

EGFr Kit (Clone 31G7)

SuperPicTure™ Polymer Detection

For Immunohistostaining of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFr)

Cat. No. 28-8763

Good for 35 Slides/Tests



INTENDED USE

For In Vitro Diagnostic Use

Zymed EGFr Kit (Clone 31G7) is an immunohistochemical (IHC) assay for the identification of EGFr protein expression in normal and neoplastic tissues that have been formalin-fixed and paraffin-embedded for histological evaluation.

Interpretation of test results must be made within the context of the patient's clinical history and in conjunction with other diagnostic tests by qualified pathologists.

SUMMARY AND EXPLANATION

Background

The Epidermal Growth Factor Receptor (EGFr, HER1, *c-erbB-1*) is a 170 kDa membrane protein that consists of an extracellular EGF-binding domain, a short transmembrane region, and an intracellular domain with ligand-activated tyrosine kinase activity.^(1,2) EGFr has two common ligands: epidermal growth factor (EGF) and Transforming Growth Factor- α (TGF- α). Binding of TGF- α activates the EGFr signaling cascade, with EGFr-mediated phosphorylation of substrates leading to an increase in cytosolic calcium ions in target cells, increased DNA synthesis, and proliferation and differentiation of the cell.⁽³⁾ TGF- α is an important growth factor in the transformation of various cell types from a benign to a malignant phenotype.⁽⁴⁾

EGFr is expressed in many normal epithelial tissues, particularly in the basal layers of stratified or pseudostratified epithelium and in squamous epithelium.^(5,6) In the normal tissues examined, Zymed's Mouse anti-EGFr antibody (clone 31G7) stains epidermal cells of the skin, colon, testis, mesothelium, kidney, placenta, and prostate. Positive staining appears as a linear to finely granular pattern within the cell membrane and adjacent cytoplasm, or as coarsely granular cytoplasmic staining.⁽⁶⁾ Zymed's 31G7 antibody reacts with EGFr, and does not recognize the highly homologous *c-erbB-2* (HER-2) protein. Western blotting analysis with an EGFr vIII-transfected NIH-3T3 cell line confirmed that clone 31G7 recognizes the 145 kDa variant III form of EGFr in addition to recognizing the wild type form of EGFr. EGFr expression has been reported in the basal layer of the skin epidermis, hair follicles, ductal and myoepithelial cells of the breast, ductal and acinar cells of the pancreas, glandular cells of the endometrium and prostate, and basal cells of the epididymis.⁽⁷⁾ The distribution of EGF receptors suggests a role for epidermal growth factor in the control of cellular proliferation and the differentiation of surface epithelia.

Many types of neoplastic tissues exhibit abnormal expression of EGFr. Over-expression of EGFr, as the result of gene amplification and/or increased protein transcription, has been observed in endometrial carcinoma, where it correlates with myometrial invasion,⁽⁸⁾ in a variety of lung neoplasia, including metaplastic squamous epithelium,⁽⁵⁾ squamous cell carcinoma, adenocarcinoma, and neuroendocrine lung tumors,^(9,10) and in glioblastoma multiforme.⁽¹¹⁾ EGFr expression has also been reported in head and neck carcinoma⁽¹²⁾ and in correlation with advanced tumor size in invasive transitional cell carcinoma of the urinary bladder, renal cell carcinoma, and gastric carcinoma.⁽¹³⁾ Variable expression of EGFr has been described in pilocytic, low grade, or anaplastic astrocytoma,⁽¹¹⁾ and in breast carcinoma, frequently in combination with tumor metastasis.⁽¹⁴⁾ In breast carcinoma, EGFr expression does not demonstrate an inverse correlation with negative estrogen receptor (ER) status.^(9,15)

Principle of Procedure

Zymed EGFr Kit utilizes Zymed Mouse anti-EGFr (clone 31G7) antibody and Zymed's proprietary *SuperPicTure*[™] 'one-step' Polymer Detection methodology to detect the presence of primary antibodies bound to antigen in formalin-fixed, paraffin-embedded specimens. Paraffin-embedded tissue sections require deparaffinization and rehydration, then quenching of endogenous peroxidase, by treatment with 3% hydrogen peroxidase in absolute methanol, or with Zymed Peroxo-Block[™] (Cat. No. 00-2015). After incubating the specimens with primary antibody (Mouse anti-EGFr (clone 31G7)), the sequential application of an HRP-Goat anti-Mouse IgG-polymer conjugate and then DAB chromogen allows the localization of the bound primary antibody within tissues. Peroxidase catalyzes the substrate (hydrogen peroxidase), converting the chromogen (DAB) into a permanent brown deposit. The specimen may then be counterstained and coverslipped, and staining results visualized under a light microscope. Control slides containing formalin-fixed, paraffin-embedded cell lines demonstrating positive and negative EGFr expression are provided as part of this kit, to validate staining performance in each IHC assay.

REAGENTS PROVIDED (Good for 35 Tests)

Reagent 1.	One dropper bottle (8 mL) of Ready-To-Use Proteinase K solution
Reagent 2.	One dropper bottle (4 mL) of Ready-To-Use Mouse anti-EGFr (Clone: 31G7) antibody
Reagent 3.	One dropper bottle (4 mL) of Ready-To-Use HRP-Goat anti-Mouse IgG-polymer conjugate
Reagent 4	One dropper bottle (4 mL) of Ready-To-Use Mouse IgG ₁ Negative Isotype Control
Reagent 5A.	One dropper bottle (1 mL) of (20X) Buffer concentrate
Reagent 5B.	One dropper bottle (1 mL) of (20X) DAB chromogen
Reagent 5C.	One dropper bottle (1 mL) of (20X) 0.6% Hydrogen peroxide
Control Slides	5 Control Slides (unstained). Each slide contains 2 formalin-fixed, paraffin-embedded cell line sections representing positive (2+) and negative levels of EGFr protein expression

EGFr Evaluation Guidelines (1 photo set):

One set of color photographs in colon carcinoma tissue is included as a guideline to scoring EGFr expression.

REAGENTS & MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Absolute methanol
- Coverslips
- Distilled or deionized water
- Ethanol
- Mayer's hematoxylin
- 30% Hydrogen peroxide
- Light microscope
- Mounting media, such as Clearmount[™] (Cat. No. 00-8010) or Histomount[™] (Cat. No. 00-8030)
- 10 mM phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, with 0.05% Tween-20
- Positive and negative tissue controls (See Quality Control, page 4, for specific recommendations on external control tissue sources)
- Staining jars or baths
- Timer
- Xylene

STORAGE

Store at 2-8°C. Do not use after expiration date.

Reagents should not be used if deterioration or substantial loss of activity is evident. The normal appearance of the reagents in this kit is a liquid free of particulate matter.

INSTRUCTIONS FOR USE

A. Specimen Preparation

Paraffin-Embedded Sections

10% neutral buffered formalin fixative is a suitable fixative for most antigens of clinical significance. Tissues that have been fixed in 10% neutral buffered formalin prior to paraffin-embedding are suitable for use with Mouse anti-EGFr (clone 31G7). Tissue sections must be deparaffinized and rehydrated before staining (see C1, Staining Procedure, for instructions).

Pre-Treatment of Tissue Sections Prior to Staining

For optimal staining, tissue sections require pretreatment with proteinase K solution (Reagent 1), as included in the Zymed EGFr Kit (Clone 31G7). This procedure includes pre-warming the proteinase K solution to room temperature, followed by incubation of the proteinase K solution on tissue sections for 10 minutes at room temperature (see C3, Step 1 of Staining Procedure, page 4, for instructions). Other enzyme treatments may reduce or eliminate the intensity of EGFr staining altogether. **Heat induced epitope retrieval (HIER) CANNOT be used with Zymed's Mouse anti-EGFr (clone 31G7).**

B. Reagent Preparation

Prepare the following reagents prior to staining:

B1. Washing Buffer (Not provided): 10 mM Phosphate-Buffered Saline (PBS), pH 7.4, with 0.05% Tween-20

B2. Peroxidase Quenching Solution (Not provided): 3% H₂O₂

Add 1 part of 30% hydrogen peroxide to 9 parts of absolute methanol. Mix well.

