare i vetrini in una camera umidificata precedentemente preparata (riempita con salviette o garze inumidite con acqua).
- 8.3.3. Applicare 200µL di reagente bloccante della perossidasi coprendo la sezione di tessuto.
- 8.3.4. Incubare per 5 minuti (±1 minuto).
- 8.3.5. Sciacquare i vetrini nel tampone di lavaggio 1X (3 cambi, 2 minuti ciascuno).

8.4. Reagente anticorpale primario

- 8.4.1. Scuotere per eliminare il tampone di lavaggio in eccesso.
- 8.4.2. Caricare i vetrini in una camera umidificata precedentemente preparata (riempita con salviette o garze inumidite con acqua).
- 8.4.3. Applicare 200 µL di reagente anticorpale C ProEx™ coprendo completamente la sezione di tessuto.
- 8.4.4. Incubare per 40 minuti a temperatura ambiente (20-25 °C).
- 8.4.5. Sciacquare ciascun vetrino singolarmente con tampone di lavaggio usando una spruzzetta (non indirizzare il flusso direttamente sulla sezione di tessuto).
- 8.4.6. Sciacquare i vetrini nel tampone di lavaggio (3 cambi, 2 minuti ciascuno).

8.5. Soluzioni di rilevazione (utilizzando i reagenti EnVision®+)

- 8.5.1. Picchiettare per eliminare il tampone di lavaggio in eccesso.
- 8.5.2. Caricare i vetrini in una camera umidificata precedentemente preparata (riempita con salviette o garze inumidite con acqua).
- 8.5.3. Applicare 200 µL di reagente poli-HRP per coprire completamente la sezione di tessuto.
- 8.5.4. Incubare per 30 minuti (±1 minuto).
- 8.5.5. Sciacquare i vetrini nel tampone di lavaggio (3 cambi, 2 minuti ciascuno).
- 8.5.6. Picchiettare per eliminare il tampone in eccesso.
- 8.5.7. Caricare i vetrini in una camera umidificata precedentemente preparata (riempita con salviette o garze inumidite con acqua).
- 8.5.8. Applicare 200 µL di soluzione di lavoro DAB coprendo la sezione di tessuto.
- 8.5.9. Incubare per 5 minuti (±1 minuto).
- 8.5.10. Sciacquare i vetrini per 5 minuti in acqua corrente deionizzata.
- 8.5.11. Sciacquare i vetrini nel tampone di lavaggio (1 cambio per 2 minuti).

8.6. Colorazione di contrasto

- 8.6.1. Caricare i vetrini in una camera umidificata precedentemente preparata (riempita con salviette o garze inumidite con acqua).
- 8.6.2. Applicare 200 µL di colorazione di contrasto con ematosilina coprendo completamente la sezione di tessuto.
- 8.6.3. Incubare per 5 minuti (±10 secondi).
- 8.6.4. Sciacquare i vetrini per 3 minuti in acqua corrente.

8.7. Montaggio

- 8.7.1. Immergere i vetrini in etanolo 95% (1 minuto o 25 immersioni).
- 8.7.2. Immergere i vetrini in alcol assoluto (4 cambi, 1 minuto ciascuno o 25 immersioni).
- 8.7.3. Chiarificare con xilene (3 cambi, 1 minuto ciascuno o 25 immersioni).
- 8.7.4. Applicare i coprioggetti con mezzo di montaggio permanente non acquoso usando coprioggetti in vetro.

9. STABILITÀ

- 9.1. Se conservati alle temperature consigliate, i reagenti chiusi rimangono stabili fino alla data di scadenza indicata sul flacone.
- 9.2. Una volta aperti, i reagenti sono stabili per novanta (90) giorni se conservati alle temperature consigliate.

10. CONTROLLO DI QUALITÀ

- 10.1. La variabilità dei risultati dipende spesso da una manipolazione dei campioni che si discosta dalle procedure consigliate. Per ulteriori informazioni, consultare le linee guida per il controllo di qualità nel Certification Program for Immunohistochemistry del College of American Pathologists (CAP).
- 10.2. Per verificare la performance del saggio, deve essere incluso un controllo di tessuto positivo in ogni procedura di colorazione. Se il controllo di tessuto positivo non mostra una colorazione positiva, i risultati ottenuti per gli altri campioni sono da considerarsi inattendibili o non validi.
- 10.3. Un controllo di tessuto negativo deve essere incluso in ogni fase di colorazione per verificare la specificità dell'anticorpo primario e per fornire indicazioni sulla colorazione di fondo. Se il controllo di tessuto negativo mostra una colorazione specifica positiva, i risultati ottenuti per gli altri campioni sono da considerarsi inattendibili o non validi.
- 10.4. Per valutare la colorazione di fondo aspecifica, si può utilizzare anche un reagente di controllo negativo aspecifico al posto dell'anticorpo primario.

11. INTERPRETAZIONE

Una colorazione marrone da moderata a intensa nei nuclei delle cellule indica la presenza di induzione della fase S aberrante. Il tecnico di patologia deve valutare i vetrini colorati al microscopio ottico. L'interpretazione dei risultati deve essere affidata ad un patologo e deve avvenire tenendo presente i risultati di altri test diagnostici e l'anamnesi del paziente.

12. LIMITAZIONI

- 12.1. La colorazione immunostochimica richiede un corso di formazione specifico per la selezione e l'applicazione dei reagenti.
- 12.2. Applicando 200 µL di reagente per vetrino, si ha una quantità di reagente necessaria per eseguire 25 test.
- 12.3. Alcune cellule normali possono assumere una colorazione positiva indicando induzione della fase S aberrante.
- 12.4. Una colorazione ottimale del tessuto dipende dal fissaggio e dal trattamento del campione.
- 12.5. Può verificarsi una colorazione aspecifica o aumentata del colore di fondo in alcune condizioni, tra cui, ma non solo, variazioni nella procedura, risciacquo inadeguato durante le varie fasi del saggio e/o trattamento inadeguato del campione.










13. RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

Problema	Possibile causa	Rimedio
Non ha luogo alcuna colorazione dei vetrini di controllo positivo.	L'ordine di applicazione dei reagenti è scorretto.	Rivedere il protocollo di colorazione.
	Omissione di un reagente.	Ripetere il protocollo di colorazione.
	Preparazione inadeguata del DAB.	Preparare secondo le specifiche del produttore e ripetere il protocollo di colorazione.
La colorazione dei vetrini di controllo positivo è molto debole.	Insufficiente smascheramento dell'antigene.	Controllare i tempi di incubazione e la temperatura del tampone di smascheramento dell'antigene/epitopo (consultare la sezione 8.2).
	È stato utilizzato il tampone sbagliato di smascheramento dell'antigene.	Rivedere il protocollo di colorazione e preparare il tampone attenendosi alle istruzioni del produttore.
	L'incubazione dell'anticorpo primario è inadeguata.	Rivedere il protocollo di colorazione e adattare opportunamente i tempi di incubazione.
	L'anticorpo primario è stato diluito.	Utilizzare l'anticorpo primario attenendosi alle istruzioni del produttore.
	Eccessiva quantità di tampone di lavaggio residuo sul vetrino prima dell'applicazione del reagente successivo.	Ripetere il protocollo di colorazione. Scuotere ed eliminare il tampone di lavaggio in eccesso.
La colorazione di fondo è eccessiva.	Il risciacquo tra le fasi del saggio è inadeguato.	Ripetere il protocollo di colorazione. Prevedere ulteriori fasi di risciacquo con tampone di lavaggio.
	I tempi di incubazione dei reagenti chiave sono eccessivi.	Rivedere il protocollo di colorazione e adattare opportunamente i tempi di incubazione.
	I vetrini si sono essiccati durante le fasi di incubazione o risciacquo.	Ripetere il protocollo di colorazione. Controllare la camera umidificata.

14. BIBLIOGRAFIA

- Kastan M and Bartec J. Cell cycle checkpoints and cancer. Nature, 2004. Vol 432:316-323.
- Massague J. G1 cell-cycle control and cancer. Nature, 2004. Vol 432:298-306.
- Freeman A, Morris LS, Millis AD, Stoeber K, Laskey RA, Williams GH and Coleman N. Minichromosome Maintenance Proteins as Biological Markers of Dysplasia and Malignancy. CI Cancer Research, 1999. Vol 5:2121-2132.
- Ishimi Y, Okayasu I, Kato C, Kwon H, Kimura H, Yamada K and Song S. Enhanced expression of MCM proteins in cancer cells derived from uterine cervix. Eur. J. Biochem 2003. 270:1089-1101.
- Lei M and Tye BK. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM Complex. J Cell Science 2001. Vol. 114 (8): 1447-1454.

15. GLOSSARIO DEI SIMBOLI


	Codice
	Per uso diagnostico <i>in vitro</i>
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Contiene 7 mL
	Attenzione, consultare la documentazione allegata
	Limiti di temperatura per la conservazione
	Codice lotto
	Utilizzare entro AAAA-MM-GG o AAAA-MM
	Produttore

INFORMAZIONI TECNICHE

USA
Telephone: 1-877-822-7771
Fax: 1-336-290-8333

Europe
Telephone: +32 (0)53 720 673
Fax: +32 (0)53 720 678


TriPath Imaging, Inc.
780 Plantation Drive
Burlington, NC 27215 USA


Benex Limited
Rineanna House
Shannon Free Zone
Shannon, County Clare
Ireland



Sviluppato con tecnologia di Millennium Pharmaceuticals, Inc.

 MILLENNIUM™

 e MILLENNIUM™ sono marchi di fabbrica di Millennium Pharmaceuticals, Inc.

Millennium Pharmaceuticals, Inc.
40 Landsdowne Street
Cambridge, MA 02139 USA
www.millennium.com

ProEx è un prodotto e marchio commerciale di TriPath Imaging, Inc.



REAGENSBESCHRIJVING

Ig-klasse IgG₁

Immunogeen Recombinant Humaan MCM2 en TOP2A

1. BEOOGD GEBRUIK

Voor in-vitrodiagnostiek.

Voor gebruik met manuele kleuring of geautomatiseerde kleuring met behulp van de Dako Envision[®]+ detectiechemie.

De ProEx[™] C immunohistochemische test is bedoeld voor de kwalitatieve evaluatie van afwijkende S-fase-inductie van in formaline gefixeerde en in paraffine ingebedde weefselbiopsieën. De resultaten moeten door een bevoegde deskundige worden geïnterpreteerd, rekening houdend met de klinische anamnese van de patiënt en andere diagnostische tests.

2. SAMENVATTING EN UITLEG

Minichromosome maintenance (MCM) en topo-isomerase II alfa (TOP2A) eiwitten spelen een belangrijke regulerende rol bij eukaryotische DNA-replicatie. De HPV-oncoproteïnen E6 en E7 bijvoorbeeld, slaan essentiële controlepunten uit de celcyclus over, hetgeen resulteert in een verlengde en afwijkende cyclus van de S-fase-inductie. Tijdens de transcriptionele activering van de afwijkende celcyclus nemen de niveaus van MCM2- en TOP2A-eiwitten in de prolifererende cellen toe.

Bij zowel MCM2- als TOP2A-eiwitten is overexpressie aangetoond in een aantal verschillende dysplastische en maligne weefsels waaronder cervicale neoplasie¹⁻⁵. De overexpressie van deze eiwitten in morfologisch abnormale cellen, zoals aangetoond door een matig-tot-intens nucleair kleuringpatroon met behulp van immunohistochemische (IHC) technieken, wijst op de aanwezigheid van afwijkende S-fase-inductie.

3. GELEVERD REAGENS

ProEx[™] C-antilichaamreagens bevat muis-monoklonale anti-MCM2 en anti-TOP2A, gezuiverd uit weefselcultuursupernatans en verdund in gebufferde zoutoplossing met proteïnestabilisatoren en 0,09% natriumazide.

4. PRINCIPES VAN DE PROCEDURE

In formaline gefixeerde en in paraffine ingebedde weefselmonsters worden geprepareerd, op glazen objectglaasjes geplaatst en gedeparaffineerd. De geprepareerde monsters worden voorbehandeld met een buffer om antigenen gebieden bloot te stellen. Er worden blokkeermiddelen toegevoegd om achtergrondkleuring veroorzaakt door endogene peroxidase tot een minimum te beperken. Het monster wordt vervolgens geïncubeerd met het ProEx[™] C-antilichaamreagens. Toevoeging van een aan enzym gekoppeld chromogeensysteem resulteert in de vorming van een zichtbaar chromogeenproduct in de antigeen-antilichaam bindende gebieden. Op het monster wordt vervolgens achtergrondkleuring toegepast met hematoxyline en op het objectglaasje wordt een dekglasje geplaatst. De resultaten worden geïnterpreteerd door een getraind deskundige met behulp van een lichtmicroscop.

ProEx[™] C immunohistochemische test kan worden gebruikt voor zowel handmatige als geautomatiseerde kleuring.

