

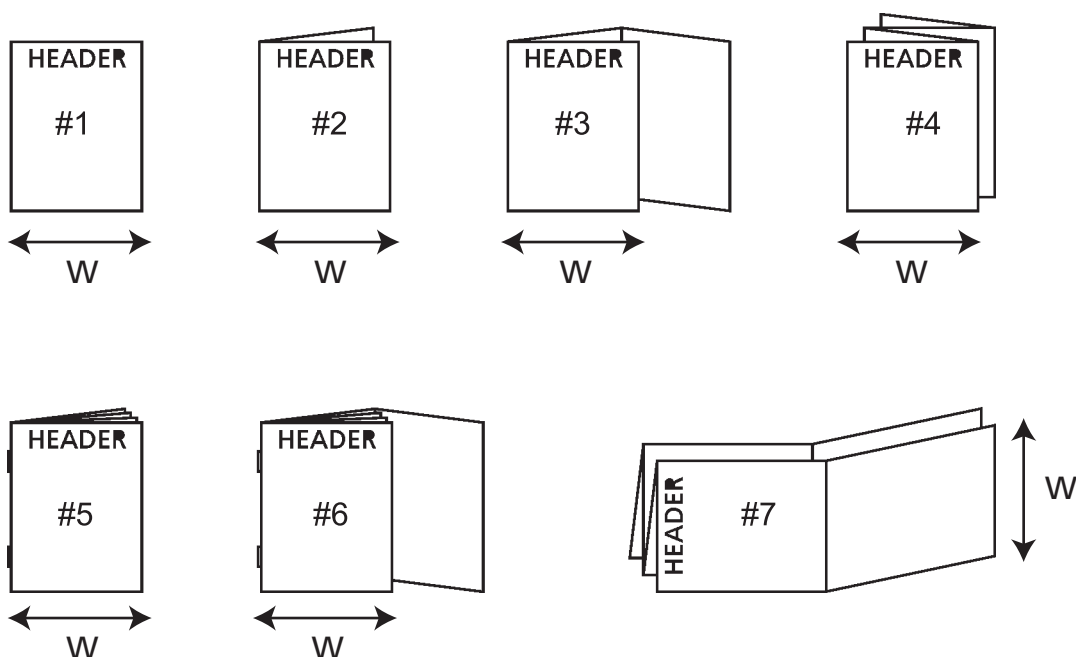
# Revisions

BALTSO0191 Version 8.0 Template 4  
Inserts

| Rev from | Rev to | JOB #   |
|----------|--------|---------|
| 08       | 09     | 7236-15 |

## NOTES:

- BD Catalog Number: 490500, 490501
- Blank (Sheet) Size: Length: 11 Width: 8.5"
- Number of Pages: 26 Number of Sheets: 13
- Page Size: Length: 11" Width: 8.5" Final Folded Size: 8.5" x 11"
- Ink Colors: No. of Colors: 2 PMS#: 032 Red; Standard Black
- Printed two sides: Yes ☒ No ☐
- Style (see illustrations below): # 1 (3-hole punched); Stapled top left corner



- BD Diagnostics inspects per procedure 838-07096-00 upon entry to their plant.
- See specification control no. N/A for material information.
- Graphics are approved by Becton, Dickinson and Company. Supplier has the responsibility for using the most current approved revision level.

|              |                                                                    |                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                          |
|--------------|--------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Label Design | REVISED BY<br>By Nancy Carlsen at 12:46 pm, Oct 20, 2015           | COMPANY CONFIDENTIAL. THIS DOCUMENT IS THE PROPERTY OF BECTON, DICKINSON AND COMPANY AND IS NOT TO BE USED OUTSIDE THE COMPANY WITHOUT WRITTEN PERMISSION. |  <b>BD</b> Becton, Dickinson and Company<br>7 Loveton Circle<br>Sparks, MD 21152 USA |
| Proofer      | PROOFING APPROVED BY<br>By Helaine Jones at 10:19 am, Oct 21, 2015 |                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                          |
| Checked By   | THIRD EYE BY<br>By Sarah Cork at 12:59 pm, Oct 21, 2015            |                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                          |
| Part Number: | 779-05848-10                                                       | Category and Description<br>Package Insert,<br>BD SurePath with ProEx C<br>Immunocytochemical Test Kit                                                     | Sheet: 1 of 27<br>Scale: N/A<br><div style="font-size: 2em; font-weight: bold; text-align: center;">A</div>                                                              |



# SurePath® with ProEx™ C Immunocytochemical Test Kit



|                                                                                                                                                                |                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|----|
| REF 490501                                                                                                                                                     | SurePath® with ProEx™ C<br>Immunocytochemical Test Kit           | 75 |
| REF 490500                                                                                                                                                     | SurePath® with ProEx™ C<br>Immunocytochemical Test Counterstains | 75 |
| English: pages 1 – 4    Deutsch: Seiten 9 – 12    Español: páginas 17 – 20<br>Français : pages 5 – 8    Italiano: pagine 13 – 16    Português: páginas 21 – 24 |                                                                  |    |

Contact your local BD representative for instructions. / Свържете се с местния представител на BD за инструкции. / Pokyny vám poskytne místní zástupce společnosti BD. / Kontakt den lokale BD repræsentant for at få instruktioner. / Επικοινωνήστε με τον τοπικό αντιπρόσωπο της BD για οδηγίες. / Kasutusjuhiste suhtes kontakteeruge oma kohaliku BD esindajaga. / Ota yhteyts lähimpään BD:n edustajaan ohjeiden saamiseksi. / Kontaktiraj lokalnog predstavnika BD za upute. / A használati utasítást kérje a BD helyi képviselőtől. / Нұсқаулар үшін жергілікті BD өкілімен хабарласыңыз. / Lai saņemtu norādījumus, sazinieties ar vietējo BD pārstāvi. / Naudojimo instrukcijų teiraukitės vietos BD įgaliotojo atstovo. / Neem contact op met uw plaatselijke BD-vertegenwoordiger voor instructies. / Kontakt din lokale BD-representant for mer informasjon. / Aby uzyskać instrukcje użytkowania, skontaktuj się z lokalnym przedstawicielstwem BD. / Contacte o representante local da BD para instruções. / Pentru instrucțiuni, contactați reprezentantul local BD. / Для получения указаний обратитесь к местному представителю компании BD. / Inštrukcie získate u miestneho zástupcu spoločnosti BD. / Obratite se svom lokalnom predstavniku kompanije BD za uputstva. / Kontakta närmaste BD-representant för anvisningar. / Talimatlar için yerel BD temsilcinizle temasa geçin. / За інструкціями зверніться до місцевого представника компанії BD

## INTENDED USE

The **SurePath with ProEx C** Immunocytochemical Test is intended for the qualitative evaluation of aberrant S-Phase induction in cervical cytology specimens collected in **SurePath** Preservative Fluid. The test results provide adjunctive information for cervical cytology diagnosis.

## SUMMARY AND EXPLANATION

Minichromosome maintenance (MCM) proteins play an essential role in eukaryotic DNA replication. Each of the MCM proteins has DNA-dependent ATPase motifs in their highly conserved central domain. Levels of MCM proteins generally increase in a variable manner as normal cells progress from G0 into the G1/S phase of the cell cycle. Topoisomerase II alpha (TOP2A) is an essential nuclear enzyme involved in DNA replication and is a target for many anti-cancer drugs used for cancer therapy. Decreased expression of TOP2A is a predominant mechanism of resistance to several chemotherapeutic agents. A significant variation in the range of expression of this protein has been noted in many different tumors. TOP2A is predominant in proliferating cells and is modified in M phase by phosphorylation at specific sites, which is critical for mitotic chromosome condensation and segregation.

**ProEx C** Antibody Cocktail 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.

## PRINCIPLES OF PROCEDURE

The **SurePath with ProEx C** Immunocytochemical Test kit contains an antibody cocktail, detection and counterstain reagents necessary to complete a three-step manual or automated immunocytochemical staining procedure for routinely prepared thinlayer cervical specimens. Following incubation of the sample with a proprietary, mouse antibody cocktail, selective monoclonal antibody binding, indicative of a positive test, is visualized using a unique, ready-to-use, enzyme-linked antibody chromogen system. The enzyme reagent is a secondary goat anti-mouse, horseradish peroxidase conjugate linked to a dextran polymer backbone. Addition of a specific chromogen results in formation of a visible chromogenic product localized at the antigen-antibody binding sites. The specimen is then counterstained with hematoxylin, a bluing agent is applied and the slide is coverslipped. Results are interpreted using a light microscope. A positive result, indicative of high-grade cervical disease, is achieved when the nucleus in cells of interest stain brown.

A reference gallery of potentially positive slides may be created using automated imaging equipment. The gallery then can be reviewed to determine a positive result or negative result.

The **SurePath with ProEx C** Immunocytochemical Test is applicable for both manual and automated staining.

## REAGENTS PROVIDED

The following materials are included, which are sufficient for 75 thinlayer preparations:

| Vial No. | Description                                                                                                                                                               |          |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| 1a       | <b>Peroxidase Block:</b> Buffered hydrogen peroxide plus stabilizer and proprietary components                                                                            | 2–8 °C   |
| 1b       | <b>Protein Block:</b> Purified casein plus proprietary combination of proteins in modified PBS with preservative and surfactant                                           | 2–8 °C   |
| 2        | <b>Ab Cocktail:</b> Ready-to-use monoclonal antibody cocktail supplied in Tris buffered solution with Tween 20. Contains stabilizing proteins and anti-microbial reagent. | 2–8 °C   |
| 3a       | <b>Mouse Probe:</b> Binds to mouse monoclonal antibodies                                                                                                                  | 2–8 °C   |
| 3b       | <b>Polymer Reagent:</b> Polymer conjugated with horseradish peroxidase that binds to Mouse Probe Reagent                                                                  | 2–8 °C   |
| 4a       | <b>DAB Substrate Buffer:</b> Substrate buffer used in the preparation of the DAB chromogen                                                                                | 2–8 °C   |
| 4b       | <b>DAB:</b> 3,3'-diaminobenzidine chromogen solution                                                                                                                      | 2–8 °C   |
| 5        | <b>Hematoxylin:</b> Aqueous based Mayer's Hematoxylin                                                                                                                     | 15–30 °C |
| 6        | <b>Bluing Agent:</b> Tris buffered saline with Tween 20 and 0.09% NaN <sub>3</sub>                                                                                        | 15–30 °C |

## MATERIALS AND REAGENTS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Absorbent Wipes
- BD SureDetect™** SiHa Cell Line
- Deionized or Distilled Water
- Ethanol (95% and 100%)
- Glass Coverslips
- Gloves
- Humid Chamber
- Light Microscope (10x, 20x [optional], 40x objectives)
- Mounting Media
- Pipettes and Pipette Tips (capable of delivering 20 µL, 200 µL and 1000 µL volumes)
- BD SureDetect** Slide Preparation Buffer 10X (Pretreatment Buffer)
- Staining Jars or Baths
- Timer (capable of 1–60 minute intervals)
- Tris Buffered Saline (TBS)
- Tween 20
- Universal Mouse IgG Negative Control
- Vortexer
- Xylene or Xylene Substitutes
- Steamer/ waterbath

## WARNINGS AND PRECAUTIONS

### 490500 SurePath with ProEx C Immunocytochemical Counterstains

#### Warning



**H302** Harmful if swallowed. **H315** Causes skin irritation. **H319** Causes serious eye irritation.

**P264** Wash thoroughly after handling. **P280** Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection. **P301+P312** IF SWALLOWED: Call a POISON CENTER or doctor/physician if you feel unwell. **P302+P352** IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water. **P305+P351+P338** IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. **P501** Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.

### 490501 SurePath with ProEx C Immunocytochemical Test Kit

#### Danger



**H341** Suspected of causing genetic defects. **H350** May cause cancer.

**P281** Use personal protective equipment as required. **P308+P313** IF exposed or concerned: Get medical advice/attention. **P405** Store locked up. **P501** Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.

## PRECAUTIONS

1. For *in vitro* Diagnostic Use.
2. Prepared **SurePath** slides must be placed into the pretreatment buffer as soon as they are prepared. The slides must remain in the pretreatment buffer for at least 1 hour, but not longer than 72 hours prior to immunocytochemistry.
3. Do not allow the slides to dry out at any time during the procedure. Slides that have been allowed to dry out during the procedure may increase background.
4. 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.
5. Minimize microbial contamination of reagents to avoid nonspecific staining.
6. Incubation times, temperatures or methods other than those specified may give erroneous results.
7. Reagents have been diluted for optimal performance. Further dilution may result in loss of antigen staining.
8. Kit components are lot specific. Do not substitute kit components with different manufactured lot numbers. Lot numbers appear on packaging labels.
9. Do not use the **SurePath** with **ProEx C** Test kit 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.
10. There are no obvious signs to indicate degradation of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed, which cannot be explained by variations in laboratory procedures or a problem with the **SurePath** with **ProEx C** Test kit is suspected, contact BD technical support.
11. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid reagent contact with eyes and skin. Refer to the Material Safety Data Sheet (MSDS) for additional information.
12. The **SurePath** with **ProEx C** Test is intended for use with cervical cytology specimens collected in **SurePath** Preservative Fluid. Compatibility with conventional and monolayer preparations other than **SurePath** has not been evaluated.

## INSTRUCTIONS FOR USE

### Specimen Preparation

Consult the User's Manual for the **BD PrepStain™** Slide Processor for instructions regarding the preparation of slides from residual **SurePath** cervical cytology specimens.

Add 8 mL of **SurePath** Preservative Fluid to the residual sample in the **SurePath** vial (approx. 2 mLs). The diluted sample should be processed on the **BD PrepMate** Instrument using the standard technique and on the **BD PrepStain** Instrument.

Prepared **SurePath** slides must be placed into the **BD SureDetect** Slide Preparation Buffer 10X as soon as they are prepared (Refer to the **BD SureDetect** Slide Preparation Buffer Product Insert for directions on preparation of a working slide solution). The slides must remain in the buffer for at least 1 hour, but not longer than 72 hours prior to immunocytochemistry.

An epitope retrieval procedure must be used for optimal kit performance. This procedure involves soaking prepared slides in a working solution of **BD SureDetect** Slide Preparation Buffer for a minimum of 1 hour at room temperature followed by heating slides in the pretreatment buffer to 95 °C. Slides are held at 95 °C for 15 minutes and are allowed to cool at room temperature for 20 minutes. The use of a calibrated waterbath or steamer capable of maintaining the required temperature is recommended. Laboratories located at higher elevations should determine the best method of maintaining the required temperature. The staining procedure should be initiated immediately following epitope retrieval and cool down. Deviations from the described procedure may adversely affect results.

### Reagent Preparation

Prepare the following reagents prior to staining.

- Tris Buffered Saline with 0.05% Tween 20 (TBST)
  - Prepare TBS according to manufacturer's specifications.
  - If not already present in TBS, add Tween 20 to a final concentration of 0.05%.
- Substrate-Chromogen Solution (DAB) (volume sufficient for 5 slides)
  - Transfer 1 mL of DAB Substrate Buffer (vial 4a) to a test tube.
  - Add one drop (20–30 µL) of DAB Chromogen (vial 4b). Mix thoroughly and apply to slides with a pipette.
  - Prepare Substrate-Chromogen solution fresh daily.
  - Staining quality is not affected by precipitate that may develop in the solution.

## STAINING PROTOCOL

(PERFORMED AT ROOM TEMPERATURE, 20–25 °C)

### Staining Procedural Notes

- Read all these instructions carefully and become familiar with all components prior to use (see Precautions).
- All reagents should be equilibrated to room temperature (20–25 °C) prior to immunostaining.
- All incubations should be performed at room temperature unless noted.
- Do not allow slides to dry out during the staining procedure. Dried cellular preparations may display increased non-specific staining. Protect slides that may be exposed to drafts. Slides should be placed in a humid chamber for prolonged incubations.

### Epitope Retrieval

- Place prepared slides in a coplin jar containing a working solution of **BD SureDetect** Slide Preparation Buffer for a minimum of 1 hour up to a maximum of 72 hours.
- Incubate in a waterbath or steamer for 15 minutes at 95 °C.
- Remove the entire coplin jar with slides from the waterbath or steamer and allow slides to cool in the buffer for 20 minutes.
- Rinse the slides with deionized H<sub>2</sub>O and transfer to a clean coplin jar containing TBST.

### Blocking Reagent

- Tap off excess buffer.
- Load slides into a prepared humidity chamber (filled with water moistened paper towels or gauze).
- Apply 200 µL Peroxidase Block reagent (vial 1a) to cover the cell deposition area.
- Incubate 5 minutes (±1 minute).
- Rinse slides in TBST, 3 changes, 2 minutes each.

### Protein Block

- Tap off excess buffer.
- Load the slides into the prepared humidity chamber (filled with water moistened paper towels or gauze).
- Apply 200 µL of Protein Block (vial 1b) to completely cover cell deposition area.
- Incubate 5 minutes (±1 minute).
- DO NOT RINSE.

### Primary Antibody Cocktail

- Tap off excess Protein Block.
- Load the slides into the prepared humidity chamber (filled with water moistened paper towels or gauze).
- Apply 200 µL **ProEx C Ab Cocktail** (vial 2) to completely cover cell deposition area.
- Incubate 30 minutes at room temperature.
- Rinse each slide individually with TBST using a wash bottle (do not focus the flow directly on the cell deposition area). Load slides into a slide rack.
- Rinse slides in TBST, 3 changes, 2 minutes each.

### Detection Chemistry

- Tap off excess buffer.
- Load slides into prepared humidity chamber (filled with water moistened paper towels or gauze).
- Apply 200 µL Mouse Probe Reagent (vial 3a) to completely cover cell deposition area.
- Incubate 20 minutes (±1 minute).
- Rinse slides in TBST, 3 changes, 2 minutes each.
- Tap off excess buffer.
- Load slides into prepared humidity chamber (filled with water moistened paper towels or gauze).
- Apply 200 µL of Polymer Reagent (vial 3b) to cover cell deposition area.
- Incubate for 20 minutes (±1 minute).
- Rinse slides in TBST bath, 3 changes, 2 minutes each.
- Tap off excess buffer.
- Load the slides into the prepared humidity chamber (filled with water moistened paper towels or gauze).
- Apply 200 µL of Substrate-Chromogen solution (DAB) completely cover cell deposition area.
- Incubate for 5 minutes (±1 minute).
- Rinse slides for 5 minutes in deionized H<sub>2</sub>O.