B3. DAB Substrate/Chromogen Solution (Prepare after step 3 of the protocol on page 4)

Reagents 5A, 5B and 5C are 20X concentrate reagents.

Add 1 drop Reagent 5A, 1 drop Reagent 5B, and 1 drop Reagent 5C to 1 mL distilled or deionized water. Mix well. Protect from light and **use within one hour**. One mL of DAB substrate/chromogen solution is sufficient for ten tissue sections.

B4. Counterstain (Not provided)

Mayer's hematoxylin (Cat. No. 00-8001) is recommended for counterstaining.

B5. Mounting Solution (Not provided)

Non-aqueous, permanent mounting medium, such as Histomount™ (Cat. No. 00-8030) or Clearmount™ (Cat. No. 00-8010) is recommended.

C. Staining Procedure

All reagents should be equilibrated to room temperature (20-25°C) prior to immunostaining, unless otherwise specified.

C1. Deparaffinization and Rehydration

1. Immerse slides in xylene twice, for 5 min. each time.
2. Immerse slides in 100% ethanol twice, for 2 min. each time.
3. Immerse slides in 95% ethanol for 2 min.
4. Immerse slides in 80% ethanol for 2 min., then proceed to Peroxidase Quenching.

C2. Immunohistostaining Protocol (Table 1)

Note: Do not perform heat induced epitope retrieval (HIER), as it may result in complete loss of EGFr antigenicity.

Table 1

Staining Procedure	
Step 1. Peroxidase Quenching	For paraffin-embedded tissues, add 1 part of 30% hydrogen peroxide to 9 parts of absolute methanol. Mix well. b. Submerge slides in Peroxidase Quenching Solution for 10 minutes. c. Wash with deionized water 2 min., 3 times.
Step 2. Enzyme Digestion	Pre-warm the proteinase K solution (Reagent 1) to room temperature. Apply 2 drops (100 μ L) of pre-warmed proteinase K to each specimen. Incubate for 10 min. at room temperature. Rinse slides in fresh PBS/Tween three times, for 2 min. each time.
Step 3. Primary Antibody, or Negative Isotype Control	Blot excess buffer off slide. Apply 2 drops (100 μ L) of Mouse anti-EGFr (Reagent 2) or Negative Isotype Control (Reagent 4) to each specimen. Incubate 30 min. Rinse slides in fresh PBS/Tween three times, for 2 min. each time.
Step 4. HRP-polymer conjugate	Blot excess liquid off slide. Apply 2 drops (100 μ L) of HRP-Goat anti-Mouse IgG-polymer conjugate (Reagent 3) to each specimen. Incubate 10 min. Rinse slides in fresh PBS/Tween three times, 2 min. each time.
Step 5. DAB Substrate/Chromogen Solution (See Section B3 for DAB preparation.)	Blot excess liquid off slide. Apply 2 drops (100 μ L) of DAB substrate/chromogen (Reagent 5) solution to each specimen. Incubate 5 min. Rinse under running tap water for 3 min.
Step 6. Counterstain	Immerse slides in hematoxylin for 1-3 minutes. Rinse slides under running tap water, then immerse in either 0.25% dilute ammonia in water or 10 mM PBS, pH 7.4, to blue the nuclei. Note: Counterstaining will produce a pale to dark blue coloration of the cell nuclei, depending on the incubation time and potency of the hematoxylin. Excessive or incomplete counterstaining may compromise proper interpretation of results.
Step 7. Coverslip	Rinse slides briefly in distilled or deionized water. Dehydrate slides in a graded series of ethanol (70%, 80%, 95%, 100%), then clear once in xylene. Non-aqueous permanent mounting medium is recommended. Apply 2 drops (100 μ L) of Histomount™ or Clearmount™ Mounting Solution to the slide, then add coverslip.

QUALITY CONTROL

Control Slides: Zymed EGFr Kit contains 5 control slides (unstained). Each control slide contains 2 formalin-fixed, paraffin-embedded cell line sections representing positive (2+) and negative levels of EGFr protein expression. One control slide should be stained along with each staining procedure, to demonstrate the validity of the staining run.

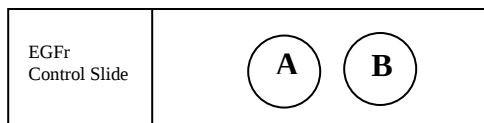


Image 1. EGFr Control Slide with positive (2+) cell line A and negative cell line B. Please note that cell lines are not drawn to scale, and are smaller than indicated in the diagram.

Positive Tissue Control: External positive control materials should be taken from fresh autopsy/biopsy/surgical specimens that have been fixed, processed, and embedded in the same manner as the samples. Positive tissue controls are indicative of correctly prepared tissues and proper staining techniques. One positive tissue control for each set of test conditions should be included in each staining run. Specimens processed differently from the patient samples validate reagent performance only, and do not verify tissue preparation.

Colorectal carcinoma may be useful as a source of positive control tissue.

Known positive tissue controls should only be utilized for monitoring the correct performance of processed tissues and test reagents, rather than as an aid in formulation of a specific diagnosis for patient samples. If the positive tissue controls fail to demonstrate positive staining, results obtained for the test specimens should be considered invalid.

Negative Tissue Control: Use an external negative tissue control (known to be negative for EGFr staining) that has been fixed, processed, and embedded in a manner identical to the patient samples in each staining run. This will verify the specificity of the IHC primary antibody for identification of the target antigen, and provide a demonstration of specific background staining (false-positive staining). The wide variety of cell types present in most tissue sections may also be used as internal negative control sites to verify the test's performance specifications.

If specific staining (false-positive staining) occurs in the negative tissue control, results obtained for the patient specimens should be considered invalid.

Nonspecific Negative Reagent Control: Use a non-specific Negative Isotype Control (Reagent 4) in place of the primary antibody with a section of each patient specimen to evaluate nonspecific staining and to allow clear interpretation of specific staining at the antigen site. The incubation period for the Negative Isotype Control should correspond to that of the primary antibody.

To differentiate endogenous enzyme activity from specific immunoreactivity, additional patient tissues may be stained exclusively with substrate-chromogen. EGFr kit utilizes *SuperPicTure™*, a polymer detection method without the use of biotin, avidin, or streptavidin, to avoid the endogenous biotin activity (avidin-binding activity) in tissue and cell samples that can cause background.

Any controversial staining should be reported to Zymed Laboratories, Inc.'s Technical Service Department.

Zymed EGFr Kit is not intended to provide prognostic information to the patient and/or physician, and has not been validated for this purpose. Slides should be evaluated according to Table 2 to verify the validity of each staining run.

Table 2: Control Slide & Sample Slide Evaluation

Slide Reading Order	Evaluation
1. Control Slides (Provided) (To verify the validity of the staining run.)	Presence of positive brown membrane staining on the positive control slide indicates a valid assay. Presence of brown staining on the negative control slide indicates that non-specific staining occurred in the assay. Assay results may be invalid due to over-staining.
2. External Positive Tissue Control	Presence of brown membrane staining, with or without cytoplasmic staining, should be observed as expected for established external positive tissue controls.
3. External Negative Tissue Control	Absence of brown specific staining in the negative tissue control confirms the lack of kit cross-reactivity to cellular components. If brown specific staining occurs in the negative tissue control, results obtained for the patient specimen should be considered invalid.
4. Patient Tissue Stained With Negative Reagent Control	Absence of brown specific staining indicates the specificity of target antigen staining by the primary antibody. Other brown staining occurring in the patient specimen stained with the negative reagent control, as in connective tissue, leucocytes, erythrocytes, or necrotic tissue, should be considered non-specific background staining.
5. Patient Tissue Stained With Primary Antibody	When EGFr over-expression is detected, it will appear as brown membrane staining, with or without cytoplasmic staining, of tumor cells that have been treated with primary antibody.

INTERPRETATION OF STAINING

Zymed EGFr Grading System

The EGFr protein is expressed in a variety of normal and neoplastic tissues. Cellular staining pattern may be homogenous or heterogeneous (ie membrane staining, cytoplasmic staining, or both). The distribution of stained cells and the intensity of tissue staining may also be heterogeneous. For the determination of EGFr protein overexpression, a combination of membrane staining pattern and intensity can be evaluated based on criteria in Table 3. To aid in the differentiation of staining intensity, please refer to the color photographs in Zymed EGFr Evaluation Guidelines (provided with Zymed EGFr Kit).