5. VEREISTE MAAR NIET BIJGELEVERDE MATERIALEN EN REAGENTIA (voor handmatige procedure)

- EDTA 5X – Cat #CB9172 (BioCare)
- EnVision[®]+ Kit – Cat # K4007 (Dako)
- Mayer's hematoxyline – Cat # S3309 (Dako)
- Wasbuffer 10X – Cat # S3006 (Dako)
- Universele muis-negatieve controle – Cat # N1698 (Dako)
- Hogedrukpan
- Glazen objectglaasjes (SuperFrost[®] Plus of gelijkwaardig)
- Preparatiemedium (ShurMount[®] of gelijkwaardig)
- Pipetten en pipettips (voor volumeafgifte van 20 , 200 en 1000)
- Timer (met mogelijkheid voor intervallen van 1-60 minuten)
- Gedemineraliseerd water
- Ethanol 95%, 100%
- Glazen dekglasjes
- Markeerstift voor het laboratorium
- 10 L fles (Nalgene[®] of gelijkwaardig)
- Steriele wegwerpflessen
- Objectglaasjesdroger

- Objectglaasjesrek met kleuringschaaltjes
- Xyleen of xyleenvervangers
- Lichtmicroscop (10x, 20x (optioneel), 40x objectieven)

6. VOORZORGSMAATREGELEN

- 6.1.** Voor in-vitrodiagnostiek.
- 6.2.** Het reinigen van objectglaasjes met gebruik van xyleen moet gebeuren onder een goedgekeurde afzuigkap voor giftige gassen.
- 6.3.** DAB (3,3'-diaminobenzidine) is geclassificeerd als vermoedelijk carcinogeen. Vermijd lichamelijk contact en langdurige of herhaalde blootstelling. Gebruik onder een goedgekeurde afzuigkap voor giftige gassen.
- 6.4.** Het ProEx[™] C-antilichaamreagens bevat natriumazide (NaN₃), een chemische stof die in zuivere vorm uiterst giftig is. Hoewel natriumazide in productconcentraties niet wordt geclassificeerd als gevaarlijk, kan het toch reageren met loden en koperen leidingen, waarbij uiterst explosieve metaalaziden worden gevormd. Bij het afvoeren spoelen met ruime hoeveelheden water om ophoping van metaalaziden in de leidingen te voorkomen.
- 6.5.** Monsters en alle aan monsters blootgestelde materialen dienen te worden behandeld als potentiële overdragers van infecties en met inachtneming van de juiste voorzorgsmaatregelen te worden verwijderd. Reagentia nooit met de mond pipetteren en contact van reagentia en monsters met de huid en slijmvliezen vermijden. Indien reagentia in contact komen met gevoelige plekken op het lichaam, dient u deze met een ruime hoeveelheid water te wassen.
- 6.6.** Beperk microbiële verontreiniging van reagentia tot een minimum om niet-specifieke kleuring te vermijden.
- 6.7.** Andere incubatietijden, -temperaturen of -methoden dan vermeld kunnen leiden tot onjuiste resultaten.
- 6.8.** Gebruik het ProEx[™] C-antilichaamreagens niet na de uiterste gebruiksdatum zoals die op de verpakking vermeld staat. Als reagentia bewaard worden onder andere omstandigheden dan vermeld in de productbijsluiters, moeten de omstandigheden door de gebruiker worden gecontroleerd.
- 6.9.** Draag de juiste beschermende uitrusting om contact van reagentia met ogen en huid te vermijden. Zie het veiligheidsinformatieblad voor verdere informatie.

7. INSTRUCTIES VOOR GEBRUIK

7.1. Voorbereiding van het monster

- 7.1.1.** Snijd coupes van 4 uit het weefselblokje en plaats de coupes op SuperFrost[®] Plus glazen objectglaasjes.
- 7.1.2.** Voorzie de objectglaasjes van een etiket.
- 7.1.3.** Laat de objectglaasjes gedurende 20 minuten drogen in een heteluchtoven.

7.2. Reagensvoorbereiding

- 7.2.1.** 1X wasbuffer, 10 L
- 7.2.1.1.** Meng 9 liter gedemineraliseerd H₂O met 1 liter 10X wasbuffer.
- 7.2.1.2.** Sluit af en meng door een paar keer om te keren.
- 7.2.1.3.** Voorzie de fles van een etiket met een gebruiksdatum van 5 dagen vanaf de bereidingsdatum.
- 7.2.1.4.** Bewaar bij kamertemperatuur (20-25 °C).
- 7.2.2.** 1X EDTA (dagelijks vers klaarmaken)
- 7.2.2.1.** Voeg 40 ml 5X EDTA toe aan een schone beker van 250 ml.
- 7.2.2.2.** Voeg 160 ml gedemineraliseerd H₂O toe.
- 7.2.2.3.** Meng door voorzichtig te roeren.
- 7.2.3.** Hematoxyline (dagelijks vers klaarmaken)
- 7.2.3.1.** Vul een reageerbuisje van 25 ml met 20 ml gedestilleerd H₂O.
- 7.2.3.2.** Voeg 1 ml Mayer's hematoxyline toe.
- 7.2.3.3.** Sluit het reageerbuisje af en meng door een paar keer om te keren.

8. KLEURINGS-PROTOCOL (handmatig of geautomatiseerd)

8.1. Opmerkingen kleuringsprocedure

- 8.1.1. Dit protocol kan worden gebruikt voor handmatige kleuring of geautomatiseerde kleuring met behulp van de Dako Envision®+ detectiechemie.
- 8.1.2. Alle reagentia dienen voorafgaand aan immunokleuring op kamertemperatuur (20–25 °C) te worden gebracht.
- 8.1.3. Alle incubaties moeten bij kamertemperatuur worden uitgevoerd, tenzij anders vermeld.
- 8.1.4. Laat de preparaten tijdens de kleuringsprocedure niet uitdrogen. Uitgedroogde preparaten kunnen een verhoogde niet-specifieke kleuring vertonen. Objectglasjes dienen in een bevochtigingskamer te worden geplaatst voor langdurige incubaties.

8.2. Epitooptesterking

- 8.2.1. Deparaffineer de preparaten in xyleen, in 3 wisselbeurten (van elk vijf minuten), gevolgd door 100% alcohol, in 3 wisselbeurten (van elk vijf minuten).
- 8.2.2. Rehydrateer de preparaten door ze te spoelen in gedemineraliseerd H₂O.
- 8.2.3. Dompel de objectglasjes in bereide 1X EDTA-bufteroplossing en plaats de houder in een hogedrukpan. Verhit de objectglasjes in de hogedrukpan gedurende 30 seconden.
- 8.2.4. Laat de objectglasjes na het verstrijken van de verhittingstijd nog 10 minuten in de buffer in de hogedrukpan afkoelen.
- 8.2.5. Spoel de objectglasjes af met gedemineraliseerd H₂O en breng ze over naar een schone Coplin jar met 1X wasbuffer.

8.3. Peroxidase blokkeerreagens

- 8.3.1. Tik overmatige wasbuffer af.
- 8.3.2. Laad de objectglasjes in een voorbereide bevochtigingskamer (gevuld met met water bevochtigde keukenrol of gaas).
- 8.3.3. Gebruik 200 µl peroxidase blokkeerreagens om de weefselcoupe te bedekken.
- 8.3.4. Incubeer gedurende 5 minuten (+1 minuut).
- 8.3.5. Spoel de objectglasjes in 1X wasbuffer, in 3 wisselbeurten van elk 2 minuten.

8.4. Primaire antilichaamreagens

- 8.4.1. Tik overmatige wasbuffer af.
- 8.4.2. Laad de objectglasjes in de voorbereide bevochtigingskamer (gevuld met met water bevochtigde keukenrol of gaas).
- 8.4.3. Gebruik 200 µl ProEx™ C-antilichaamreagens om de weefselcoupe volledig te bedekken.
- 8.4.4. Incubeer gedurende 40 minuten bij kamertemperatuur (20-25 °C).
- 8.4.5. Spoel elke objectglasje afzonderlijk af met wasbuffer met behulp van een wasfles (richt de stroom niet rechtstreeks op de weefselcoupe).
- 8.4.6. Spoel de objectglasjes in wasbuffer, in 3 wisselbeurten van elk 2 minuten.

8.5. Detectiechemie (met behulp van EnVision®+ reagentia)

- 8.5.1. Tik overmatige wasbuffer af.
- 8.5.2. Laad de objectglasjes in een voorbereide bevochtigingskamer (gevuld met met water bevochtigde keukenrol of gaas).
- 8.5.3. Gebruik 200 µl HRP-polymeerreegens om de weefselcoupe volledig te bedekken.
- 8.5.4. Incubeer gedurende 30 minuten (+1 minuut).
- 8.5.5. Spoel de objectglasjes in wasbuffer, in 3 wisselbeurten van elk 2 minuten.
- 8.5.6. Tik overmatige buffer af.
- 8.5.7. Laad de objectglasjes in een voorbereide bevochtigingskamer (gevuld met met water bevochtigde keukenrol of gaas).
- 8.5.8. Gebruik 200 µl DAB-werkoplossingsreagens om de weefselcoupe te bedekken.
- 8.5.9. Incubeer gedurende 5 minuten (+ 1 minuut).
- 8.5.10. Spoel de objectglasjes in stromend gedistilleerd H₂O gedurende 5 minuten.
- 8.5.11. Spoel de objectglasjes 1 maal in wasbuffer gedurende 2 minuten.

8.6. Achtergrondkleuring

- 8.6.1. Laad de objectglasjes in een voorbereide bevochtigingskamer (gevuld met met water bevochtigde keukenrol of gaas).

8.6.2. Gebruik 200 µl hematoxyline achtergrondkleuring om de weefselcoupe volledig te bedekken.

8.6.3. Incubeer gedurende 5 minuten (±10 seconden).

8.6.4. Spoel de objectglasjes gedurende 3 minuten af in stromend H₂O.

8.7. Preparatie

8.7.1. Dompel de objectglasjes onder in 95% ethanol, gedurende 1 minuut of 25 onderdempelingen.

8.7.2. Dompel de objectglasjes onder in absolute alcohol, in 4 wisselbeurten van elk 1 minuut of 25 onderdempelingen.

8.7.3. Reinig met xyleen, in 3 wisselbeurten van elk 1 minuut of 25 onderdempelingen.

8.7.4. Bedek de objectglasjes met glazen dekglasjes met een niet-waterig, permanent preparatiemedium.

9. STABILITEIT

9.1. Opgeopende reagentiaflacons zijn stabiel tot de op de flacon vermelde uiterste gebruiksdatum, mits bewaard bij de aanbevolen temperaturen.

9.2. Na opening zijn de reagentia stabiel gedurende negentig (90) dagen, mits bewaard bij de aanbevolen temperaturen.

10. KWALITEITSCONTROLE

10.1. Variabiliteit in de resultaten is vaak te wijten aan verschillen in monsterbehandeling, die afwijkt van de aanbevolen testprocedures. Raadpleeg de richtlijnen voor kwaliteitscontrole van het College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry voor aanvullende informatie.

10.2. Gebruik met elke kleuringsrun een positieve weefselcontrole om de werking van het assay te controleren. Als de positieve weefselcontrole geen positieve kleuring vertoont, moeten de resultaten met de andere testmonsters als verdacht of ongeldig worden beschouwd.

10.3. Gebruik met elke kleuringsrun een negatief controleweefsel om de specificiteit van de primaire antistof te controleren en een indicatie van specifieke achtergrondkleuring te krijgen. Als de negatieve weefselcontrole een positieve specifieke kleuring vertoont, moeten de resultaten met de andere testmonsters als verdacht of ongeldig worden beschouwd.

10.4. Voor de evaluatie van niet-specifieke of achtergrondkleuring kan in plaats van de primaire antistof ook een niet-specifiek negatieve controleweefsel worden gebruikt.

11. INTERPRETATIE

Matig-tot-intens bruine kleuring in de celkernen wijst op de aanwezigheid van afwijkende S-fase-inductie. De gekleurde objectglasjes dienen door een patholoog te worden beoordeeld met behulp van een lichtmicroscop. De resultaten moeten door een bevoegde deskundige worden geïnterpreteerd, rekening houdend met de klinische anamnese van de patiënt en andere diagnostische tests.

12. BEPERKINGEN

12.1. Immunohistochemische kleuring vereist speciale training voor de selectie en toepassing van reagentia.

12.2. Met dit reagens kunnen 25 tests worden uitgevoerd op basis van 200 µl reagens per objectglasje.

12.3. Sommige normale cellen kunnen positief kleuren voor afwijkende S-fase-inductie.

12.4. Optimale weefselkleuring is afhankelijk van de fixatie en verwerking van het monster.

12.5. Niet-specifieke of toegenomen achtergrondkleuring kan zich voordoen als gevolg van, maar niet beperkt tot, variaties in de procedure, inadequate spoeling tussen assaystappen en/of niet correct verwerkte monsters.

13. PROBLEEMOPLOSSING

Probleem	Mogelijke oorzaak	Actie
Geen kleuring op objectglaasjes positieve controle	Reagentia niet in de juiste volgorde gebruikt.	Bekijk kleuringsprotocol opnieuw.
	Weglaten van een reagens.	Herhaal kleuringsprotocol.
	Incorrecte bereiding DAB.	Bereid conform de specificaties van de fabrikant en herhaal het kleuringsprotocol.
Zwakke kleuring op objectglaasjes positieve controle	Onvoldoende antigeenversterking.	Controleer incubatietijden en temperatuur antigeen/epitooopversterkingsbuffer (zie paragraaf 8.2).
	Verkeerde antigeenversterkingsbuffer gebruikt.	Bekijk kleuringsprotocol opnieuw en bereid buffer conform de richtlijnen van de fabrikant.
	Ontoereikende incubatie primaire antistof.	Bekijk kleuringsprotocol opnieuw en pas incubatietijden aan.
	Primaire antistof is verdund.	Gebruik primaire antistof conform de richtlijnen van de fabrikant.
	Er blijft overmatige wasbuffer achter op objectglaasje voor gebruik volgende reagens.	Herhaal kleuringsprotocol. Tik en veeg overmatige wasbuffer af.
	Overmatige achtergrondkleuring	Inadequate spoeling tussen assaystappen.
Te lange incubatietijden met hoofdreagentia.		Bekijk kleuringsprotocol opnieuw en pas incubatietijden aan.
Objectglaasjes drogen uit tijdens assay-incubatie of spoelstappen.		Herhaal kleuringsprotocol. Controleer bevochtigingskamer.

14. REFERENTIES

1. Kastan M and Bartec J.

Cell cycle checkpoints and cancer. Nature, 2004. Vol 432:316-323.

2. Massague J. G1 cell-cycle control and cancer. Nature, 2004. Vol 432:298-306.

3. Freeman A, Morris LS, Millis AD, Stoeber K, Laskey RA, Williams GH and Coleman N. Minichromosome Maintenance Proteins as Biological Markers of Dysplasia and Malignancy. *CI Cancer Research*, 1999. Vol 5:2121-2132.

4. Ishimi Y, Okayasu I, Kato C, Kwon H, Kimura H, Yamada K and Song S. Enhanced expression of MCM proteins in cancer cells derived from uterine cervix. *Eur. J. Biochem* 2003. 270:1089-1101.