### Counterstain

- Rinse slides in TBST, 1 change for 2 minutes.
- Load slides into prepared humidity chamber (filled with water moistened paper towels or gauze).
- Apply 200 µL of Hematoxylin counterstain (vial 5) to completely cover cell deposition area.
- Incubate for 1 minute (±10 seconds).
- Rinse slides for 3 minutes in running H<sub>2</sub>O.
- Load slides into prepared humidity chamber (filled with water moistened paper towels or gauze).
- Blue slides by applying 200 µL Bluing Agent (vial 6) for 1 minute (±10 seconds).
- Repeat running water rinse for 1 minute.

### Mounting

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

### STORAGE

The storage limit of the **SurePath with ProEx C** Immunocytochemical Test Kit (Antibody and Detection reagents) is up to 12 months from date of manufacture at 2–8 °C.

The storage limit of the **SurePath with ProEx C** Immunocytochemical Test Counterstains (Hematoxylin and Bluing Reagent) is up to 12 months from date of manufacture at 15–30 °C.

Once opened, reagents are stable for thirty (30) days when stored at recommended temperatures. Do not use reagents beyond the expiration date printed on the label.

### QUALITY CONTROL

Variability in results is often derived from differences in specimen handling which deviates from recommended test procedures. Consult the proposed quality control guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute, *Quality Assurance for Immunocytochemistry* for additional information.

**BD SureDetect** SiHa Cell Control is available as a positive control from BD Diagnostics. Each vial contains a cervical cancer cell line, which is processed in a similar manner as the clinical specimens. A universal mouse IgG negative control can be used as a negative control. A positive and negative control slide should be included in each staining procedure. The staining results should be used as an indication of the validity of the staining run.

### INTERPRETATION OF STAINING

**Patient and Control Specimens:** A cytotechnologist or pathologist should evaluate the stained slides using a light microscope. Cells can be reviewed manually or stored in an electronic image gallery derived from a light microscope.

**Control Slides:** The positive and negative control slides should be examined prior to the review of patient specimens to ascertain that all reagents functioned properly. The presence of a brown reaction product (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB) in the nuclei of the SiHa Cell Control slide stained with the **SurePath with ProEx C** Test is indicative of positive reactivity. The universal mouse IgG negative control slide stained with the **SurePath with ProEx C** Test should have no brown staining nuclei and should show staining only from the hematoxylin counterstain.

**Scoring of slides is a 4-step process.**

#### Step 1: Is the specimen adequate?

The Bethesda System (TBS) for Reporting Cervical Cytology (2nd Ed.) states, "An adequate liquid-based preparation should have an estimated minimum of at least 5000 well-visualized/well-preserved squamous cells." The same criteria should be applied to **SurePath with ProEx C** slides. However, as with a routine Pap preparation, any specimen with abnormal cells, which is exhibiting a positive molecular reaction, is, by definition, satisfactory for evaluation. If the answer at this step is "yes," proceed to the next step, if the answer is "no" the result is **Unsatisfactory for Evaluation**.

#### Step 2: Is there moderate to intense brown nuclear staining in epithelial cells?

To answer "yes" to this step look for brown staining that is easily visualized. If just a faint amount, or "blush," of brown is seen this is not enough to warrant a rendering of positive. If no brown nuclear stain is seen, the result is reported as **Negative**. If adequate brown stain is visualized, proceed to the next step.

#### Step 3: Is the cell with nuclear brown staining a squamous or glandular cell?

If the answer is yes, proceed to the next step. If the answer is no, this is a **Negative** test result.

#### Step 4: Is the cell ≥ ASC (atypical squamous cell) or AGC (atypical glandular cell)?

Use the same morphological criteria outlined in The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology (2nd Ed.) to determine if the squamous cell containing the brown nucleus is ≥ ASC (atypical squamous cells). If the cell is considered ≥ASC (or ≥AGC) then this is a **Positive** test result. This includes ASC-US, ASC-H, LSIL, HSIL, and cancer. If the cell is glandular in appearance the TBS criteria for determining if a cell is ≥ AGC (atypical glandular cells) applies. This includes endocervical AGC, endometrial AGC, AIS, and adenocarcinoma. If the cell in question is consistent with NILM (negative for intraepithelial lesion or malignancy) this is a **Negative** test result.

## REFERENCES

1. Wright TC, Schiffman M, Solomon D, Cox JT, Garcia F, Goldie S, Hatch K, Noller KL, Roach N, Runowicz C and Saslow D. Interim Guidance for the Use of Human Papillomavirus DNA Testing as an Adjunct to Cervical Cytology for Screening. *Obstet. Gynecol.* 2004. 102:304-309.
2. 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.
3. Lei M and Tye BK. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM Complex. *J Cell Science* 2001. Vol. 114 (8): 1447-1454.
4. Solomon D, Nayar R. The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology. Definitions, Criteria, and Explanatory Notes. 2nd Edition. 2004.

Technical Information: In the United States contact BD Technical Service and Support at 800-638-8663 or [www.bd.com/ds](http://www.bd.com/ds).



## SurePath with ProEx C Immunocytochemical Test Kit



|            |                                                                |    |
|------------|----------------------------------------------------------------|----|
| REF 490501 | SurePath with ProEx C<br>Immunocytochemical Test Kit           | 75 |
| REF 490500 | SurePath with ProEx C<br>Immunocytochemical Test Counterstains | 75 |

### APPLICATION

Le **SurePath with ProEx C** Immunocytochemical Test (**SurePath** avec test immunocytochimique **ProEx C**) est destiné à l'évaluation qualitative de l'induction de la phase S aberrante dans les échantillons cytologiques cervicaux recueillis dans le **SurePath** Preservative Fluid (Liquide conservateur). Les résultats du test apportent des informations d'appoint aux diagnostics de cytologie cervicale.

### RÉSUMÉ ET EXPLICATION

Les protéines de maintenance des minichromosomes (MCM) jouent un rôle essentiel dans la réplication de l'ADN eucaryote. Toutes les protéines MCM possèdent des motifs ATPase ADN-dépendants dans leurs domaines centraux hautement conservés. Les concentrations des protéines MCM augmentent en général de façon variable tandis que les cellules normales passent de la phase G0 à la phase G1/S du cycle cellulaire. La topoisomérase II alpha (TOP2A) est une enzyme nucléaire essentielle impliquée dans la réplication de l'ADN. Elle constitue la cible de nombreux médicaments anticancéreux utilisés dans le cadre des thérapies anticancéreuses. Une expression diminuée de la TOP2A constitue un mécanisme prédominant de la résistance de plusieurs agents chimiothérapeutiques. Une variation significative de la gamme d'expression de cette protéine a été remarquée au niveau de nombreuses tumeurs. Le TOP2A est prédominant dans les cellules en cours de prolifération et elle est modifiée au cours de la phase M par phosphorylation au niveau de sites spécifiques, qui jouent un rôle critique dans la condensation et la ségrégation des chromosomes mitotiques.

Le **ProEx C** Antibody Cocktail (Mélange d'anticorps) 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 %.

### PRINCIPES DE LA MÉTHODE

Le **SurePath with ProEx C** Immunocytochemical Test kit (**SurePath** avec kit de test immunocytochimique **ProEx C**) contient un mélange d'anticorps, les réactifs de détection et de coloration de contraste, nécessaires à la réalisation d'un protocole de coloration immunocytochimique manuelle ou automatique d'échantillons cervicaux sur couche mince préparés en routine. Après incubation de l'échantillon avec un mélange propriétaire d'anticorps de souris, une liaison sélective avec un anticorps monoclonal, indicative d'un test positif, est visualisée à l'aide d'un système chromogène d'anticorps prêt à l'emploi lié à une enzyme. Le réactif enzymatique est constitué d'un anticorps de chèvre anti-souris secondaire, conjugué à la peroxydase de raifort, fixé sur un squelette en polymère de dextran. L'ajout d'un chromogène spécifique se traduit par la formation d'un produit chromogène visible localisé au niveau des sites de liaison antigène-anticorps. L'échantillon fait alors l'objet d'une coloration de contraste par l'hématoxyline, un agent bleuissant est appliqué sur la lame puis une lamelle est mise en place. Les résultats sont interprétés à l'aide d'un microscope optique. Un résultat positif, indicatif d'une lésion cervicale de grade élevé, est mis en évidence par la coloration en marron du noyau des cellules considérées.

Une galerie de référence comportant des lames potentiellement positives peut être créée à l'aide d'un appareil d'imagerie automatique. La galerie peut être examinée afin de déterminer si un résultat est positif ou négatif.

Le **SurePath** avec test immunocytochimique **ProEx C** est utilisable avec les appareils de coloration manuels et automatiques.

### RÉACTIFS FOURNIS

Les matériels suivants sont inclus dans le kit et permettent de réaliser 75 préparations sur couche mince :

| Flacon n° | Description                                                                                                                                                                                    |            |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 1a        | <b>Bloc de peroxydase</b> : peroxyde d'hydrogène tamponné avec agents de stabilisation et composés propriétaires                                                                               | 2 à 8 °C   |
| 1b        | <b>Bloc de protéines</b> : caséine purifiée avec combinaison propriétaire de protéines dans du PBS modifié avec agent de conservation et surfactant                                            | 2 à 8 °C   |
| 2         | <b>Mélange Ac</b> : mélange d'anticorps monoclonaux prêt à l'emploi dans une solution tamponnée de Tris avec du Tween 20. Contient des protéines de stabilisation et un réactif antimicrobien. | 2 à 8 °C   |
| 3a        | <b>Sonde de souris</b> : se lie à des anticorps monoclonaux de souris                                                                                                                          | 2 à 8 °C   |
| 3b        | <b>Réactif polymère</b> : polymère conjugué à de la peroxydase de raifort qui se lie au Réactif sonde de souris                                                                                | 2 à 8 °C   |
| 4a        | <b>Tampon substrat DAB</b> : tampon substrat utilisé au cours de la préparation du chromogène DAB                                                                                              | 2 à 8 °C   |
| 4b        | <b>DAB</b> : solution chromogène de 3,3'-diaminobenzidine                                                                                                                                      | 2 à 8 °C   |
| 5         | <b>Hématoxyline</b> : hématoxyline de Mayer aqueuse                                                                                                                                            | 15 à 30 °C |
| 6         | <b>Agent bleuissant</b> : solution saline tamponnée de Tris avec Tween 20 et 0,09 % de NaN <sub>3</sub>                                                                                        | 15 à 30 °C |

### MATÉRIELS ET RÉACTIFS REQUIS MAIS NON FOURNIS

- Tampons absorbants
- **BD SureDetect** SiHa Cell Line (Ligne de cellules)
- Eau désionisée ou distillée
- Éthanol (95 % et 100 %)
- Lamelles de verre
- Gants
- Chambre humide
- Microscope optique (objectifs 10x, 20x (en option), 40x)
- Milieu de montage
- Pipettes et embouts de pipettes (capables de distribuer des volumes de 20 µL, 200 µL et 1 000 µL)
- **BD SureDetect** Slide Preparation Buffer 10X (Tampon de préparation des lames) (tampon de prétraitement)
- Bains ou cuves de coloration
- Horloge (capable de mesurer des durées de 1 à 60 minutes)
- Solution saline tamponnée de Tris (TBS)
- Tween 20
- Contrôle négatif universel à base d'IgG de souris
- Agitateur vortex
- Xylène ou substituts du xylène
- Étuve/bain-marie

## AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

**490500 SurePath with ProEx C Immunocytochemical Counterstains (SurePath avec colorations de contraste immunochimiques ProEx C)**

### Attention



**H302** Nocif en cas d'ingestion. **H315** Provoque une irritation cutanée. **H319** Provoque une sévère irritation des yeux.

**P264** Se laver soigneusement après manipulation. **P280** Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. **P301+P312** EN CAS D'INGESTION: Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise. **P302+P352** EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: Laver abondamment à l'eau et au savon. **P305+P351+P338** EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. **P501** Éliminer le contenu/récipient conformément aux règlements locaux/régionaux/nationaux/internationaux.

**490501 SurePath with ProEx C Immunocytochemical Test Kit (SurePath avec kit de test immunocytochimique ProEx C)**

### Danger



**H341** Susceptible d'induire des anomalies génétiques. **H350** Peut provoquer le cancer.

**P281** Utiliser l'équipement de protection individuel requis. **P308+P313** EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée: consulter un médecin. **P405** Garder sous clef. **P501** Éliminer le contenu/récipient conformément aux règlements locaux/régionaux/nationaux/internationaux.

## PRÉCAUTIONS

1. Pour le diagnostic *in vitro*.
2. Les lames **SurePath** préparées doivent être placées dans le tampon de prétraitement dès qu'elles ont été préparées. Les lames doivent demeurer dans le tampon de prétraitement pendant au moins 1 heure, mais pas plus de 72 heures avant le protocole immunocytochimique.
3. Ne laisser les lames sécher à aucun moment au cours du protocole. Les lames qui ont pu sécher pendant le protocole peuvent provoquer une augmentation du bruit de fond.
4. 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.
5. Limiter la contamination microbienne des réactifs pour éviter les colorations non spécifiques.
6. Des durées d'incubation, des températures ou des méthodes autres que celles qui sont spécifiées peuvent conduire à des résultats erronés.
7. Les réactifs ont été dilués pour obtenir des performances optimales. Une dilution supplémentaire est susceptible de se traduire par une perte de coloration des antigènes.
8. Les éléments du kit sont spécifiques à un lot. Ne pas remplacer les éléments d'un kit par d'autres provenant de lots dont les numéros sont différents. Les numéros de lot figurent sur les étiquettes du conditionnement.
9. Ne pas utiliser le **SurePath** avec kit de test immunochimique **ProEx C** après 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.
10. Il n'existe aucun signe évident susceptible de signaler une dégradation de ce produit. Par conséquent, des contrôles négatif et positif doivent être traités de façon simultanée avec les échantillons de patiente. Si une coloration inattendue est observée, qui ne peut pas s'expliquer par des variations dans les protocoles du laboratoire ou si un problème avec le **SurePath** avec kit de test **ProEx C** est suspecté, contacter l'assistance technique de BD.

11. Porter des vêtements de protection appropriés pour éviter le contact avec les yeux et la peau. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (MSDS).
12. Le **SurePath** avec test **ProEx C** est conçu pour être utilisé avec des échantillons cytologiques cervicaux recueillis dans du liquide conservateur **SurePath**. La compatibilité avec les préparations conventionnelles et monocouches autres que le **SurePath** n'a pas été évaluée.

## MODE D'EMPLOI

### Préparation des échantillons

Consulter le manuel de l'opérateur du **BD PrepStain Slide Processor** (Système de traitement des lames) pour obtenir des instructions relatives à la préparation des lames à partir des échantillons cytologiques cervicaux **SurePath** résiduels.

Ajouter 8 mL de liquide conservateur **SurePath** à l'échantillon résiduel dans le flacon **SurePath** (environ 2 mL). L'échantillon dilué doit être traité sur l'appareil **BD PrepMate** à l'aide de la technique standard et sur l'appareil **BD PrepStain**.

Les lames **SurePath** préparées doivent être placées dans le tampon de préparation pour lame **BD SureDetect** 10X dès qu'elles ont été préparées (consulter la notice du tampon de préparation des lames **BD SureDetect** 10X pour obtenir des indications sur la préparation d'une lame de travail). Les lames doivent demeurer dans le tampon pendant au moins 1 heure, mais pas plus de 72 heures avant le procédé immunocytochimique.

Un protocole de restauration de l'épitope doit être utilisé pour obtenir des performances optimales du kit. Cette méthode comporte le trempage des lames préparées dans une solution de travail de tampon de préparation des lames **BD SureDetect** pendant un minimum de 1 heure à température ambiante, suivi d'un chauffage des lames dans le tampon de prétraitement à 95 °C. Les lames sont laissées à 95 °C pendant 15 minutes puis elles refroidissent à température ambiante pendant 20 minutes. Il est recommandé d'utiliser un bain-marie calibré ou une étuveuse capables de maintenir la température nécessaire. Les laboratoires situés en altitude doivent déterminer la meilleure méthode permettant de maintenir la température nécessaire. Le protocole de coloration doit être lancé immédiatement après la restauration de l'épitope et le refroidissement. Les écarts par rapport au protocole décrit sont susceptibles d'affecter défavorablement les résultats.

### Préparation des réactifs

Préparer les réactifs suivants avant la coloration.

- Solution saline tamponnée de Tris avec du Tween 20 à 0,05 % (TBST)
  - Préparer le TBS conformément aux spécifications du fabricant.
  - S'il n'est pas déjà présent dans le TBS, ajouter du Tween 20 pour obtenir une concentration finale de 0,05 %.
- Solution substrat-chromogène (DAB) (volume suffisant pour 5 lames)
  - Transférer 1 mL de tampon substrat DAB (flacon 4a) dans un tube à essai.
  - Ajouter une goutte (20 à 30 µL) de chromogène DAB (flacon 4b). Mélanger soigneusement et appliquer sur les lames avec une pipette.
  - Préparer la solution substrat-chromogène quotidiennement.
  - La qualité de la coloration n'est pas affectée par le précipité qui est susceptible de se développer dans la solution.

## PROTOCOLE DE COLORATION (EFFECTUÉ À TEMPÉRATURE AMBIANTE, 20 À 25 °C)

### Remarques concernant le protocole de coloration

- Lire soigneusement toutes les instructions et se familiariser avec tous les éléments avant l'utilisation (voir Précautions).
- Tous les réactifs doivent s'équilibrer à température ambiante (20 à 25 °C) avant l'immunocoloration.
- Toutes les incubations doivent se dérouler à température ambiante, sauf mention contraire.
- Ne pas laisser sécher les lames au cours du protocole de coloration. Les préparations cellulaires desséchées peuvent présenter une coloration non spécifique accrue. Protéger les lames susceptibles d'être exposées aux courants d'air. Les lames doivent être placées dans une chambre humide pour des incubations prolongées.

### Restauration de l'épitope

- Placer les lames préparées dans une cuve de Coplin contenant la solution de travail de tampon de préparation des lames **BD SureDetect** pendant un minimum de 1 heure et jusqu'à 72 heures.
- Incuber au bain-marie ou à l'étuve pendant 15 minutes à 95 °C.

- Retirer la cuve de Coplin avec les lames du bain-marie ou de l'étuve et laisser les lames refroidir dans le tampon pendant 20 minutes.
- Rincer les lames avec de l'H<sub>2</sub>O désionisée et les transférer dans une cuve de Coplin propre contenant du TBST.