Table 3: EGFr Scoring System for Representative Tissue Section

Staining Pattern: Membrane	Staining Intensity	Score	EGFr Overexpression
No staining in tumor cells	None	0	Negative
Faint or barely perceptible membrane staining is observed. Partial staining in part of the membrane, or weak complete membrane staining is observed.	Very Weak to Weak	1+	Weak
Moderate membrane staining is observed in tumor cells.	Moderate	2+	Moderate
Strong membrane staining is observed in tumor cells.	Strong	3+	Strong

* EGFr membrane staining is usually observed in various tumors such as head and neck, breast, colon and ovary. However, membrane and cytoplasmic staining has been observed either alone or in combination in glioma²²⁻²⁴. Cytoplasmic staining has also been observed in some squamous cell cancers of the lung²⁵. Therefore, it may be important to report the intensity of cytoplasmic staining in glioma and lung carcinomas.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Specificity

EGFr expression in A431 (human epidermoid carcinoma) cells, either stimulated or non-stimulated with EGF, has been detected by Mouse anti-EGFr (clone 31G7). On Western blot analysis, clone 31G7 recognized a 170 kDa protein band⁽¹⁹⁻²¹⁾, corresponding to the published molecular weight of EGFr. Clone 31G7 does not react with HER2. Clone 31G7 will recognize EGFr VIII.

Reproducibility

Zymed EGFr Kit was tested on 57 cases of colon carcinoma tissues specimens. Each tested case demonstrated consistent agreement in reproducibility in the evaluation of staining versus no staining.

Immunoreactivity

Abnormal Tissue Reactivity

All studies cited below used clone 31G7 antibody and formalin-fixed, paraffin-embedded tissues.

EGFr over-expression has been demonstrated in pulmonary neoplasms. In one study of 92 neuroendocrine tumors, 28% of typical carcinoid, 57% of atypical carcinoid, 42% of large cell neuroendocrine carcinoma, 39% of mixed small and large cell neuroendocrine carcinoma, and 22% of small cell lung carcinoma demonstrated a score of 2+ to 4+ in EGFr staining.⁽¹⁶⁾ In another study, EGFr over-expression was observed in 56% of lung adenocarcinoma⁽¹⁷⁾ and 84% of lung squamous cell carcinoma specimens.⁽⁵⁾

Clone 31G7 stained 50% of head and neck squamous cell carcinoma specimens in one study.⁽¹⁸⁾ Variable EGFr expression in breast carcinoma specimens has been reported, despite its presence on cells derived from all three germ layers; one study reported EGFr overexpression in up to 35% of breast cancers.⁽¹⁴⁾ Clone 31G7 has also been used in studies of glandular cells of endometrial and prostatic carcinoma. In one study of 40 cases of endometrioid endometrial carcinoma, Mouse anti-EGFr (clone 31G7) exhibited positive staining in 65% of the specimens.⁽⁸⁾

Normal Tissue Reactivity

Table 4 reflects normal tissue reactivity exhibited by Mouse anti-EGFr (clone 31G7). Tissues were formalin-fixed, paraffin-embedded, and stained with clone 31G7 according to the instructions in the EGFr Kit.

Table 4: Immunoreactivity – Normal Tissues†

Tissue Type (number tested)	Positive Staining (3+ intensity rating system)
Adrenal gland (5)	Cortical area, granular cells: 3+ (1/5); Negative (4/5)
Bone marrow (3)	Negative
Breast (5)	Lobular epithelial cells: 2+
Colon (5)	Mucosal epithelial cells: 1+ (1/5); Negative (4/5)
Cerebellum (3)	Molecular layer axons: 3+ (2/3); 2+ (1/3)
Cerebrum (5)	Negative
Cervix (3)	Squamous cells in basal layer: 3+ (1/3); 2+ (2/3)
Endometrium (3)	Negative
Esophagus (4)	Squamous cells in basal layer, some submucosal glandular cells: 2+ (3/4); Negative (1/4)
Kidney (5)	Tubules: 1+ (4/5); Negative (1/5)
Liver (5)	Hepatocytes, some bile duct: 2+ (3/5); Negative (2/5)
Lung (5)	Negative
Mesothelium (3)	3+
Muscle, cardiac (5)	Negative
Muscle, smooth (5)	Negative‡
Muscle, skeletal (5)	Negative
Nerve (3)	Negative
Ovary (3)	Negative
Pancreas (5)	Pancreatic duct epithelium, some acinic cells: 1+ (2/5); Negative (3/5)
Parathyroid (3)	Negative
Placenta (5)	Syncytiotrophoblasts: 3+ (4/5); 2+ (1/5)
Prostate (2)	3+ (2/2)
Skin (5)	Basal layer, some spinosum layer epithelial cells: 3+ (2/5); 1+ (1/5); Negative (2/5)
Small intestine (3)	Negative
Spleen (5)	Negative
Stomach (5)	Mucosal epithelial cells: 1+ (3/5); Negative (2/5)
Testis (5)	Basemembrane: 2+ (3/5); Negative (2/5)
Thyroid gland (5)	1+ (3/5); Negative (2/5)
Tonsil (5)	Squamous epithelial cells: 3+ (3/5); Negative (2/5)

Staining pattern:

† Both membrane and cytoplasmic staining may be observed.

‡ Myoepithelial cells, muscularis mucosa in different tissues may be stained (1+ to 2+) in some cases.

TROUBLESHOOTING

Possible causes for negative staining on positive slides:

1. Steps in the staining protocol were performed in incorrect sequence.
2. Primary or secondary antibody incubation steps were omitted.
3. Labile antigens were destroyed.
4. Specimen was improperly fixed and/or processed.
5. Specimen dehydrated during staining.

Possible causes for weak staining on all slides:

1. Specimen retained excess liquid after rinsing steps.
2. Incubation times were insufficient.
3. Substrate prepared improperly.
4. Deparaffinization was incomplete (staining may be accompanied by high background).

Possible causes for high background staining:

1. Endogenous peroxidase activity was incompletely blocked.
2. Deparaffinization was incomplete.
3. Excessive application of tissue adhesive.

4. Inadequate rinsing of slides.
5. Over-development of substrate.
6. Dehydration of specimen during staining.

PRODUCT SPECIFIC LIMITATIONS

1. Zymed Mouse anti-EGFr (clone 31G7) requires enzyme pretreatment of FFPE tissue sections for proper staining. Failure to pretreat FFPE tissue sections may result in reduced staining of false negative results.
2. Reagents have been optimized. Do not further dilute or substitute reagents of different manufactured lots.
3. False-negative results may be obtained due to the degradation of the antigen in tissues over time. Specimens should be stained within 4-6 weeks after mounting on slides, when stored at dry room temperature (20-25°C).

SAFETY AND PRECAUTIONS

1. For In Vitro Diagnostic Use
2. Use ample precautions when handling reagents. Wear disposable gloves, coat, and safety glasses when handling suspected carcinogens.
3. Do not use this kit after expiration date.
4. After use, store as specified. Any storage conditions other than those specified by this package insert must be validated by the user.
5. Avoid contact of eyes and mucous membranes with reagents. If reagents come into contact with sensitive areas, flush with generous amounts of water.
6. 3,3'-Diaminobenzidine tetrachloride (DAB) may be harmful if swallowed, inhaled, or absorbed through the skin, and may be irritating to eyes, skin, mucous membranes and upper respiratory tract. DAB is a suspected carcinogen; consult Federal, State, and/or local regulations for disposal recommendations.
7. The 0.1% sodium azide (NaN_3) used as a preservative in this kit is toxic if ingested. Sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. To prevent azide build-up in plumbing, flush with large volumes of water during disposal.
8. Patient specimens and all materials coming into contact with them should be handled as if capable of transmitting infection, and disposed of with proper precautions. Never pipette by mouth, and avoid contact of antibody and tissue specimens with skin and mucous membranes.
9. Minimize microbial contamination of reagents to avoid non-specific staining.
10. Reagents have been optimally diluted for IHC as described in this package insert. Do not further dilute, to prevent loss of antigen staining.

