



cytoactiv® HPV L1 Screening
Monoklonale Maus-Antikörper
(enthält < 0,1% NaN₃)
15 ml, gebrauchsfertig



19211015BM



2-8°C



2023-10



Automatenpackung
Für 100 Bestimmungen mit
Färbeautomaten Leica Bond - maX / Bond III

Produktbeschreibung

Produktcode: ACA1900-BM

Anwendungshinweis, Lagerung

Die enthaltene Menge Antikörperlösung ist bei bestimmungsgemäßem Einsatz nach den angegebenen Protokollen ausreichend für 100 Bestimmungen. Zur Vermeidung von Verlusten durch Totvolumina wird empfohlen, die gesamte Menge der Antikörperlösung in den dafür bestimmten Leica Bond Reagenziencontainer zu geben und bei Nichtgebrauch darin im Kühlschrank (2 – 8 °C) zu lagern.

Unbedingt beachten: Die gebrauchsfertige Antikörperlösung muss unverdünnt eingesetzt werden, andernfalls kann keine Gewährleistung für korrekte und reproduzierbare Färbeergebnisse gegeben werden.

Allgemeiner Hintergrund

Gebärmutterhalskrebs wird durch humane Papillomviren (HPV), epitheliotrope DNA Tumoviren ausgelöst. Viele HPV Typen befallen den Urogenitaltrakt, aber nur wenige Typen sind an der Entstehung von bösartigen Läsionen beteiligt⁸. Das L1 Kapsidprotein ist eines der acht bekannten HPV spezifischen Proteine (E1, E2, E4, E5, E6, E7, L1 und L2). Im Verlauf des viralen Lebenszyklus wird L1 („major“ Kapsidprotein) gebildet um gemeinsam mit L2 („minor“ Kapsidprotein) die virale DNA zu verpacken und so neue, infektiöse Viruspartikel zu generieren welche in die Superfizialschicht freigesetzt werden⁷.

Anwendungszweck

Der **cytoactiv® HPV L1 Screening** Antikörper ermöglicht den immunchemischen Nachweis des HPV L1 Kapsidproteins in zytologischen und histologischen Präparaten (Details siehe Seite 3 dieser Produktbeschreibung).

Zelluläre Lokalisation eines positiven Signals

Das L1 Kapsidprotein wird nach seiner Synthese im Zytoplasma sehr schnell in den Kern transportiert. **Die Kernfärbung¹ ist daher das spezifische Signal.** Bei starker Kernfärbung ist darüber hinaus eine schwache zytoplasmatische Anfärbung von vesikulären Strukturen (Ribosomen, die das L1-Protein bilden) möglich.¹

Analytische Sensitivität

100 %. Ein positiv angefärbter Zellkern auf dem gesamten Präparat.

Analytische Spezifität

Die von **cytoactiv® HPV L1 High Risk Antikörper** erkannten Epitope sind innerhalb des L1 Kapsidproteins **aller** humanpathogenen Papillomviren stark konserviert.

Diagnostische Sensitivität

ca. 80 % bei leichten bis mäßigen Dysplasien (Pap IIID; CIN I , CIN II)³
 ca. 25 % bei hochgradigen Dysplasien/Ca in situ (Pap IVa; CIN III)³
 unter 5% bei zervikalen Karzinomen (Pap V; >CIN III)⁴

Diagnostische Spezifität

> 95 % bei unauffälligen zytologischen Präparaten (Pap I, NIL).²

Prognostische Wertigkeit des L1 Kapsidprotein Nachweises

Bei leichten bis mäßigen Dysplasien korreliert der **positive** Nachweis des L1 Kapsidproteins in über 80 - 85% mit einer **Remission** der Dysplasie.^{5, 6, 9, 10, 11, 12}

Bei leichten bis mäßigen Dysplasien korreliert der **negative** Nachweis des L1 Kapsidproteins in über 80 - 97% mit einer **Progression** der Dysplasie.^{5, 6, 9, 10, 11, 12,}

