

REAGENSBESCHRIJVING**Kloon** MCM2 26H6.19, MCM2 27C5.6, TOP2A SWT3D1**Ig-klasse** IgG₁**Immunogeen** Recombinant Humaan MCM2 en TOP2A**1. BEOOGD GEBRUIK**

Voor in-vitrodiagnostiek.

Voor gebruik met geautomatiseerde kleuring op de Ventana Benchmark[®] XT met behulp van de iView[™]-detectiechemie.

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

2. SAMENVATTING EN UITLEG

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

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

3. GELEVERD REAGENS

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

4. PRINCIPES VAN DE PROCEDURE

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

5. VEREISTE MAAR NIET BIJGELEVERDE MATERIALEN EN REAGENTIA (voor Ventana Benchmark[®] XT-procedure)

- 10X reactiebuffer – Cat # 950-300 2L (Ventana Medical Systems)
- LCS (Liquid Coverslip) – Cat # 650-010 2L (Ventana Medical Systems)
- 10X SSC – Cat # 950-110 2L (Ventana Medical Systems)
- EZ Prep – Cat # 950-102 2L (Ventana Medical Systems)
- CC1 (celconditionering) – Cat # 950-124 2L (Ventana Medical Systems)
- iView[™] DAB-detectiekit – Cat # 760-091 (Ventana Medical Systems)
- Amplification Kit (A&B) – Cat # 760-080 (Ventana Medical Systems)
- Prep Kit Dispenser met Prep Kit Button – Cat # 786-3034 (Ventana Medical Systems)
- Hematoxyline – Cat # 760-2021 (Ventana Medical Systems)
- Blauwkleurend reagens – Cat # 760-2037 (Ventana Medical Systems)
- Glazen objectglaasjes (SuperFrost[®] Plus of gelijkwaardig)
- Preparatiemedium (Acrytol[®] of gelijkwaardig)
- Timer (met mogelijkheid voor intervallen van 1-60 minuten)
- Gedistilleerd H₂O
- Ethanol 95%, 100%

- Glazen dekglasjes
- Markeerstift voor het laboratorium
- 20 L flessen (Nalgene[®] of gelijkwaardig)
- Objectglaasjesdroger
- Objectglaasjesrek met kleuringschaaltjes
- Xyleen of xyleenvervangers
- Lichtmicroscop (10x, 20x (optioneel), 40x objectieven)

6. VOORZORGSMAATREGELEN**6.1. Voor in-vitrodiagnostiek.**

6.2. Het reinigen van objectglaasjes met gebruik van xyleen moet gebeuren onder een goedgekeurde afzuigkap voor giftige gassen.

6.3. Het ProEx[™] C-antilichaamreagens bevat natriumazide (NaN₃), een chemische stof die in zuivere vorm uiterst giftig is. Hoewel natriumazide in productconcentraties niet wordt geclassificeerd als gevaarlijk, kan het toch reageren met loden en koperen leidingen, waarbij uiterst explosieve metaalaziden worden gevormd. Bij het afvoeren spoelen met ruime hoeveelheden water om ophoping van metaalaziden in de leidingen te voorkomen.

6.4. DAB (3,3'-diaminobenzidine) is geclassificeerd als vermoedelijk carcinogeen. Vermijd lichamelijk contact en langdurige of herhaalde blootstelling. Gebruik onder een goedgekeurde afzuigkap voor giftige gassen.

6.5. Monsters en alle aan monsters blootgestelde materialen dienen te worden behandeld als potentiële overdragers van infecties en met inachtneming van de juiste voorzorgsmaatregelen te worden verwijderd. Reagentia nooit met de mond pipetteren en contact van reagentia en monsters met de huid en slijmvliezen vermijden. Indien reagentia in contact komen met gevoelige plekken op het lichaam, dient u deze met een ruime hoeveelheid water te wassen.