#### Réactif de blocage

- Tapoter pour éliminer l'excès de tampon.
- Charger les lames dans une chambre humide préparée (remplie de serviettes en papier ou de tampons de gaze imprégnés d'eau).
- Appliquer 200 µL de réactif de blocage de la peroxydase (flacon 1a) pour couvrir la zone de dépôt des cellules.
- Incuber pendant 5 minutes (±1 minute).
- Rincer les lames dans du TBST, à 3 reprises, 2 minutes chacune.

#### Bloc de protéines

- Tapoter pour éliminer l'excès de tampon.
- Charger les lames dans la chambre humide préparée (remplie de serviettes en papier ou de tampons de gaze imprégnés d'eau).
- Appliquer 200 µL de bloc de protéines (flacon 1b) pour couvrir la zone de dépôt des cellules.
- Incuber pendant 5 minutes (±1 minute).
- NE PAS RINCER.

#### Mélange d'anticorps primaires

- Tapoter pour éliminer l'excès de bloc de protéines.
- Charger les lames dans la chambre humide préparée (remplie de serviettes en papier ou de tampons de gaze imprégnés d'eau).
- Appliquer 200 µL de mélange Ac **ProEx C** (flacon 2) pour couvrir la zone de dépôt des cellules.
- Incuber pendant 30 minutes à température ambiante.
- Rincer chaque lame individuellement dans le TBST à l'aide d'un flacon pissette (ne pas diriger le jet directement sur la zone de dépôt des cellules). Charger les lames sur un portoir de lames.
- Rincer les lames dans du TBST, à 3 reprises, 2 minutes chacune.

#### Chimie de détection

- Tapoter pour éliminer l'excès de tampon.
- Charger les lames dans une chambre humide préparée (remplie de serviettes en papier ou de tampons de gaze imprégnés d'eau).
- Appliquer 200 µL de réactif Sonde de souris (flacon 3a) pour couvrir la zone de dépôt des cellules.
- Incuber pendant 20 minutes (±1 minute).
- Rincer les lames dans du TBST, à 3 reprises, 2 minutes chacune.
- Tapoter pour éliminer l'excès de tampon.
- Charger les lames dans une chambre humide préparée (remplie de serviettes en papier ou de tampons de gaze imprégnés d'eau).
- Appliquer 200 µL de réactif polymère (flacon 3b) pour couvrir la zone de dépôt des cellules.
- Incuber pendant 20 minutes (±1 minute).
- Rincer les lames dans un bain de TBST, à 3 reprises, 2 minutes chacune.
- Tapoter pour éliminer l'excès de tampon.
- Charger les lames dans la chambre humide préparée (remplie de serviettes en papier ou de tampons de gaze imprégnés d'eau).
- Appliquer 200 µL de solution substrat-chromogène (DAB) pour couvrir complètement la zone de dépôt des cellules.
- Incuber pendant 5 minutes (±1 minute).
- Rincer les lames pendant 5 minutes dans l'H<sub>2</sub>O désionisée.

#### Coloration de contraste

- Rincer les lames à 1 reprise dans du TBST pendant 2 minutes.
- Charger les lames dans une chambre humide préparée (remplie de serviettes en papier ou de tampons de gaze imprégnés d'eau).
- Appliquer 200 µL du colorant de contraste à l'hématoxyline (flacon 5) pour couvrir complètement la zone de dépôt des cellules.
- Incuber pendant 1 minute (±10 secondes).
- Rincer les lames pendant 3 minutes sous l'H<sub>2</sub>O courante.
- Charger les lames dans une chambre humide préparée (remplie de serviettes en papier ou de tampons de gaze imprégnés d'eau).
- Bleuir les lames en appliquant 200 µL d'agent bleuissant (flacon 6) pendant 1 minute (±10 secondes).

- Répéter le rinçage à l'eau courante pendant 1 minute.

#### Montage

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

#### CONSERVATION

La limite de conservation du **SurePath** avec le kit de test immunocytochimique **ProEx C** (anticorps et réactifs de détection) atteint jusqu'à 12 mois à compter de la date de fabrication, à une température de 2 à 8 °C.

La limite de conservation du **SurePath** avec les colorations de contraste immunocytochimiques **ProEx C** (hématoxyline et réactif bleuissant) atteint jusqu'à 12 mois à compter de la date de fabrication, à une température de 15 à 30 °C.

Une fois ouverts, les réactifs sont stables pendant trente (30) jours s'ils sont conservés à la température recommandée. Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption figurant sur l'étiquette.

#### CONTRÔLE DE QUALITÉ

La variabilité des résultats provient souvent de différences de manipulations des échantillons qui s'écartent des modes opératoires du test recommandés. Pour plus d'informations, consulter les directives de contrôle de qualité du Clinical and Laboratory Standards Institute, *Quality Assurance for Immunocytochemistry*.

Le **BD SureDetect** SiHa Cell Control (Contrôle des cellules SiHa) est disponible sous forme de contrôle positif auprès de BD Diagnostics. Chaque flacon contient une ligne de cellules de cancer du col de l'utérus, qui est traitée de la même manière que les échantillons cliniques. Un contrôle négatif universel constitué d'IgG de souris peut être utilisé en tant que contrôle négatif. Une lame de contrôle positive et négative doit être incluse dans tous les protocoles de coloration. Les résultats de la coloration doivent être utilisés en tant qu'indication de la validité du protocole de coloration.

#### INTERPRÉTATION DE LA COLORATION

**Échantillons de patiente et de contrôle** : un cytologiste ou un pathologiste doit évaluer les lames colorées à l'aide d'un microscope optique. Les cellules peuvent être examinées manuellement ou conservées dans une galerie d'images électroniques provenant d'un microscope optique.

**Lames de contrôle** : les lames de contrôle positive et négative doivent être examinées avant les échantillons de patiente pour s'assurer que tous les réactifs ont fonctionné correctement. La présence d'un produit de réaction marron (tétrahydrochlorure de 3,3'-diaminobenzidine, DAB) dans les noyaux des cellules de contrôle SiHa colorées avec le **SurePath** avec le test **ProEx C** est indicative d'une réactivité positive. La lame de contrôle négatif universel constitué d'IgG de souris colorée avec le **SurePath** avec le test **ProEx C** ne doit pas présenter de noyaux colorés en marron et ne doit présenter comme coloration que celle provenant de la coloration de contraste par l'hématoxyline.

#### Score des lames à l'aide d'un processus en 4 étapes.

##### Étape 1 : L'échantillon est-il adéquat ?

Le Système Bethesda (TBS) de rapport cytologique cervical (2nd Ed.) précise que « une préparation liquide adéquate doit présenter au minimum 5 000 cellules malpighiennes bien visualisées/bien conservées ». Le même critère doit être appliqué aux lames **SurePath** avec **ProEx C**. Cependant, comme dans le cas des préparations Pap de routine, tout échantillon présentant des cellules anormales, c'est-à-dire qui montre une réaction moléculaire positive, est par définition satisfaisant pour l'évaluation. Si la réponse lors de cette étape est « oui », passer à l'étape suivante, si la réponse est « non », le résultat est **Non satisfaisant pour l'évaluation**.

##### Étape 2 : Existe-t-il une coloration nucléaire marron modérée à intense dans les cellules épithéliales ?

Pour répondre « oui » à cette étape, rechercher une coloration marron facilement observée. Si la coloration marron n'est présente qu'à l'état de trace ou « d'ombre », cela n'est pas suffisant pour rendre un résultat positif. Si aucune coloration nucléaire marron n'est observée, le résultat du test est **Négatif**. Si une coloration marron adéquate est observée, passer à l'étape suivante.

**Étape 3 : Est-ce que la cellule qui présente une coloration nucléaire marron est une cellule épithéliale malpighienne ou une cellule glandulaire ?**

Si la réponse est « oui », passer à l'étape suivante. Si la réponse est « non », le résultat du test est **Négatif**.

**Étape 4 : Est-ce que la cellule est  $\geq$  ASC (cellule malpighienne atypique) ou AGC (cellule glandulaire atypique) ?**

Utiliser les mêmes critères morphologiques que ceux du système Bethesda (TBS) de rapport cytologique cervical (2nd Ed.) pour déterminer si la cellule malpighienne contenant le noyau marron est  $\geq$  ASC (cellule malpighienne atypique). Si la cellule est considérée comme  $\geq$  ASC (ou  $\geq$  AGC), le résultat du test est alors **Positif**. Ceci inclut les cellules ASC-US, ASC-H, LSIL, HSIL et les cas de cancer. Si la cellule est d'apparence glandulaire, les critères du TBS permettant de déterminer qu'une cellule est  $\geq$  AGC (cellule glandulaire atypique) s'appliquent. Ceci inclut les cellules AGC endocervicales, AGC endométriales, AIS et les adénocarcinomes. Si la cellule en question est cohérente avec le NILM (négative pour les lésions intra-épithéliales ou les atteintes malignes), le résultat du test est **Négatif**.

**BIBLIOGRAPHIE** : voir la rubrique "References" du texte anglais.

Service et assistance technique de BD Diagnostics : contacter votre représentant local de BD ou consulter le site [www.bd.com/ds](http://www.bd.com/ds).

# SurePath with ProEx C Immunocytochemical Test Kit



|            |                                                             |    |
|------------|-------------------------------------------------------------|----|
| REF 490501 | SurePath with ProEx C Immunocytochemical Test Kit           | 75 |
| REF 490500 | SurePath with ProEx C Immunocytochemical Test Counterstains | 75 |

## VERWENDUNGSZWECK

**SurePath mit ProEx C Immunocytochemical Test** (Konservierungslösung mit immunzytochemischem Test) dient bestimmungsgemäß zum qualitativen Nachweis einer abweichenden S-Phasen-Induktion in zervikalen, in **SurePath Preservative Fluid** (Konservierungslösung) gesammelten Zytologieproben. Die Testergebnisse liefern begleitende Daten für die zytologische Zervixdiagnostik.

## ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Bei der eukaryoten DNA-Replikation spielen die MCM-Proteine (minichromosome maintenance proteins) eine wichtige Rolle. Jedes MCM-Protein weist in seiner hochkonservierten zentralen Domäne DNA-abhängige ATPase-Motive auf. Normalerweise steigen die Konzentrationen des MCM-Proteins beim Übergang normaler Zellen aus der G0- in die G1/S-Phase des Zellzyklus unterschiedlich stark an. Topoisomerase II alpha (TOP2A) ist ein wichtiges, an der DNA-Replikation beteiligtes nukleäres Enzym und das Zielprotein vieler gängiger Krebstherapeutika. Bei Resistenz gegen diverse chemotherapeutische Wirkstoffe ist Expression von TOP2A zumeist vermindert. Auffällige Abweichungen der Expression dieses Proteins wurden bei vielen verschiedenen Tumoren beobachtet. TOP2A wird überwiegend in proliferativen Zellen exprimiert und in der M-Phase durch Phosphorylierung an bestimmten Stellen modifiziert; diese Modifikationen sind wesentlich für die mitotische Chromosomenkondensation und -segregation.

Der **ProEx C** Antikörper Cocktail (Antikörper-Cocktail) enthält gereinigtes, mit gepufferter Kochsalzlösung verdünntes monoklonales Anti-MCM2 und Anti-TOP2A (Maus) aus Gewebekulturüberstand sowie Proteinstabilisatoren und 0,09 % Natriumazid.

## VERFAHRENSPRINZIP

Das **Sure Path with ProEx C Immunocytochemical Test kit** (immunzytochemisches **SurePath mit ProEx C** Testkit) enthält neben einem Antikörper-Cocktail alle für manuelle oder automatische immunzytochemische Drei-Schritt-Färbeverfahren an routinemäßig verarbeiteten Dünnschicht-Zervixproben erforderlichen Nachweis- und Gegenfärbungsreagenzien. Nach Inkubation der Probe mit einem geschützten Antikörper-Cocktail (Maus) wird die ein positives Testergebnis anzeigende selektive Bindung an den monoklonalen Antikörper durch ein einzigartiges, gebrauchsfertiges enzymgebundenes Antikörper-Chromogen-System dargestellt. Bei dem Enzymreagenz handelt es sich um ein sekundäres, an einen Dextranpolymer-Backbone gekoppeltes Anti-Maus-Meerrettichperoxidase-Konjugat (Ziege). Der Zusatz eines spezifischen Chromogens führt zur Bildung eines sichtbaren chromogenen Reaktionsprodukts an den Antigen-Antikörper-Bindungsstellen. Anschließend wird die Probe mit Hämatoxylin gegengefärbt, ein Bläuungsmittel zugegeben und der Objektträger mit einem Deckglas versehen. Die Ergebnisse werden mit einem Lichtmikroskop ausgewertet. Ein positives Ergebnis liegt bei einer Braunfärbung des Zellkerns der untersuchten Zellen vor und zeigt eine hochgradige Zervixerkrankung an.

Mittels automatischer bildgebender Geräte kann eine Referenzkartei potenziell positiver Objektträger erstellt werden. Diese kann bei der Entscheidung, ob ein positives oder negatives Ergebnis vorliegt, herangezogen werden.

Der **SurePath with ProEx C Immunocytochemical Test** eignet sich für manuelle und automatische Färbeverfahren.

## MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Im Lieferumfang enthalten sind folgende, für 75 Dünnschicht-Präparate ausreichende Materialien:

| Gefäß Nr. | Description (Beschreibung)                                                                                                                                                         |          |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| 1a        | <b>Peroxidasehemmer:</b> Gepuffertes Wasserstoffperoxid, enthält einen Stabilisator und geschützte Komponenten                                                                     | 2–8 °C   |
| 1b        | <b>Proteinhemmer:</b> Gereinigtes Kasein plus eine geschützte Proteinkombination in modifizierter PBS mit Konservierungsmittel und oberflächenaktiver Substanz                     | 2–8 °C   |
| 2         | <b>Ak-Cocktail:</b> Gebrauchsfertiger Cocktail aus monoklonalen Antikörpern in Tris-gepufferter Lösung mit Tween 20. Enthält Stabilisierungsproteine und antimikrobielles Reagenz. | 2–8 °C   |
| 3a        | <b>Maus-Sonde.</b> Bindet sich an monoklonale Mausantikörper                                                                                                                       | 2–8 °C   |
| 3b        | <b>Polymerreagenz:</b> Mit Meerrettichperoxidase konjugiertes Polymer, bindet sich an Sondenreagenz (Maus)                                                                         | 2–8 °C   |
| 4a        | <b>DAB Substratpuffer:</b> Substratpuffer zum Ansetzen des DAB-Chromogens                                                                                                          | 2–8 °C   |
| 4b        | <b>DAB:</b> 3,3'-Diaminobenzidin-Chromogenlösung                                                                                                                                   | 2–8 °C   |
| 5         | <b>Hämatoxylin:</b> Hämatoxylin nach Mayer auf wässriger Basis                                                                                                                     | 15–30 °C |
| 6         | <b>Bläuungsmittel:</b> Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20 und 0,09 % NaN <sub>3</sub>                                                                                     | 15–30 °C |

## BENÖTIGTES MATERIAL UND REAGENZIEN (NICHT IM LIEFERUMFANG)

- Absorbierende Tücher
- BD SureDetect** SiHa Cell Line (SiHa-Zelllinie)
- Entionisiertes oder destilliertes Wasser
- Ethanol (95 % und 100 %)
- Glas-Deckgläser
- Handschuhe
- Feuchtigkeitskammer
- Lichtmikroskop (Vergrößerung 10x, 20x [optional], 40x)
- Eindeckmittel
- Pipetten und Pipettenspitzen (geeignet für die Abgabe von Volumina von 20 µL, 200 µL und 1000 µL)
- BD SureDetect** Slide Preparation Buffer (Puffer zur Objektträgerpräparation) 10X (Vorbereitungspuffer)
- Färbeschalen oder -bäder
- Stoppuhr (1–60 Minuten)
- Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS, Tris Buffered Saline)
- Tween 20
- Universelle Maus-IgG Negativkontrolle
- Vortexer
- Xylol oder Xylol-Ersatz
- Dampfkocher/Wasserbad

## WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

**490500 SurePath with ProEx C Immunocytochemical Counterstains**  
(immunzytochemische SurePath mit ProEx C Gegenfärbungen)

### Achtung



**H302** Gesundheitsschädlich bei Verschlucken. **H315** Verursacht Hautreizungen. **H319** Verursacht schwere Augenreizung.

**P264** Nach Gebrauch gründlich waschen. **P280** Schutzhandschuhe/ Schutzbekleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. **P301+P312** BEI VERSCHLUCKEN: Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen. **P302+P352** BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen. **P305+P351+P338** BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. **P501** Inhalt/ Behälter gemäß den örtlichen/regionalen/nationalen/internationalen Bestimmungen entsorgen.

**490501 SurePath with ProEx C Immunocytochemical Test Kit**  
(immunzytochemisches SurePath mit ProEx C Testkit)

### Gefahr



**H341** Kann vermutlich genetische Defekte verursachen. **H350** Kann Krebs erzeugen.

**P281** Vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung verwenden. **P308+P313** BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ ärztliche Hilfe hinzuziehen. **P405** Unter Verschluss aufbewahren. **P501** Inhalt/Behälter gemäß den örtlichen/regionalen/nationalen/internationalen Bestimmungen entsorgen.

## SICHERHEITSHINWEISE

1. Zur *In-vitro*-Diagnostik.
2. Präparierte **SurePath**-Objektträger sofort nach dem Präparieren in den Vorbehandlungspuffer einlegen. Die Objektträger vor immunzytochemischen Färbungen mindestens eine Stunde, aber höchstens 72 Stunden im Vorbehandlungspuffer belassen.
3. Die Objektträger dürfen während des gesamten Verfahrens niemals austrocknen. Bei Objektträgern, die während des Verfahrens ausgetrocknet sind, kann eine erhöhte Hintergrundfärbung auftreten.
4. 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. Falls es zu einem Kontakt der Reagenzien mit empfindlichen Bereichen gekommen ist, mit reichlich Wasser abspülen.
5. Mikrobielle Kontamination von Reagenzien minimieren, um unspezifische Färbung zu vermeiden.
6. Von den Angaben abweichende Inkubationszeiten, -temperaturen oder -methoden können zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
7. Die Reagenzien wurden für eine optimale Leistung verdünnt. Eine weitere Verdünnung kann den Verlust der Antigenfärbung zur Folge haben.
8. Kitkomponenten sind chargenspezifisch und dürfen nicht durch Kitkomponenten mit anderen Herstellungschargennummern ausgetauscht werden. Die Chargennummern befinden sich auf den Verpackungsetiketten.
9. Das **SurePath with ProEx C Test kit** nach Ablauf des auf der Verpackung aufgedruckten Verfalldatums nicht mehr verwenden. Werden Reagenzien unter anderen als in der Verpackungsbeilage angegebenen Bedingungen aufbewahrt, müssen diese vom Anwender validiert werden.
10. Es gibt keine sichtbaren Anzeichen für eine eventuelle Produktinstabilität. Daher sollten parallel zu den Patientenproben jeweils Positiv- und Negativkontrollen getestet werden. Falls es zu einer unerwarteten Färbung kommt, die sich nicht durch Unterschiede bei Laborverfahren erklären lässt und auf ein Problem mit dem **SurePath with ProEx C Test kit** hindeutet, ist der technische Kundendienst von BD zu verständigen.