Literatur

1. **McMurray HR, Nguyen D, Westbrook TF, Mcance DJ. 2001.** Biology of Human Papillomavirus. *Int J Pathol* 82:13-33.
2. **Prömer et al. 2004.** Detection of productive HPV-Infections in routinely performed cytological smears *J Fertil Reprod* 4/2004.
3. **Melsheimer et al. 2003.** Immunocytochemical detection of HPV High risk type L1 capsid protein in LSIL and HSIL as compared with detection of HPV L1 DNA. *Acta cytologica* 47: 124-128.
4. **Birner et al. 2001.** Signal-amplified colorimetric in situ hybridisation for assessment of human papillomavirus infection in cervical lesions. *Mod Pathol* 14, 7:702-709.
5. **Griesser et al. 2004.** Correlation of Immunochemical detection of HPV L1 capsid protein in Pap smears with regression of High risk positive mild/moderate dysplasia. *AQCH* 26, 5: 241-245.
6. **Griesser H, Sander H, Hilfrich R. 2006.** HPV L1 capsid protein detection as prognostic marker for hr HPV associated early dysplastic lesions. *Pathologica* 98: 368.
7. **zur Hausen H. 2002.** Papilloma viruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer* 2: 342-350.
8. **Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et al. 2003.** Epidemiologic classification of human papilloma virus types associated with cervical cancer. *Engl J Med* 348: 518-527.
9. **Hilfrich R, Hariri J. 2008.** Prognostic relevance of HPV L1 capsid protein detection within mild to moderate dysplastic lesions of the cervix uteri in combination with a second biomarker p16. *AQCH* 30, 2: 78-82.
10. **Rauber D, Mehlhorn G, Fasching P A, Beckmann M W, Ackermann S. 2008.** Prognostic significance of the detection of the human papilloma virus L1 protein in smears of mild to moderate cervical intraepithelial lesions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 140, 2: 258-262.
11. **Griesser H, Sander H, Walczak C, Hilfrich R. 2007.** Immunochemical detection of HPV L1 capsid protein: prognostic marker for early squamous lesions of the cervix. *Acta cytologica* 52, 268.
12. **Griesser H, Sander H, Walczak C, Hilfrich R. 2009.** HPV vaccine protein L1 predicts disease outcome of high-risk HPV+ early dysplastic lesions. *Am J Clin Pathol* 132, 6: 480-485.
13. **Mehlhorn G, et al. 2013,** HPV L1 detection discriminates cervical precancer from transient HPV infection: a prospective international multicenter study. *Nature-Modern Pathology*, 26, 967-974

ACA1900-BM Arbeitsanleitung

I. Vorbereitung des Probenmaterials

1. Bei **Pap-gefärbten Präparaten** müssen zunächst die Deckgläser entfernt werden. Dazu werden die Objektträger in eine Küvette mit geeignetem **Lösungsmittel** (z.B. Xylol) eingestellt bis sich die Deckgläser ablösen. Die Deckgläser müssen leicht abgehen, keine Gewalt anwenden.

Wichtig: Mit Klarlack eingedeckte Präparate bitte nach Herstellerangaben entdecken.

Hinweis: Bei älteren Präparaten kann der Ablöseprozess bis zu einer Woche dauern. Die Präparate müssen nicht fixiert und nicht entfärbt werden.

2. **Native Präparate** werden nach dem Ausstreichen fixiert (z.B. 20 min in 96% Alkohol), anschließend getrocknet und bis zum cytoactiv® - Nachweis bei Raumtemperatur (17-27° Celsius) gelagert.
3. **Abstrichmaterial in Flüssigmedium** (z. B. in HPV-PCR Sammelröhrchen): die Zellsuspension wird gut gemischt (Vortex) und 100 µl werden mit gelber Pipettenspitze mittig auf einen Glasobjektträger aufgebracht und kreisförmig verteilt. Die Objektträger bei Raumtemperatur oder im 37°C Inkubator vollständig trocknen lassen und 20 min in 96% Alkohol fixieren. Die Proben können anschließend direkt verwendet werden (Abschnitt II, Antigen-Demaskierung) oder werden wieder getrocknet und bis zum cytoactiv® - Nachweis bei Raumtemperatur (17-27° Celsius) gelagert.
4. **Monolayer-Präparate** werden nach Herstellerangaben angefertigt und bis zum cytoactiv® - Nachweis bei Raumtemperatur (17-27° Celsius) gelagert.
5. **Gewebeschnitte:** In Paraffin eingebettetes Material wird auf Glasobjektträger aufgebracht und laborüblich entparaffiniert.