GENERAL LIMITATIONS

1. Immunohistochemistry is a multi-step diagnostic process that requires specialized training in the selection of the appropriate reagents; tissue selection, fixation, and processing; preparation of the IHC slide; and interpretation of the staining results.
2. Tissue staining is dependent on the handling and processing of the tissue prior to staining. Improper fixation, freezing, thawing, washing, drying, heating, sectioning, or contamination with other tissues or fluids may produce artifacts, antibody trapping, or false-negative results. Inconsistent results may be due to variations in fixation and embedding methods, or to inherent irregularities within the tissue.
3. Excessive or incomplete counterstaining may compromise proper interpretation of results. The clinical interpretation of any positive or negative staining should be evaluated within the context of clinical presentation, morphology, and other histopathological criteria. The clinical interpretation of positive or negative staining should be complemented by morphological studies using proper positive and negative internal and external controls, as well as other diagnostic tests. It is the responsibility of a qualified pathologist who is familiar with the proper use of IHC antibodies, reagents, and methods to assess all of the steps used to prepare and interpret the final IHC preparation.
4. Any deviation from recommended test procedures may invalidate declared expected results; appropriate controls must be employed and documented.
5. Reagents may demonstrate unexpected reactions in previously untested tissues. The possibility of unexpected reactions, even in tested tissue groups, cannot be completely eliminated due to biological variability of antigen expression in pathological tissues. Contact Zymed's Technical Service Department at Tel: +1 650 871-4494, Fax: +1 650 871 4499 or e-mail tech@zymed.com with documented unexpected reactions.

- False-positive results may be observed due to non-immunological binding of proteins or substrate reaction products. They may also be caused by pseudoperoxidase activity (erythrocytes), endogenous peroxidase activity (cytochrome c), or endogenous biotin (liver, breast, brain, kidney), depending on the immunodetection method used.
- As in any immunohistochemical test, a negative result means that the antigen was not detected, not necessarily that the antigen was absent, in the tissue assayed. If necessary, use a panel of antibodies to identify false-negative reactions.

RELATED PRODUCTS

Table 5. Related Products

Product	Clone	Cat. No.
Mouse anti-EGFr Concentrate	31G7	28-0005
Mouse anti-EGFr 2 nd Gen Predilute	31G7	08-1205
Mouse anti-EGFr (V-Line Predilute)	31G7	08-4205
EGFr Amplification Probe for CISH™	-----	84-1300
SuperPicTure™ Polymer Kit (Broad Spectrum; DAB)	-----	87-9663

REFERENCES

- Cohen S, et al. A native 170,000 epidermal growth factor receptor-kinase complex from shed plasma membrane vesicles. *J Biol Chem* 257: 1523-1539, 1982.
- Burhow SA, et al. Affinity labeling of the protein kinase association with the epidermal growth factor receptor in membrane vesicles from A431 cells. *J Biol Chem* 257:40019-40022, 1982.
- Chen WS, et al. Functional independence of the epidermal growth factor receptor from a domain required for ligand-induced internalization and calcium regulation. *Cell* 59:33-43, 1989.
- Pusztai L, et al. Growth factors: Regulation of normal and neoplastic growth. *J Pathol* 169:191-201, 1993.
- Ozane B, Richardson CS. Overexpression of the EGFr is a hallmark of squamous cell carcinoma. *J Pathol* 149: 9-14, 1986.
- Gusterson B, et al. Cellular localization of human epidermal growth factor receptor. *Cell Biol Int Rep* 8: 649-658, 1984.
- Damjanov I, et al. Immunohistochemical localization of the epidermal growth factor receptor in normal human tissue. *Lab Invest* 55(5): 588-592, 1986.
- Niikura H, et al. Expression of epidermal growth factor family proteins and epidermal growth factor receptor in human endometrium. *Human Pathol* 27(3):282-289, 1996.
- Rusch V, et al. Aberrant expression of p53 or the epidermal growth factor receptor is frequent in early bronchial neoplasia, and coexpression precedes squamous cell carcinoma development. *Cancer Res* 55:1365-1372, 1995.
- Rusch, V, et al. Molecular markers help characterize neuroendocrine lung tumors. *Ann Thorac Surg* 62:798-810, 1996.
- Agosti RM, et al. Expression of the epidermal growth factor receptor in astrocytic tumours is specifically associated with glioblastoma multiforme. *Virchows Arch Pathol Anat* 420:321-325, 1992.
- Christensen ME. The EGF receptor system in head and neck carcinomas and normal tissues. Immunohistochemical and quantitative studies. *Dan Med Bull* 45(2):121-34, 1998.
- Neal DE, et al. Epidermal growth factor receptors in human bladder cancer: comparison of invasive and superficial tumors. *Lancet*. 1:366-368, 1985.
- Sainsbury JRC, et al. Epidermal growth factor receptors and estrogen receptors in human breast cancer. *Lancet* 1:364-366, 1985.
- Toi, M, et al. Immunocytochemical and biochemical analysis of epidermal growth factor receptor expression in human breast cancer tissues: relationship to estrogen receptor and lymphatic invasion. *Int J Cancer* 43:220-225, 1989.
- Veale D, et al. Epidermal growth factor receptors in non-small cell lung cancer. *Brit J Cancer* 55:513-516, 1987.
- Berger MS, et al. Epidermal growth factor receptors in lung tumors. *J Pathol* 152:297-307, 1987.
- Patridge M, et al. Expression of epidermal growth factor receptor on oral squamous cell carcinoma. *Brit J Oral Maxillofac Surg* 26:381-389, 1988.
- Sartor CI, et al. Role of epidermal growth factor receptor and STAT-3 activation in autonomous proliferation of SUM-102PT human breast cancer cells. *Cancer Res* 57(5):978-87, 1997.
- Nguyen PL, et al. Expression of epidermal growth factor receptor in invasive transitional cell carcinoma of the urinary bladder. A multivariate survival analysis. *Am J Clin Pathol* 101(2):166-76, 1994.
- Moscattello DK, et al. A naturally occurring mutant human epidermal growth factor receptor as a target for peptide vaccine immunotherapy of tumors. *Cancer Res* 57(8):1419-24, 1997.
- Marquez A, et al. Evaluation of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) by Chromogenic In Situ Hybridization (CISH) and Immunohistochemistry (IHC) in Archival Gliomas Using Bright-Field Microscopy. *Diagn Mol Pathol* 13(1):1-8, 2004.
- Arita N, et al. Epidermal Growth Factor Receptor in human glioma. *J Neurosurg* 70:916-919, 1989.
- Quezado MM, et al. Correlation of EGFR Gene Amplification and Overexpression by Chromogenic In Situ Hybridization (CISH) and Immunohistochemistry in High Grade Gliomas. USCAP Annual Meeting, Abstract 1334, 2003.
- Piyathilake CJ, et al. Differential expression of growth factors in squamous cell carcinoma and precancerous lesions of the lung. *Clin Cancer Res* 8:734-744, 2002.

TRADEMARKS

Clearmount™, HistoGrip™, Histomount™, *PicTure*™, Peroxo-Block™, and Zymed® are trademarks of Zymed Laboratories, Inc.

Authorized Representative:

MDSS

Burckhardstr. 1

D-30163 Hannover

Germany

Authorized Representative for IVDD 98/79/EC

Equipo EGFr (Clon 31G7)

Sistema de detección de polimerizado (SuperPicTure™)

***Para la inmunotinción del receptor del factor de crecimiento epidérmico
(Epidermal Growth Factor Receptor, EGFr)***

Cat. N° 28-8763

Suficiente para 35 portas/pruebas



INDICACIONES

Para utilización en diagnóstico in vitro. La interpretación de los resultados debe realizarla un patólogo cualificado, dentro del contexto de la historia clínica del paciente y otras pruebas diagnósticas.

El equipo Zymed EGFr (Clon 31G7) es un análisis inmunohistoquímico (IHQ) completo, para la identificación de la expresión de la proteína del EGFr en tejidos normales y neoplásicos que han sido fijados en formalina y infiltrados en parafina para su evaluación histológica.

Patólogos cualificados deben interpretar los resultados IHQ dentro del contexto del historial clínico del paciente y de otras pruebas diagnósticas.