6.6. Beperk microbiële verontreiniging van reagentia tot een minimum om niet-specifieke kleuring te vermijden.

6.7. Andere incubatietijden, -temperaturen of -methoden dan vermeld kunnen leiden tot onjuiste resultaten.

6.8. Gebruik het ProEx[™] C-antilichaamreagens niet na de uiterste gebruiksdatum die op de verpakking vermeld staat. Als reagentia bewaard worden onder andere omstandigheden dan vermeld in de productbijsluiters, moeten de omstandigheden door de gebruiker worden gecontroleerd.

6.9. Draag de juiste beschermende uitrusting om contact van reagentia met ogen en huid te vermijden. Zie het veiligheidsinformatieblad voor verdere informatie.

7. INSTRUCIES VOOR GEBRUIK**7.1. Voorbereiding van het monster**

7.1.1. Snijd coupes van 4 µm uit het weefselblokje en plaats de coupes op SuperFrost[®] Plus glazen objectglaasjes.

7.1.2. Voorzie de objectglaasjes van een etiket.

7.1.3. Laat de objectglaasjes gedurende 20 minuten drogen in een heteluchtoven. Als de objectglaasjes al droog zijn, breng ze dan in contact met een Histo-Oriënter totdat de paraffine smelt.

7.2. Voorbereiding reagens voor de Ventana Benchmark[®] XT

Opmerking: Zie de instructies van de fabrikant.

7.2.1. 10X reactiebuffer

7.2.1.1. Neem een nieuwe fles van het 10X reactiebufferconcentraat.

7.2.1.2. Voeg 1 (een) fles 10X reactiebufferconcentraat toe aan 18 liter gedistilleerd water. Goed mengen.

7.2.1.3. Vul de EZ Prep-fles #4 op de Benchmark[®] XT. Controleer of de pH tussen 6,5 – 7,1 ligt.

7.2.2. EZ Prep (10X) – deparaffineringsoplossing

7.2.2.1. Neem een nieuwe fles EZ Prep-concentraat.

7.2.2.2. Voeg 1 (een) fles EZ Prep-concentraat toe aan 18 liter gedistilleerd water. Goed mengen.

7.2.2.3. Vul de EZ Prep-fles #1 op de Benchmark[®] XT. Controleer of de pH tussen 6,90 – 7,2 ligt.

7.2.3. SSC (10X)

7.2.3.1. Neem 2 (twee) flessen SSC-concentraat.

7.2.3.2. Voeg 2 (twee) flessen SSC-concentraat toe aan 16 liter gedistilleerd water. Goed mengen.

7.2.3.3. Vul de SSC-fles #3 op de Benchmark[®] XT. Controleer of de pH tussen 7,1 – 7,5 ligt.

7.2.4. Vulbare Prep Kit

7.2.4.1. Neem Prep Kit Button

7.2.4.2. Vul de Prep Kit Dispenser conform de instructies van de fabrikant.

7.3. Opmerkingen kleuringsprocedure

- 7.3.1. Dit protocol is voor gebruik met geautomatiseerde kleuring op de Ventana Benchmark® XT met behulp van de iView™-detectiechemie.
- 7.3.2. Laat de objectglaasjes tijdens de procedure niet uitdrogen. Objectglaasjes die tijdens de procedure hebben kunnen uitdrogen, kunnen meer achtergrondkleuring vertonen.

