



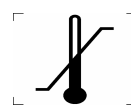
cytoactiv® HPV L1 High Risk
Monoklonale Maus-Antikörper
(enthält < 0,1% NaN₃)

20 ml, gebrauchsfertig

Automatenpackung
Für 100 Bestimmungen mit
Biogenex Färbeautomaten



08071018



2-8°C



2009-04



Produktbeschreibung

Produktcode: ACA0800-B

Allgemeiner Hintergrund

Gebärmutterhalskrebs wird durch humane Papillomviren (HPV), epitheliotrope DNA Tumoviren ausgelöst. Eine große Anzahl von HPV Typen befallen den Urogenitaltrakt, aber nur wenige Typen sind an der Entstehung von bösartigen Läsionen beteiligt⁹.

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 bilden welche in die Superfizialschicht freigesetzt werden⁸.

Anwendungshinweis

Der **cytoactiv® HPV L1 High Risk** Antikörper ermöglicht den immunchemischen Nachweis des L1 Kapsidproteins der humanen Hochrisiko-Papillomviren in Papgefärbten oder nativen Ausstrichen und in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten.

Zelluläre Lokalisation eines positiven Signals

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

Analytische Spezifität

Die von **cytoactiv® HPV L1 High Risk Antikörper** erkannten Epitope sind innerhalb des L1 Kapsidproteins **aller** humanen Hochrisiko - Papillomviren stark konserviert. Es werden folgende High Risk HPV Typen erkannt: 16, 18, 31,33, 35, 39, 45, 56.

Analytische Sensitivität

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

Diagnostische Spezifität

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

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

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, 10, 11, 12}

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

Literatur

1. McMurray, HR.; Nguyen, D.; Westbrook, TF.; Mcance, DJ. : Biology of Human Papillomavirus. Int. J. Pathol. 2001, 82: 13-33
2. Prömer et al., 2004: Nachweis produktiver HPV-Infektionen am zytologischen Routine-Abstrichpräparat. 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):702-9.
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, Vol. 26, No. 5: 241-245
6. Griesser et al.: 2006, Immunochemical detection of HPV L1 capsid protein : a prognostic marker for early squamous lesions of the cervix uteri. Abstract Eurogin2006, Paris
7. Griesser, H.; Sander, H.; Hilfrich, R.: HPV L1 capsid protein detection as prognostic marker for hr HPV associated early dysplastic lesions. Pathologica 2006, 98: 368
8. zur Hausen, H.: Papillomaviruses and cancer : from basic studies to clinical application. Nat. Rev. Cancer 2002, 2: 342-350
9. Munoz, N. ; Bosch, FX. ; de Sanjose, S. et al. : Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. Engl. J. Med. 2003, 348: 518-527
10. Hilfrich R, Hariri J: 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, 2008, Vol 30, No 2, 78-82
11. Rauber, D.; Mehlhorn, G.; Fasching, P. A.; Beckmann, M. W.; Ackermann, S.: Prognostic significance of the detection of the human papillomavirus L1 protein in smears of mild to moderate cervical intraepithelial lesions. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, October 2008, Vol.140, Issue 2, pages 258-262
12. Griesser H., Sander H., Walczak C., Hilfrich R.: Immunochemical detection of HPV L1 capsid protein : prognostic marker for early squamous lesions of the cervix, Acta cytologica 2007, Vol 52, 268

ACA0800-B 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, um sicher zu stellen, dass die **Positivkontrolle** bei allen folgenden Schritten auf der **richtigen Seite** liegt.

>>bitte wenden

2. Die Präparate und eine Positivkontrolle über eine absteigende Alkoholreihe rehydrieren: je 2 Minuten in 96%, 70%, 50% Alkohol und Aqua dest.

Vor der immunchemischen Färbung auf dem Biogenex Färbeautomaten muss die Antigendemaskierung im Dampfgerät, in der Mikrowelle oder im Wasserbad durchgeführt werden.

Die Antigen-Demaskierung erfolgt in Zitratpuffer pH 6 für 20 min bei ca. 98°C.