5. Lei M and Tye BK. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM Complex. *J Cell Science* 2001. Vol. 114 (8): 1447-1454.

15. SYMBOLENIJST

	Bestelnummer
	Voor <i>in-vitro</i> diagnostiek
	Raadpleeg de gebruiksaanwijzing
	Bevat 7 ml
	Let op, raadpleeg de bijgeleverde documentatie
	Beperkingen bewaar temperatuur
	Batchcode
	Houdbaar tot jiii-mm-dd of jiii-mm
	Fabrikant

TECHNISCHE INFORMATIE

USA
Telephone: 1-877-822-7771
Fax: 1-336-290-8333

Europe
Telephone: +32 (0)53 720 673
Fax: +32 (0)53 720 678



TriPath Imaging, Inc.
780 Plantation Drive
Burlington, NC 27215 USA



Benex Limited
Rineanna House
Shannon Free Zone
Shannon, County Clare
Ireland



Ontwikkeld met technologie van Millennium Pharmaceuticals, Inc.

 MILLENNIUM™

 en MILLENNIUM™ zijn handelsmerken van Millennium Pharmaceuticals, Inc.

Millennium Pharmaceuticals, Inc.
40 Landsdowne Street
Cambridge, MA 02139 VS
www.millennium.com

ProEx is een product en handelsmerk van TriPath Imaging, Inc.



REAGENSBEKRIVELSE

Ig-klasse IgG₁

Immunogen Rekombinant humant MCM2 og TOP2A

1. ANVENDELSE

Til *in vitro*-diagnostisk brug.

Til brug til manuel farvning eller automatisk farvning vha. Dako Envision[®] + detektionskemi.

ProEx[™] C-immunhistokemisk test er beregnet til kvalitativ evaluering af afvigende S-faseinduktion i formalinfikserede, paraffinindstøbte vævsbiopsier. Fortolkning af resultaterne skal foretages af en faguddannet person under hensyn til patientens kliniske historie samt andre diagnostiske prøver.

2. RESUMÉ OG FORKLARING

Minikromosomvedligeholdelse (MCM) og topoisomerase II alpha (TOP2A)-proteiner spiller en vigtig regulerende rolle ved eukaryotisk DNA-replikation. Eksempelvis resulterer HPV oncoprotein E6- og E7-bypass af kritiske celleyklus-testpunkter i en forlænget og afvigende S-faseinduktionscyklus. Under den transkriptionale aktivering af den afvigende celleyklus øges niveauerne af MCM2- og TOP2A-proteiner i de prolifererende celler.

Både MCM2- og TOP2A-proteinerne har vist sig at være overudtrykte i et antal forskellige dysplastiske og maligne vævsprøver, herunder cervical neoplasia¹⁻⁵. Overudtrykket af disse proteiner i morfologisk abnorme celler, der udtrykkes som et moderat-til-intens nukleært farvningsmønster ved brug af immunhistokemiske (IHC) teknikker, indikerer tilstedeværelsen af afvigende S-faseinduktion.

3. MEDFØLGENDE REAGENS

ProEx[™] C antistofreagens indeholder monoklonalt anti-MCM2 og anti-TOP2A fra mus, oprenset fra vævskultursupernatant og fortyndet i en bufferet saltvandsopløsning, som indeholder proteinstabilisatorer og 0,09% natriumazid.

4. PROCEDUREPRINCIPPER

Formalinfikserede, paraffinindstøbte vævsprøver skæres i snit, deponeres på objektglas og alparaffineres. Prøvesnit er forbehandlede med en buffer, der eksponerer antigenene steder. Der er tilsat blokeringsstoffer for at minimere baggrundsfarvning, der skyldes endogen peroxidase. Prøven inkuberes derefter med ProEx[™] C-antistofreagens. Tilføjelsen af et enzym-kædet antistofkromogensystem resulterer i dannelsen af et synligt kromogent produkt, lokaliseret ved antigen-antistoffets bindingssteder. Prøven kontrastfarves derefter med hæmatoxylin, og der sættes dækglass på. Resultaterne skal fortolkes af en faguddannet person ved hjælp af lysmikroskop.

ProEx[™] C immunhistokemisk test er egnet til både manuel og automatisk farvning.

5. NØDVENDIGE, IKKE MEDFØLGENDE MATERIALER OG REAGENSER (til manuelle procedurer)

- EDTA 5X – Kat. nr. CB9172 (BioCare)
- EnVision[®] + sæt – Kat. nr. K4007 (Dako)
- Mayer's Hematoxylin – Kat. nr. S3309 (Dako)
- Wash Buffer 10X – Kat. nr. S3006 (Dako)
- Universal Mouse Negative Control – Kat. nr. N1698 (Dako)
- Trykkoger
- Objektglas (SuperFrost[®] Plus eller tilsvarende)
- Monteringsmedie (ShurMount[®] eller tilsvarende)
- Pipetter og pipettespidser (som kan levere volumenmængder på 20µL, 200µL og 1000µL)
- Minutur (skal kunne indstilles til intervaller på 1-60 minutter)
- Demineraliseret vand
- Ethanol 95%, 100%
- Dækglass
- Laboratorie-mærkepen
- 10 l glasballon (Nalgene[®] eller tilsvarende)
- Sterile engangsflasker

- Tørrerack til objektglas
- Objektglasrack med farvningssskiver
- Xylen eller xylenerstatninger
- Lysmikroskop (10x, 20x [valgfrit], 40x objektiver)

6. FORSIGTIGHEDSREGLER

- 6.1. Til *in vitro*-diagnostisk brug
- 6.2. Objektglasrensetrin, der kræver xylen, skal udføres i et certificeret stinkskab.
- 6.3. DAB (3,3'-diaminobenzidin) er klassificeret som et muligt kræftfremkaldende stof. Undgå fysisk kontakt og længerevarende eller gentagen eksponering af stoffet. Anvend det i et certificeret stinkskab.
- 6.4. ProEx[™] C antistofreagenset indeholder natriumazid (NaN₃), et kemikalie, der er meget giftigt i ren form. Selvom koncentrationen i produktet ikke er klassificeret som farlig, kan natriumazid reagere med bly og kobber og danne meget eksplosive ophobninger af metalazider. Efter bortskaffelse skylles med rigelige mængder vand for at hindre ophobning af metalazid i afløb.
- 6.5. Prøver og alle materialer, der kommer i kontakt med prøver, skal behandles som potentielt smittefarlige og bortskaffes i overensstemmelse med passende forholdsregler. Brug aldrig mundpipette, og undgå, at hud og slimhinder kommer i kontakt med reagenser og præparater. Hvis reagenser kommer i kontakt med følsomme områder, skal de afvaskes med rigelige mængder vand.
- 6.6. Minimér mikrobiel kontaminering af reagenser for at undgå non-specifik farvning.
- 6.7. Andre inkubationstider, -temperaturer eller -metoder end de angivne kan medføre fejlagtige resultater.
- 6.8. Anvend ikke ProEx[™] C-antistofreagenset efter den udløbsdato, der er trykt på emballagen. Brugeren skal validere forholdene, hvis reagenser opbevares under andre forhold end dem, der er angivet i pakningsindlægget.
- 6.9. Brug egnet personligt beskyttelsesudstyr for at undgå kontakt med øjne og hud. Se materialesikkerhedsdatabladet (MSDS) vedr. yderligere oplysninger.

7. BRUGSANVISNING

7.1. Prøveforberedelse

- 7.1.1. Skær snit på 4 µm af vævsblokken, og placér snittene på SuperFrost[®] Plus-objektglas.
- 7.1.2. Mærk objektglassene.
- 7.1.3. Bag glassene i en ovn med varmluft i 20 minutter.

7.2. Reagensforberedelse

- 7.2.1. 1X vaskebuffer, 10 l
 - 7.2.1.1. Bland 9 liter demineraliseret H₂O med 1 liter 10X vaskebuffer.
 - 7.2.1.2. Påsæt hætte, og bland ved at vende ballonen flere gange.
 - 7.2.1.3. Mærk med en udløbsdato, der er 5 dage efter blandingstidspunktet.
 - 7.2.1.4. Opbevar ved rumtemperatur (20-25 °C).
- 7.2.2. 1X EDTA (forberedes frisk hver dag)
 - 7.2.2.1. Tilsæt 40 ml 5X EDTA til et rent 250 ml-bæger.
 - 7.2.2.2. Tilsæt 160 ml demineraliseret H₂O.
 - 7.2.2.3. Bland ved forsigtig omrøring.
- 7.2.3. Hæmatoxylin (forberedes frisk hver dag)
 - 7.2.3.1. Tilsæt 20 ml destilleret H₂O til et 25 ml testglas.
 - 7.2.3.2. Tilsæt 1 ml Mayers hæmatoxylin.
 - 7.2.3.3. Påsæt hætte, og bland ved at vende testglasset flere gange.

8. FARVNINGSPROTOKOL (manuel eller automatisk)

8.1. Noter om farvningsproceduren

- 8.1.1. Denne protokol kan anvendes til manuel farvning eller automatisk farvning vha. Dako Envision[®] + detektionskemi.
- 8.1.2. Alle reagenser skal have opnået stuetemperatur (20-25°C), inden immunfarvning foretages.
- 8.1.3. Alle inkubationer skal udføres ved stuetemperatur, medmindre andet er angivet.
- 8.1.4. Lad ikke objektglassene tørre ud under farvningsproceduren. Udtørrede prøver kan udvise forøget specifik farvning. Objektglas skal anbringes i et fugtkammer ved længerevarende inkubationer.

- 8.2. Epitop-retrieval**
- 8.2.1. Aparaaffinér objektglassene i 3 hold xylen (fem minutter hver gang) efterfulgt af 3 hold 100% alkohol (fem minutter hver gang).
- 8.2.2. Genhydrér objektglassene ved at skylle med demineraliseret H₂O.
- 8.2.3. Nedsænk objektglassene i forberedt 1X EDTA bufferopløsning, og placér beholderen i en trykkoger. Opvarm objektglassene i trykkogeren i 30 sekunder.
- 8.2.4. Når opvarmningen er færdig, skal objektglassene forblive i trykkogeren og køle ned i 10 minutter.
- 8.2.5. Skyl objektglassene med demineraliseret H₂O, og læg dem i en ren Coplin-skål, der indeholder 1X vaskebuffer.

- 8.3. Peroxidaseblokeringsreagens**
- 8.3.1. Bank overskydende vaskebuffer af.
- 8.3.2. Placér objektglassene i et forberedt fugtkammer (fyldt med vandfugtede papirhåndklæder eller gaze).
- 8.3.3. Tilsæt 200 µl-peroxidaseblokeringsreagens, så det dækker vævssnittet.
- 8.3.4. Inkubér i 5 minutter (±1 minut).
- 8.3.5. Skyl objektglassene i 1X vaskebuffer, 3 hold, 2 minutter i hvert hold.

- 8.4. Primær antistofreagens**
- 8.4.1. Bank overskydende vaskebuffer af.
- 8.4.2. Placér objektglassene i et forberedt fugtkammer (fyldt med vandfugtede papirhåndklæder eller gaze).
- 8.4.3. Tilsæt 200 µl ProEx™ C-antistofreagens, så det fuldstændigt dækker vævssnittet.
- 8.4.4. Inkubér i 40 minutter ved rumtemperatur (20-25°C).
- 8.4.5. Skyl hver enkelt objektglas individuelt med vaskebuffer vha. en vaskeflaske (ret ikke flowet direkte mod vævssnittet).
- 8.4.6. Skyl objektglassene i 1X vaskebuffer, 3 hold, 2 minutter i hvert hold.

- 8.5. Detektionskemi (vha. EnVision®+ reagenser)**
- 8.5.1. Bank overskydende vaskebuffer af.
- 8.5.2. Placér objektglassene i et forberedt fugtkammer (fyldt med vandfugtede papirhåndklæder eller gaze).
- 8.5.3. Tilsæt 200 µl polymerreagens, så det dækker vævssnittet.
- 8.5.4. Inkubér i 30 minutter (±1 minut).
- 8.5.5. Skyl objektglassene i 1X vaskebuffer, 3 hold, 2 minutter i hvert hold.
- 8.5.6. Bank overskydende buffer af.
- 8.5.7. Placér objektglassene i et forberedt fugtkammer (fyldt med vandfugtede papirhåndklæder eller gaze).
- 8.5.8. Tilsæt 200 µl DAB-arbejdsopløsningsreagens, så vævssnittet er dækket.
- 8.5.9. Inkubér i 5 minutter (±1 minut).
- 8.5.10. Skyl objektglassene i rindende destilleret H₂O i 5 minutter.
- 8.5.11. Skyl objektglassene i vaskebuffer, 1 hold, i 2 minutter.

- 8.6. Kontrastfarvning**
- 8.6.1. Placér objektglassene i et forberedt fugtkammer (fyldt med vandfugtede papirhåndklæder eller gaze).
- 8.6.2. Tilsæt 200 µl hæmatoxylinkontrastfarvning, så det dækker vævssnittet fuldstændigt.
- 8.6.3. Inkubér i 5 minutter (±10 sekunder).
- 8.6.4. Skyl objektglassene i 3 minutter i rindende H₂O.

- 8.7. Montering**
- 8.7.1. Nedsænk objektglassene i 95% ethanol i 1 minut eller 25 dyp.
- 8.7.2. Nedsænk objektglassene i ren alkohol, 4 hold, 1 minut hver eller 25 dyp.
- 8.7.3. Rens med xylen, 3 hold, 1 minut hver eller 25 dyp.
- 8.7.4. Dæk objektglassene med ikke-vandholdig, permanent monteringsmedie ved hjælp af dækglas.