Principio del procedimiento

El equipo Zymed EGFr utiliza el anticuerpo anti-EGFr de ratón (clon 31G7) de Zymed y la metodología de detección de polimerizado patentado por Zymed para detectar la presencia de anticuerpos primarios unidos a los antígenos, en muestras fijadas en formalina y infiltradas en parafina. Como parte de este equipo, se proporcionan portas de control con estirpes celulares infiltradas en parafina y fijadas en formalina, para demostrar la expresión positiva y negativa del EGFr, a fin de validar el rendimiento de la tinción en cada análisis IHQ.

REACTIVOS PROPORCIONADOS (Suficientes para 35 pruebas)

- | | |
|--------------------------|--|
| Reactivo 1. | Un frasco cuentagotas (8 mL) de solución de proteinase K, lista para usar |
| Reactivo 2. | Un frasco cuentagotas (4 mL) de anticuerpo anti-EGFr de ratón (clon 31G7), listo para usar |
| Reactivo 3. | Un frasco cuentagotas (4 mL) de suero de cabra anti-IgG polimerizado de ratón conjugado con HRP, listo para usar. |
| Reactivo 4. | Un frasco cuentagotas (4 mL) de IgG ₁ de ratón, listo para usar, para control negativo de isotipo. |
| Reactivo 5A. | Un frasco cuentagotas (1 mL) de amortiguador concentrado (20X) |
| Reactivo 5B. | Un frasco cuentagotas (1 mL) de cromógeno DAB (20X) |
| Reactivo 5C. | Un frasco cuentagotas (1 mL) de peróxido de hidrógeno al 0,6% (20X) |
| Portas de control | 5 portas de control (sin tinción). Cada porta contiene 2 cortes de estirpes celulares infiltrados en parafina y fijados en formalina que representan la expresión de niveles positivos (2+) y negativos de la proteína del EGFr. |

Recomendaciones para la evaluación de EGFr (un juego de fotos):

Se incluyen dos juegos de fotografías color, uno con muestras de tejido carcinoma de colon, como recomendaciones para la clasificación.

REACTIVOS Y MATERIALES NECESARIOS PERO NO PROPORCIONADOS

- Metanol absoluto
- Cubreobjetos
- Agua destilada o desionizada
- Etanol
- Hematoxilina de Mayer
- Peróxido de hidrógeno al 30%
- Microscopio de luz
- Medio de montaje, como Clearmount™ (Cat. N° 00-8010) o Histomount™ (Cat. N° 00-8030).
- 10 mm de solución salina amortiguada fosfato (PBS), pH 7,4 con Tween-20 al 0,05%

- Controles tisulares positivos y negativos (consulte el control de calidad, página 4, para leer las recomendaciones específicas sobre las fuentes externas de control tisular)
- Jarras o baños de tinción
- Cronómetro
- Xileno

ALMACENAMIENTO

Almacenar a 2-8 °C. No utilizar después de la fecha de caducidad.

No utilizar los reagentes si el deterioro o la pérdida sustancial de actividad es evidente. La apariencia normal de los reactivos que forman parte de este equipo es la de un líquido libre de partículas.

INSTRUCCIONES DE USO:

A. *Pretratamiento de los cortes tisulares antes de la tinción*

Para una tinción óptima, los cortes tisulares se deben pretratar con solución de proteinase K (reactivo 1), que se incluye en el equipo Zymed EGFr. Este procedimiento incluye el precalentamiento de la solución de proteinase K a temperatura ambiente, seguido de la incubación de la solución de proteinase K a temperatura ambiente durante 10 minutos en los cortes tisulares (para instrucciones, consulte C3, paso 1 del procedimiento de tinción, página 4). El tratamiento con otras enzimas puede reducir o eliminar por completo la intensidad de la tinción de EGFr. **La recuperación del epítipo inducida por el calor (HIER) no puede ser utilizada con el anti-EGFr de ratón (clon 31G7) de Zymed.**

B. *Preparación del reactivo*

Antes de proceder a la tinción, preparar los siguientes reactivos:

B1. Amortiguador para lavado (no se proporciona con el equipo): 10 mM de solución salina amortiguada fosfato (PBS), pH 7,4 con Tween-20 al 0,05%

B2. Solución para extinción de la peroxidasa (no se proporciona con el equipo): H₂O₂ al 3%. Agregar 1 parte de peróxido de hidrógeno al 30% a 9 partes de metanol absoluto. Mezclar bien.

B3. Solución sustrato/cromógeno DAB (preparar después del paso 3 del protocolo en la página 4) Los reactivos 6A, 6B y 6C son reactivos concentrados 20X. Agregar 1 gota de reactivo 6A, 1 de reactivo 6B y 1 de reactivo 6C a 1 mL de agua destilada o desionizada. Mezclar bien. Proteger de la luz y **utilizar en el plazo de una hora**. Un mL de solución sustrato/cromógeno DAB es suficiente para diez cortes tisulares.

B4. Contra tinción (no se proporciona con el equipo) La hematoxilina de Mayer (Cat. N° 00-8001) es la recomendada para la contra tinción.

B5. Solución de montaje (no se proporciona con el equipo) Se recomienda el medio de montaje permanente y no acuoso, como Histomount™ (Cat. N° 00-8030) o Clearmount™ (Cat. N° 00-8010).

C. *Procedimiento de tinción*

Todos los reactivos deben equilibrarse a temperatura ambiente (20-25 °C) antes de proceder a la inmunotinción, excepto indicación en contrario.

C1. Desparafinización y rehidratación

1. Sumergir los portaobjetos en xileno dos veces, durante 5 minutos cada vez.
2. Sumergir los portaobjetos en etanol al 100% dos veces, durante 2 minutos cada vez.
3. Sumergir los portaobjetos en etanol al 95% durante 2 minutos.
4. Sumergir los portas en etanol al 80% durante 2 minutos y luego proceder a la extinción de la peroxidasa.

C2. Protocolo de inmunotinción histológica (tabla 1)

Nota: No realizar la recuperación del epítipo inducida por calor (Heat Induced Epitope Retrieval, HIER), ya que puede dar lugar a la pérdida completa de la antigenicidad al EGFr.

Procedimiento de tinción	
Paso 1.	Para tejidos en parafina, añadir 1 parte de peróxido de hidrógeno al 30% a nueve partes de metanol puro (o sin diluir). Mezclar bien. b. Bañar los portaobjetos de la solución para la eliminación de la Peroxidasa durante 10 minutos. c. Lavar con agua desionizada (2 minutos, 3 veces).
Paso 2. Digestión enzimática	Precalentar la solución de proteinase K (reactivo 1) a temperatura ambiente. Aplicar 2 gotas (100 µL) de proteinase K precalentada a cada muestra. Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Enjuagar los portas en PBS/Tween fresco tres veces, durante 2 minutos cada vez.
Paso 3. Anticuerpo primario o control negativo de isotipo	Eliminar el exceso de amortiguador del porta. Aplicar 2 gotas (100 µL) de anticuerpo anti-EGFr de ratón (reactivo 2) o control negativo de isotipo (reactivo 4) a cada muestra. Incubar durante 30 minutos. Enjuagar los portas en PBS/Tween fresco tres veces, durante 2 minutos cada vez.
Paso 4. Conjugado de Polímero HRP	Eliminar el exceso de líquido del porta. Aplicar 2 gotas (100 µL) de suero de cabra anti-IgG polimerizado de ratón conjugado con HRP (reactivo 3) a cada muestra. Incubar durante 10 minutos. Enjuagar los portas en PBS/Tween fresco tres veces, durante 2 minutos cada vez.
Paso 5. Solución sustrato/ cromógeno DAB (consulte la sección B3 para la preparación del DAB)	Eliminar el exceso de líquido del porta. Aplicar 2 gotas (100 µL) de solución sustrato/cromógeno DAB (reactivo 5) a cada muestra. Incubar durante 5 minutos. Enjuagar con agua corriente durante 3 minutos.
Paso 6. Contra tinción	Sumergir los portas en hematoxilina durante 1 a 3 minutos. Enjuagar los portas en agua corriente, luego sumergirlos en amoníaco al 0,25% diluido en agua o 10 mm PBS, pH 7,4 para colorear los núcleos de azul. Nota: la contra tinción producirá la coloración azul claro a azul oscuro de los núcleos celulares, dependiendo del tiempo de incubación y de la potencia de la hematoxilina. La contra tinción excesiva o incompleta puede comprometer la correcta interpretación de los resultados.
Paso 7. Cubreobjetos	Enjuagar brevemente los portas en agua destilada o desionizada. Deshidratar los portas en una serie graduada de etanol (al 70%, 80%, 95% y 100%), luego eliminar una vez en xileno. Se recomienda la utilización de un medio de montaje permanente y no acuoso. Aplicar al porta 2 gotas (100 µL) de solución de montaje Histomount™ o Clearmount™, luego agregar el cubreobjetos.