**Warnhinweis: durch kochenden Puffer besteht Verbrühungsgefahr!
Unbedingt hitzeresistente Schutzhandschuhe oder Tiegelzange benutzen!!**

Dampfgerät (sicherste Methode, empfohlen):

- Den Dampfgerät nach Vorschrift bis zur Maximalmarkierung mit destilliertem Wasser befüllen und den Garkorb aufsetzen.
- Die Objektträger in eine Küvette mit Zitratpuffer überführen. Die Proben müssen **vollständig** mit **Zitratpuffer** bedeckt sein. Den Deckel der Küvette lose auflegen und in den Garkorb auf dem Dampfgerät stellen.
- Den Deckel des Dampfgeräts aufsetzen und das Gerät einschalten.
- Sobald Dampf erkennbar aus dem Deckel des Dampfgeräts austritt wird die Zeitschaltuhr des Geräts auf **40 Min.** Zeit eingestellt.
- Nach 40 Minuten schaltet der Dampfgerät selbsttätig ab. Die Proben anschließend **10 Minuten** im Zitratpuffer der Küvette **abkühlen** lassen.

Empfehlung: Mit der Einstellung der Zeitschaltuhr des Dampfgeräts gleichzeitig eine separate Zeitschaltuhr (Laborwecker) auf 50 Min. einstellen.

Mikrowelle:

- Die Objektträger in eine Plastik-Küvette überführen und **vollständig** mit **Zitratpuffer** bedecken.
- Ohne Deckel in der **Mikrowelle** zum **Kochen** bringen (3-4 Minuten volle Leistung)!
- Deckel lose auflegen und **20 Minuten** bei 1/3 der Mikrowellen-Leistung kochen.
- Anschließend die Proben **10 Minuten** im Zitratpuffer **abkühlen** lassen.

Empfehlung: Nach 10 Minuten Kochen den Deckel der Küvette abnehmen (**Schutzhandschuhe!**) und den Füllstand des Zitratpuffers überprüfen. Eventuell Zitratpuffer nachfüllen, den Deckel wieder lose auflegen und weitere 10 min. kochen. Die Proben dürfen während des Kochens nicht austrocknen.

Wasserbad:

- Die Objektträger in eine Küvette überführen und **vollständig** mit **Zitratpuffer** bedecken.
- Ohne Deckel im Wasserbad zum Kochen bringen.
- Anschließend den Deckel lose auflegen und 20 Minuten kochen.
- Proben **10 Minuten** im Zitratpuffer abkühlen lassen.

1. Die Präparate in eine Küvette mit Waschpuffer überführen und **1 Minute** im Waschpuffer waschen (Einsatz mit den Proben auf und ab bewegen).
2. Die Objektträger anschließend herausnehmen und überschüssigen Waschpuffer durch leichtes Abklopfen der Seitenränder auf saugfähigem Papier entfernen. Die Proben in den Biogenex Färbeautomaten einlegen.

III. Immunchemische Färbung mit Biogenex Färbeautomaten

Wichtig: Alle Färbeschritte werden bei Raumtemperatur (17 – 27 °C) durchgeführt.

Wir empfehlen, sich generell nach dem Standardprotokoll des jeweiligen Biogenex-Färbeautomaten (Optimax Plus oder i 6000) zu richten!

Empfehlungen im Einzelnen:

1. Antikörper: gebrauchsfertig: 200 µl je Probe einsetzen, Inkubationszeit 20 min bei Raumtemperatur
2. Detektionssystem/Chromogen: APAAP / Fast Red It. Standard-Färbeprotokoll des jeweiligen Automaten verwenden. Inkubation bei Raumtemperatur.

IV. Evaluierung der Positivkontrolle

Positivkontrolle:

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

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



Cytoimmun Diagnostics GmbH
Delaware Avenue 1-3
D-66953 Pirmasens
Phone 0049 6331 145 333-0
Fax 0049 6331 145 333-99
E-Mail info@cytoimmun.de