- 9. HOLDBARHED**
- 9.1. Ved opbevaring ved anbefalede temperaturer er uåbnede reagenshætteglas holdbare, indtil den udløbsdato, der er angivet på hætteglasset.
- 9.2. Efter åbning er reagenserne holdbare i halvfems (90) dage, hvis de opbevares ved de anbefalede temperaturer.
- 10. KVALITETSKONTROL**
- 10.1. Varians i resultater skyldes ofte forskelle i prøvehåndteringen, som afviger fra de anbefalede testprocedurer. Se retningslinjerne for kvalitetskontrol fra College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry for at få yderligere oplysninger.
- 10.2. Der bør udføres en positiv vævskontrol ved hver farvningskørsel for at verificere analysens effektivitet. Hvis den positive vævskontrol ikke udviser positiv farvning, skal resultaterne med de øvrige prøver betragtes som mistænkelige eller ugyldige.
- 10.3. Der bør udføres en negativ vævskontrol ved hver farvningskørsel for at verificere det primære antistofs specificitet samt for at give en indikation af baggrundsfarvningen. Hvis den negative vævskontrol udviser positiv specifik farvning, bør resultaterne med de øvrige prøver betragtes som værende mistænkelige eller ugyldige.
- 10.4. Der kan også anvendes en uspecifik negativ kontrolreagens i stedet for det primære antistof til evaluering af uspecifik farvning eller baggrundsfarvning.
- 11. FORTOLKNING**
- Moderat-til-intens brunfarvning i cellekernerne indikerer tilstedeværelse af afvigende S-faseinduktion. De farvede objektglas bør evalueres af en patolog vha. et lysmikroskop. Fortolkning af resultaterne skal foretages af en faguddannet person under hensyn til patientens kliniske historie samt andre diagnostiske prøver.
- 12. BEGRÆNSNINGER**
- 12.1. Immunhistokemisk farvning kræver specialuddannelse i udvælgelse og anvendelse af reagenser.
- 12.2. Dette reagens kan anvendes til 25 test, forudsat at der anvendes 200 µl reagens pr. objektglas.
- 12.3. Visse normale celler kan blive farvet positive for afvigende S-faseinduktion.
- 12.4. Optimal vævsfarvning afhænger af fiksering og behandling af prøven.
- 12.5. Der kan forekomme uspecifik eller øget baggrundsfarvning på grund af, men ikke begrænset til, procedureafvigelser, utilstrækkelig rensning mellem analysetrin og/eller utilstrækkeligt behandlede prøver.
- 13. FEJLFINDING**

Problem	Mulige årsager	Afhjælpning
Ingen farvning på positive kontrolglas	Reagens anvendt i forkert rækkefølge.	Gennemgå farvningsprotokollen.
	Udeladelse af et reagens.	Gentag farvningsprotokollen.
	Forkert forberedelse af DAB.	Forbered i henhold til producentens specifikationer, og gentag farvningsprotokollen.
Svag farvning på positive kontrolobjektglas	Utilstrækkelig antigen-retrieval.	Kontrollér inkubationstider og temperatur for antigen-/epitop-retrievalbuffer (se afsnit 8.2).
	Forkert antigen-retrievalbuffer er anvendt.	Gennemgå farvningsprotokollen, og forbered buffer i henhold til producentens anvisninger.
	Utilstrækkelig inkubation af primært antistof.	Gennemgå farvningsprotokollen, og justér inkubationstiderne i henhold til protokollen.
	Primært antistof er blevet fortyndet.	Anvend primært antistof i overensstemmelse med producentens anvisninger.
Kraftig baggrundsfarvning	For megen vaskebuffer resterer på objektglasset inden påføring af det næste reagens.	Gentag farvningsprotokollen. Bank og tør overskydende vaskebuffer af.
	Utilstrækkelig rensning mellem analysetrin.	Gentag farvningsprotokollen. Tilføj yderligere skylletrin med vaskebuffer.
	Lange inkubationstider med nøglereagenser.	Gennemgå farvningsprotokollen, og justér inkubationstiderne i henhold til protokollen.
Objektglas tørrer ud under analyseinkubation eller skylletrin.		Gentag farvningsprotokollen. Kontrollér fugtkammeret.

14. REFERENCER

1. Kastan M and Bartec J. Cell cycle checkpoints and cancer. Nature, 2004. Vol 432:316-323.
2. Massague J. G1 cell-cycle control and cancer. Nature, 2004. Vol 432:298-306.
3. Freeman A, Morris LS, Millis AD, Stoeber K, Laskey RA, Williams GH and Coleman N. Minichromosome Maintenance Proteins as Biological Markers of Dysplasia and Malignancy. *CI Cancer Research*, 1999. Vol 5:2121-2132.
4. Ishimi Y, Okayasu I, Kato C, Kwon H, Kimura H, Yamada K and Song S. Enhanced expression of MCM proteins in cancer cells derived from uterine cervix. *Eur. J. Biochem* 2003. 270:1089-1101.
5. Lei M and Tye BK. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM Complex. *J Cell Science* 2001. Vol. 114 (8): 1447-1454.

15. SYMBOLFORKLARING

-  Katalognummer
-  Til *in vitro*-diagnostisk brug
-  Se brugsanvisningen
-  Indeholder 7 ml
-  Forsigtig! Se brugsanvisningen
-  Temperaturbegrænsning under opbevaring
-  Batchnummer
-  Anvendes inden ÅÅÅÅ-MM-DD eller ÅÅÅÅ-MM
-  Producent

TEKNISKE OPLYSNINGER

USA
Telephone: 1-877-822-7771
Fax: 1-336-290-8333

Europe
Telephone: +32 (0)53 720 673
Fax: +32 (0)53 720 678



TriPath Imaging, Inc.
780 Plantation Drive
Burlington, NC 27215 USA



Benex Limited
Rineanna House
Shannon Free Zone
Shannon, County Clare
Ireland



Udviklet med teknologi fra Millennium Pharmaceuticals, Inc.



 og MILLENNIUM™ er varemærker tilhørende Millennium Pharmaceuticals, Inc.

Millennium Pharmaceuticals, Inc.
40 Landsdowne Street
Cambridge, MA 02139 USA
www.millennium.com

ProEx er et produkt og varemærke tilhørende TriPath Imaging, Inc.



DESCRIÇÃO DO REAGENTE

Classe Ig IgG₁

Imunogénio Recombinante Humano MCM2 e TOP2A

1. FINALIDADE

Para utilização em diagnóstico *in vitro*.

Para utilização com a coloração manual ou a coloração automática utilizando o kit de detecção química Dako Envision[®]+

A Análise imuno-histoquímica ProEx[™] C destina-se a ser utilizada para uma avaliação qualitativa da indução aberrante de uma fase S em biópsias de secções de tecido fixado em formol e impregnado em parafina. A interpretação dos resultados tem de ser efectuada por um profissional qualificado, dentro do contexto do historial do doente e através de outros testes de diagnóstico.

2. RESUMO E EXPLICAÇÃO

A proteína de manutenção de minicromossomas (MCM) e a proteína alfa topoisomerase II (TOP2A) desempenham um importante papel regulador na replicação de ADN eucariótico. Por exemplo, o desvio das oncoproteínas E6 e E7 HPV dos pontos de verificação crítica do ciclo celular, que resulta num ciclo de indução de uma fase S prolongado e aberrante. Durante a activação da transcrição do ciclo celular aberrante, os níveis de proteínas MCM2 e TOP2A aumentam nas células proliferativas.

Demonstrou-se que tanto a proteína MCM2 como a TOP2A apresentam uma sobreexpressão em diversos tecidos malignos e displásicos diferentes, incluindo em neoplasias cervicais¹⁻⁵. A sobreexpressão destas proteínas em células morfológicamente anómalas, conforme demonstrado por um padrão de coloração nuclear moderado a intenso utilizando técnicas de imuno-histoquímica (IHC), é indicadora da presença de indução aberrante de uma fase S.

3. REAGENTES FORNECIDOS

O Reagente de Anticorpo ProEx[™] C contém anti-MCM2 monoclonal de rato e anti-TOP2A purificado de sobrenadante de cultura de tecidos e foi diluído numa solução salina de tampão, que contém estabilizadores de proteínas e 0,09% de azida de sódio.

4. PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

As amostras de tecido fixadas em formol e impregnadas em parafina são seccionadas, depositadas em lâminas de vidro e desparafinizadas. As amostras seccionadas são pré-tratadas com um tampão para expor os locais antigénicos. São adicionados bloqueadores para minimizar a coloração de fundo causada por peroxidase endógena. A amostra é, em seguida, incubada com Reagente de Anticorpo ProEx[™] C. A adição de um sistema de cromogénio de anticorpos ligados à enzima resulta na formação de um produto cromogénico visível localizado nos locais de ligação do antígeno-anticorpo. A amostra é, em seguida, sujeita a contrastação com hematoxilina e a lâmina é protegida com uma lamela. Os resultados são interpretados por um profissional qualificado utilizando um microscópio óptico.

A Análise imuno-histoquímica ProEx[™] C é aplicável tanto para a coloração manual como para a automática.

5. MATERIAIS E REAGENTES NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS (para Procedimento Manual)

- EDTA 5X – Cat #CB9172 (BioCare)
- EnVision[®]+ Kit – Cat # K4007 (Dako)
- Mayer's Hematoxylin – Cat # S3309 (Dako)
- Wash Buffer 10X – Cat # S3006 (Dako)
- Universal Mouse Negative Control – Cat # N1698 (Dako)
- Panela de pressão
- Lâminas de vidro (SuperFrost[®] Plus ou equivalente)
- Meio de montagem (ShurMount[®] ou equivalente)
- Pipetas e pontas de pipeta (com capacidade para administrar volumes de 20µL, 200µL e 1000µL)
- Cronómetro (com intervalos de 1 a 60 minutos)
- Água desionizada
- Etanol 95%, 100%
- Lamelas de vidro
- Marcador de laboratório
- Garrafão de 10L (Nalgene[®] ou equivalente)
- Frascos descartáveis esterilizados

- Secador de lâminas
- Suporte de lâminas com placas de coloração
- Xilol ou substitutos de xilol
- Microscópio óptico (objectivas de 10x, 20x [opcional], 40x)

6. PRECAUÇÕES

- 6.1. Para utilização em diagnóstico *in vitro*.
- 6.2. Os passos de limpeza das lâminas que requerem xilol têm de ser efectuados numa câmara de fumos químicos certificada.
- 6.3. A DAB (3,3'-diaminobenzidina) é classificada como um suposto carcinogénico. Evitar o contacto físico e exposição repetida ou prolongada à mesma. Utilizá-la numa câmara de fumos químicos certificada.
- 6.4. O Reagente de Anticorpo ProEx[™] C contém azida de sódio (NaN₃), um produto químico altamente tóxico na forma pura. Em situações de concentração do produto, embora não sendo classificada como perigosa, a azida de sódio pode reagir com as canalizações de chumbo e de cobre, formando acumulações de azidas metálicas altamente explosivas. Ao eliminar o produto, adicionar água abundante para evitar a acumulação de azidas metálicas na canalização.
- 6.5. As amostras e todos os materiais expostos às amostras deverão ser manuseados como materiais passíveis de transmitir infecção e devem ser eliminados com as devidas precauções. Nunca pipetar os reagentes com a boca e evitar o contacto da pele e membranas mucosas com os reagentes e as amostras. Se os reagentes entrarem em contacto com áreas sensíveis, lavar com água abundante.
- 6.6. Minimizar a contaminação microbiana dos reagentes para evitar uma coloração não específica.
- 6.7. Os tempos e as temperaturas de incubação ou métodos diferentes dos especificados podem originar resultados erróneos.
- 6.8. Não utilizar o Reagente de Anticorpo ProEx[™] C após o fim do prazo de validade impresso na embalagem. O utilizador deverá validar as condições, caso os reagentes sejam conservados noutras condições que não as especificadas no folheto informativo incluído na embalagem.
- 6.9. Usar equipamento de protecção pessoal adequado para evitar o contacto do reagente com a pele e os olhos. Consultar a Ficha de Dados de Segurança do Material (MSDS) para obter informações adicionais.

7. INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

7.1. Preparação das amostras

- 7.1.1. Cortar secções com 4 µm do bloco de tecido e colocá-las em lâminas de vidro SuperFrost[®] Plus.
- 7.1.2. Rotular as lâminas com etiquetas.
- 7.1.3. Aquecer as lâminas numa estufa de ar forçado durante 20 minutos.

7.2. Preparação dos reagentes

- 7.2.1. Tampão de lavagem 1X, 10L
 - 7.2.1.1. Misturar 9 litros de H₂O desionizada com 1 litro de 10X Wash Buffer.
 - 7.2.1.2. Fechar a tampa e misturar, invertendo diversas vezes.
 - 7.2.1.3. Rotular com uma etiqueta indicando um prazo de validade de 5 dias a contar da data de preparação.
 - 7.2.1.4. Conservar à temperatura ambiente (entre 20 e 25 °C).
- 7.2.2. EDTA 1X (preparar uma nova solução diariamente)
 - 7.2.2.1. Adicionar 40 mL de EDTA 5X a uma proveta de 250 mL limpa.
 - 7.2.2.2. Adicionar 160 mL de H₂O desionizada.
 - 7.2.2.3. Misturar, mexendo suavemente.
- 7.2.3. Hematoxilina (preparar uma nova solução diariamente)
 - 7.2.3.1. Adicionar 20 mL de H₂O destilada a um tubo de ensaio de 25 mL.
 - 7.2.3.2. Adicionar 1 mL de Mayer's Hematoxylin.
 - 7.2.3.3. Fechar a tampa do tubo de ensaio e misturar, invertendo diversas vezes.

8. PROTOCOLO DE COLORAÇÃO (Manual ou Automático)

8.1. Notas ao procedimento de coloração

- 8.1.1. Este protocolo pode ser utilizado com a coloração manual ou a coloração automática utilizando o kit de detecção química Dako EnVision[®]+
- 8.1.2. Antes da imunocoloração, todos os reagentes devem estar à temperatura ambiente (entre 20 e 25 °C).
- 8.1.3. Todas as incubações devem ser efectuadas à temperatura ambiente, salvo indicação em contrário.
- 8.1.4. Durante o procedimento de coloração, não permitir a secagem das lâminas. As preparações secas poderão apresentar um aumento da coloração não específica. As lâminas devem ser colocadas numa câmara húmida para incubações prolongadas.