CONTROL DE CALIDAD

Portaobjetos de control: El equipo Zymed EGFr contiene 5 portaobjetos de control (sin tinción). Cada portaobjetos contiene 2 cortes de estirpes celulares infiltrados en parafina y fijados en formalina que representan la expresión de niveles positivos (2+) y negativos de la proteína del EGFr. A fin de demostrar la validez de la ejecución de la tinción se debe colorear un portaobjetos de control en cada procedimiento de tinción.

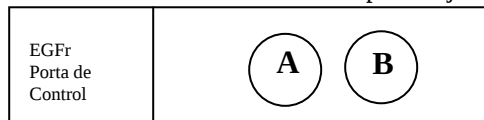


Imagen 1. Porta de control EGFr con positivo (2+) estirpe celular A y and negativo estirpe celular B. Por favor anota que los estirpes celulares no son dibujado a escala, y son más pequeño que es indicado en la esquema.

El carcinoma de cabeza y cuello y/o el carcinoma colorrectal humano puede ser útil como fuente de tejido para control positivo.

Cualquier tinción controvertida se debe comunicar al servicio técnico de Zymed Laboratories Inc.

El equipo Zymed EGFr no está diseñado para proporcionar información diagnóstica al paciente y/o al médico y no ha sido validado con este fin. Los portaobjetos deben ser evaluados de acuerdo con la tabla 2 para verificar la validez de cada tinción.

Tabla 2: Evaluación del portaobjetos de control y del portaobjetos de muestra

Orden de lectura del portaobjetos	Evaluación
1. Portaobjetos de control (proporcionados) (Para verificar la validez de la carrera de tinción.)	La presencia de tinción marrón positiva en la membrana del portaobjetos de control positivo indica que el análisis es válido. La presencia de tinción marrón en el portaobjetos de control negativo indica que en el análisis se produjo una tinción inespecífica. Los resultados de los análisis pueden ser incorrectos debido a la tinción excesiva.
2. Control positivo de tejido externo	La presencia de tinción marrón de la membrana, con o sin tinción del citoplasma, debe observarse como es de esperar para los controles positivos establecidos de tejido externo.
3. Control negativo de tejido externo	La ausencia de tinción marrón específica en el control negativo de tejido confirma la falta de reactividad cruzada del equipo a los componentes celulares. Si se produce la tinción marrón específica en el control negativo de tejido, los resultados obtenidos para la muestra del paciente deben ser considerados incorrectos.
4. Tejido del paciente coloreado con control negativo del reactivo	La ausencia de tinción marrón específica indica la especificidad de la tinción del antígeno blanco por el anticuerpo primario. Otra tinción marrón que se produzca en la muestra del paciente teñida con el control negativo del reactivo, como en el tejido conectivo, leucocitos, eritrocitos o tejido necrótico, debe ser considerada como tinción de base inespecífica.
5. Tejido del paciente coloreado con anticuerpo primario	Cuando se detecta sobre-expresión del EGFr, aparecerá como tinción marrón de la membrana, con o sin tinción del citoplasma, de células tumorales que han sido tratadas con anticuerpo primario.

INTERPRETACIÓN DE LA TINCIÓN

Sistema de graduación Zymed EGFr

La proteína del EGFr se expresa en una variedad de tejidos normales y neoplásicos. El patrón de tinción celular puede ser homogéneo o heterogéneo (es decir, tinción de la membrana, tinción del citoplasma, o ambos). La distribución de las células coloreadas y la intensidad de la tinción tisular también pueden ser heterogéneas. Para la determinación de la sobre-expresión de la proteína del EGFr, solamente la membrana que se mancha debe ser considerada. Consulte las fotografías color en las recomendaciones para la evaluación de EGFr de Zymed (proporcionado con el equipo Zymed EGFr).

Tabla 3: Sistema de puntuación del EGFr para cortes tisulares representativos

Patrón de tinción: Membrana	Intensidad de tinción	Resultado	Sobre-expresión de EGFr
No hay tinción en las células tumorales.	Nada	0	Negativo
Se observa una tinción de membrana débil o apenas perceptible en las células tumorales. Se observa una tinción en parte de la membrana o tinción débil de toda la membrana.	Débil a Muy Débil	1+	Débil
Se observa la tinción moderada de la membrana en las células tumorales.	Moderada	2+	Moderada
Se observa una tinción fuerte de la membrana en las células tumorales.	Fuerte	3+	Fuerte

* La tinción EGFr de la membrana es observado usualmente en varios tumores como cabeza y cuello, pecho, colon y ovario. Sin embargo, la tinción membrana y citoplasmática ha serado observado o solo o en combinación an glioma.¹⁻³ La tinción citoplasmática ha serado observado en algunas carcinomas de las células escamosas del pulmón.⁴ Por lo tanto, puede ser importante a informar la intensidad de la tinción citoplasmática en gliomas y las carcinomas de pulmón.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Especificidad

La expresión de EGF4 en células A431 (carcinoma epidermoide humano), ya sea estimulado o no estimulado con EGF, ha sido detectada por el anticuerpo anti-EGFr de ratón (clon 31G7). En análisis por inmunotransferencia, el clon 31G7 reconoció a la banda de proteína kDa 170, correspondiente al peso molecular publicado para el EGFr. Clon 31G7 no reacciona con HER2. Clon 31G7 reconocerá EGFr VIII.

Reproducibilidad

El equipo Zymed EGFr se sometió a pruebas en 57 casos de muestras tisulares de carcinoma de cabeza y cuello. Cada caso examinado demostró un acuerdo regular de la reproducibilidad en la evaluación de la tinción en comparación con la falta de ella.

Inmunoreactividad

Reactividad del tejido anormal

Todos los estudios mencionados a continuación utilizaron el anticuerpo del clon 31G7 y tejidos infiltrados en parafina y fijados en formalina.

La sobre-expresión del EGFr fue demostrada en neoplasias pulmonares. En un estudio de 92 tumores neuroendocrinos, el 28% de las muestras de carcinoide típico, el 57% de las de carcinoide atípico, el 42% de las de carcinoma neuroendocrino de células grandes, el 39% de las de carcinoma neuroendocrino mixto de las células pequeñas y grandes, y el 22% de las muestras de carcinoma pulmonar de las células pequeñas, demostraron un resultado de 2+ a 4+ en la tinción para EGFr. En otro estudio, se observó sobre-expresión del EGFr en el 56% de las muestras de adenocarcinoma pulmonar y el 84% de las muestras de carcinoma pulmonar de las células escamosas.

En un estudio, el clon 31G7 tiñó el 50% de las muestras de carcinoma de las células escamosas de cabeza y cuello. Se informó de la expresión variable de EGFr en muestras de carcinoma de mama, a pesar de su presencia en células derivadas de los tres planos germinales; un estudio informó de la sobre-expresión del EGFr hasta en un 35% de los cánceres de mama. El clon 31G7 también ha sido utilizado en estudios de células glandulares de carcinoma endometrial y prostático. En un estudio de 40 casos de carcinoma endometrial endometriode, el anticuerpo anti-EGFr de ratón (clon 31G7) mostró tinción positiva en el 65% de las muestras.

DETECCIÓN Y DIAGNÓSTICO DE AVERÍAS

Causas posibles de la tinción negativa en portaobjetos positivos:

1. Los pasos en el protocolo de tinción se realizaron en una secuencia incorrecta.
2. Se omitieron los pasos de incubación del anticuerpo primario o secundario.
3. Se destruyeron antígenos lábiles.
4. La muestra no se fijó y/o procesó correctamente.
5. La muestra se deshidrató durante la tinción.