II. Rehydrierung der Proben und Antigen - Demaskierung

1. Bei jedem Färbeansatz muss eine **Positivkontrolle** mitgefärbt werden um den Erfolg des Ansatzes zu dokumentieren. **Markieren** Sie die **Vorderseite** des Positivkontroll-Objektträgers mit einem Bleistift.
2. Die **Austriche** und eine **Positivkontrolle** über eine **absteigende Alkoholreihe** rehydrieren:
je 2 Minuten in 96%, 70%, 50% Alkohol und Aqua dest.

>> bitte wenden

III. Färbung mit Leica Bond - maX / Bond III Färbeautomaten

Wir empfehlen, sich generell nach den Leica BondMax **Standardprotokollen** zu richten. Es sollten **Menzel Superfrost+ (plus) Objektträger** verwendet werden.

Empfehlungen im Einzelnen:

1. Immunchemische Färbung von zytologischen Präparaten:
(Abstrichpräparate und Dünnschichtzytologie)
 - Anwendung des **IHC Standardprotokoll J (Mixed Red Refine)**
2. Immunchemische Färbung von histologischen Präparaten:
 - Anwendung des **IHC Standardprotokoll F (Mixed DAB Refine)**

Die **Antigendemaskierung** erfolgt in beiden **Protokollen F und J** entsprechend des Bond™ - maX **Hitze Standardprotokolls mit Zitratpuffer (ER1) pH 6:**

- Inkubationszeit: 30 min bei 95 °C.
3. **Antikörper:** gebrauchsfertig, **150 µl je Probe einsetzen**, Inkubationszeit 15 min bei Raumtemperatur

Unbedingt beachten: Die gebrauchsfertige Antikörperlösung muss unverdünnt eingesetzt werden, andernfalls kann keine Gewährleistung für korrekte und reproduzierbare Färbeargebnisse gegeben werden.

Reaktionsschritte im Einzelnen:

Peroxidase-Block:	Inkubationszeit 5 min
Waschen:	3 x 1 min. BondMax Waschlösung
Primärantikörper:	gebrauchsfertig 150 µl; Inkubationszeit 15 min
Waschen:	3 x 1 min. BondMax Waschlösung
Post primary AP:	Inkubationszeit 8 min
Waschen:	3 x 2 min. BondMax Waschlösung
Polymer AP:	Inkubationszeit 8 min
Waschen:	2 x 2 min. BondMax Waschlösung, 1 x 1 min. dest. Wasser

Reaktionsschritte im Einzelnen (weiter):

Protokoll „J“:

Mixed Red Refine: Inkubationszeiten 1 x 10 min, 1 x 5 min
Waschen: 3 x 1 min dest. Wasser

Protokoll „F“:

Mixed DAB Refine: Inkubationszeiten 1 x 10 min, 1 x 5 min
Waschen: 3 x 1 min dest. Wasser

Hämatoxylin: Inkubationszeit 5 min
Waschen: 3 x 1 min (dest. Wasser, BondMax Waschlösung,
dest. Wasser)

Die gegengefärbten Präparate werden eingedeckt und anschließend mikroskopisch ausgewertet.

IV. Evaluierung der Positivkontrolle

Positivkontrolle:

Rot (Mixed Red) bzw. braun (Mixed DAB) gefärbte Zellen zeigen eine positive Reaktion für das L1 Kapsidprotein an. 30-50% aller auf dem Objektträger befindlichen Zellen sollten rot bzw. braun gefärbt sein.

Bemerkung: Die Färbung fällt in einem helleren Farbton aus als sie in den Patientenproben erwartet wird. Dies ist in der unterschiedlichen Herkunft der in der Positivkontrolle verwendeten Zellen (Insektenzellen) begründet.