8.2. Recuperação do epitopo

- 8.2.1. Desparafinizar as lâminas em 3 banhos de xilol (cinco minutos cada), seguidas de 3 banhos de álcool a 100% (cinco minutos cada).
- 8.2.2. Rehidratar as lâminas, lavando-as em H₂O desionizada.
- 8.2.3. Mergulhar as lâminas numa solução tampão de EDTA 1X e colocar o recipiente numa panela de pressão. Aquecer as lâminas na panela de pressão durante 30 segundos.
- 8.2.4. Quando o ponto da duração de aquecimento estiver concluído, deixar as lâminas permanecerem na solução tampão na panela de pressão a arrefecerem durante 10 minutos.
- 8.2.5. Lavar as lâminas com H₂O desionizada e transferir para um frasco Coplin limpo que contenha Tampão de lavagem 1X.

8.3. Reagente de bloqueio de peroxidase

- 8.3.1. Remover o tampão de lavagem em excesso com pequenas pancadas.
- 8.3.2. Colocar as lâminas numa câmara húmida preparada (cheia de gazes ou folhas de papel absorvente embebidas em água).
- 8.3.3. Aplicar 200µL de Peroxidase Block Reagent de modo a cobrir a secção de tecido.
- 8.3.4. Incubar durante 5 minutos (±1 minuto).
- 8.3.5. Lavar as lâminas num Tampão de lavagem 1X, 3 banhos, 2 minutos cada.

8.4. Reagente de anticorpo primário

- 8.4.1. Remover o tampão de lavagem em excesso com pequenas pancadas.
- 8.4.2. Colocar as lâminas na câmara húmida preparada (cheia de gazes ou folhas de papel absorvente embebidas em água).
- 8.4.3. Aplicar 200µL de Reagente de Anticorpo ProEx[™] C de modo a cobrir totalmente a secção de tecido.
- 8.4.4. Incubar durante 40 minutos à temperatura ambiente (20-25 °C).
- 8.4.5. Lavar cada lâmina individualmente com Tampão de lavagem utilizando um frasco de lavagem (não incidir o fluxo directamente sobre a secção de tecido).
- 8.4.6. Lavar as lâminas num Tampão de lavagem, 3 banhos, 2 minutos cada.

8.5. Química de detecção (utilizando os Reagentes EnVision[®]+))

- 8.5.1. Remover o tampão de lavagem em excesso com pequenas pancadas.
- 8.5.2. Colocar as lâminas na câmara húmida preparada (cheia de gazes ou folhas de papel absorvente embebidas em água).
- 8.5.3. Aplicar 200µL de reagente HRP-Polymer de modo a cobrir totalmente a secção de tecido.
- 8.5.4. Incubar durante 30 minutos (±1 minuto).
- 8.5.5. Lavar as lâminas num Tampão de lavagem, 3 banhos, 2 minutos cada.
- 8.5.6. Remover o tampão em excesso com pequenas pancadas.
- 8.5.7. Colocar as lâminas na câmara húmida preparada (cheia de gazes ou folhas de papel absorvente embebidas em água).
- 8.5.8. Aplicar 200µL de reagente da solução de trabalho de DAB de modo a cobrir a secção de tecido.
- 8.5.9. Incubar durante 5 minutos (±1 minuto).
- 8.5.10. Lavar as lâminas com H₂O destilada corrente durante 5 minutos.
- 8.5.11. Lavar as lâminas com um Tampão de lavagem, 1 banho durante 2 minutos.

8.6. Contrastante

- 8.6.1. Colocar as lâminas na câmara húmida preparada (cheia de gazes ou folhas de papel absorvente embebidas em água).
- 8.6.2. Aplicar 200µL de contrastante de Hematoxilina de modo a cobrir totalmente a secção de tecido.
- 8.6.3. Incubar durante 5 minutos (±10 segundos).
- 8.6.4. Lavar as lâminas com H₂O corrente durante 3 minutos.

8.7. Montagem

- 8.7.1. Imergir as lâminas em etanol a 95%, durante 1 minuto ou 25 vezes.
- 8.7.2. Imergir as lâminas em álcool absoluto, 4 banhos, 1 minuto cada ou 25 vezes.
- 8.7.3. Limpar com xilol, 3 banhos, 1 minuto cada ou 25 imersões.
- 8.7.4. Cobrir com meios de montagem permanentes não aquosos, utilizando lamelas de vidro.

9. ESTABILIDADE

- 9.1. Quando conservados às temperaturas recomendadas, os frascos fechados de reagente permanecem estáveis até à data indicada no frasco.
- 9.2. Uma vez aberto o frasco, os reagentes permanecem estáveis durante noventa (90) dias quando conservados às temperaturas recomendadas.

10. CONTROLO DE QUALIDADE

- 10.1. A variabilidade nos resultados deriva frequentemente de diferenças no manuseamento das amostras, que se desviam dos procedimentos de teste recomendados. Consultar as directrizes de controlo de qualidade do College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry para obter mais informações.
- 10.2. Em cada processo de coloração efectuado deverá ser incluído um controlo tecidular positivo para confirmar o desempenho do ensaio. Se o controlo tecidular positivo não apresentar uma coloração positiva, os resultados das outras amostras de teste deverão ser considerados suspeitos ou inválidos.
- 10.3. Em cada processo de coloração efectuado deverá ser incluído um controlo tecidular negativo para confirmar a especificidade do anticorpo primário e fornecer uma indicação da coloração de fundo. Se o controlo tecidular negativo apresentar coloração positiva específica, os resultados das outras amostras de teste deverão ser considerados suspeitos ou inválidos.
- 10.4. Pode também ser utilizado um reagente de controlo negativo não específico em vez do anticorpo primário para avaliar a coloração de fundo ou não específica.

11. INTERPRETAÇÃO

Uma coloração castanha moderada a intensa no núcleo das células indica a presença de indução aberrante de uma fase S. Um patologista deverá avaliar as lâminas coradas utilizando um microscópio óptico. A interpretação dos resultados tem de ser efectuada por um profissional qualificado, dentro do contexto do historial do doente e através de outros testes de diagnóstico.

12. LIMITAÇÕES

- 12.1. A coloração imuno-histoquímica requer uma formação especializada na selecção e aplicação dos reagentes.
- 12.2. Este reagente será suficiente para efectuar 25 testes, partindo do princípio que se aplica 200 µL de reagente por lâmina.
- 12.3. Algumas células normais podem apresentar uma coloração positiva quanto à indução aberrante de uma fase S.
- 12.4. A coloração tecidular ideal está dependente da fixação e processamento da amostra.
- 12.5. Pode ocorrer uma coloração de fundo não específica ou um aumento da coloração de fundo devido a, mas não se limitando a, variações no procedimento, lavagem inadequada entre as etapas do ensaio e/ou amostras processadas inadequadamente.










13. RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

Problema	Possível causa	Medida
As lâminas de controlo positivo não apresentam qualquer coloração.	Reagentes aplicados pela ordem incorrecta.	Rever protocolo de coloração.
	Omissão de qualquer um dos reagentes.	Repetir protocolo de coloração.
	Preparação incorrecta da DAB.	Preparar de acordo com as especificações do fabricante e repetir o protocolo de coloração.
As lâminas de controlo positivo apresentam uma coloração fraca.	Recuperação insuficiente do antígeno.	Verificar tempos de incubação e temperatura do tampão de recuperação do antígeno/epitopo (consultar secção 8.2).
	O tampão utilizado para a recuperação do antígeno é incorrecto.	Rever protocolo de coloração e preparar o tampão de acordo com as instruções do fabricante.
	Incubação inadequada do anticorpo primário.	Rever protocolo de coloração e ajustar os tempos de incubação em conformidade.
	O anticorpo primário foi diluído.	Utilizar o anticorpo primário de acordo com as instruções do fabricante.
	Excesso de tampão de lavagem que resta na lâmina antes da aplicação do próximo reagente.	Repetir protocolo de coloração. Remover com pequenas pancadas e limpar o tampão de lavagem em excesso.
Coloração de fundo excessiva	Lavagem inadequada entre as etapas do ensaio.	Repetir protocolo de coloração. Acrescentar mais passos de lavagem de tampão de lavagem.
	Tempos de incubação excessivos com os principais reagentes.	Rever protocolo de coloração e ajustar os tempos de incubação em conformidade.
	As lâminas secaram durante a incubação do ensaio ou dos passos de lavagem.	Repetir protocolo de coloração. Verificar a câmara húmida.

14. BIBLIOGRAFIA

1. Kastan M and Bartec J. Cell cycle checkpoints and cancer. Nature, 2004. Vol 432:316-323.
2. Massague J. G1 cell-cycle control and cancer. Nature, 2004. Vol 432:298-306.
3. Freeman A, Morris LS, Millis AD, Stoeber K, Laskey RA, Williams GH and Coleman N. Minichromosome Maintenance Proteins as Biological Markers of Dysplasia and Malignancy. *CI Cancer Research*, 1999. Vol 5:2121-2132.
4. Ishimi Y, Okayasu I, Kato C, Kwon H, Kimura H, Yamada K and Song S. Enhanced expression of MCM proteins in cancer cells derived from uterine cervix. *Eur. J. Biochem* 2003. 270:1089-1101.
5. Lei M and Tye BK. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM Complex. *J Cell Science* 2001. Vol. 114 (8): 1447-1454.

15. GLOSSÁRIO DE SÍMBOLOS


	Número de catálogo
	Para utilização em diagnóstico <i>in vitro</i>
	Consultar as instruções de utilização
	Contém 7 mL
	Cuidado, consultar a documentação fornecida
	Limitações da temperatura de conservação
	Código do lote
	Utilizar até AAAA-MM-DD ou AAAA-MM
	Fabricante

INFORMAÇÕES TÉCNICAS

USA
Telephone: 1-877-822-7771
Fax: 1-336-290-8333

Europe
Telephone: +32 (0)53 720 673
Fax: +32 (0)53 720 678


TriPath Imaging, Inc.
780 Plantation Drive
Burlington, NC 27215 USA


Benex Limited
Rineanna House
Shannon Free Zone
Shannon, County Clare
Ireland



Desenvolvido com tecnologia da Millennium Pharmaceuticals, Inc.

 **MILLENNIUM**

 e **MILLENNIUM** são marcas comerciais da Millennium Pharmaceuticals, Inc.

Millennium Pharmaceuticals, Inc.
40 Landsdowne Street
Cambridge, MA 02139 USA
www.millennium.com

ProEx é um produto e marca comercial da TriPath Imaging, Inc.



ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

Τάξη Ig IgG₁

Ανοσογόνο Ανασυνδυασμένες MCM2 και TOP2A ανθρώπου

1. ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Για in vitro διαγνωστική χρήση.

Για χρήση με χειροκίνητη ή αυτοματοποιημένη χρώση στη διαδικασία εντοπισμού Dako Envision[®]+

Η ανοσοϊστοχημική εξέταση ProEx[™] C προορίζεται για τον ποιοτικό προσδιορισμό της έναρξης της παρεκκλίνουσας S-φάσης σε βιοψίες ιστού μονιμοποιημένου με φορμαλίνη και εγκλεισμένου σε παραφίνη. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων πρέπει να πραγματοποιείται από πιστοποιημένο επαγγελματία και εντός των πλαισίων του ιστορικού του ασθενούς και άλλων διαγνωστικών εξετάσεων.

2. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Η συντήρηση των μίνι χρωμοσωμάτων (MCM) και οι α πρωτεΐνες της τοποϊσομεράσης II (TOP2A) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της αντιγραφής του DNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Για παράδειγμα, οι ογκοπρωτεΐνες E6 και E7 του HPV παρακάμπτουν τα κρίσιμα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου συντελώντας στην έναρξη ενός κύκλου με παρατεταμένη και παρεκκλίνουσα S φάση. Κατά τη μεταγραφική ενεργοποίηση του ανώμαλου κυτταρικού κύκλου, αυξάνονται τα επίπεδα των πρωτεϊνών MCM2 και TOP2A στα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα.

Έχει διαπιστωθεί ότι τόσο η MCM2 όσο και η TOP2A υπερεκφράζονται σε πλήθος διαφορετικών δυσπλαστικών και κακοήθων ιστών, μεταξύ των οποίων και οι νεοπλασίες του τραχήλου της μήτρας¹⁻⁵. Όπως διαπιστώθηκε με τεχνικές ανοσοϊστοχημείας (IHC) χρησιμοποιώντας το σχήμα της μέτριας έως έντονης πυρηνικής χρώσης, η υπερέκφραση των παραπάνω πρωτεϊνών σε μορφολογικά ανώμαλα κύτταρα είναι ενδεικτική της υπαρξης παρεκκλίνουσας έναρξης της S φάσης.

3. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΟ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ

Το αντιδραστήριο αντισώματος ProEx[™] C περιέχει μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι των MCM2 και TOP2A, τα οποία έχουν απομονωθεί από υπερεκίμενο ιστοκαλλιέργειας και είναι αραιωμένα σε ρυθμισμένο διάλυμα φυσιολογικού ορού με σταθεροποιητές πρωτεϊνών και νατραζίδιο 0,09%.

4. ΟΙ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Τομές από δείγματα ιστών μονιμοποιημένων με φορμαλίνη και εγκλεισμένων σε παραφίνη, τοποθετήθηκαν επάνω σε γυάλινες αντικειμενοφόρους πλάκες και αποπαραφινώθηκαν. Οι τομές των δειγμάτων υποβλήθηκαν σε προπεξεργασία με ρυθμιστικό διάλυμα για την αποκάλυψη των αντιγονικών θέσεων. Οι παράγοντες αποκλεισμού προστίθενται για την ελαχιστοποίηση της χρώσης του υποβάθρου που προκαλεί η ενδογενής υπεροξειδάση. Στη συνέχεια το δείγμα επωάστηκε με το Αντιδραστήριο αντισώματος ProEx[™] C. Η προσθήκη ενός συστήματος χρωμογόνου με αντίσωμα συνδεδεμένο σε ένζυμο έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό και τον εντοπισμό ενός ορατού χρωμογονικού προϊόντος στις θέσεις δέμευσης αντιγόνου-αντισώματος. Στη συνέχεια, το δείγμα αντιχρωματίζεται με αιματοξυλίνη και η αντικειμενοφόρος καλύπτεται με καλυπτρίδα. Τα αποτελέσματα ερμηνεύονται από εκπαιδευμένο επαγγελματία χρησιμοποιώντας φωτονικό μικροσκόπιο.