Causas posibles de la tinción débil en todos los portaobjetos:

1. La muestra retuvo exceso de líquido después de los aclarados.
2. Los tiempos de incubación no fueron suficientes.
3. El sustrato no se preparó correctamente.
4. La desparafinización fue incompleta (la tinción puede acompañarse por un fondo elevado).

Causas posibles para la tinción elevada del fondo:

1. La actividad de la peroxidasa endógena no se bloqueó completamente.
2. La desparafinización fue incompleta.
3. Aplicación excesiva del adhesivo tisular.
4. Aclarado inadecuado de los portaobjetos.
5. Excesivo desarrollo del sustrato.
6. Deshidratación de la muestra durante la tinción.

LIMITACIONES CONCRETAS DEL PRODUCTO

1. El anti-EGFr de ratón (clon 31G7) de Zymed requiere un pretratamiento enzimático de los cortes tisulares FFPE para una tinción adecuada. La imposibilidad del pretratamiento de los cortes tisulares FFPE puede dar lugar a la tinción reducida de resultados negativos falsos.
2. Los reactivos han sido optimizados. No diluir ni reemplazar reactivos de distintos lotes de fabricación.
3. Debido a la degradación del antígeno en los tejidos a lo largo del tiempo se pueden obtener resultados negativos falsos. Las muestras deben ser sometidas a tinción entre las 4 y 6 semanas siguientes a su montaje en los portaobjetos, cuando se almacenan a una temperatura ambiente seca (20-25 °C).

Referencias:

1. Marquez A, et al. Evaluation of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) by Chromogenic in Situ Hybridization (CISH) and Immunohistochemistry (IHC) in Archival Gliomas Using Bright-Field Microscopy. *Diagn Mol Pathol* 13(1):1-8, 2004.
2. Arita N, et al. Epidermal Growth Factor Receptor in human glioma. *J Neurosurg* 70:916-919, 1989.
3. Quezado MM, et al. Correlation of EGFR Gene Amplification and Overexpression by Chromogenic In Situ Hybridization (CISH) and Immunohistochemistry in High Grade Gliomas. USCAP Annual Meeting, Abstract 1334, 2003.
4. Piyathilake CJ, et al. Differential expression of growth factors in squamous cell carcinoma and precancerous lesions of the lung. *Clin Cancer Res* 8:734-744, 2002.

Representante autorizado de IVDD 98/79/EC:

MDSS

Burckhardstr. 1

D-30163 Hannover

Germany

Kit EGFr (clone 31G7)

Système de détection polymère (*SuperPicTure™*)

**Pour l'immuno-coloration du récepteur du facteur de croissance épidermique
(Epidermal Growth Factor Receptor, EGFr)**

No de cat. 28-8763

Bon pour 35 lames/tests



UTILISATION PREVUE

Pour Utilisation de Diagnostiques In Vitro. L'interprétation doit être faite par un pathologiste qualifié dans le cadre des antécédents cliniques du patient et d'autres tests de diagnostics.

Le kit EGFr de Zymed (clone 31G7) est un essai immunohistochimique (IHC) complet pour l'identification de l'expression de la protéine EGFr dans des tissus normaux et néoplasiques fixés dans du formol et incorporés dans de la paraffine pour une évaluation histologique.

L'interprétation des résultats examens doit être effectuée dans le cadre des antécédents cliniques du patient et simultanément avec d'autres tests de diagnostic effectués par des pathologistes qualifiés.

Principe de procédure

Le kit EGFr de Zymed utilise l'anticorps de souris anti-EGFr (clone 31G7) et la méthodologie de détection *SuperPicTure™* brevetée de Zymed pour détecter la présence d'anticorps primaires attachés aux antigènes dans des spécimens fixés dans du formol et incorporés dans de la paraffine. Des lames de contrôle contenant des lignées cellulaires fixées dans du formol et incorporées dans de la paraffine manifestant une expression d'EGFr positive et négative font partie de ce kit afin de valider la performance de coloration dans chaque essai IHC.

REACTIFS FOURNIS (Bons pour 35 tests)

- | | |
|-----------------------|--|
| Réactif n° 1. | Un flacon compte-gouttes (8 mL) de solution de Proteinase K prête à l'emploi |
| Réactif n° 2. | Un flacon compte-gouttes (4 mL) d'anticorps anti-EGFr (clone : 31G7) de souris prêt à l'emploi |
| Réactif n° 3. | Un flacon compte-gouttes (4 mL) de conjugué de polymère IgG anti-souris de HRP chèvre |
| Réactif n° 4. | Un flacon compte-gouttes (4 mL) de contrôle isotype négatif d'IgG ₁ de souris prêt à l'emploi |
| Réactif n° 5A. | Un flacon compte-gouttes (1 mL) de concentré tampon (20 x) |
| Réactif n° 5B. | Un flacon compte-gouttes (1 mL) de chromogène DAB (20 x) |
| Réactif n° 5C. | Un flacon compte-gouttes (1 mL) de peroxyde d'hydrogène à 0,6 % (20 x) |

Lames de contrôle 5 lames de contrôle (non colorées). Chaque lame contient 2 sections de lignées cellulaires fixées dans du formol et incorporées dans de la paraffine représentant des niveaux d'expression de protéine EGFr positifs (2+) et négatifs

Directives pour l'évaluation d'EGFr (1 jeu de photos) :

Un jeu de photos en couleur des spécimens du cancer du côlon.

RÉACTIFS ET MATÉRIEL NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS

- Méthanol absolu
- Lamelles couvrir-objet
- Eau distillée ou désionisée
- Éthanol
- Hématoxyline de Mayer
- Peroxyde d'hydrogène à 30 %
- Microscope optique
- Support pour préparations microscopiques tel que Clearmount™ (No de cat. 00-8010) ou Histomount™ (No de cat. 00-8030)
- Soluté tampon de phosphate (PBS) à 10 mM, pH 7,4, avec du Tween-20 à 0,05 %

- Contrôles tissulaires positifs ou négatifs (voir Contrôle de la qualité, page 4, pour des recommandations spécifiques sur les sources de tissus de contrôle externe)
- Bocaux ou bains de coloration
- Minuterie
- Xylène

STOCKAGE

Conserver entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption.

Les réactifs ne doivent pas être utilisés si des signes de dégradation ou d'une perte d'activité importante sont visibles. L'apparence normale des réactifs dans ce kit est celle d'un liquide exempt de particules.

MODE D'EMPLOI

A. *Traitement des sections de tissus avant la coloration*

Pour une coloration optimale, les sections de tissus doivent être prétraitées avec une solution de Proteinase K (réactif n° 1), tel que celle comprise dans le kit EGFr de Zymed. Cette procédure comprend un préchauffage de la solution de proteinase K à température ambiante, suivi d'une incubation de la solution de proteinase K sur des sections de tissus pendant 10 minutes à température ambiante (voir C3, étape n° 1 de la procédure de coloration, page 4, pour des instructions supplémentaires). D'autres traitements enzymatiques risquent de réduire ou d'éliminer complètement l'intensité de la coloration de l'EGFr. **La restauration antigénique par la chaleur (RAC) ne peut pas être utilisée avec l'anti-EGFr de souris (clone 31G7) de Zymed.**

B. *Préparation du réactif*

Préparer les réactifs suivants avant de colorer :

B1. Tampon de lavage (non fourni) : soluté tampon de phosphate (PBS) à 10 mM, pH 7,4, avec du Tween-20 à 0,05 %

B2. Solution de refroidissement à la peroxydase (non fournie) : H₂O₂ à 3 %

Ajouter 1 partie de peroxyde d'hydrogène à 30 % à 9 parties de méthanol absolu. Bien mélanger.

B3. Solution de substrat/chromogène DAB (Préparer après la étape n° 3 du protocole à la page 4)

Les réactifs n° 6A, 6B et 6C sont des concentrés de réactifs 20 x.

Ajouter 1 goutte de réactif 6A, 1 goutte de réactif 6B et 1 goutte de réactif 6C à 1 mL d'eau distillée ou désionisée. Bien mélanger. Protéger de la lumière et **utiliser dans l'heure**. Un mL de solution de substrat/chromogène DAB est suffisant pour dix sections de tissus.

B4. Coloration de contraste (non fournie)

L'hématoxyline de Mayer (No de cat. 00-8001) est recommandée pour la coloration de contraste.