11. Geeignete Schutzausrüstung tragen, um Kontakt des Reagenzes mit Haut und Augen zu vermeiden. Weitere Hinweise sind dem Material Sicherheitsdatenblatt (MSDS) zu entnehmen.
12. Der **SurePath with ProEx C Test** ist für die Färbung in **SurePath Preservative Fluid** gesammelter zervikaler Zytologieproben bestimmt. Die Kompatibilität mit anderen konventionellen oder Einschicht-Präparaten wurde noch nicht untersucht.

## GEBRAUCHSANWEISUNG

### Präparation der Proben

Anweisungen zum Präparieren von Objektträgern mit verbliebenem **SurePath** Zervix-Zytologieprobenmaterial dem Benutzerhandbuch für den **BD PrepStain Slide Processor** (Objektträger-Prozessor) entnehmen.

Zu der im **SurePath** Gefäß verbliebenen Probe (etwa 2 mL) 8 mL **SurePath Preservative Fluid** geben. Die verdünnte Probe mit der Standardtechnik auf dem **BD PrepMate**-Instrument sowie auf dem **BD PrepStain**-Instrument verarbeiten.

Präparierte **SurePath**-Objektträger unmittelbar nach dem Präparieren in den **BD SureDetect Slide Preparation Buffer 10X** einlegen (Hinweise zum Ansetzen einer Objektträger-Arbeitslösung der Packungsbeilage des **BD SureDetect Slide Preparation Buffer** entnehmen). Vor immunzytochemischen Verfahren müssen die Objektträger mindestens eine Stunde, aber höchstens 72 Stunden im Puffer verbleiben.

Für eine optimale Kitleistung ist eine Epitopdemaskierung zwingend erforderlich. Dieses Verfahren umfasst das mindestens 1-stündige Eintauchen der präparierten Objektträger in eine Arbeitslösung aus **BD SureDetect Slide Preparation Buffer** bei Raumtemperatur, gefolgt von einer Erhitzung der Objektträger in Vorbehandlungspuffer auf 95 °C. Die Temperatur der Objektträger wird 15 Minuten auf 95 °C gehalten, dann folgt eine 20-minütige Abkühlung bei Raumtemperatur. Empfohlen wird die Verwendung eines kalibrierten Wasserbads oder Dampfkochers, der imstande ist, die geforderte Temperatur beizubehalten. Labors in größeren Höhenlagen sollten die beste Methode, die geforderte Temperatur beizubehalten, selbst ermitteln. Das Färbeverfahren sollte unmittelbar im Anschluss an die Demaskierung und Abkühlung erfolgen. Abweichungen vom beschriebenen Vorgehen können die Ergebnisse beeinträchtigen.

### Ansetzen der Reagenzien

Folgende Reagenzien vor der Färbung ansetzen.

- Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit 0,05 % Tween 20 (TBST)
  - TBS gemäß den Anweisungen des Herstellers ansetzen.
  - Falls im TBS noch nicht vorhanden, Tween 20 bis zu einer Endkonzentration von 0,05 % zusetzen.
- Substratchromogenlösung (DAB) (Volumen für 5 Objektträger)
  - 1 mL DAB Substratpuffer (Gefäß 4a) in ein Teströhrchen geben.
  - Einen Tropfen (20–30 µL) DAB Chromogen (Gefäß 4b) zugeben. Gründlich mischen und mit einer Pipette auf die Objektträger aufbringen.
  - Substratchromogenlösung täglich frisch ansetzen.
  - Ein in der Lösung eventuell auftretendes Präzipitat beeinträchtigt die Färbung nicht.

## FÄRBEPROTOKOLL

(BEI RAUMTEMPERATUR DURCHFÜHREN, 20–25 °C)

### Verfahrenshinweise zu Färbung

- Anwender sollten vor der Verwendung diese Anweisungen sorgfältig lesen und sich mit allen Komponenten vertraut machen (siehe Vorsichtsmaßnahmen).
- Alle Reagenzien vor der Immunfärbung Raumtemperatur (20–25 °C) annehmen lassen.
- Sofern nicht anders angegeben, alle Inkubationen ebenfalls bei Raumtemperatur durchführen.
- Die Objektträger während des Färbeverfahrens nicht austrocknen lassen. Eintrocknete Zellpräparate können eine erhöhte unspezifische Färbung aufweisen. Objektträger vor Zugluft schützen. Bei längeren Inkubationen die Objektträger in eine Feuchtigkeitskammer stellen.

### Epitopdemaskierung

- Die präparierten Objektträger für mindestens eine Stunde, aber höchstens 72 Stunden, in eine Coplin-Küvette stellen, die eine Arbeitslösung aus **BD SureDetect Slide Preparation Buffer** enthält.
- In einem Wasserbad oder Dampfkocher mindestens 15 Minuten bei 95 °C inkubieren.

- Die Coplin-Küvette mit den Objektträgern aus dem Wasserbad bzw. Dampfkocher nehmen und Objektträger 20 Minuten in Puffer abkühlen lassen.
- Objektträger mit entionisiertem H<sub>2</sub>O spülen und in eine saubere Coplin-Küvette mit TBST geben.

#### Blockierungsreagenz

- Überschüssigen Puffer abklopfen.
- Objektträger in eine vorbereitete Feuchtigkeitskammer stellen, die mit Wasser angefeuchtete Papiertücher oder Gaze enthält.
- 200 µL Peroxidasehemmer-Reagenz (Gefäß 1a) zugeben, um den Zellablagerungsbereich zu bedecken.
- 5 Minuten (±1 Minute) inkubieren.
- Objektträger viermal jeweils 2 Minuten in frischem TBST spülen.

#### Proteinhemmer

- Überschüssigen Puffer abklopfen.
- Objektträger in eine vorbereitete Feuchtigkeitskammer stellen, die mit Wasser angefeuchtete Papiertücher oder Gaze enthält.
- 200 µL Protein-Blockierungsreagenz (Gefäß 1b) zugeben, um den Zellablagerungsbereich vollständig zu bedecken.
- 5 Minuten (±1 Minute) inkubieren.
- NICHT SPÜLEN.

#### Cocktail Primärer Antikörper

- Überschüssigen Proteinhemmer abklopfen.
- Objektträger in eine vorbereitete Feuchtigkeitskammer stellen, die mit Wasser angefeuchtete Papiertücher oder Gaze enthält.
- 200 µL **ProEx C** Ak-Cocktail (Gefäß 2) zugeben, um den Zellablagerungsbereich vollständig zu bedecken.
- 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
- Jeden Objektträger einzeln mit TBST aus einer Waschflasche spülen (den Strahl nicht direkt auf den Zellablagerungsbereich richten). Objektträger auf ein Objektträgergestell stellen.
- Objektträger viermal jeweils 2 Minuten in frischem TBST spülen.

#### Chemischer Nachweis

- Überschüssigen Puffer abklopfen.
- Objektträger in eine vorbereitete Feuchtigkeitskammer stellen, die mit Wasser angefeuchtete Papiertücher oder Gaze enthält.
- 200 µL Maus-Sondenreagenz (Gefäß 3a) zugeben, um den Zellablagerungsbereich vollständig zu bedecken.
- 20 Minuten (±1 Minute) inkubieren.
- Objektträger viermal jeweils 2 Minuten in frischem TBST spülen.
- Überschüssigen Puffer abklopfen.
- Objektträger in eine vorbereitete Feuchtigkeitskammer stellen, die mit Wasser angefeuchtete Papiertücher oder Gaze enthält.
- 200 µL Polymerreagenz (Gefäß 3b) zugeben, um den Zellablagerungsbereich zu bedecken.
- 20 Minuten (±1 Minute) inkubieren.
- Objektträger viermal jeweils 2 Minuten in einem frischen TBST-Bad spülen.
- Überschüssigen Puffer abklopfen.
- Objektträger in eine vorbereitete Feuchtigkeitskammer stellen, die mit Wasser angefeuchtete Papiertücher oder Gaze enthält.
- 200 µL Substratchromogenlösung (DAB) zugeben, um den Zellablagerungsbereich vollständig zu bedecken.
- 5 Minuten (±1 Minute) inkubieren.
- Objektträger 5 Minuten in entionisiertem H<sub>2</sub>O spülen.

#### Gegenfärbung

- Objektträger zweimal jeweils 2 Minuten in frischem TBST spülen.
- Objektträger in eine vorbereitete Feuchtigkeitskammer stellen, die mit Wasser angefeuchtete Papiertücher oder Gaze enthält.
- 200 µL Hämatoxylin-Gegenfärbung (Gefäß 5) zugeben, um den Zellablagerungsbereich vollständig zu bedecken.
- 1 Minute (±10 Sekunden) inkubieren.
- Objektträger 3 Minuten unter fließendem H<sub>2</sub>O spülen.
- Objektträger in eine vorbereitete Feuchtigkeitskammer stellen, die mit Wasser angefeuchtete Papiertücher oder Gaze enthält.

- Objektträger durch Zusatz von 200 µL Bläuingmittel (Gefäß 6) eine (1) Minute (±10 Sekunden) bläuen.
- Erneut 1 Minute unter fließendem Wasser spülen.

#### Fixieren

- Objektträger in 95%iges Ethanol eintauchen (1 Minute bzw. 25 Mal).
- Objektträger in reinen Alkohol eintauchen (4 Wechsel, je 1 Minute bzw. 25 Mal).
- Mit Xylol klarspülen (3 Wechsel, je 1 Minute bzw. 25 Mal).
- Objektträger mit nicht-wässrigem, permanentem Fixiermittel und Deckgläsern abdecken.

#### LAGERUNG

**SurePath with ProEx C** Immunohistochemical Test Kit (Antikörper- und Nachweisreagenzien) kann bis zu 12 Monate nach dem Herstellungsdatum bei 2–8 °C gelagert werden.

**SurePath with ProEx C** Immunohistochemical Counterstains (Hämatoxylin- und Bläuingreagenz) kann bis zu 12 Monate nach dem Herstellungsdatum bei 15–30 °C gelagert werden.

Nach dem Öffnen sind Reagenzien dreißig (30) Tage stabil, wenn die empfohlenen Lagertemperaturen eingehalten werden. Die Reagenzien nach dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfallsdatum nicht mehr verwenden.

#### QUALITÄTSKONTROLLE

Schwankungen der Ergebnisse ergeben sich häufig aus einer Probenhandhabung, die von den empfohlenen Testverfahren abweicht. Weitere Angaben bitte den Empfehlungen zur Qualitätskontrolle des Clinical and Laboratory Standards Institute, *Quality Assurance for Immunocytochemistry* entnehmen.

**BD SureDetect** SiHa Cell Control ist als positive Kontrolle über BD Diagnostics erhältlich. Jedes Gefäß enthält eine Zervixkarzinom-Zelllinie, die analog zu den klinischen Proben verarbeitet wurde. Als Negativkontrolle eignet sich eine universelle Maus-IgG-Negativkontrolle. Bei jedem Färbeverfahren sollte je ein Objektträger mit einer Positiv- und Negativkontrolle mitgeführt werden. Die Färbungsergebnisse validieren den Färbedurchlauf.

#### AUSWERTUNG DER FÄRBUNG

**Patienten- und Kontrollproben:** Die gefärbten Objektträger sind durch einen Zytotechniker oder Pathologen mit einem Lichtmikroskop auszuwerten. Die Zellen können manuell überprüft oder in einer mit einem Lichtmikroskop generierten elektronischen Referenz-Bildkartei abgespeichert werden.

**Kontrollobjektträger:** Zur Bestätigung des korrekten Funktionierens aller Reagenzien die Positiv- bzw. Negativkontrolle vor den Patientenproben auswerten. Ein braunes Reaktionsendprodukt (3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid, DAB) in den Zellkernen der mit dem **SurePath with ProEx C** Test gefärbten SiHa-Zellkontrolllinien zeigt die positive Reaktivität an. Der mit **SurePath with ProEx C** Test gefärbte Objektträger mit der universellen Maus-IgG-Negativkontrolle darf keine Braunfärbung der Zellkerne, sondern allenfalls eine Färbung durch die Hämatoxylin-Gegenfärbung aufweisen.

**Die Auswertung der Objektträger ist ein Prozess in vier Schritten.**

##### Schritt 1: Ist die Probe geeignet?

Laut dem Bethesda System (TBS) for Reporting Cervical Cytology (2nd Ed.) sollte „ein geeignetes Flüssigkeitszytologie-Präparat mindestens etwa 5000 gut dargestellte/gut erhaltene Plattenepithelzellen aufweisen.“ Dieses Kriterium ist auch auf die Objektträger beim **SurePath with ProEx C**-Verfahren anzuwenden. Allerdings eignet sich, wie bei routinemäßigen Pap-Abstrichen, für die Auswertung per definitionem jede abnormale Zellen aufweisende Probe, bei der eine positive molekulare Reaktion auftritt. Kann die Frage bei diesem Schritt mit „Ja“ beantwortet werden, mit dem nächsten Schritt fortfahren; bei „Nein“ ist **das Ergebnis nicht für eine Auswertung geeignet**.

##### Schritt 2: Weisen die Epithelzellen eine mäßige bis intensive nukleäre Braunfärbung auf?

Um diese Frage mit „Ja“ beantworten zu können, nach einer leicht sichtbaren Braunfärbung Ausschau halten. Nur eine leichte Tönung, also ein „Hauch“ von Braun, reicht nicht aus, um das Ergebnis als positiv zu bewerten. Tritt keine nukleäre Braunfärbung auf, ist das Ergebnis **negativ**. Falls eine angemessene Braunfärbung darstellbar ist, mit dem nächsten Schritt fortfahren.

##### Schritt 3: Handelt es sich bei der Zelle, die die nukleäre Braunfärbung aufweist, um eine Zelle des Plattenepithels oder eine Drüsenzelle?

Kann diese Frage bejaht werden, mit dem nächsten Schritt fortfahren. Bei „Nein“ ist das Testergebnis **negativ**.

**Schritt 4: Handelt es sich bei der Zelle um eine  $\geq$  ASC (atypical squamous cell, atypische Plattenepithelzelle) oder eine AGC (atypical glandular cell, atypische Drüsenzelle)?**

Die im Bethesda System for Reporting Cervical Cytology (2nd Ed.) angegebenen morphologischen Kriterien zugrundelegen, um zu ermitteln, ob es sich bei der den einen braunen Zellkern aufweisenden Plattenepithelzellen um  $\geq$  ASC (atypische Plattenepithelzellen) handelt. Kann die Zelle als  $\geq$  ASC (oder  $\geq$  AGC) klassifiziert werden, ist das Testergebnis **positiv**. Diese Zelltypen schließen ASCUS, ASC-H, LSIL, HSIL und Krebs ein. Weist die Zelle ein eher glanduläres Erscheinungsbild auf, sind die TBS-Kriterien für die Definition von  $\geq$  AGC (atypischen Drüsenzellen) anzuwenden. Diese umfassen endozervikales AGC, endometrales AGC, AIS und Adenokarzinom. Ein **negatives** Testergebnis liegt auch dann vor, wenn NILM (negative for intraepithelial lesion or malignancy, keine intraepitheliale Läsion oder Malignität) auf die fragliche Zelle zutrifft.

**LITERATUR:** S. "References" im englischen Text.

BD Diagnostics Technischer Kundendienst: setzen Sie sich mit Ihrer zuständigen BD-Vertretung oder [www.bd.com/ds](http://www.bd.com/ds).



## SurePath with ProEx C Immunocytochemical Test Kit



|            |                                                                |    |
|------------|----------------------------------------------------------------|----|
| REF 490501 | SurePath with ProEx C<br>Immunocytochemical Test Kit           | 75 |
| REF 490500 | SurePath with ProEx C<br>Immunocytochemical Test Counterstains | 75 |

### USO PREVISTO

Il **SurePath with ProEx C** Immunocytochemical Test (Test immunocitochimico **SurePath con ProEx C**) è destinato alla valutazione qualitativa dell'induzione della fase S aberrante in campioni citologici cervicali raccolti nel **SurePath Preservative Fluid** (Conservante **SurePath**). I risultati del test forniscono ulteriori informazioni per la diagnosi citologica cervicale.

### SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Le proteine di mantenimento del minicromosoma (MCM) rivestono un ruolo importante nella replicazione del DNA eucariotico. Ciascuna proteina MCM presenta elementi di ATPasi, DNA dipendenti, nel proprio dominio centrale altamente conservato. I livelli di proteine MCM aumentano generalmente in modo variabile mentre le cellule normali progrediscono da G0 alla fase G1/S del ciclo cellulare. La topoisomerasi 2 alfa (TOP2A) è un enzima nucleare essenziale coinvolto nella replicazione del DNA e rappresenta il bersaglio di numerosi farmaci anti-tumorali utilizzati nella terapia oncologica. La diminuzione di espressione di TOP2A indica un meccanismo predominante di resistenza a diversi agenti chemioterapici. Una variazione significativa nella gamma di espressione di questa proteina è stata osservata in diversi tumori. L'enzima TOP2A è predominante nelle cellule proliferanti e viene modificato nella fase M tramite fosforilazione in siti specifici, il che è importante per la condensazione e la segregazione dei cromosomi mitotici.

Il **ProEx C** Antibody Cocktail (Cocktail di anticorpi **ProEx C**) contiene anti-MCM2 monoclonale murino e anti-TOP2A purificato da un supernatante per colture tissutali e diluito in soluzione salina tamponata contenente stabilizzatori per proteine e sodio azide 0,09%.

### PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Il **SurePath with ProEx C** Immunocytochemical Test kit (Kit per test immunocitochimico **SurePath con ProEx C**) contiene un cocktail di anticorpi, reagenti di rilevamento e di colorazione di contrasto necessari per l'esecuzione di una procedura di colorazione immunocitochimica manuale o automatica a tre fasi per campioni cervicali a strato sottile di routine. Dopo l'incubazione del campione con un cocktail proprietario di anticorpi murini, il legame dell'anticorpo monoclonale selettivo, che indica un test positivo, viene visualizzato tramite un sistema cromogeno univoco di anticorpi legati a enzima, pronto all'uso. Il reagente enzimatico è un coniugato secondario con radice di rafano, di capra anti-topo, legato a una catena principale di destrano. L'aggiunta di uno specifico cromogeno 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, viene applicato un agente azzurrante e quindi viene montato il coprioggetto. I risultati vengono interpretati tramite microscopio ottico. Il risultato positivo, indice di patologia cervicale di alto grado, si ottiene quando il nucleo delle cellule in questione si colora di marrone.

È possibile creare una galleria di riferimento di vetrini potenzialmente positivi utilizzando apparecchiature di imaging automatiche. È quindi possibile consultare la galleria per determinare un risultato positivo o negativo.

Il test immunocitochimico **SurePath con ProEx C** è applicabile a colorazione sia manuale che automatica.

### REAGENTI FORNITI

Vengono forniti i seguenti materiali, sufficienti per 75 preparazioni a strato sottile:

| Fiala nr. | Descrizione                                                                                                                                                                               |          |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| 1a        | <b>Blocco perossidasi:</b> perossido di idrogeno tamponato, più stabilizzatore e componenti proprietari                                                                                   | 2–8 °C   |
| 1b        | <b>Blocco proteina:</b> caseina purificata più una combinazione proprietaria di proteine in PBS modificata con conservante e tensioattivo                                                 | 2–8 °C   |
| 2         | <b>Cocktail di anticorpi:</b> cocktail di anticorpi monoclonali pronto all'uso fornito in soluzione tamponata Tris con Tween 20. Contiene proteine stabilizzanti e agente anti-microbico. | 2–8 °C   |
| 3a        | <b>Mouse probe:</b> si lega agli anticorpi monoclonali murini                                                                                                                             | 2–8 °C   |
| 3b        | <b>Reagente polimero:</b> polimero coniugato con perossidasi di rafano che si lega al reagente mouse probe                                                                                | 2–8 °C   |
| 4a        | <b>Tampone substrato DAB:</b> tampone substrato usato per la preparazione del cromogeno DAB                                                                                               | 2–8 °C   |
| 4b        | <b>DAB:</b> Soluzione cromogeno 3,3'-diaminobenzidina                                                                                                                                     | 2–8 °C   |
| 5         | <b>Ematossilina:</b> ematossilina Mayer acquosa                                                                                                                                           | 15–30 °C |
| 6         | <b>Agente azzurrante:</b> soluzione salina tamponata Tris con Tween 20 e NaN <sub>3</sub> 0,09%                                                                                           | 15–30 °C |

### MATERIALI E REAGENTI NECESSARI MA NON FORNITI

- Panni assorbenti
- **BD SureDetect** SiHa Cell Line (Linea cellulare **BD SureDetect** SiHa)
- Acqua deionizzata o distillata
- Etanolo (95% e 100%)
- Vetrini coprioggetti
- Guanti
- Camera umidificata
- Microscopio ottico (obiettivi da 10x, 20x [opzionale], 40x)
- Mezzo di montaggio
- Pipette e punte delle pipette (in grado di erogare volumi da 20 µL, 200 µL e 1.000 µL)
- **BD SureDetect** Slide Preparation Buffer (Tampone di preparazione dei vetrini **BD SureDetect**) 10X (tampone di pretrattamento)
- Vaschette o bagni di colorazione
- Timer (con intervalli di 1–60 minuti)
- Soluzione tamponata Tris (TBS)
- Tween 20
- Controllo negativo universale per IgG murina
- Vortex
- Xilene o sostituti dello xilene
- Vaporiera/bagnomaria

## AVVERTENZE E PRECAUZIONI

**490500 SurePath with ProEx C** Immunocytochemical Counterstains  
(Colorazioni di contrasto immunocitochimiche **SurePath** con **ProEx C**)

### Attenzione



**H302** Nocivo se ingerito. **H315** Provoca irritazione cutanea. **H319** Provoca grave irritazione oculare.

**P264** Lavarsi accuratamente dopo l'uso. **P280** Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. **P301+P312** "IN CASO DI INGESTIONE: In caso di malessere, contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico." **P302+P352** IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua e sapone. **P305+P351+P338** IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. **P501** Smaltire il prodotto/recipiente in conformità alle normative locali/regionali/nazionali/internazionali.

**490501 Kit per test immunocitochimico SurePath con ProEx C**

### Pericolo



**H341** Sospettato di provocare alterazioni genetiche. **H350** Può provocare il cancro.

**P281** Utilizzare il dispositivo di protezione individuale richiesto. **P308+P313** IN CASO di esposizione o di possibile esposizione, consultare un medico. **P405** Conservare sotto chiave. **P501** Smaltire il prodotto/recipiente in conformità alle normative locali/regionali/nazionali/internazionali.

## PRECAUZIONI

1. Per uso diagnostico *in vitro*.
2. Appena pronti, i vetrini **SurePath** allestiti devono essere posti nel tampone di pretrattamento, dove dovranno rimanere per almeno 1 ora, ma non più di 72 ore, prima del test immunocitochimico.
3. Evitare l'essiccazione dei vetrini in qualunque fase della procedura. I vetrini che hanno subito essiccazione durante la procedura possono aumentare lo sfondo.
4. I campioni e tutti i materiali che entrano in contatto con essi devono essere trattati come materiali potenzialmente infetti, pertanto devono essere smaltiti assumendo tutte le precauzioni necessarie. Non pipettare mai i reagenti per bocca ed evitare che reagenti e campioni entrino in contatto con la pelle e le mucose. In caso di contatto dei reagenti con zone sensibili, lavare la zona con abbondante acqua.
5. Evitare la contaminazione batterica dei reagenti, altrimenti potrebbe verificarsi una colorazione aspecifica.
6. Tempi, temperature e modalità di incubazione diversi da quelli specificati possono generare risultati errati.
7. I reagenti sono stati diluiti per assicurare una prestazione ottimale. Ulteriori diluizioni potrebbero causare la perdita di colorazione antigenica.
8. I componenti del kit sono specifici del lotto. Non sostituire i componenti del kit con numeri di lotto diversi. I numeri di lotto appaiono sulle etichette della confezione.
9. Non utilizzare il kit per test **SurePath** con **ProEx C** 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.
10. Non esistono segni chiari che indichino il degrado del prodotto. Pertanto, i controlli positivi e negativi devono essere eseguiti contemporaneamente ai campioni del paziente. Se si osserva una colorazione imprevista, non derivante da variazioni nelle procedure di laboratorio, o si sospetta un problema nel kit per test **SurePath** con **ProEx C**, contattare l'assistenza tecnica BD.
11. Per evitare il contatto del reagente con occhi e cute, indossare attrezzature di protezione personale adeguate. Per ulteriori informazioni, consultare la scheda di sicurezza del materiale (MSDS).

12. Il test **SurePath** con **ProEx C** è indicato per l'uso con campioni citologici cervicali raccolti in conservante **SurePath**. Non è stata valutata la compatibilità con preparazioni tradizionali e monostrato diverse da **SurePath**.

## ISTRUZIONI PER L'USO

### Preparazione dei campioni

Consultare il Manuale dell'utente del **BD PrepStain Slide Processor** (Processore per vetrini **BD PrepStain**) per istruzioni sulla preparazione dei vetrini da campioni citologici cervicali residui **SurePath**.

Aggiungere 8 mL di conservante **SurePath** al campione residuo nella fiala **SurePath** (circa 2 mL). Il campione diluito deve essere elaborato sullo strumento **BD PrepMate** secondo la tecnica standard e sullo strumento **BD PrepStain**.

Appena pronti, i vetrini **SurePath** allestiti devono essere posti nel tampone di preparazione dei vetrini **BD SureDetect** 10X (fare riferimento al foglietto illustrativo del tampone di preparazione dei vetrini **BD SureDetect** per istruzioni sulla preparazione della soluzione di lavoro per vetrini). I vetrini devono rimanere nel tampone per almeno 1 ora, ma non più di 72 ore, prima del test immunocitochimico.

Per ottenere prestazioni ottimali dal kit, eseguire la procedura di recupero dell'epitopo. Questa procedura prevede l'immersione dei vetrini allestiti in una soluzione di tampone di preparazione dei vetrini **BD SureDetect** per almeno 1 ora a temperatura ambiente, con successivo riscaldamento dei vetrini nel tampone di pretrattamento a 95 °C. I vetrini vengono mantenuti a 95 °C per 15 minuti e lasciati raffreddare a temperatura ambiente per 20 minuti. È consigliato l'uso di un bagnomaria calibrato o di una vaporiera in grado di mantenere la temperatura richiesta. I laboratori situati ad altitudini particolarmente elevate devono determinare il metodo migliore per il mantenimento della temperatura richiesta. La procedura di colorazione deve essere avviata immediatamente dopo il recupero dell'epitopo e il raffreddamento. La mancata osservanza della procedura descritta può influenzare negativamente i risultati.

### Preparazione dei reagenti

Preparare i seguenti reagenti prima della colorazione.

- Soluzione tamponata Tris con 0,05% Tween 20 (TBST)
  - Preparare la soluzione TBS secondo le specifiche del fabbricante.
  - Se non ancora presente nella TBS, aggiungere Tween 20 fino a una concentrazione finale di 0,05%.
- Soluzione substrato-cromogeno (DAB) (volume sufficiente per 5 vetrini)
  - Trasferire 1 mL di tampone substrato DAB (fiala 4a) in una provetta.
  - Aggiungere una goccia (20–30 µL) di cromogeno DAB (fiala 4b). Miscelare bene e applicare sui vetrini tramite una pipetta.
  - Preparare una nuova soluzione substrato-cromogeno quotidianamente.
  - La qualità di colorazione non viene intaccata dal precipitato che può svilupparsi nella soluzione.

## PROTOCOLLO DI COLORAZIONE (ESEGUITO A TEMPERATURA AMBIENTE, 20–25 °C)

### Note sulla procedura di colorazione

- Leggere attentamente queste istruzioni e acquisire familiarità con tutti i componenti prima dell'uso (vedere Precauzioni).
- Tutti i reagenti devono essere equilibrati a temperatura ambiente (20–25 °C) prima dell'immunocolorazione.
- Tutte le incubazioni devono essere eseguite a temperatura ambiente se non diversamente specificato.
- Evitare l'essiccazione dei vetrini durante la procedura di colorazione. Preparazioni cellulari essiccate possono presentare una maggiore colorazione aspecifica. Proteggere i vetrini che possono essere esposti a correnti d'aria. Per incubazioni prolungate, porre i vetrini in una camera umidificata.

### Recupero dell'epitopo

- Porre i vetrini allestiti in una vaschetta coplin contenente una corretta soluzione di tampone di preparazione dei vetrini **BD SureDetect** per almeno 1 ora, fino a un massimo di 72 ore.
- Incubare a bagnomaria o in vaporiera per 15 minuti a 95 °C.
- Rimuovere la vaschetta coplin con i vetrini dal bagnomaria o dalla vaporiera e lasciare raffreddare i vetrini nel tampone per 20 minuti.
- Sciacquare i vetrini con acqua deionizzata e trasferire in una vaschetta coplin pulita contenente TBST.

### Reagente bloccante

- Picchiettare per eliminare il tampone in eccesso.
- Caricare i vetrini in una camera umidificata precedentemente preparata (riempita con salviette o garze inumidite con acqua).
- Applicare 200 µL di reagente blocco perossidasi (fiala 1a) per coprire l'area di deposito delle cellule.
- Incubare per 5 minuti (±1 minuto).
- Sciacquare i vetrini in TBST (3 cambi, 2 minuti ciascuno).

### Blocco proteina

- Picchiettare per eliminare il tampone in eccesso.
- Caricare i vetrini in una camera umidificata precedentemente preparata (riempita con salviette o garze inumidite con acqua).
- Applicare 200 µL di blocco proteina (fiala 1b) per coprire completamente l'area di deposito delle cellule.
- Incubare per 5 minuti (±1 minuto).
- NON SCIACQUARE.

### Cocktail di anticorpi primario

- Picchiettare per eliminare il blocco proteina in eccesso.
- Caricare i vetrini in una camera umidificata precedentemente preparata (riempita con salviette o garze inumidite con acqua).
- Applicare 200 µL **ProEx C** di cocktail di anticorpi (fiala 2) per coprire completamente l'area di deposito delle cellule.
- Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.
- Sciacquare ciascun vetrino singolarmente con TBST usando una spruzzetta (non indirizzare il flusso direttamente sull'area di deposito delle cellule). Caricare i vetrini in un rack per vetrini.
- Sciacquare i vetrini in TBST (3 cambi, 2 minuti ciascuno).

### Soluzioni di rilevamento

- Picchiettare per eliminare il tampone in eccesso.
- Caricare i vetrini in una camera umidificata precedentemente preparata (riempita con salviette o garze inumidite con acqua).
- Applicare 200 µL di reagente mouse probe (fiala 3a) per coprire completamente l'area di deposito delle cellule.
- Incubare per 20 minuti (±1 minuto).
- Sciacquare i vetrini in TBST (3 cambi, 2 minuti ciascuno).
- Picchiettare per eliminare il tampone in eccesso.
- Caricare i vetrini in una camera umidificata precedentemente preparata (riempita con salviette o garze inumidite con acqua).
- Applicare 200 µL di soluzione substrato-cromogeno (DAB) per coprire completamente l'area di deposito delle cellule.
- Incubare per 20 minuti (±1 minuto).
- Sciacquare i vetrini in bagno TBST (3 cambi, 2 minuti ciascuno).
- Picchiettare per eliminare il tampone in eccesso.
- Caricare i vetrini in una camera umidificata precedentemente preparata (riempita con salviette o garze inumidite con acqua).
- Applicare 200 µL di soluzione substrato-cromogeno (DAB) per coprire completamente l'area di deposito delle cellule.
- Incubare per 5 minuti (±1 minuto).
- Sciacquare per 5 minuti in acqua deionizzata.

### Colorazione di contrasto

- Sciacquare i vetrini in TBST (1 cambio, 2 minuti).
- Caricare i vetrini in una camera umidificata precedentemente preparata (riempita con salviette o garze inumidite con acqua).
- Applicare 200 µL di colorazione di contrasto ematossilina (fiala 5) per coprire completamente l'area di deposito delle cellule.
- Incubare per 1 minuto (±10 secondi).
- Sciacquare i vetrini per 3 minuti in acqua corrente.
- Caricare i vetrini in una camera umidificata precedentemente preparata (riempita con salviette o garze inumidite con acqua).
- Colorare di blu i vetrini applicando 200 µL di agente azzurrante (fiala 6) per 1 minuto (±10 secondi).
- Ripetere il risciacquo in acqua corrente per 1 minuto.

### Montaggio

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

### CONSERVAZIONE

La durata massima di conservazione del kit per test immunocitochimico **SurePath** con **ProEx C** (reagenti dell'anticorpo e di rilevamento) è di 12 mesi dalla data di fabbricazione, a 2–8 °C.

La durata massima di conservazione delle colorazioni di contrasto per test immunocitochimico **SurePath** con **ProEx C** (ematossilina e reagente azzurrante) è di 12 mesi dalla data di fabbricazione, a 15–30 °C.

Una volta aperti, i reagenti sono stabili per trenta (30) giorni se conservati alle temperature consigliate. Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza indicata sull'etichetta.

### CONTROLLO DELLA QUALITÀ

La variabilità dei risultati dipende spesso da una manipolazione dei campioni che si discosta dalle procedure del test. Per ulteriori informazioni, consultare le linee guida di controllo della qualità proposte dal Clinical and Laboratory Standards Institute, *Quality Assurance for Immunocytochemistry*.

Il controllo cellule **BD SureDetect** SiHa è disponibile come controllo positivo presso BD Diagnostics. Ciascuna fiala contiene una linea cellulare di cancro cervicale, che viene elaborata in modo simile ai campioni clinici. Come controllo negativo è possibile utilizzare un controllo negativo di IgG murina universale. A ciascuna procedura di colorazione è allegato un vetrino per il controllo positivo e negativo. I risultati di colorazione devono essere usati come indicazione della validità della fase di colorazione.

### INTERPRETAZIONE DELLA COLORAZIONE

**Campioni di paziente e di controllo:** il tecnico di citologia o di patologia deve valutare i vetrini colorati tramite microscopio ottico. Le cellule possono essere visionate manualmente o conservate in una galleria di immagini elettroniche ottenute tramite il microscopio ottico.

**Vetrini di controllo:** i vetrini di controllo positivo e negativo devono essere esaminati prima della revisione dei campioni del paziente per verificare che tutti i reagenti abbiano funzionato correttamente. La presenza di un prodotto di reazione marrone (3,3'-diaminobenzidina tetraidrocloruro, DAB) nei nuclei del vetrino di controllo cellule SiHa colorato con test **SurePath** con **ProEx C** indica una reattività positiva. Il vetrino di controllo negativo di IgG murina universale colorato con il test **SurePath** con **ProEx C** non deve mostrare alcun nucleo di colorazione marrone e deve mostrare colorazione di contrasto solo con ematossilina.

**La valutazione dei vetrini è una procedura a 4 fasi.**

#### Fase 1: il campione è adeguato?

Il Bethesda System (TBS) per Reporting Cervical Cytology (2nd Ed.) dichiara che "An adequate liquid-based preparation should have an estimated minimum of at least 5000 well-visualized/well-preserved squamous cells" (Una corretta preparazione a base liquida deve contenere un minimo previsto di 5.000 cellule squamose ben visualizzate e ben conservate). Lo stesso criterio deve essere applicato ai vetrini **SurePath** con **ProEx C**. Tuttavia, analogamente a una preparazione Pap convenzionale, qualunque campione con cellule anomale che mostri una reazione molecolare positiva, viene automaticamente considerato soddisfacente per la valutazione. Se a questo punto la risposta è "sì", passare alla fase successiva; se invece la risposta è "no" il risultato è **Non soddisfacente per la valutazione**.

#### Fase 2: appare una colorazione nucleare marrone da moderata a intensa nelle cellule epiteliali?

Per rispondere "sì" a questa domanda, cercare la colorazione marrone ben visibile. Una debole quantità, o sfumatura, di marrone, non è sufficiente a garantire un risultato positivo. Se non appare alcuna colorazione nucleare marrone, il risultato viene considerato **Negativo**. Se appare una colorazione marrone corretta, procedere alla fase successiva.

#### Fase 3: la cellula con colorazione nucleare marrone è una cellula squamosa o ghiandolare?

Se la risposta è affermativa, procedere alla fase successiva. Se la risposta è negativa, si tratta di un risultato di test **Negativo**.