Η ανοσοϊστοχημική εξέταση ProEx[™] C εφαρμόζεται τόσο στη χειροκίνητη όσο και στην αυτοματοποιημένη χρώση.

5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΑΛΛΑ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ (για τη χειροκίνητη διαδικασία)

- EDTA 5X – Αρ. κατ. CB9172 (BioCare)
- Kit EnVision[®]+ – Αρ. κατ. K4007 (Dako)
- Mayer's Hematoxylin – Αρ. κατ. S3309 (Dako)
- Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 10X – Αρ. κατ. S3006 (Dako)
- Γενικός αρνητικός μάρτυρας ποντικού – Αρ. κατ. N1698 (Dako)
- Χύτρα ταχύτητας
- Γυάλινες αντικειμενοφόροι πλάκες (SuperFrost[®] Plus ή άλλο ισοδύναμο)
- Υλικό κάλυψης (ShurMount[®] ή άλλο ισοδύναμο)
- Πιπέτες και ρύγχη πιπετών (ικανές να μεταφέρουν όγκους 20μL, 200μL και 1000μL)
- Χρονόμετρο (με δυνατότητα διαστημάτων 1-60 λεπτά)
- Απιονισμένο νερό
- Αιθανόλη 95%, 100%
- Γυάλινες καλυπτρίδες
- Μαρκαδόρος εργαστηρίου
- Γυάλινη φιάλη 10L (Nalgene[®] ή άλλο ισοδύναμο)

- Αποστειρωμένες φιάλες μιας χρήσης
- Ξηραντήρας αντικειμενοφόρων
- Σταθίρας αντικειμενοφόρων με δίσκους χρώσης
- Ξυλένιο ή υποκατάστατα ξυλένιο
- Μικροσκόπιο ορατού (αντικειμενικός φακός 10x, 20x [προαιρετικά], 40x)

6. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

- 6.1. Για in vitro διαγνωστική χρήση.
- 6.2. Τα στάδια διάγνωσης των αντικειμενοφόρων με ξυλένιο πρέπει να πραγματοποιούνται σε πιστοποιημένο απαγωγό χημικών αερίων.
- 6.3. Το DAB (3,3'-Διαμινοβενζιδίνη) έχει ταξινομηθεί ως ύποπτο καρκινογόνο. Αποφεύγετε τη σωματική επαφή και την παρατεταμένη ή επανειλημμένη έκθεση. Χρησιμοποιήστε σε πιστοποιημένο απαγωγό χημικών αερίων.
- 6.4. Το Αντιδραστήριο αντισώματος ProEx[™] C περιέχει νατραζίδιο (NaN₃), μια χημική ένωση πολύ τοξική σε καθαρή μορφή. Στις συγκεντρώσεις του προϊόντος, το νατραζίδιο αν και δεν κατατάσσεται ως επικίνδυνο, μπορεί να αντιδράσει με τις μολύβδινες και χάλκινες σωληνώσεις σχηματίζοντας πολύ εκρηκτικά συσσωμάτωμα μεταλλικών αζιδίων. Όταν απορρίπτετε, ξεπλύνετε με μεγάλες ποσότητες νερού ώστε να προλάβετε τον σχηματισμό μεταλλικών αζιδίων στις σωληνώσεις.
- 6.5. Πρέπει να χειρίζεστε τα δείγματα και όλα τα υλικά που εκτίθενται στα δείγματα ως πιθανά λοιμογόνα και να τα απορρίπτετε με τις κατάλληλες προφυλάξεις. Ποτέ μην αναρροφάτε τα αντιδραστήρια και τα δείγματα με το στόμα και αποφεύγετε την επαφή τους με το δέρμα και τις βλεννογόνους μεμβράνες. Εάν τα αντιδραστήρια έλθουν σε επαφή με ευαίσθητες περιοχές, ξεπλύνετε με άφθονο νερό.
- 6.6. Ελαχιστοποιήστε τη μικροβιακή επιμόλυνση των αντιδραστηρίων για την αποφυγή της μη ειδικής χρώσης.
- 6.7. Χρόνοι επώασης, θερμοκρασίες και μέθοδοι διαφορετικοί από εκείνους που έχουν καθοριστεί μπορεί να οδηγήσουν σε εσφαλμένα αποτελέσματα.
- 6.8. Μην χρησιμοποιείτε το Αντιδραστήριο αντισώματος ProEx[™] C μετά την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται επάνω στη συσκευασία. Ο χρήστης πρέπει να ελέγχει τις συνθήκες εάν τα αντιδραστήρια φυλάσσονται υπό συνθήκες διαφορετικές από εκείνες που καθορίζει το ένθετο της συσκευασίας.
- 6.9. Να φοράτε τον κατάλληλο προσωπικό εξοπλισμό προστασίας για να αποφύγετε την επαφή των αντιδραστηρίων με τα μάτια και το δέρμα. Για περισσότερες πληροφορίες ανατρέξτε στο Φύλλο δεδομένων ασφαλείας υλικού (MSDS).

7. ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ

7.1. Προετοιμασία του δείγματος

- 7.1.1. Από το τεμάχιο του ιστού κόψτε τομές πάχους 4 μm και τοποθετήστε τις σε γυάλινες αντικειμενοφόρους πλάκες SuperFrost[®] Plus.
- 7.1.2. Επισημάνετε τις αντικειμενοφόρους πλάκες.
- 7.1.3. Θερμάνετε τις αντικειμενοφόρους σε κλίβανο με αέρα επί 20 λεπτά.

7.2. Προετοιμασία του αντιδραστήριου

- 7.2.1. 1X Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης, 10L
 - 7.2.1.1. Αναμίξτε 9 λίτρα απιονισμένου H₂O με 1 λίτρο ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης 10X.
 - 7.2.1.2. Σφραγίστε και αναμίξτε, αναστρέφοντας πολλές φορές.
 - 7.2.1.3. Τοποθετήστε μια ετικέτα στην οποία θα αναγράφετε την ημερομηνία λήξης 5 ημέρες μετά την ημερομηνία παρασκευής.
 - 7.2.1.4. Φυλάξτε σε θερμοκρασία δωματίου (20-25 °C).
- 7.2.2. 1X EDTA (παρασκευάζετε καθημερινά φρέσκο διάλυμα)
 - 7.2.2.1. Προσθέστε 40 mL EDTA 5X σε ένα καθαρό ποτήρι ζέσεως 250 mL.
 - 7.2.2.2. Προσθέστε 160 mL απιονισμένου H₂O.
 - 7.2.2.3. Αναμίξτε ήπια με ανάδευση.
- 7.2.3. Αιματοξυλίνη (παρασκευάζετε καθημερινά φρέσκο διάλυμα)
 - 7.2.3.1. Προσθέστε 20 mL αποσταγμένου H₂O σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα 25 mL.
 - 7.2.3.2. Προσθέστε 1 mL Mayer's Hematoxylin.
 - 7.2.3.3. Σφραγίστε τον δοκιμαστικό σωλήνα και αναμίξτε αναστρέφοντας πολλές φορές.

8. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΧΡΩΣΗΣ (Χειροκίνητη ή αυτοματοποιημένη)

8.1. Σημειώσεις για τη διαδικασία χρώσης

- 8.1.1. Το παρόν πρωτόκολλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί με τη χειροκίνητη ή την αυτοματοποιημένη χρώση στη διαδικασία εντοπισμού Dako Envision[®]+
- 8.1.2. Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να αφήνονται να ισορροπούν σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) πριν την ανοσοχρώση.

- 8.1.3. Όλες οι επωάσεις πρέπει να πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία δωματίου, εκτός εάν σημειώνεται διαφορετικά.
- 8.1.4. Μην αφήνετε τις αντικειμενοφόρους να στεγνώσουν κατά τη διάρκεια της διαδικασίας χρώσης. Τα παρασκευάσματα που έχουν στεγνώσει ενδέχεται να εμφανίζουν αυξημένη μη ειδική χρώση. Στις παρατεταμένες επωάσεις, οι αντικειμενοφόροι πρέπει να τοποθετούνται σε θάλαμο ύγρανσης.
- 8.2. Ανάκτηση επιτοπίου**
- 8.2.1. Προχωρήστε σε αποπαραφίνωση των αντικειμενοφόρων με 3 αλλαγές ξυλενίου (πέντε λεπτά έκαστη) ακολουθούμενη από 3 αλλαγές σε αλκοόλη 100% (πέντε λεπτά έκαστη).
- 8.2.2. Ενυδατώστε ξανά τις αντικειμενοφόρους με έκπλυση σε απιονισμένο H₂O.
- 8.2.3. Βυθίστε τις αντικειμενοφόρους στο διάλυμα ρυθμιστικού διαλύματος 1X EDTA που παρασκευάσατε και τοποθετήστε το δοχείο σε μια χύτρα ταχύτητας. Θερμάνετε τις αντικειμενοφόρους στη χύτρα ταχύτητας επί 30 δευτερόλεπτα.
- 8.2.4. Όταν ολοκληρωθεί το χρονικό σημείο θέρμανσης, αφήστε τις αντικειμενοφόρους στο ρυθμιστικό διάλυμα που υπάρχει στη χύτρα ταχύτητας και αφήστε τις να κρυώσουν επί 10 λεπτά.
- 8.2.5. Ξεπλύνετε τις αντικειμενοφόρους με απιονισμένο H₂O και μεταφέρετε τις σε ένα καθαρό δοχείο τύπου corlip που περιέχει 1X ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης.
- 8.3. Αντιδραστήριο αποκλεισμού υπεροξειδίασης**
- 8.3.1. Κτυπήστε ελαφρά για να απομακρύνετε την περίσσεια του ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης.
- 8.3.2. Τοποθετήστε τις αντικειμενοφόρους σε έναν θάλαμο ύγρανσης που έχετε ετοιμάσει (γεμάτο από χαρτοπετσέτες ή γάζες νοτισμένες με νερό).
- 8.3.3. Προσθέστε 200μL αντιδραστήριου αποκλεισμού υπεροξειδίασης για να καλύψετε την τομή του ιστού.
- 8.3.4. Επωάστε επί 5 λεπτά (\pm 1 λεπτό).
- 8.3.5. Ξεπλύνετε τις αντικειμενοφόρους σε 1X ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης, 3 αλλαγές, 2 λεπτά έκαστη.
- 8.4. Αντιδραστήριο πρωτοταγούς αντισώματος**
- 8.4.1. Κτυπήστε ελαφρά για να απομακρύνετε την περίσσεια του Ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης.
- 8.4.2. Τοποθετήστε τις αντικειμενοφόρους σε έναν θάλαμο ύγρανσης που έχετε ετοιμάσει (γεμάτο από χαρτοπετσέτες ή γάζες νοτισμένες με νερό).
- 8.4.3. Προσθέστε 200μL αντιδραστήριου αντισώματος ProEx™ C για να καλύψετε πλήρως την τομή του ιστού.
- 8.4.4. Επωάστε επί 40 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (20-25 °C).
- 8.4.5. Ξεπλύνετε ανεξάρτητα κάθε αντικειμενοφόρο με ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης με έναν υδροβολέα (μην επικεντρώνετε τη ροή απευθείας επάνω στην τομή του ιστού).
- 8.4.6. Ξεπλύνετε τις αντικειμενοφόρους σε ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης, 3 αλλαγές, 2 λεπτά έκαστη.
- 8.5. Διαδικασία εντοπισμού (χρήση των αντιδραστηρίων EnVision®+)**
- 8.5.1. Κτυπήστε ελαφρά για να απομακρύνετε την περίσσεια του ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης.
- 8.5.2. Τοποθετήστε τις αντικειμενοφόρους σε έναν θάλαμο ύγρανσης που έχετε ετοιμάσει (γεμάτο από χαρτοπετσέτες ή γάζες νοτισμένες με νερό).
- 8.5.3. Προσθέστε 200μL αντιδραστήριου HRP-Polymer για να καλύψετε την τομή του ιστού.
- 8.5.4. Επωάστε επί 30 λεπτά (\pm 1 λεπτό).
- 8.5.5. Ξεπλύνετε τις αντικειμενοφόρους σε ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης, 3 αλλαγές, 2 λεπτά έκαστη.
- 8.5.6. Κτυπήστε ελαφρά για να απομακρύνετε την περίσσεια του ρυθμιστικού διαλύματος.
- 8.5.7. Τοποθετήστε τις αντικειμενοφόρους σε έναν θάλαμο ύγρανσης που έχετε ετοιμάσει (γεμάτο από χαρτοπετσέτες ή γάζες νοτισμένες με νερό).
- 8.5.8. Προσθέστε 200μL αντιδραστήριου του διαλύματος εργασίας DAB για να καλύψετε την τομή ιστού.
- 8.5.9. Επωάστε επί 5 λεπτά (\pm 1 λεπτό).
- 8.5.10. Ξεπλύνετε τις αντικειμενοφόρους σε τρεχούμενο αποσταγμένο H₂O επί 5 λεπτά.
- 8.5.11. Ξεπλύνετε τις αντικειμενοφόρους σε Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης, 1 αλλαγή επί 2 λεπτά.
- 8.6. Αντίχρωση**
- 8.6.1. Τοποθετήστε τις αντικειμενοφόρους σε έναν θάλαμο ύγρανσης που έχετε ετοιμάσει (γεμάτο από χαρτοπετσέτες ή γάζες νοτισμένες με νερό).
- 8.6.2. Προσθέστε 200μL αντίχρωσης αιματοξυλίνης για να καλύψετε πλήρως την τομή του ιστού.
- 8.6.3. Επωάστε επί 5 λεπτά (\pm 10 δευτερόλεπτα).
- 8.6.4. Ξεπλύνετε τις αντικειμενοφόρους επί 3 λεπτά σε τρεχούμενο H₂O.
- 8.7. Κάλυψη**
- 8.7.1. Εμβαπτίστε τις αντικειμενοφόρους σε αιθανόλη 95%, 1 λεπτό ή 25 εμβαπτίσεις.
- 8.7.2. Εμβαπτίστε τις αντικειμενοφόρους σε απόλυτη αλκοόλη, 4 αλλαγές, 1 λεπτό έκαστη ή 25 εμβαπτίσεις.
- 8.7.3. Διαυγάστε με ξυλένιο, 3 αλλαγές, 1 λεπτό έκαστη ή 25 εμβαπτίσεις.
- 8.7.4. Καλύψτε τις αντικειμενοφόρους με μη υδατικό μονιμοποιητικό υλικό κάλυψης χρησιμοποιώντας γυάλινες καλυπτρίδες.
- 9. ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ**
- 9.1. Όταν τα φιαλίδια αντιδραστηρίων που δεν έχουν ανοιχτεί φυλάσσονται στις προτεινόμενες θερμοκρασίες παραμένουν σταθερά έως την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στο φιαλίδιο.
- 9.2. Μόλις ανοιχθούν τα αντιδραστήρια παραμένουν σταθερά επί ενενήντα (90) ημέρες όταν φυλάσσονται στις προτεινόμενες θερμοκρασίες.
- 10. ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ**
- 10.1. Η μεταβλητότητα στα αποτελέσματα συχνά προέρχεται από διαφορές στον χειρισμό των δειγμάτων, η οποία αποκλίνει από τις προτεινόμενες διαδικασίες της εξέτασης. Για περισσότερες πληροφορίες συμβουλευτείτε τις κατευθυντήριες οδηγίες του College of American Pathologists (CAP) Certification Program (CAP).
- 10.2. Σε κάθε κύκλο χρώσης πρέπει να περιλαμβάνεται ένας ιστός θετικού μάρτυρα για την επαλήθευση της απόδοσης της δοκιμασίας. Όταν ο ιστός θετικού μάρτυρα δεν παρουσιάζει θετική χρώση, τα αποτελέσματα των υπόλοιπων δειγμάτων της εξέτασης πρέπει να θεωρηθούν ύποπτα ή άκυρα.
- 10.3. Σε κάθε κύκλο χρώσης πρέπει να περιλαμβάνεται και έναν ιστό αρνητικού μάρτυρα για να επαληθεύετε την ειδικότητα του πρωτοταγούς αντισώματος και ως ένδειξη για τη χρώση του υπόβαθρου. Όταν ο ιστός αρνητικού μάρτυρα παρουσιάζει θετική ειδική χρώση, τα αποτελέσματα των υπόλοιπων δειγμάτων της εξέτασης πρέπει να θεωρηθούν ύποπτα ή άκυρα.
- 10.4. Για την αξιολόγηση της μη ειδικής χρώσης ή της χρώσης του υπόβαθρου, μπορείτε στη θέση του πρωτοταγούς αντισώματος να χρησιμοποιήσετε το αντιδραστήριο του μη ειδικού αρνητικού μάρτυρα.
- 11. ΕΡΜΗΝΕΙΑ**
- Η μέτρια έως έντονη καφέ χρώση του πυρήνα των κυτάρων αποτελεί ένδειξη παρουσίας παρεκκλίνουσας έναρξης της S φάσης. Οι χρωματισμένες αντικειμενοφόροι πρέπει να αξιολογηθούν από ειδικό ιστοπαθολόγο χρησιμοποιώντας μικροσκόπιο ορατού. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων πρέπει να πραγματοποιείται από πιστοποιημένο επαγγελματία και εντός των πλαισίων του ιστορικού του ασθενούς και άλλων διαγνωστικών εξετάσεων.
- 12. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ**
- 12.1. Η ανοσοϊστοχημική χρώση απαιτεί ειδικευμένη εκπαίδευση για την επιλογή και την εφαρμογή των αντιδραστηρίων.
- 12.2. Το παρόν αντιδραστήριο επαρκεί για 25 εξετάσεις με την υπόθεση ότι εφαρμόζετε 200μL αντιδραστήριου ανά αντικειμενοφόρο πλάκα.
- 12.3. Ορισμένα φυσιολογικά κύτταρα μπορεί να χρωματίζονται θετικά για παρεκκλίνουσα έναρξη S φάσης.
- 12.4. Η βέλτιστη χρώση του ιστού εξαρτάται από τη μονιμοποίηση και την επεξεργασία του δείγματος.
- 12.5. Η μη ειδική ή αυξημένη χρώση του υπόβαθρου μπορεί να οφείλεται, μεταξύ άλλων, σε αποκλίσεις στη διαδικασία, ανεπαρκές ξέπλυμα μεταξύ των βημάτων της δοκιμασίας ή/και ανεπαρκή επεξεργασία των δειγμάτων.










13. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ

Πρόβλημα	Πιθανή αιτία	Ενέργεια
Καμία χρώση στις αντικειμενοφόρους θετικού μάρτυρα	Τα αντιδραστήρια εφαρμόστηκαν με λάθος σειρά.	Εξετάστε και πάλι το πρωτόκολλο χρώσης.
	Παράλειψη κάποιου αντιδραστήριου.	Επαναλάβετε το πρωτόκολλο χρώσης.
	Εσφαλμένη παρασκευή του DAB.	Παρασκευάστε το σύμφωνα με τις προδιαγραφές του κατασκευαστή και επαναλάβετε το πρωτόκολλο χρώσης.
Ασθενής χρώση σε θετικές αντικειμενοφόρους μάρτυρες	Ανεπαρκής ανάκτηση αντιγόνου.	Ελέγξτε τους χρόνους επώασης και τη θερμοκρασία του ρυθμιστικού διαλύματος ανάκτησης αντιγόνου/επιτόπου (ανατρέξτε στην ενότητα 8.2).
	Χρήση εσφαλμένου ρυθμιστικού διαλύματος ανάκτησης αντιγόνου.	Εξετάστε και πάλι το πρωτόκολλο χρώσης και προετοιμάστε το ρυθμιστικό διάλυμα σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
	Ανεπαρκής επώαση του πρωτοταγούς αντι σώματος.	Εξετάστε και πάλι το πρωτόκολλο χρώσης και προσαρμόστε αναλόγως τους χρόνους επώασης.
	Αραιώθηκε το πρωτοταγές αντίσωμα.	Χρησιμοποιήστε το πρωτοταγές αντίσωμα σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
	Στην αντικειμενοφόρο παρέμεινε περίσσεια ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης, πριν την προσθήκη του επόμενου αντιδραστήριου.	Επαναλάβετε το πρωτόκολλο χρώσης. Κτυπήστε ελαφρά και σκουπίστε την περίσσεια του ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης.
Υπερβολική χρώση του υπόβαθρου	Ανεπαρκές ξέπλυμα μεταξύ των βημάτων της δοκιμασίας.	Επαναλάβετε το πρωτόκολλο χρώσης. Προσθέστε επιπλέον βήματα με ξέπλυμα ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης.
	Υπερβολικοί χρόνοι επώασης με τα βασικά αντιδραστήρια.	Εξετάστε και πάλι το πρωτόκολλο χρώσης και προσαρμόστε αναλόγως τους χρόνους επώασης.
	Οι αντικειμενοφόροι στεγνώνουν κατά τη διάρκεια της επώασης της δοκιμασίας ή των βημάτων ξέπλυματος.	Επαναλάβετε το πρωτόκολλο χρώσης. Ελέγξτε τον θάλαμο ύγρανσης.

14. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Kastan M and Bartec J. Cell cycle checkpoints and cancer. Nature, 2004. Vol 432:316-323.
- Massague J. G1 cell-cycle control and cancer. Nature, 2004. Vol 432:298-306.
- Freeman A, Morris LS, Millis AD, Stoeber K, Laskey RA, Williams GH and Coleman N. Minichromosome Maintenance Proteins as Biological Markers of Dysplasia and Malignancy. CI Cancer Research, 1999. Vol 5:2121-2132.
- Ishimi Y, Okayasu I, Kato C, Kwon H, Kimura H, Yamada K and Song S. Enhanced expression of MCM proteins in cancer cells derived from uterine cervix. Eur. J. Biochem 2003. 270:1089-1101.
- Lei M and Tye BK. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM Complex. J Cell Science 2001. Vol. 114 (8): 1447-1454.

15. ΓΛΩΣΣΑΡΙΟ ΣΥΜΒΟΛΩΝ


-  Αριθμός καταλόγου
-  Για *in vitro* διαγνωστική χρήση
-  Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης
-  Περιέχει 7 mL
-  Προσοχή, συμβουλευτείτε το έγγραφο που το συνοδεύει
-  Περιορισμοί θερμοκρασίας φύλαξης
-  Κωδικός παρτίδας
-  Χρήση έως EEEE-MM-HH ή EEEE-MM
-  Κατασκευαστής

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

USA
Telephone: 1-877-822-7771
Fax: 1-336-290-8333

Europe
Telephone: +32 (0)53 720 673
Fax: +32 (0)53 720 678


TriPath Imaging, Inc.
780 Plantation Drive
Burlington, NC 27215 USA


Benex Limited
Rineanna House
Shannon Free Zone
Shannon, County Clare
Ireland



Αναπτύχθηκε με την τεχνολογία της Millennium Pharmaceuticals, Inc.

 MILLENNIUM™

 και MILLENNIUM™ αποτελούν κατατεθέντα σήματα της Millennium Pharmaceuticals, Inc.

Millennium Pharmaceuticals, Inc.
40 Landsdowne Street
Cambridge, MA 02139 USA
www.millennium.com

Το ProEx αποτελεί σήμα κατατεθέν της TriPath Imaging, Inc.



REAGENS BESKRIVNING

Ig-klass IgG₁

Immunogen Rekombinant humant MCM2 och TOP2A

1. AVSEDD ANVÄNDNING

För in vitro-diagnostik.

För användning med manuell eller automatisk färgning med användning av Dako Envision[®]+ detekteringskemi.

ProEx[™] C immunohistokemiskt test är avsett för kvalitativ utvärdering av avvikande S-fasinduktion i formalinfixerade paraffinbäddade vävnadsbiopsier. Tolkning av resultaten måste ske av certifierad personal i kombination med patientens anamnes och andra diagnostiska tester.

2. SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING

Minikromosomunderhåll (MCM) och topisomeras II alfa (TOP2A)-proteiner spelar en viktig reglerande roll vid eukaryotisk DNA-replikation. HPV-onkoproteinerna E6 och E7 leder t.ex. förbi kritiska kontrollpunkter för cellcykeln vilket resulterar i en längre och avvikande S-fasinduktionscykel. Under transkriptionsaktiveringen av den avvikande cellcykeln ökar nivåerna av MCM2 och TOP2A vid celledelningen.

Både MCM2- OCH TOP2A-proteiner har visat sig vara överrepresenterade i ett antal olika dysplastiska och maligna vävnader, t.ex. cervixneoplasier.¹⁻⁵ Överrepresentationen av dessa proteiner i morfologiskt abnorma celler vilket påvisas av ett måttligt till intensivt kärnfärgningsmönster med immunohistokemiska (IHC)-tekniker indikerar förekomst av avvikande S-fasinduktion.

3. REAGENSER SOM TILLHANDAHÅLLS

ProEx[™] C antikroppsreagens innehåller musmonoklonalt anti-MCM2 och anti-TOP2A som renats från vävnadskultursupernatant och späts med buffrad koksaltlösning som innehåller proteinstabilisatorer och 0,09 % natriumazid.

4. PROCEDURPRINCIPER

Formalinfixerade paraffinbäddade vävnadsprover sektioneras, placeras på objektglas och deparaffineras. De sektionerade proverna förbehandlas med en buffert för att exponera antigenplatser. Blockerande medel tillsätts för att minimera bakgrunds-färgning som orsakats av endogent peroxid. Provet inkuberas därefter med ProEx[™] C antikroppsreagens. Tillsats av ett enzymänkat antikropps-kromogensystem resulterar i bildning av en synlig kromogen produkt som är lokaliserad till bindningsställen för antigen-antikroppar. Provet kontrollfärgas därefter med hematoxylin. Ett blåfärgande medel appliceras och objektglaset förses med ett täckglas. Resultaten tolkas av utbildad personal med hjälp av ett ljusmikroskop.

ProEx[™] C immunohistokemiskt test är tillämpligt för både manuell och automatisk färgning.