8. GEAUTOMATISEERD KLEURINGS-PROTOCOL (voor de Ventana Benchmark® XT)

- 8.1. Zet de kleuringsmodule op de Ventana Benchmark® XT aan en start de software. Zie de bedieningsinstructies voor de Ventana Benchmark® XT van de fabrikant.
- 8.2. Selecteer de volgende protocolparameters op de Benchmark® XT-software.
- 8.2.1. Paraffine (geselecteerd)
 - 8.2.2. Deparaffineren (geselecteerd)
 - 8.2.3. Celconditionering (geselecteerd)
 - 8.2.4. Conditioner #1 (geselecteerd)
 - 8.2.5. Lichte CC1 (geselecteerd)
 - 8.2.6. Standaard CC1 (geselecteerd)
 - 8.2.7. Uitgebreide CC1 (geselecteerd)
 - 8.2.8. Ab incubatietemperaturen (geselecteerd)
 - 8.2.9. 37 C Ab. Inc. (geselecteerd)
 - 8.2.10. Antilichaam (geselecteerd)
 - 8.2.11. Gebruik 1 druppel [PREP KIT 100] (antilichaam) en incubeer gedurende (1 uur).
 - 8.2.12. Versterken (geselecteerd)
 - 8.2.13. Tegenkleuring (geselecteerd)
 - 8.2.14. Gebruik 1 druppel [hematoxyline] (tegenkleuring), gebruik dekglasje en incubeer gedurende (8 minuten).
 - 8.2.15. Tegenkleuring achteraf (geselecteerd)
 - 8.2.16. Gebruik 1 druppel [blauwkleurend reagens] (tegenkleuring achteraf), gebruik dekglasje en incubeer gedurende (4 minuten).
- 8.3. Noteer alle in het assay gebruikte reagentia.
- 8.4. Bepaal het aantal te kleuren objectglaasjes (inclusief controles).
- 8.5. Selecteer of maak etiketten voor elk objectglaasje en zorg ervoor dat het etiket overeenkomt met één enkel kleuringsprotocol.
- 8.6. Voorzie elk objectglaasje van het bijbehorende etiket.
- 8.7. Laad de objectglaasjes in de objectglaasjescarrousel.
- 8.8. Laad de reagensdispensers en plaats de reagensbak op de reagenscarrousel.
- 8.9. Vul de bulkreagensflessen.
- 8.10. Controleer de afvalmoduleflus en maak deze indien nodig leeg.
- 8.11. Selecteer 'RUN' op het hoofdcomputerscherf van de Benchmark® XT om de kleuring te beginnen.
- 8.12. Maak na voltooiing van de run een uitdraai van de protocolsamenvatting en kleuringsrunverslagen.
- 8.13. Haal de objectglaasjes uit het instrument en spoel de objectglaasjes in zeepwater gedurende 3-5 minuten of totdat er geen restanten van Liquid Coverslip meer zichtbaar zijn.
- 8.14. Dehydrateer de objectglaasjes.
- 8.14.1. Dompel de objectglaasjes onder in 95% ethanol, gedurende 1 minuut of 25 onderdempelingen.
 - 8.14.2. Dompel de objectglaasjes onder in absolute alcohol, in 4 wisselbeurten van elk 1 minuut of 25 onderdempelingen.
 - 8.14.3. Reinig met xyleen, in 3 wisselbeurten van elk 1 minuut of 25 onderdempelingen.
- 8.15. Bedek de objectglaasjes met glazen dekglasjes met een niet-waterig, permanent preparatiemedium.

9. STABILITEIT

- 9.1. Ongeopende reagentiaflacons zijn stabiel tot de op de flacon vermelde uiterste gebruiksdatum, mits bewaard bij de aanbevolen temperaturen.
- 9.2. Na opening zijn de reagentia stabiel gedurende negentig (90) dagen, mits bewaard bij de aanbevolen temperaturen.

10. KWALITEITSCONTROLE

- 10.1. Variabiliteit in de resultaten is vaak te wijten aan verschillen in monsterbehandeling, die afwijkt van de aanbevolen testprocedures. Raadpleeg de richtlijnen voor kwaliteitscontrole van het College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry voor aanvullende informatie.
- 10.2. Gebruik met elke kleuringsrun een positieve weefselcontrole om de werking van het assay te controleren. Als de positieve weefselcontrole geen positieve kleuring vertoont, moeten de resultaten met de andere testmonsters als verdacht of ongeldig worden beschouwd.
- 10.3. Gebruik met elke kleuringsrun een negatief controleweefsel om de specificiteit van de primaire antistof te controleren en een indicatie van specifieke achtergrondkleuring te krijgen. Als de negatieve weefselcontrole een positieve specifieke kleuring vertoont, moeten de resultaten met de andere testmonsters als verdacht of ongeldig worden beschouwd.
- 10.4. Voor de evaluatie van niet-specifieke of achtergrondkleuring kan in plaats van de primaire antistof ook een niet-specifiek negatieve controle-reagens worden gebruikt.