**Fase 4: la cellula è  $\geq$  ASC (cellula squamosa atipica) o AGC (cellula ghiandolare atipica)?**

Adottare lo stesso criterio morfologico indicato nel Bethesda System for Reporting Cervical Cytology (2nd Ed.) per determinare se la cellula squamosa contenente il nucleo marrone è  $\geq$  ASC (cellula squamosa atipica). Se la cellula è considerata  $\geq$  ASC (o  $\geq$  AGC), si sarà ottenuto un risultato **Positivo**. Ciò comprende ASC-US, ASC-H, LSIL, HSIL e cancro. Se la cellula ha un aspetto ghiandolare, viene applicato il criterio TBS per determinare se la cellula è  $\geq$  AGC (cellula ghiandolare atipica). Ciò comprende AGC endocervicale, AGC endometriale, AIS e adenocarcinoma. Se la cellula in questione è compatibile con NILM (negativa a lesioni intraepiteliali o patologie maligne), il risultato del test è **Negativo**.

**BIBLIOGRAFIA:** Vedere "References" nel testo inglese.

Assistenza e supporto tecnico BD Diagnostics: rivolgersi al rappresentante locale BD o visitare il sito [www.bd.com/ds](http://www.bd.com/ds).



## SurePath with ProEx C Immunocytochemical Test Kit



|            |                                                                |    |
|------------|----------------------------------------------------------------|----|
| REF 490501 | SurePath with ProEx C<br>Immunocytochemical Test Kit           | 75 |
| REF 490500 | SurePath with ProEx C<br>Immunocytochemical Test Counterstains | 75 |

### USO PREVISTO

**SurePath with ProEx C** Immunocytochemical Test (prueba inmunocitoquímica **SurePath con ProEx C**) se ha diseñado para la evaluación cualitativa de inducción aberrante de fase S en muestras citológicas de cuello uterino recogidas en **SurePath Preservative Fluid** (líquido conservante **SurePath**). Los resultados de la prueba proporcionan información complementaria para el diagnóstico citológico cervical.

### RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Las proteínas de mantenimiento de minicromosomas (MCM) desempeñan un papel esencial en la replicación del ADN eucariótico. Cada una de las proteínas MCM tiene secuencias de ATPasa dependientes del ADN en su dominio central altamente conservado. Los niveles de proteínas MCM aumentan generalmente de forma variable a medida que las células normales progresan desde la fase G0 a la fase G1/S del ciclo celular. La topoisomerasa II alfa (TOP2A) es una enzima nuclear esencial utilizada en la replicación del ADN y es un objetivo de muchos medicamentos que se utilizan en el tratamiento del cáncer. La expresión disminuida de TOP2A es un mecanismo predominante de resistencia a varios agentes quimioterapéuticos. Se ha observado una variación significativa en el intervalo de expresión de esta proteína en muchos tumores diferentes. La TOP2A es predominante en células en proliferación y se modifica en la fase M por fosforilación en puntos específicos, lo que es de vital importancia para la condensación y segregación de cromosomas mitóticos.

**ProEx C** Antibody Cocktail (cóctel de anticuerpos **ProEx C**) contiene anticuerpos de MCM2 y TOP2A monoclonales de ratón purificados a partir de sobrenadante de cultivo tisular y diluidos en una solución salina tamponada que contiene estabilizadores proteicos y 0,09% de azida de sodio.

### PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

**SurePath with ProEx C** Immunocytochemical Test kit (kit de prueba inmunocitoquímica **SurePath con ProEx C**) contiene un cóctel de anticuerpos y reactivos de detección y contraste necesarios para completar un procedimiento de tinción inmunocitoquímica manual o automático de tres pasos para muestras de cuello uterino de capa fina preparadas de forma rutinaria. Después de la incubación de la muestra con un cóctel de anticuerpos de ratón propio, la unión selectiva de anticuerpos monoclonales, indicativa de una prueba positiva, se visualiza mediante un exclusivo sistema cromogénico de anticuerpos unidos a enzimas listo para su uso. El reactivo enzimático es un anticuerpo de chivo anti-ratón secundario, conjugado con peroxidasa de rábano, unido a una espina dorsal de polímero de dextrano. La adición de un cromógeno específico produce la formación de un producto cromogénico visible localizado en los puntos de unión de antígenos y anticuerpos. A continuación, se realiza la contratinción de la muestra con hematoxilina, se aplica un agente de coloración azul y se cubre el portaobjetos. Los resultados se interpretan mediante un microscopio óptico. Se consigue un resultado positivo, indicativo de un alto grado de enfermedad cervical, cuando el núcleo de las células de interés se tiñe de marrón.

Se puede crear una galería de referencia de portaobjetos potencialmente positivos mediante un equipo de formación de imágenes automático. A continuación, la galería se puede revisar para determinar si el resultado es positivo o negativo.

**SurePath with ProEx C** Immunocytochemical Test (prueba inmunocitoquímica **SurePath con ProEx C**) se puede aplicar en la tinción tanto manual como automática.

### REACTIVOS PROPORCIONADOS

Se incluyen los siguientes materiales, que son suficientes para 75 preparaciones de capa fina:

| Nº de vial | Descripción                                                                                                                                                                                              |          |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| 1a         | <b>Bloque de peroxidasa:</b> peróxido de hidrógeno tamponado más estabilizador y componentes patentados.                                                                                                 | 2–8 °C   |
| 1b         | <b>Inhibidor de proteínas:</b> caseína purificada más combinación patentada de proteínas en solución PBS modificada con conservante y surfactante.                                                       | 2–8 °C   |
| 2          | <b>Cóctel de anticuerpos:</b> cóctel de anticuerpos monoclonales listo para usar, suministrado en solución tamponada de Tris con Tween 20; contiene proteínas estabilizadoras y reactivo antimicrobiano. | 2–8 °C   |
| 3a         | <b>Sonda de ratón:</b> se une a los anticuerpos monoclonales de ratón.                                                                                                                                   | 2–8 °C   |
| 3b         | <b>Reactivo polimérico:</b> polímero conjugado con peroxidasa de rábano que se une al reactivo de sonda de ratón.                                                                                        | 2–8 °C   |
| 4a         | <b>Tampón de sustrato de DAB:</b> tampón de sustrato utilizado en la preparación del cromógeno DAB.                                                                                                      | 2–8 °C   |
| 4b         | <b>DAB:</b> solución cromogénica de 3,3'-diaminobencidina.                                                                                                                                               | 2–8 °C   |
| 5          | <b>Hematoxilina:</b> hematoxilina de Mayer con base acuosa.                                                                                                                                              | 15–30 °C |
| 6          | <b>Agente de coloración azul:</b> solución salina tamponada de Tris con Tween 20 y NaN <sub>3</sub> al 0,09%.                                                                                            | 15–30 °C |

### MATERIALES Y REACTIVOS NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Toallitas absorbentes
- BD SureDetect** SiHa Cell Line (línea celular SiHa **BD SureDetect**)
- Agua desionizada o destilada
- Etanol (95% y 100%)
- Tapas de vidrio
- Guantes
- Cámara húmeda
- Microscopio óptico (lentes 10x, 20x [opcional], 40x)
- Medios de montaje
- Pipetas y puntas de pipeta (capaces de dispensar volúmenes de 20 µL, 200 µL y 1000 µL)
- BD SureDetect** Slide Preparation Buffer 10 X (tampón de preparación de portaobjetos **BD SureDetect** 10X) (tampón de tratamiento previo)
- Jarras o baños de tinción
- Temporizador (con capacidad para intervalos de 1–60 minutos)
- Solución salina tamponada de Tris (TBS)
- Tween 20
- Control negativo universal de IgG de ratón
- Agitador vórtex
- Xileno o sustitutos de xileno
- Vaporera/baño de agua

## ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

### 490500 SurePath with ProEx C Immunocytochemical Counterstains

#### Atención



**H302** Nocivo en caso de ingestión. **H315** Provoca irritación cutánea. **H319** Provoca irritación ocular grave.

**P264** Lavarse concienzudamente tras la manipulación. **P280** Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. **P301+P312** EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar a un CENTRO DE INFORMACION TOXICOLOGICA o a un médico en caso de malestar. **P302+P352** EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes. **P305+P351+P338** "EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando." **P501** Eliminar el contenido/el recipiente de conformidad con las normativas locales, regionales, nacionales e internacionales.

### 490501 SurePath with ProEx C Immunocytochemical Test Kit

#### Peligro



**H341** Se sospecha que provoca defectos genéticos. **H350** Puede provocar cáncer.

**P281** Utilizar el equipo de protección individual obligatorio. **P308+P313** EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Consultar a un médico. **P405** Guardar bajo llave. **P501** Eliminar el contenido/el recipiente de conformidad con las normativas locales, regionales, nacionales e internacionales.

## PRECAUCIONES

1. Para uso diagnóstico *in vitro*.
2. Los portaobjetos de **SurePath** preparados se deben colocar en el tampón de tratamiento previo tan pronto como estén preparados. Antes de la inmunocitoquímica, los portaobjetos deben permanecer en el tampón de tratamiento previo durante al menos 1 hora, pero no más de 72 horas.
3. No deje que los portaobjetos se sequen durante ningún momento del procedimiento. Los portaobjetos que se hayan secado durante el procedimiento podrían tener más tinción de fondo.
4. 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 adoptando las precauciones adecuadas. Nunca pipetee reactivos con la boca y evite el contacto de los reactivos y las muestras con la piel y las membranas mucosas. Si los reactivos entran en contacto con zonas sensibles, lávelas con abundante agua.
5. Reduzca al mínimo la contaminación microbiana de los reactivos para evitar tinciones no específicas.
6. Cualquier tiempo, temperatura o método de incubación distintos de los especificados pueden producir resultados erróneos.
7. Los reactivos se han diluido para un rendimiento óptimo. La dilución adicional podría resultar en la pérdida de la tinción del antígeno.
8. Los componentes del kit son específicos de cada lote. No sustituya los componentes del kit con componentes pertenecientes a diferentes números de lote de fabricación. Los números de lote figuran en las etiquetas del envase.
9. No utilice el kit de prueba **SurePath** con **ProEx C** después de la fecha de vencimiento impresa en la caja. El usuario debe validar las condiciones de almacenamiento de los reactivos si estas no son las que se especifican en el prospecto de la caja.
10. No hay signos obvios que indiquen la degradación de este producto. Por lo tanto, se deben procesar controles negativos y positivos de forma simultánea con las muestras de los pacientes. Si se observa una tinción inesperada, que no se puede explicar por variaciones en los procedimientos de laboratorio, o se sospecha de un problema con el kit de prueba **SurePath** con **ProEx C**, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de BD.

11. 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.
12. La prueba de **SurePath** con **ProEx C** se ha diseñado para su uso con muestras de citología cervical recogidas en líquido conservante **SurePath**. La compatibilidad con preparaciones de monocapa y convencionales distintas de **SurePath** no se ha evaluado.

## INSTRUCCIONES DE USO

### Preparación de la muestra

Consulte en el Manual del usuario de **BD PrepStain Slide Processor** (procesador de portaobjetos **BD PrepStain**) para conocer las instrucciones relacionadas con la preparación de portaobjetos a partir de muestras citológicas cervicales **SurePath** residuales.

Añada 8 mL de líquido conservante **SurePath** a la muestra residual en el vial **SurePath** (2 mL aproximadamente). La muestra diluida se debe procesar en el instrumento **BD PrepMate** mediante la técnica estándar y en el instrumento **BD PrepStain**.

Los portaobjetos de **SurePath** preparados se deben colocar en el tampón de preparación de portaobjetos **BD SureDetect** 10X tan pronto como estén preparados (consulte el prospecto del tampón de preparación de portaobjetos **BD SureDetect** para obtener información acerca de la preparación de una solución de portaobjetos de trabajo). Antes de la inmunocitoquímica, los portaobjetos deben permanecer en el tampón durante al menos 1 hora, pero no más de 72 horas.

Se debe utilizar un procedimiento de recuperación de epitopos para un rendimiento óptimo del kit. Este procedimiento implica sumergir los portaobjetos preparados en una solución de trabajo de tampón de preparación de portaobjetos **BD SureDetect** durante un mínimo de 1 hora a temperatura ambiente, seguido del calentamiento de los portaobjetos en el tampón de tratamiento previo a 95 °C. Los portaobjetos se mantienen a 95 °C durante 15 minutos y después se dejan enfriar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se recomienda el uso de un baño de agua calibrado o de una vaporera que pueda mantener la temperatura necesaria. Los laboratorios ubicados en alturas superiores deben determinar el mejor método para mantener la temperatura necesaria. El procedimiento de tinción se debe iniciar inmediatamente después de la recuperación de epitopos y del enfriamiento. Las desviaciones del procedimiento descrito podrían afectar de forma adversa a los resultados.

### Preparación del reactivo

Prepare los siguientes reactivos antes de la tinción.

- Solución salina tamponada de Tris con Tween 20 al 0,05% (TBST)
  - Prepare la solución TBS de acuerdo con las especificaciones del fabricante.
  - Si no está ya presente en la solución TBS, añada Tween 20 en una concentración final de 0,05%.
- Solución cromógeno-sustrato (DAB) (volumen suficiente para 5 portaobjetos)
  - Transfiera 1 mL de tampón de sustrato de DAB (vial 4a) a un tubo de ensayo.
  - Añada una gota (20–30 µL) de cromógeno DAB (vial 4b). Mézclelo concienzudamente y aplíquelo a los portaobjetos con una pipeta.
  - Prepare la solución de sustrato-cromógeno diariamente.
  - La calidad de la tinción no se ve afectada por el precipitado que se puede producir en la solución.

## PROTOCOLO DE TINCIÓN

(REALIZADO A TEMPERATURA AMBIENTE, 20–25 °C)

### Notas acerca del procedimiento de tinción

- Lea todas las instrucciones atentamente y familiarícese con todos los componentes antes de utilizarlos (consulte la sección Precauciones).
- Hay que equilibrar todos los reactivos a temperatura ambiente (20–25 °C) antes de la inmunotinción.
- Todas las incubaciones se deben realizar a temperatura ambiente a menos que se indique lo contrario.
- No deje que los portaobjetos se sequen durante el procedimiento de tinción. Las preparaciones celulares secas pueden producir un aumento de la tinción no específica. Proteja los portaobjetos que puedan estar expuestos a corrientes de aire. Es preciso colocar los portaobjetos en una cámara húmeda durante incubaciones prolongadas.

### Recuperación de epitopos

- Coloque los portaobjetos preparados en una jarra de Coplin que contenga una solución de trabajo de tampón de preparación de portaobjetos **BD SureDetect** durante un mínimo de 1 hora y hasta un máximo de 72 horas.
- Incúbelos en un baño de agua o una vaporera durante 15 minutos a 95 °C.
- Retire del baño de agua o la vaporera toda la jarra de Coplin con los portaobjetos y deje que se enfrien en el tampón durante 20 minutos.
- Enjuague los portaobjetos con H<sub>2</sub>O desionizada y transfíralos a una jarra de Coplin limpia que contenga TBST.

### Reactivo inhibidor

- Golpee suavemente varias veces para eliminar el exceso de tampón.
- Cargue los portaobjetos en una cámara de humedad preparada (llena de toallas de papel o gasas humedecidas en agua).
- Aplique 200 µL de reactivo de bloque de peroxidasa (vial 1a) para cubrir el área de deposición del pocillo.
- Incúbelo durante 5 minutos (±1 minuto).
- Enjuague los portaobjetos en TBST, con 3 cambios, de 2 minutos cada uno.

### Inhibidor de proteínas

- Golpee suavemente varias veces para eliminar el exceso de tampón.
- Cargue los portaobjetos en una cámara de humedad preparada (llena de toallas de papel o gasas humedecidas en agua).
- Aplique 200 µL de inhibidor de proteínas (vial 1a) para cubrir completamente el área de deposición del pocillo.
- Incúbelo durante 5 minutos (±1 minuto).
- NO LO ENJUAGUE.

### Cóctel de anticuerpos principal

- Golpee suavemente varias veces para eliminar el exceso de inhibidor de proteínas.
- Cargue los portaobjetos en una cámara de humedad preparada (llena de toallas de papel o gasas humedecidas en agua).
- Aplique 200 µL de cóctel de anticuerpos **ProEx C** (vial 2) para cubrir completamente el área de deposición del pocillo.
- Incúbelos durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Enjuague cada portaobjetos de forma individual con TBST utilizando una botella de lavado (no dirija el flujo directamente al área de deposición del pocillo). Cargue los portaobjetos en una gradilla de portaobjetos.
- Enjuague los portaobjetos en TBST, con 3 cambios, de 2 minutos cada uno.

### Química de detección

- Golpee suavemente varias veces para eliminar el exceso de tampón.
- Cargue los portaobjetos en una cámara de humedad preparada (llena de toallas de papel o gasas humedecidas en agua).
- Aplique 200 µL de reactivo de sonda de ratón (vial 3a) para cubrir completamente el área de deposición del pocillo.
- Incúbelo durante 20 minutos (±1 minuto).
- Enjuague los portaobjetos en TBST, con 3 cambios, de 2 minutos cada uno.
- Golpee suavemente varias veces para eliminar el exceso de tampón.
- Cargue los portaobjetos en una cámara de humedad preparada (llena de toallas de papel o gasas humedecidas en agua).
- Aplique 200 µL de reactivo polimérico (vial 3b) para cubrir el área de deposición del pocillo.
- Incúbelo durante 20 minutos (±1 minuto).
- Enjuague los portaobjetos en un baño de TBST, con 3 cambios, de 2 minutos cada uno.
- Golpee suavemente varias veces para eliminar el exceso de tampón.
- Cargue los portaobjetos en una cámara de humedad preparada (llena de toallas de papel o gasas humedecidas en agua).
- Aplique 200 µL de solución de sustrato-cromógeno (DAB) para cubrir completamente el área de deposición del pocillo.
- Incúbelo durante 5 minutos (±1 minuto).
- Enjuague los portaobjetos durante 5 minutos en H<sub>2</sub>O desionizada.

### Contratinción

- Enjuague los portaobjetos en TBST, con 1 cambio, de 2 minutos.
- Cargue los portaobjetos en una cámara de humedad preparada (llena de toallas de papel o gasas humedecidas en agua).
- Aplique 200 µL de contratinción de hematoxilina (vial 5) para cubrir completamente el área de deposición del pocillo.
- Incúbelo durante 1 minuto (±10 segundos).
- Enjuague los portaobjetos durante 3 minutos en H<sub>2</sub>O corriente.
- Cargue los portaobjetos en una cámara de humedad preparada (llena de toallas de papel o gasas humedecidas en agua).
- Tiña los portaobjetos de azul mediante la aplicación de 200 µL de agente de coloración azul (vial 6) durante 1 minuto (±10 segundos).
- Repita el enjuague con agua corriente durante 1 minuto.