5. MATERIAL OCH REAGENSER SOM KRÄVS MEN SOM INTE MEDFÖLJER (för manuell procedur)

- EDTA 5X – kat.nr. CB9172 (BioCare)
- EnVision[®]+ kit – kat. nr K4007 (Dako)
- Mayers Hematoxylin – kat. nr. S3309 (Dako)
- Tvättbuffert 10X – kat. nr S3006 (Dako)
- Universell musnegativ kontroll – kat. nr. N1698 (Dako)
- Tryckkokare
- Objektglas av glas (SuperFrost[®] Plus eller motsvarande)
- Monteringsmedia (ShurMount[®] eller motsvarande)
- Pipetter och pipettspetsar (klarar att avge volymer på 20 µL, 200 µL och 1 000 µL)
- Timer (klarar intervaller på 1 – 60 minuter)
- Avjoniserat vatten
- Etanol 95 % och 100 %
- Täckglas av glas
- Laboratoriemärkpena
- 10 L damejeanne (Nalgene[®] eller motsvarande)
- Sterila engångsflaskor
- Objektglastork
- Objektglasställ med färgningsfat
- Xylen eller Xylenersättning
- Ljusmikroskop (10x-, 20x- [tillval], 40x-objektiv)

6. FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

- 6.1. För in vitro-diagnostik.
- 6.2. Klargöringsprocedurer av objektglas som kräver xylen måste genomföras i godkända dragskåp.
- 6.3. DAB (3,3'-Diaminobenzidin) är klassat som en misstänkt karcinogen. Undvik fysisk kontakt och långvarig eller upprepad exponering. Använd i ett godkänt dragskåp.
- 6.4. ProEx[™] C antikroppsreagens innehåller natriumazid (NaN₃), en mycket toxisk kemikalie i ren form. Trots att det inte klassificerats som farligt vid produktkoncentration, kan natriumazid reagera med bly- och kopparledningar och bilda högejplösa ansamlingar av metallazider. Vid bortskaffning skall man spola med stora mängder vatten för att förhindra metallazidansamling i ledningarna.
- 6.5. Proverna och alla material som utsätts för proverna ska hanteras som om de kan överföra infektion och kasseras med tillämpliga försiktighetsåtgärder. Pipettera aldrig reagenser med munnen och undvik kontakt med hud och slemhinor. Tvätta rikligt med vatten om reagenserna kommer i kontakt med känsliga områden.
- 6.6. Minimera den mikrobiella kontaminationen av reagenser för att undvika ej specifik färgning.
- 6.7. Andra inkubationstider, temperaturer eller metoder än vad som anges kan ge felaktiga resultat.
- 6.8. Använd inte ProEx[™] C antikroppsreagens efter det utgångsdatum som är stämplat på förpackningen. Användaren måste validera tillståndet om reagensen förvaras under andra förvaringsvillkor än de som anges på förpackningsinlagen.
- 6.9. Använd tillämplig personlig skyddsutrustning för att undvika att reagentet kommer i kontakt med ögonen eller huden. Se databladet för materialsäkerhet för ytterligare information.

7. BRUKSANVISNING

7.1. Proverberedning

- 7.1.1. Skär ut 4 µm sektioner från vävnadsblocket och placera sektionerna på SuperFrost[®] Plus objektglas av glas.
- 7.1.2. Märk objektglaset.
- 7.1.3. Torka objektglaset i varmluftsugn i 20 minuter.

7.2. Reagensberedning

- 7.2.1. 1X Tvättbuffert, 10 L
 - 7.2.1.1. Kombinera 9 liter avjoniserat H₂O med 1 liter 10X tvättbuffert.
 - 7.2.1.2. Sätt kork på och blanda genom att vända upp och ner flera gånger.
 - 7.2.1.3. Märk med ett utgångsdatum på 5 dagar från beredningsdatum.
 - 7.2.1.4. Förvaras i rumstemperatur (20 – 25 °C).
- 7.2.2. 1X EDTA (bered färskt varje dag)
 - 7.2.2.1. Tillsätt 40 mL 5X EDTA till en ren 250 mL bägare.
 - 7.2.2.2. Tillsätt 160 mL avjoniserat H₂O.
 - 7.2.2.3. Blanda genom att röra om försiktigt.
- 7.2.3. Hematoxylin (bered färskt varje dag)
 - 7.2.3.1. Tillsätt 20 mL destillerat H₂O till ett 25 mL provrör.
 - 7.2.3.2. Tillsätt 1 mL Mayers hematoxylin
 - 7.2.3.3. Sätt kork på provröret och blanda genom att vända upp och ner flera gånger.

8. FÄRGNINGS PROTOKOLL (manuellt eller automatiskt)

8.1. Anmärkningar om färgningsprocedurer

- 8.1.1. Detta protokoll kan användas med manuell eller automatisk färgning med användning av Dako Envision[®]+ detekteringskemi.
- 8.1.2. Alla reagenser ska ekvibreras till rumstemperatur (20 – 25 °C) före immunfärgning.
- 8.1.3. Alla inkubationer ska genomföras i rumstemperatur om inget annat anges.
- 8.1.4. Låt inte objektglaset torka någon gång under färgningsproceduren. Torkade cellberedningar kan uppvisa ökad ospecificerad färgning. Objektglaset ska placeras i en fuktigare miljö vid längre inkubationer.

- 8.2. Epitopåtervinning**
- 8.2.1. Avparaffinera objektglaset med 3 byten av xylol (5 minuter vardera) följt av 3 byten med 100 % alkohol (5 minuter vardera).
- 8.2.2. Rehydrera objektglaset genom att skölja dem i avjoniserat H₂O.
- 8.2.3. Sänk ned objektglaset i beredd 1X EDTA-buffertlösning och placera behållaren i en tryckkokare. Värm upp objektglaset i tryckkokaren i 30 sekunder.
- 8.2.4. När uppvärmningen är klar låter du objektglaset vara kvar i bufferten i tryckkokaren och låter dem svalna i 10 minuter.
- 8.2.5. Skölj objektglaset med avjoniserat H₂O och överför till ett rent coplinkårl som innehåller 1X tvättbuffert.
- 8.3. Peroxidblockerande reagens**
- 8.3.1. Knacka bort all kvarvarande tvättbuffert.
- 8.3.2. Ladda objektglaset i en beredd fuktammare (fylld med pappershanddukar eller kompresser fuktade med vatten).
- 8.3.3. Applicera 200 µL peroxidblockeringsreagens så att det täcker vävnadssektionen.
- 8.3.4. Inkubera i 5 minuter (±1 minut).
- 8.3.5. Skölj objektglaset i 1X tvättbuffert, 3 byten, 2 minuter vardera.
- 8.4. Primär antikroppsreagens**
- 8.4.1. Knacka bort all kvarvarande tvättbuffert.
- 8.4.2. Ladda objektglaset i en beredd fuktammare (fylld med pappershanddukar eller kompresser fuktade med vatten).
- 8.4.3. Applicera 200 µL ProEx™ C antikroppsreagens så att det täcker vävnadssektionen helt.
- 8.4.4. Inkubera 40 minuter vid rumtemperatur (20 – 25 °C).
- 8.4.5. Skölj varje objektglas individuellt med tvättbuffert genom att använda en tvättflaska (rikta inte flödet direkt mot vävnadssektionen).
- 8.4.6. Skölj objektglaset i tvättbuffert, 3 byten, 2 minuter vardera.
- 8.5. Detekteringskemi (med användning av EnVision®+ reagenser)**
- 8.5.1. Knacka bort all kvarvarande tvättbuffert.
- 8.5.2. Ladda objektglaset i en beredd fuktammare (fylld med pappershanddukar eller kompresser fuktade med vatten).
- 8.5.3. Applicera 200 µL HRP-polymerreagens så att det täcker vävnadssektionen helt.
- 8.5.4. Inkubera i 30 minuter (±1 minut).
- 8.5.5. Skölj objektglaset i tvättbuffert, 3 byten, 2 minuter vardera.
- 8.5.6. Knacka bort all kvarvarande buffert.
- 8.5.7. Ladda objektglaset i en beredd fuktammare (fylld med pappershanddukar eller kompresser fuktade med vatten).
- 8.5.8. Applicera 200 µL DAB-arbetslösning med reagens så att det täcker vävnadssektionen.
- 8.5.9. Inkubera i 5 minuter (±1 minut).
- 8.5.10. Skölj objektglaset i 5 minuter i rinnande destillerat H₂O.
- 8.5.11. Skölj objektglaset i tvättbuffert, 1 byten, 2 minuter vardera.
- 8.6. Kontrollfärg**
- 8.6.1. Ladda objektglaset i en beredd fuktammare (fylld med pappershanddukar eller kompresser fuktade med vatten).
- 8.6.2. Applicera 200 µL hematoxylin kontrollfärg så att det täcker vävnadssektionen.
- 8.6.3. Inkubera i 5 minuter (±10 sekunder).
- 8.6.4. Skölj objektglaset i 3 minuter i rinnande vatten.
- 8.7. Montering**
- 8.7.1. Sänk ned objektglaset i 95 % etanol, 1 minut eller 25 doppningar.
- 8.7.2. Sänk ned objektglaset i absolut alkohol, 4 byten, 1 minut vardera eller 25 doppningar.
- 8.7.3. Klargör med xylol, 3 byten, 1 minut vardera eller 25 doppningar.
- 8.7.4. Täck objektglaset med permanent ej vattenlösligt monteringsmedel med hjälp av täckglas av glas.

9. STABILITET

- 9.1. Vid förvaring vid de rekommenderade temperaturerna är öppnade reagensvialer stabila till det utgångsdatum som anges på vialen.

- 9.2. När de öppnats är reagenserna stabila i nittio (90) dagar när de förvarats vid de rekommenderade temperaturerna.

10. KVALITETSKONTROLL

- 10.1. Variabilitet i resultaten härleds ofta från skillnader i provhantering som avviker från de rekommenderade testprocedurerna. Ytterligare information finns i riktlinjerna för kvalitetskontroll i Certification Program for Immunohistochemistry från College of American Pathologists (CAP).
- 10.2. En positiv vävnadskontroll ska ingå vid varje färgningskörning för att verifiera analysens prestanda. Om den positiva vävnadskontrollen inte visar positiv färgning ska resultaten för de andra testproverna betraktas som suspekta eller ogiltiga.
- 10.3. En negativ vävnadskontroll ska ingå i varje färgningskörning för att verifiera specificiteten för den primära antikroppen och för att ge en indikation på bakgrunds-färgning. Om den negativa vävnadskontrollen visar positiv specifik färgning ska resultaten för de andra testproverna betraktas som suspekta eller ogiltiga.
- 10.4. En icke-specifik negativ kontrollreagens kan också användas i stället för den primära antikroppen för att utvärdera icke-specifik färgning eller bakgrunds-färgning.

11. TOLKNING

Måttlig till intensiv brun färgning i cellkärnorna anger förekomst av avvikande S-fasinduktion. En patolog bör utvärdera de färgade objektglaset med ett ljusmikroskop. Tolkning av resultaten måste ske av certifierad personal i kombination med patientens anamnes och andra diagnostiska tester.

12. BEGRÄNSNINGAR

- 12.1. Immunohistokemisk färgning kräver specialiserad utbildning i val och applicering av reagenser.
- 12.2. Detta reagens genomför 25 tester och antar att 200 µL reagens appliceras per objektglas.
- 12.3. Vissa normala celler kan få positiv färgning för avvikande S-fasinduktion.
- 12.4. Optimal vävnadsfärgning är beroende av fixering och bearbetning av provet.
- 12.5. Icke-specifik eller ökad bakgrunds-färgning kan inträffa på grund av, men inte begränsat till variationer i proceduren, otillräcklig sköljning mellan analysstegen och/eller felaktigt bearbetade prover.




13. FELSÖKNING

Problem	Möjlig orsak	Åtgärd
Ingen färgning på positiva kontrollobjektglas	Reagenserna har applicerats i felaktig ordning.	Granska färgningsprotokollet.
	Utelämnande av något reagens.	Upprepa färgningsprotokollet.
	Felaktig beredning av DAB.	Bered enligt tillverkarens specifikationer och upprepa färgningsprotokollet.
Svag färgning på positiva kontrollobjektglas	Otillräcklig antigenåtervinning.	Kontrollera inkuberings-tiderna och temperaturen för antigen-/epitopåtervinningsbufferten (se avsnitt 8.2).
	Felaktig antigenåtervinningsbuffert används.	Granska färgningsprotokollet och bered buffert enligt tillverkarens specifikationer.
	Felaktig inkubation av primär antikropp.	Granska färgningsprotokollet och justera inkuberings-tiderna därefter.
	Primär antikropp har späts.	Använd primär antikropp enligt tillverkarens anvisningar.
	För mycket tvättbuffert kvar på objektglaset före appliceringen av nästa reagens.	Upprepa färgningsprotokollet. Knacka och torka bort all kvarvarande tvättbuffert.
För mycket bakgrunds-färgning	Otillräcklig sköljning mellan analysstegen.	Upprepa färgningsprotokollet. Tillsätt ytterligare steg med sköljning av tvättbuffert.
	För långa inkubationstider med nyckelreagenser.	Granska färgningsprotokollet och justera inkuberings-tiderna därefter.
	Objektglaset har torkat ut under analysens inkuberings- eller sköljningssteg.	Upprepa färgningsprotokollet. Kontrollera fuktammaren.

14. REFERENSER

1. Kastan M and Bartec J. Cell cycle checkpoints and cancer. Nature, 2004. Vol 432:316-323.
2. Massague J. G1 cell-cycle control and cancer. Nature, 2004. Vol 432:298-306.
3. Freeman A, Morris LS, Millis AD, Stoerber K, Laskey RA, Williams GH and Coleman N. Minichromosome Maintenance Proteins as Biological Markers of Dysplasia and Malignancy. *CI Cancer Research*, 1999. Vol 5:2121-2132.
4. Ishimi Y, Okayasu I, Kato C, Kwon H, Kimura H, Yamada K and Song S. Enhanced expression of MCM proteins in cancer cells derived from uterine cervix. *Eur. J. Biochem* 2003. 270:1089-1101.
5. Lei M and Tye BK. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM Complex. *J Cell Science* 2001. Vol. 114 (8): 1447-1454.

15. SYMBOLFÖRTECKNING

-  Katalognummer
-  För *in vitro*-diagnostik
-  Se bruksanvisningen
-  Innehåller 7 mL
-  Försiktigt! Se medföljande dokumentation
-  Begränsningar för förvaringstemperaturen
-  Batchkod
-  Använd senast ÅÅÅÅ-MM-DD eller ÅÅÅÅ-MM
-  Tillverkare

TEKNISK INFORMATION

USA
Telephone: 1-877-822-7771
Fax: 1-336-290-8333

Europe
Telephone: +32 (0)53 720 673
Fax: +32 (0)53 720 678



TriPath Imaging, Inc.
780 Plantation Drive
Burlington, NC 27215 USA




Benex Limited
Rineanna House
Shannon Free Zone
Shannon, County Clare
Ireland



Utvecklat med teknik från Millennium Pharmaceuticals, Inc.



 och MILLENNIUM® är varumärken som tillhör Millennium Pharmaceuticals, Inc.

Millennium Pharmaceuticals, Inc.
40 Landsdowne Street
Cambridge, MA 02139 USA
www.millennium.com

ProEx är en produkt och ett varumärke som tillhör TriPath Imaging, Inc.