11. INTERPRETATIE

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

12. BEPERKINGEN

- 12.1. Immunohistochemische kleuring vereist speciale training voor de selectie en toepassing van reagentia.
- 12.2. Met dit reagens kunnen 50 tests worden uitgevoerd op basis van 100 µL reagens per objectglaasje.
- 12.3. Sommige normale cellen kunnen positief kleuren voor afwijkende S-fase-inductie.
- 12.4. Optimale weefselkleuring is afhankelijk van de fixatie en verwerking van het monster.
- 12.5. Niet-specifieke of toegenomen achtergrondkleuring kan zich voordoen als gevolg van, maar niet beperkt tot, variaties in de procedure, inadequate spoeling tussen assaystappen en/of niet correct verwerkte monsters.

13. PROBLEEMOPLOSSING

Probleem	Mogelijke oorzaak	Actie
Geen kleuring op objectglaasjes positieve controle	Reagentia niet in de juiste volgorde gebruikt.	Bekijk kleuringsprotocol opnieuw.
	Weglaten van een reagens.	Herhaal kleuringsprotocol.
Zwakke kleuring op positieve objectglaasjes	Onvoldoende antigeenversterking.	Controleer incubatietijden en temperatuur antigeen/epitoooversterkingsbuffer
	Verkeerde antigeenversterkingsbuffer gebruikt.	Bekijk kleuringsprotocol opnieuw.
	Ontoereikende incubatie primaire antistof.	Bekijk kleuringsprotocol opnieuw.
	Primaire antistof is verdund.	Gebruik primaire antistof conform de richtlijnen van de fabrikant.
Overmatige achtergrondkleuring	Inadequate spoeling tussen assaystappen.	Herhaal kleuringsprotocol.
	Te lange incubatietijden met hoofdreagentia.	Bekijk kleuringsprotocol opnieuw.
	Objectglaasjes drogen uit na assayverwerking.	Herhaal kleuringsprotocol.

14. REFERENTIES

1. Kastan M and Bartec J. Cell cycle checkpoints and cancer. Nature, 2004. Vol32:316-323.
2. Massague J. G1 cell-cycle control and cancer. Nature, 2004. Vol 432:298-432.
3. Freeman A, Morris LS, Millis AD, Stoeber K, Laskey RA, Williams GH and Coleman N. Minichromosome Maintenance Proteins as Biological Markers of Dysplasia and Malignancy. CI Cancer Research, 1999. Vol 5:2121-2132.
4. Ishimi Y, Okayasu I, Kato C, Kwon H, Kimura H, Yamada K and Song S. Enhanced expression of MCM proteins in cancer cells derived from uterine cervix. Eur. J. Biochem 2003. 270:1089-1101.
5. Lei M and Tye BK. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM Complex. J Cell Science 2001. Vol. 114 (8): 1447-1454.

15. SYMBOLENIJST

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

TECHNISCHE INFORMATIE

In de Verenigde Staten belt u gratis naar de TriPath technische dienst op 1-866-874-7284.

TRIPATH IMAGING



TriPath Imaging, Inc.
780 Plantation Drive
Burlington, NC 27215 VS
(800) 426-2176

Ontwikkeld met technologie van Millennium Pharmaceuticals, Inc.

MILLENNIUM

M en **MILLENNIUM** zijn handelsmerken van Millennium Pharmaceuticals, Inc.

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

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