### Montaje

- Sumerja los portaobjetos en una solución de etanol al 95% durante 1 minuto o realice 25 inmersiones.
- Sumerja los portaobjetos en alcohol absoluto, con 4 cambios, de 1 minuto cada uno, o realice 25 inmersiones.
- Limpie con xileno, con 3 cambios, de 1 minuto cada uno, o realice 25 inmersiones.
- Cubra los portaobjetos con medios de montaje permanentes no acuosos utilizando tapas de vidrio.

### CONSERVACIÓN

El límite de conservación del kit de prueba inmunocitoquímica **SurePath** con **ProEx C** (anticuerpos y reactivos de detección) es de hasta 12 meses a partir de la fecha de fabricación a una temperatura de 2–8 °C.

El límite de conservación de las contratinciones de la prueba inmunocitoquímica **SurePath** con **ProEx C** (hematoxilina y reactivo de coloración azul) es de hasta 12 meses a partir de la fecha de fabricación a una temperatura de 15–30 °C.

Una vez abiertos, los reactivos son estables durante treinta (30) días si se almacenan a las temperaturas recomendadas. No utilice los reactivos después de la fecha de vencimiento que se indica en la etiqueta.

### CONTROL DE CALIDAD

Las variaciones en los resultados se suelen deber a diferencias en el tratamiento de las muestras con respecto a los procedimientos de prueba recomendados. Para obtener información adicional, consulte las pautas de control de calidad *Quality Assurance for Immunocytochemistry* del Clinical and Laboratory Standards Institute (Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio).

El control celular SiHa de **BD SureDetect** está disponible como control positivo de BD Diagnostics. Cada vial contiene una línea celular de cáncer de cuello uterino, que se procesa de modo similar a las muestras clínicas. Se puede utilizar un control negativo universal de IgG de ratón como control negativo. Se debe incluir un portaobjetos de control negativo y positivo en cada procedimiento de tinción. Los resultados de tinción se deben utilizar como una indicación de la validez del proceso de tinción.

### INTERPRETACIÓN DE LA TINCIÓN

**Muestras del control y de la paciente:** los portaobjetos con tinción deberán ser evaluados por un citotécnico o un patólogo con un microscopio óptico. Las células se pueden revisar de forma manual o se pueden almacenar en una galería de imágenes electrónica procedente del microscopio óptico.

**Portaobjetos de control:** los portaobjetos de control negativo y positivo se deben examinar antes de revisar las muestras de la paciente para determinar que todos los reactivos han funcionado correctamente. La presencia de un producto de reacción marrón (3,3'-diaminobencidina tetraclorhidrato, DAB) en los núcleos del portaobjetos de control celular SiHa teñido con la prueba **SurePath** con **ProEx C** es indicativa de reactividad positiva. El control negativo universal de IgG de ratón teñido con la prueba **SurePath** con **ProEx C** no debe tener núcleos de tinción marrón y debe mostrar tinción solo a partir de la contratinción de hematoxilina.

**La puntuación de los portaobjetos es un proceso de 4 pasos.**

**Paso 1: ¿Es adecuada la muestra?**

El sistema Bethesda (TBS) de información de citología cervical (2ª edición) establece lo siguiente: “Una preparación adecuada basada en líquidos debe tener un mínimo estimado de al menos 5000 células escamosas debidamente conservadas y visualizadas”. Los mismos criterios han de aplicarse a los portaobjetos de **SurePath** con **ProEx C**. Sin embargo, al igual que con la preparación de Papanicolaou rutinaria, cualquier muestra con células anómalas que presentan una reacción molecular positiva es, por definición, satisfactoria para su evaluación. Si la respuesta a este paso es “sí”, continúe con el siguiente paso; si la respuesta es “no”, el resultado es **No satisfactorio para la evaluación**.

**Paso 2: ¿Existe tinción marrón de intensa a moderada en las células epiteliales?**

Para contestar “sí” a este paso, busque tinción marrón que se vea fácilmente. Si solo se ve una cantidad apenas perceptible o de tono rosáceo, no es suficiente para garantizar una interpretación positiva. Si no se ve ninguna tinción nuclear marrón, el resultado se notifica como **Negativo**. Si se visualiza una tinción marrón adecuada, continúe con el siguiente paso.

**Paso 3: ¿Es la célula con tinción marrón nuclear una célula glandular o escamosa?**

Si la respuesta es “sí”, continúe con el siguiente paso. Si la respuesta es “no”, el resultado de la prueba es **Negativo**.

**Paso 4: ¿La célula es ≥ASC (célula escamosa atípica) o AGC (célula escamosa atípica)?**

Utilice los mismos criterios morfológicos descritos en el sistema Bethesda de información de citología cervical (2ª edición) para determinar si la célula escamosa que contiene el núcleo marrón es ≥ASC (célula escamosa atípica). Si la célula se considera ≥ASC (o ≥AGC), el resultado de la prueba es **Positivo**. Esto incluye ASC-US, ASC-H, LSIL, HSIL y cáncer. Si la célula tiene un aspecto glandular, se aplican los criterios TBS para determinar si es ≥AGC (célula glandular atípica). Esto incluye AGC endocervicales, AGC endometriales, AIS y adenocarcinoma. Si la célula en cuestión concuerda con NILM (negativo para lesión intraepitelial o tumor maligno), el resultado de la prueba es **Negativo**.

**BIBLIOGRAFIA:** Véase “References” en el texto en inglés.

Servicio técnico de BD Diagnostics: póngase en contacto con el representante local de BD o visite [www.bd.com/ds](http://www.bd.com/ds).



## SurePath with ProEx C Immunocytochemical Test Kit



|            |                                                             |    |
|------------|-------------------------------------------------------------|----|
| REF 490501 | SurePath with ProEx C Immunocytochemical Test Kit           | 75 |
| REF 490500 | SurePath with ProEx C Immunocytochemical Test Counterstains | 75 |

### UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

O **SurePath with ProEx C** Immunocytochemical Test (Teste imunocitoquímico) destina-se a ser utilizado para a avaliação qualitativa da indução aberrante de fase S em amostras de citologia do colo do útero colhidas em **SurePath Preservative Fluid** (Fluido conservante). Os resultados do teste fornecem informações adicionais para o diagnóstico citológico do colo do útero.

### RESUMO E EXPLICAÇÃO

As proteínas de manutenção de minicromossomas (MCM) desempenham um papel essencial na replicação de ADN eucariótico. Cada uma das proteínas MCM possui motivos ATPase dependentes do ADN no seu domínio central altamente conservado. Os níveis de proteínas MCM aumentam geralmente de forma variável à medida que as células normais passam da fase G0 para a fase G1/S do ciclo celular. A alfa topoisomerase II (TOP2A) é uma enzima nuclear essencial envolvida na replicação do ADN, sendo um alvo para muitos medicamentos anti-cancerígenos utilizados na terapêutica contra o cancro. A expressão reduzida da TOP2A constitui um mecanismo predominante de resistência a diversos agentes quimioterapêuticos. Foi observada uma variação significativa no intervalo de expressão desta proteína em diversos tipos de tumores. A TOP2A expressa-se predominantemente nas células proliferativas e é modificada na fase M através de fosforilação em locais específicos, um processo que é fundamental para a condensação e segregação dos cromossomas mitóticos.

O **ProEx C** Antibody Cocktail (Cocktail de anticorpos) contém anti-MCM2 e anti-TOP2A monoclonais de rato, purificados do sobrenadante de cultura de tecidos e diluídos em soro fisiológico tamponado que contém estabilizadores de proteínas e azida de sódio a 0,09%.

### PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O **SurePath with ProEx C** Immunocytochemical Test Kit (Kit do teste imunocitoquímico) contém um cocktail de anticorpos, reagentes de deteção e contrastante necessários para concluir um procedimento de coloração imunocitoquímica manual ou automático composto de três passos, destinado a amostras do colo do útero de camada fina de preparações de rotina. Após a incubação da amostra com o cocktail de anticorpos de rato patenteado, é visualizada uma ligação de anticorpo monoclonal seletiva, indicadora de um teste positivo, utilizando um sistema exclusivo e pronto a utilizar de cromogénio de anticorpos ligados à enzima. O reagente enzimático consiste num conjugado de peroxidase de rábano e de anticorpo de cabra anti-ratinho secundário ligado à cadeia principal do polímero dextrano. A adição de um cromogénio específico resulta na formação de um produto cromogénico visível localizado nos locais de ligação antigénio-anticorpo. A amostra é, em seguida, sujeita a contração com hematoxilina, é aplicado um agente de Bluing (azulamento) e a lâmina é protegida com uma lamela. Os resultados são interpretados utilizando um microscópio ótico. Obtém-se um resultado positivo, indicador de uma doença no colo do útero de alto grau, sempre que o núcleo das células em causa apresenta uma coloração castanha.

Pode criar-se uma galeria de referência de lâminas potencialmente positivas utilizando equipamento de imagiologia automático. A galeria pode ser revista para determinar um resultado positivo ou negativo.

O **SurePath with ProEx C** Immunocytochemical Test é aplicável tanto para a coloração manual, como para a coloração automática.

### REAGENTES FORNECIDOS

Os seguintes materiais estão incluídos e são suficientes para 75 preparações de camada fina:

| Frasco N.º | Descrição                                                                                                                                                                                |          |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| 1a         | <b>Bloqueador da peroxidase:</b> Peróxido de hidrogénio tamponado acrescido de estabilizador e de componentes patenteados                                                                | 2–8 °C   |
| 1b         | <b>Bloqueador de proteínas:</b> Caseína purificada acrescida de combinação patenteada de proteínas em PBS modificado com conservante e surfactante                                       | 2–8 °C   |
| 2          | <b>Cocktail Ab:</b> Cocktail de anticorpos monoclonais, pronto a utilizar, fornecido em solução tamponada Tris com Tween 20. Contém proteínas estabilizadoras e reagente antimicrobiano. | 2–8 °C   |
| 3a         | <b>Sonda de ratinho:</b> Liga-se a anticorpos monoclonais de ratinho                                                                                                                     | 2–8 °C   |
| 3b         | <b>Reagente polimérico:</b> Polímero conjugado com peroxidase de rábano que se liga ao reagente de sonda de ratinho                                                                      | 2–8 °C   |
| 4a         | <b>Tampão substrato DAB:</b> Tampão substrato utilizado na preparação do cromogénio DAB                                                                                                  | 2–8 °C   |
| 4b         | <b>DAB:</b> Solução de cromogénio de 3,3'-diaminobenzidina                                                                                                                               | 2–8 °C   |
| 5          | <b>Hematoxilina:</b> Hematoxilina de Mayer de base aquosa                                                                                                                                | 15–30 °C |
| 6          | <b>Agente de Bluing:</b> Soro fisiológico tamponado Tris com Tween 20 e NaN <sub>3</sub> a 0,09%                                                                                         | 15–30 °C |

### MATERIAIS E REAGENTES NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

- Toalhetes absorventes
- **BD SureDetect** SiHa Cell Line (Linha celular)
- Água desionizada ou destilada
- Etanol (95% e 100%)
- Lamelas de vidro
- Luvas
- Câmara húmida
- Microscópio ótico (objetivas de 10x, 20x [opcional], 40x)
- Meio de montagem
- Pipetas e pontas de pipeta (com capacidade para administrar volumes de 20 µL, 200 µL e 1000 µL)
- **BD SureDetect** Slide Preparation Buffer 10X (Tampão de preparação de lâminas, tampão de pré-tratamento)
- Frascos ou banhos de coloração
- Cronómetro (com intervalos de 1 a 60 minutos)
- Soro fisiológico tamponado Tris (TBS)
- Tween 20
- Controlo negativo de IgG de rato universal
- Dispositivo de vórtex
- Xilol ou substitutos de xilol
- Estufa de vapor/banho-maria

## ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

**490500 SurePath with ProEx C Immunocytochemical Counterstains** (Contrastantes imunocitoquímicos)

### Atenção



**H302** Nocivo por ingestão. **H315** Provoca irritação cutânea. **H319** Provoca irritação ocular grave.

**P264** Lavar cuidadosamente após manuseamento. **P280** Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. **P301+P312** "EM CASO DE INGESTÃO: caso sinta indisposição, contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico." **P302+P352** SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar com sabonete e água abundantes. **P305+P351+P338** "SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar." **P501** Eliminar o conteúdo/recipiente de acordo com os regulamentos locais/regionais/nacionais/internacionais.

**490501 SurePath with ProEx C Immunocytochemical Test Kit** (Kit do teste imunocitoquímico)

### Perigo



**H341** Suspeito de provocar anomalias genéticas. **H350** Pode provocar cancro.

**P281** Usar o equipamento de proteção individual exigido. **P308+P313** EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: consulte um médico. **P405** Armazenar em local fechado à chave. **P501** Eliminar o conteúdo/recipiente de acordo com os regulamentos locais/regionais/nacionais/internacionais.

## PRECAUÇÕES

1. Para uso diagnóstico *in vitro*.
2. As lâminas **SurePath** preparadas devem ser colocadas no tampão de pré-tratamento assim que acabarem de ser preparadas. As lâminas devem permanecer no tampão de pré-tratamento durante, no mínimo, 1 hora, mas não mais de 72 horas antes do procedimento de imunocitoquímica.
3. Não permita que as lâminas sequem em nenhum momento durante o procedimento. Caso se permita que as lâminas sequem durante o procedimento, tal poderá resultar num aumento da coloração de fundo.
4. As amostras e todos os materiais expostos às amostras deverão ser manuseados como materiais passíveis de transmitir infecções e devem ser eliminados com as devidas precauções. Nunca pipete os reagentes com a boca e evite o contacto da pele e membranas mucosas com os reagentes e as amostras. Se os reagentes entrarem em contacto com áreas sensíveis, lave com água abundante.
5. Minimize a contaminação microbiana dos reagentes para evitar uma coloração não específica.
6. A utilização de tempos e temperaturas de incubação ou de métodos diferentes dos especificados podem originar resultados erróneos.
7. Os reagentes foram diluídos para proporcionar um desempenho ideal. Uma diluição adicional pode resultar na perda de coloração do antígeno.
8. Os componentes do kit são específicos do lote. Não substitua os componentes do kit por números de lotes de diferentes fabricantes. Os números dos lotes são apresentados nas etiquetas das embalagens.
9. Não utilize o **SurePath with ProEx C Test Kit** depois do prazo de validade impresso na embalagem. O utilizador deverá validar as condições efetivas, caso os reagentes sejam conservados em condições diferentes das especificadas no folheto informativo.
10. Não existem quaisquer sinais óbvios que indiquem a degradação deste produto. Por conseguinte, devem processar-se simultaneamente controlos positivos e negativos em conjunto com as amostras das doentes. Se se observar uma coloração imprevista, que não possa ser explicada pelas variações dos procedimentos laboratoriais, ou houver suspeita de uma anomalia no **SurePath with ProEx C Test Kit**, contacte a assistência técnica da BD.

11. Utilize equipamento de proteção pessoal adequado para evitar o contacto do reagente com a pele e os olhos. Consulte a Ficha de Dados de Segurança do Material (MSDS) para obter informações adicionais.
12. O **SurePath with ProEx C Test Kit** destina-se a ser utilizado em amostras de citologia do colo do útero colhidas em **SurePath Preservative Fluid**. A compatibilidade com preparações convencionais e de uma única camada que não sejam **SurePath** ainda não foi avaliada.

## INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

### Preparação das amostras

Consulte o Manual do Utilizador do **BD PrepStain Slide Processor** (Processador de lâminas) para obter as instruções para a preparação de lâminas provenientes de amostras residuais **SurePath** de citologia do colo do útero.

Adicione 8 mL de **SurePath Preservative Fluid** à amostra residual no frasco **SurePath** (aprox. 2 mL). A amostra diluída deverá ser processada no instrumento **BD PrepMate** utilizando a técnica padrão e no instrumento **BD PrepStain**.

As lâminas **SurePath** preparadas devem ser colocadas no **BD SureDetect Slide Preparation Buffer 10X** assim que acabarem de ser preparadas (consulte o folheto informativo do **BD SureDetect Slide Preparation Buffer** para obter instruções sobre a preparação de uma solução de trabalho para as lâminas). As lâminas devem permanecer no tampão durante, no mínimo, 1 hora, mas não mais de 72 horas antes do procedimento de imunocitoquímica.

Para obter um desempenho ideal do kit, deve utilizar-se um procedimento de recuperação do epítipo. Este procedimento envolve embeber as lâminas preparadas numa solução de trabalho do **BD SureDetect Slide Preparation Buffer** durante um período mínimo de 1 hora à temperatura ambiente, após o qual as lâminas são aquecidas no tampão de pré-tratamento a uma temperatura de 95 °C. As lâminas são mantidas a uma temperatura de 95 °C durante 15 minutos e devem ser deixadas arrefecer à temperatura ambiente durante 20 minutos. Recomenda-se a utilização de um banho-maria calibrado ou de uma estufa de vapor capaz de manter a temperatura necessária. Os laboratórios situados em locais mais elevados deverão determinar o melhor método de manter a temperatura necessária. O procedimento de coloração deverá ser iniciado imediatamente após a recuperação do epítipo e período de arrefecimento. Os desvios ao procedimento descrito podem afetar adversamente os resultados.

### Preparação dos reagentes

Prepare os seguintes reagentes antes de proceder à coloração.

- Soro fisiológico tamponado Tris com Tween 20 a 0,05% (TBST)
  - Prepare o TBS de acordo com as especificações do fabricante.
  - Caso ainda não esteja incluído no TBS, adicione Tween 20 para obter uma concentração final de 0,05%.
- Solução substrato-cromogénio (DAB) (volume suficiente para 5 lâminas)
  - Transfira 1 mL de tampão substrato DAB (frasco 4a) para um tubo de ensaio.
  - Adicione uma gota (20–30 µL) de cromogénio DAB (frasco 4b). Homogeneíze bem e aplique nas lâminas com uma pipeta.
  - Prepare uma nova solução de substrato-cromogénio diariamente.
  - A qualidade da coloração não é afetada pelo precipitado que pode desenvolver-se na solução.

## PROTOCOLO DE COLORAÇÃO (EFETUADO À TEMPERATURA AMBIENTE, A 20–25 °C)

### Notas acerca do procedimento de coloração

- Leia atentamente todas estas instruções e familiarize-se com todos os componentes antes da respetiva utilização (consulte Precauções).
- Antes da imunocoloração, todos os reagentes devem estar à temperatura ambiente (20–25 °C).
- Todas as incubações devem ser efetuadas à temperatura ambiente, salvo indicação em contrário.
- Durante o procedimento de coloração, não permita a secagem das lâminas. As preparações celulares secas poderão apresentar um aumento da coloração não específica. Proteja as lâminas que possam ser expostas a correntes de ar. As lâminas devem ser colocadas numa câmara húmida para incubações prolongadas.

### Recuperação do epítipo

- Coloque as lâminas preparadas num frasco Coplin contendo uma solução de trabalho de **BD SureDetect** Slide Preparation Buffer durante um período mínimo de 1 hora, até um máximo de 72 horas.
- Proceda à incubação em banho-maria ou estufa de vapor durante 15 minutos a uma temperatura de 95 °C.
- Retire o frasco Coplin com as lâminas do banho-maria ou da estufa de vapor e deixe as lâminas arrefecer no tampão durante 20 minutos.
- Lave as lâminas com H<sub>2</sub>O desionizada e transfira para um frasco Coplin limpo que contenha TBST.

### Reagente de bloqueio

- Remova o tampão em excesso com pequenas pancadas.
- Coloque as lâminas numa câmara húmida preparada (cheia de gaze ou toalhetes de papel absorvente humedecidos com água).
- Aplique 200 µL de reagente de bloqueio da peroxidase (frasco 1a) de modo a cobrir a área de deposição de células.
- Deixe incubar durante 5 minutos (±1 minuto).
- Lave as lâminas em TBST, 3 banhos, 2 minutos cada.

### Bloqueador de proteínas

- Remova o tampão em excesso com pequenas pancadas.
- Coloque as lâminas na câmara húmida preparada (cheia de gaze ou toalhetes de papel absorvente humedecidos com água).
- Aplique 200 µL de bloqueador de proteínas (frasco 1b) de modo a cobrir completamente a área de deposição de células.
- Deixe incubar durante 5 minutos (±1 minuto).
- NÃO LAVAR.

### Cocktail de anticorpos primário

- Remova o bloqueador de proteínas em excesso com pequenas pancadas.
- Coloque as lâminas na câmara húmida preparada (cheia de gaze ou toalhetes de papel absorvente humedecidos com água).
- Aplique 200 µL de **ProEx C** Ab Cocktail (frasco 2) de modo a cobrir completamente a área de deposição de células.
- Deixe incubar durante 30 minutos à temperatura ambiente.
- Lave cada lâmina individualmente com TBST utilizando um frasco de lavagem (o fluxo não deve incidir diretamente sobre a área de deposição de células). Coloque as lâminas num suporte de lâminas.
- Lave as lâminas em TBST, 3 banhos, 2 minutos cada.

### Química de deteção

- Remova o tampão em excesso com pequenas pancadas.
- Coloque as lâminas na câmara húmida preparada (cheia de gaze ou toalhetes de papel absorvente humedecidos com água).
- Aplique 200 µL de reagente de sonda de ratinho (frasco 3a) de modo a cobrir completamente a área de deposição de células.
- Deixe incubar durante 20 minutos (±1 minuto).
- Lave as lâminas em TBST, 3 banhos, 2 minutos cada.
- Remova o tampão em excesso com pequenas pancadas.
- Coloque as lâminas na câmara húmida preparada (cheia de gaze ou toalhetes de papel absorvente humedecidos com água).
- Aplique 200 µL de reagente polimérico (frasco 3b) de modo a cobrir completamente a área de deposição de células.
- Deixe incubar durante 20 minutos (±1 minuto).
- Lave as lâminas num banho de TBST, 3 banhos, 2 minutos cada.
- Remova o tampão em excesso com pequenas pancadas.
- Coloque as lâminas na câmara húmida preparada (cheia de gaze ou toalhetes de papel absorvente humedecidos com água).
- Aplicar 200 µL de solução de substrato-cromogénio (DAB) de modo a cobrir completamente a área de deposição de células.
- Deixe incubar durante 5 minutos (±1 minuto).
- Lave as lâminas com H<sub>2</sub>O desionizada durante 5 minutos.

### Contrastante

- Lave as lâminas em TBST, 1 banho durante 2 minutos.
- Coloque as lâminas na câmara húmida preparada (cheia de gaze ou toalhetes de papel absorvente humedecidos com água).

- Aplique 200 µL de contrastante Hematoxilina (frasco 5) de modo a cobrir completamente a área de deposição de células.
- Deixe incubar durante 1 minuto (±10 segundos).
- Lave as lâminas com H<sub>2</sub>O corrente durante 3 minutos.
- Coloque as lâminas na câmara húmida preparada (cheia de gaze ou toalhetes de papel absorvente humedecidos com água).
- Proceda ao azulamento das lâminas aplicando 200 µL de agente de Bluing (frasco 6) durante 1 minuto (±10 segundos).
- Repita a lavagem em água corrente durante 1 minuto.

### Montagem

- Mergulhe as lâminas em etanol a 95%, durante 1 minuto ou 25 vezes.
- Mergulhe as lâminas em álcool absoluto, 4 banhos, 1 minuto cada ou 25 vezes.
- Limpe com xilol, 3 banhos, 1 minuto cada ou 25 imersões.
- Aplique lamelas de vidro nas lâminas, utilizando meios de montagem permanentes não aquosos.

### CONSERVAÇÃO

O prazo de conservação do **SurePath with ProEx C** Immunocytochemical Test Kit (reagentes de anticorpo e de deteção) é de 12 meses a partir da data de fabrico, a 2–8 °C.

O prazo de conservação do **SurePath with ProEx C** Immunocytochemical Test Counterstains (reagentes de Hematoxilina e Bluing) é de 12 meses a partir da data de fabrico, a 15–30 °C.

Uma vez aberto o frasco, os reagentes permanecem estáveis durante trinta (30) dias quando conservados às temperaturas recomendadas. Não utilize os reagentes depois de expirar a data de validade indicada no rótulo.

### CONTROLO DE QUALIDADE

A variabilidade nos resultados deriva frequentemente de diferenças no manuseamento das amostras, que se desviam dos procedimentos de teste recomendados. Consulte as diretrizes de controlo de qualidade propostas pelo Clinical and Laboratory Standards Institute, *Quality Assurance for Immunocytochemistry* (Garantia de qualidade em imunocitoquímica), para obter mais informações.

O **BD SureDetect** SiHa Cell Control (Controlo de células SiHa) é disponibilizado como um controlo positivo pela BD Diagnostics. Cada frasco contém uma linha celular de cancro do colo do útero, processada de forma semelhante às amostras clínicas. Como controlo negativo, pode utilizar-se o controlo universal negativo de IgG de ratinho. Em cada procedimento de coloração deverá ser incluída uma lâmina de controlo positivo e negativo. Os resultados da coloração deverão ser utilizados como indicação da validade do processo de coloração.

### INTERPRETAÇÃO DA COLORAÇÃO

**Amostras de doentes e de controlo:** Um técnico de citologia ou um patologista deverá avaliar as lâminas coradas utilizando um microscópio ótico. As células podem ser revistas manualmente ou guardadas numa galeria de imagens eletrónicas obtidas a partir de um microscópio ótico.

**Lâminas de controlo:** As lâminas de controlo positivo e negativo deverão ser examinadas antes da respetiva revisão das amostras das doentes, de modo a assegurar que todos os reagentes funcionaram devidamente. A presença de um produto de reação castanho (3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorato, DAB) no núcleo de uma lâmina de controlo de células SiHa, corada por meio do **SurePath with ProEx C** Test, é indicadora de reatividade positiva. A lâmina de controlo negativo universal de IgG de ratinho, corada por meio do **SurePath with ProEx C** Test, não deve apresentar quaisquer núcleos de coloração castanha e só deverá apresentar coloração com a aplicação do contrastante hematoxilina.

**A classificação das lâminas é um processo composto por 4 passos.**

#### Passo 1: A amostra é adequada?

O Bethesda System (TBS) for Reporting Cervical Cytology (Relatórios de diagnóstico citológico do colo do útero) (2ª Ed.) refere: "Uma preparação adequada de base líquida deverá apresentar, no mínimo, uma estimativa de 5000 células escamosas bem visualizadas/bem conservadas." O mesmo critério deverá ser aplicado às lâminas **SurePath with ProEx C**. Todavia, tal como sucede com uma preparação citológica de rotina, qualquer amostra com células anormais que evidencie uma reação molecular positiva é, por definição, satisfatória para avaliação. Se a resposta a este passo for "sim", avance para o passo seguinte; se a resposta for "não", o resultado é **Insatisfatório para avaliação**.

**Passo 2: Verifica-se uma coloração nuclear castanha moderada a intensa nas células epiteliais?**

Para responder “sim” a este passo, é necessário verificar se existe alguma coloração castanha que seja facilmente visualizada. Se for detetado apenas um ligeiro vestígio de castanho, isto não é suficiente para garantir uma classificação positiva. Se não se detetar qualquer coloração nuclear castanha, o resultado é comunicado como **Negativo**. Se for visualizada uma coloração castanha adequada, avance para o passo seguinte.

**Passo 3: A célula com uma coloração nuclear castanha é uma célula escamosa ou glandular?**

Se a resposta for sim, avance para o passo seguinte. Se a resposta for não, o resultado do teste é **Negativo**.

**Passo 4: A célula é ≥ASC (célula escamosa atípica) ou AGC (célula glandular atípica)?**

Utilize os mesmos critérios morfológicos descritos em The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology (2ª Ed.) para determinar se a célula escamosa que contém o núcleo castanho é ≥ASC (células escamosas atípicas). Se a célula for considerada ≥ASC (ou ≥AGC), isso significa que o resultado do teste é **Positivo**. Isto inclui células ASC-US, ASC-H, LSIL, HSIL e cancerígenas. Se a célula for glandular em termos de aspeto, aplicam-se os critérios TBS para determinar se a célula é ≥AGC (células glandulares atípicas). Isto inclui AGC endocervical, AGC endométrica, AIS e adenocarcinoma. Se a célula em questão for consistente com um caso de NILM (negativo quanto a lesão ou malignidade intraepitelial), o resultado do teste é **Negativo**.

**BIBLIOGRAFIA** Consulte “References” no texto em Inglês.

Assistência Técnica e Suporte da BD Diagnostics: contacte o representante local da BD ou visite [www.bd.com/ds](http://www.bd.com/ds).

REF

Catalog number / Каталоген номер / Katalogové číslo / Katalognummer / Αριθμός καταλόγου / Número de catálogo / Katalooginumber / Numéro catalogue / Kataloški broj / Katalógusszám / Numero di catalogo / Каталог номери / Katalogo numeris / Kataloga numurs / Catalogus nummer / Numer katalogowy / Număr de catalog / Номер по каталогу / Katalógové číslo / Kataloški broj / Katalog numarası / Номер за каталогом

IVD

*In vitro* Diagnostic Medical Device / Медицински уред за диагностика ин витро / Lékařské zařízení určené pro diagnostiku *in vitro* / *In vitro* diagnostisk medicinsk anordning / Medizinisches In-vitro-Diagnostikum / *In vitro* διαγνωστική ιατρική συσκευή / Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro* / *In vitro* diagnostika meditsiinaparatuur / Dispositif médical de diagnostic *in vitro* / Medicinska pomagala za *In vitro* Diagnostiku / *In vitro* diagnosztikai orvosi eszköz / Dispositivo medicale per diagnostica *in vitro* / Жасанды жағдайда жүргізілетін медициналық диагностика аспабы / *In vitro* diagnostikos prietaisai / Medicinas ierīces, ko lieto *in vitro* diagnostikā / Medisch hulpmiddel voor *in-vitro* diagnostiek / *In vitro* diagnostisk medisinsk utstyr / Urządzenie medyczne do diagnostyki *in vitro* / Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro* / Dispozitiv medical pentru diagnostic *in vitro* / Медицинский прибор для диагностики *in vitro* / Medicinska pomôcka na diagnostiku *in vitro* / Medicinski uređaj za *in vitro* dijagnostiku / Medicinteknisk produkt för *in vitro*-diagnostik / In Vitro Diyagnostik Tibbi Cihaz / Медицинский пристрій для діагностики *in vitro*



Consult Instructions for Use / Направете справка в инструкциите за употреба / Prostudujte pokyny k použití / Se brugsanvisningen / Gebrauchsanweisung beachten / Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης / Consultar las instrucciones de uso / Lügeda kasutusjuhendit / Consulter la notice d'emploi / Koristi upute za upotrebu / Olvassa el a használati utasítást / Consultare le istruzioni per l'uso / Пайдалану нұсқаулығымен танысып алыңыз / Skaitykite naudojimo instrukcijas / Skatīt lietošanas pamācību / Raadpleeg de gebruiksaanwijzing / Se i brugsanvisningen / Zobacz instrukcja użytkowania / Consultar as instruções de utilização / Consultați instrucțiunile de utilizare / См. руководство по эксплуатации / Pozri Pokyny na používanie / Pogledajte uputstvo za upotrebu / Se brugsanvisningen / Kullanım Talimatları na başvurun / Див. інструкції з використання



Contains sufficient for <n> tests / Съдържанието е достатъчно за <n> теста / Dostatečné množství pro <n> testů / Indeholder tilstrækkeligt til <n> tests / Ausreichend für <n> Tests / Περιέχει επαρκή ποσότητα για <n> εξετάσεις / Contenido suficiente para <n> pruebas / Küllaldane <n> testide jaoks / Contenu suffisant pour <n> tests / Sadržaj za <n> testova / <n> teszthez elegendő / Contenuto sufficiente per <n> test / <n> тесттәрі үшін жеткілікті / Pakankamas kiekis atlikti <n> testų / Satur pietiekami <n> pārbaudēm / Inhoud voldoende voor "n" testen / Innholder tilstrekkelig til <n> tester / Zawiera ilość wystarczającą do <n> testów / Conteúdo suficiente para <n> testes / Conținut suficient pentru <n> teste / Достаточо для <n> тестов(а) / Obsah vystačí na <n> testov / Sadržaj dovoljan za <n> testova / Innehåller tillräckligt för <n> analyser / <n> test için yeterli malzeme içerir / Вистачить для аналізів: <n>



Temperature limitation / Температурни ограничения / Teplovní omezení / Temperaturbegrænsning / Temperaturbegrenzung / Περιορισμοί θερμοκρασίας / Limitación de temperatura / Temperaturi piirang / Limites de température / Dozvoljena temperatura / Hőmérsékleti határ / Limiti di temperatura / Температураны шектеу / Laikymo temperatūra / Temperatūras ierobežojumi / Temperatuurlimiet / Temperaturbegrensning / Ograniczenie temperatury / Limites de temperatura / Limite de temperatură / Ограничение температуры / Ohraničenje teploty / Ograničenje temperature / Temperaturgräns / Sicaklık sınırlaması / Обмеження температури

LOT

Batch Code (Lot) / Код на партидата / Kód (číslo) šarže / Batch-kode (lot) / Batch-Code (Charge) / Κωδικός παρτίδας (παρτίδα) / Código de lote (lote) / Partii kood / Numéro de lot / Lot (kod) / Tétel száma (Lot) / Codice batch (lotto) / Топтама коды / Partijos numeris (LOT) / Partijas kods (laidiens) / Lot nummer / Batch-kode (parti) / Kod partii (seria) / Código do lote / Cod de serie (Lot) / Код партии (лот) / Kód série (šarža) / Kod serije / Partinummer (Lot) / Parti Kodu (Lot) / Код партії



Use by / Използвайте до / Spotřebujte do / Brug før / Verwendbar bis / Χρήση έως / Usar antes de / Kasutada enne / Date de péremption / Upotrijebiti do / Felhasználhatóság dátuma / Usare entro / Дейин пайдаланура / Naudokite iki / Izlietot līdz / Houdbaar tot / Brukes før / Stosować do / Prazo de validade / A se utiliza până la / Использовать до / Použít do / Upotrebiti do / Använd före / Son kullanma tarihi / Використати до/line  
YYYY-MM-DD / YYYY-MM (MM = end of month)  
ГГГГ-ММ-ДД / ГГГГ-ММ (ММ = края на месеца)  
RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec miesiąca)  
AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = slutning af måned)  
JJJJ-MM-TT / JJJJ-MM (MM = Monatsende)  
EEEE-MM-HH / EEEE-MM (MM = τέλος του μήνα)  
AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = fin del mes)  
AAAA-KK-PP / AAAA-KK (KK = kuu lõpp)  
AAAA-MM-JJ / AAAA-MM (MM = fin du mois)  
GGGG-MM-DD / GGGG-MM (MM = kraj mjeseca)  
ÉÉÉÉ-HH-NN / ÉÉÉÉ-HH (HH = hónap utolsó napja)  
AAAA-MM-GG / AAAA-MM (MM = fine mese)  
ЖЖЖЖ-АА-КК / ЖЖЖЖ-АА / (АА = айдын соңы)  
MMMM-MM-DD / MMMM-MM (MM = mėnesio pabaiga)  
GGGG-MM-DD/GGGG-MM (MM = mēneša beigās)  
JJJJ-MM-DD / JJJJ-MM (MM = einde maand)  
AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = sluttet av måneden)  
RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec miesiąca)  
AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = fim do mês)  
AAAA-LL-ZZ / AAAA-LL (LL = sfârșitul lunii)  
ГГГГ-ММ-ДД / ГГГГ-ММ (ММ = конец месяца)  
RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec miesiąca)  
GGGG-MM-DD / GGGG-MM (MM = kraj meseca)  
AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = sluttet av månaden)  
YYYY-AA-GG / YYYY-AA (AA = ayın sonu)  
PPPP-MM-DD / PPPP-MM (MM = кінець місяця)



Manufacturer / Производител / Výrobce / Fabrikant / Hersteller / Κατασκευαστής / Fabricante / Tootja / Fabricant / Proizvođač / Gyártó / Fabbicante / Аткарушы / Gamintojas / Ražotājs / Tilvirker / Producent / Producător / Производитель / Výrobca / Proizvođač / Tillverkare / Üretici / Виробник



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



Benex Limited  
Pottery Road, Dun Laoghaire  
Co. Dublin, Ireland

**Australian Sponsor:**

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](http://www.millennium.com)

Detection Reagents supplied by



BioCare Medical  
4040 Pike Ln.  
Concord, CA 94520

BD, BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company. © 2015