B5. Solution de fixation (non fournie)

Un support de fixation permanent et non aqueux, tel que le Histomount™ (No de cat. 00-8030) ou Clearmount™ (No de cat. 00-8010) est recommandé.

C. *Procédure de coloration*

Sauf avis contraire, tous les réactifs doivent être équilibrés à température ambiante (entre 20 et 25 °C) avant d'effectuer l'immunocoloration.

C1. *Déparaffination et réhydratation*

1. Plonger deux fois les lames dans du xylène pendant 5 min chaque fois.
2. Plonger deux fois les lames dans de l'éthanol à 100 % pendant 2 min chaque fois.
3. Plonger les lames dans de l'éthanol à 95 % pendant 2 min.
4. Plonger les lames dans de l'éthanol à 80 % pendant 2 min et passer ensuite au refroidissement à la peroxydase.

C2. *Protocole d'immunohistocoloration (Tableau 1)*

Remarque : Ne pas effectuer de restauration antigénique par la chaleur (RAC) car elle risque d'entraîner une perte complète de l'antigénicité de l'EGFr.

Procédure de coloration	
Étape n° 1. Peroxydase Refroidissant	Pour des tissus de paraffine-incluse, ajouter 1 part 30% peroxyde d'hydrogène à 9 parts de méthanol absolu. Bien mélanger. Plonger les lames dans une solution de peroxydase refroidissant pendant 10 minutes. Laver avec du PBS 2 min., 3 fois. Passer à l'étape 2.
Étape n° 2. Digestion enzymatique	Préchauffer la solution de Proteinase K (réactif n° 1) à température ambiante. Appliquer 2 gouttes (100 µL) de Proteinase K préchauffée sur chaque spécimen. Incuber pendant 10 min à température ambiante. Rincer les lames dans du PBS/Tween frais, pendant 2 min chaque fois.
Étape n° 3. Anticorps primaire ou contrôle isotype négatif	Éponger l'excès de tampon de la lame. Appliquer 2 gouttes (100 µL) d'anti-EGFr de souris (réactif n° 2) ou de contrôle isotype négatif (réactif n° 4) sur chaque spécimen. Incuber pendant 30 min. Rincer les lames dans du PBS/Tween frais, pendant 2 min chaque fois.
Étape n° 4. de conjugué de polymère IgG anti-souris de HRP	Éponger l'excès de liquide sur la lame. Appliquer 2 gouttes (100 µL) de conjugué de polymère IgG anti-souris de HRP chèvre (réactif n° 3) sur chaque spécimen. Incuber pendant 10 min. Rincer les lames dans du PBS/Tween frais, pendant 2 min chaque fois.
Étape n° 5. Solution de substrat/ chromogène DAB (voir la section B3 pour la préparation du DAB).	Éponger l'excès de liquide sur la lame. Appliquer 2 gouttes (100 µL) de solution substrat/chromogène DAB (réactif n° 5) sur chaque spécimen. Incuber pendant 5 min. Rincer sous l'eau du robinet pendant 3 min.
Étape n° 6. Coloration de contraste	Plonger les lames dans de l'hématoxyline pendant 1 à 3 minutes. Rincer les lames sous l'eau du robinet, les plonger ensuite soit dans de l'ammoniac à 0,25 % dilué dans de l'eau soit dans du PBS à 10 mM, pH 7,4, pour faire bleuir les noyaux. Remarque : la coloration de contraste produira une coloration des noyaux des cellules de bleu clair à bleu foncé en fonction du temps d'incubation et de la puissance de l'hématoxyline. Une coloration de contraste excessive ou incomplète risque de compromettre une interprétation exacte des résultats.
Étape n° 7. Lamelle couvre-objet	Rincer brièvement les lames dans de l'eau distillée ou désionisée. Déshydrater les lames dans une série classée d'éthanol (70 %, 80 %, 95 %, 100 %) et nettoyer ensuite une fois dans du xylène. Un moyen de fixation permanent non aqueux est recommandé. Appliquer 2 gouttes (100 µL) de solution de fixation Histomount™ ou Clearmount™ sur la lame et ajouter la lamelle couvre-objet.

CONTROLE DE LA QUALITE

Lames de contrôle : Le kit EGFr de Zymed comprend 5 lames de contrôle (non colorées). Chaque lame contient 2 sections de lignées cellulaires fixées dans du formol et incorporées dans de la paraffine représentant des niveaux d'expression de protéine EGFr positifs (2+) et négatifs. Une lame de contrôle doit être colorée pour chaque procédure de coloration afin d'illustrer la validité de l'essai de coloration.

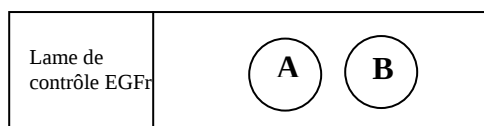


Image 1. Lame de contrôle EGFr avec lignée cellulaire A positif (2+) et lignée cellulaire B négatif. Veuillez noter cela lignées cellulaires ne sont pas dessinés à la balance, et soyez plus petit qu'indiqué dan le diagramme.

Les cancers colorectaux chez l'homme peuvent être utiles comme sources de tissus de contrôle positifs.

Toute coloration douteuse doit être signalée au Service technique de Zymed Laboratories, Inc.

Le kit EGFr de Zymed n'a pas été conçu pour fournir des informations de diagnostic au patient et/ou au médecin et n'a pas été validé à ces fins. Les lames doivent être évaluées en suivant le Tableau 2 afin de vérifier la validité de chaque série de coloration.

Tableau 2 : Évaluation des lames de contrôle et des lames d'échantillons

Ordre de lecture des lames	Évaluation
1. Lames de contrôle (fournies) (Pour vérifier la validité du souillure couru.)	La présence d'une coloration de la membrane brune positive sur la lame de contrôle positif indique un essai valide. La présence d'une coloration brune sur la lame de contrôle négatif indique qu'une coloration non spécifique a eu lieu dans l'essai. Les résultats de l'essai peuvent être invalides suite à une coloration excessive.
2. Contrôle tissulaire externe positif	La présence d'une coloration brune de la membrane, avec ou sans coloration cytoplasmique, doit être observée comme prévu pour les contrôles tissulaires externes positifs établis.
3. Contrôle tissulaire externe négatif	L'absence d'une coloration brune spécifique dans le contrôle tissulaire négatif confirme le manque de réactivité croisée entre le kit et les composants cellulaires. Si une coloration brune spécifique a lieu dans le contrôle tissulaire négatif, les résultats obtenus pour le spécimen du patient doivent être considérés comme invalides.
4. Tissu de patient coloré avec du contrôle de réactif négatif	Une absence de coloration brune spécifique indique la spécificité de la coloration d'antigène cible par l'anticorps primaire. Toute autre coloration brune ayant lieu dans le spécimen du patient coloré avec le contrôle de réactif négatif, tel que dans les tissus conjonctifs, les leucocytes, les érythrocytes ou les tissus nécrotiques, doivent être considérés comme étant une coloration de fond non spécifique.
5. Tissu de patient coloré avec des anticorps primaires	Lorsqu'une surexpression d'EGFr est détectée, elle ressemblera à une coloration brune de la membrane, avec ou sans coloration cytoplasmique, des cellules tumorales traitées avec un anticorps primaire.

INTERPRETATION DE LA COLORATION

Système de notation de l'EGFr de Zymed

La protéine EGFr est exprimée dans une gamme de tissus normaux et néoplasiques. Le motif de la coloration cellulaire peut être homogène ou hétérogène (c.-à-d. une coloration de la membrane, une coloration cytoplasmique, ou les deux). La distribution de cellules colorées et l'intensité de la coloration du tissu peuvent également être hétérogènes. Pour déterminer la surexpression de la protéine EGFr, une combinaison du motif et de l'intensité de la coloration de la membrane peut être évaluée en se basant sur les critères du Tableau 3. Pour aider à différencier les intensités de coloration, veuillez vous reporter aux photos en couleurs dans les Directives d'évaluation de l'EGFr de Zymed (fournies avec le kit EGFr de Zymed)..

Tableau 3 : Système de notation de l'EGFr pour une section de tissu représentative

Motif de coloration : Membrane	Intensité de coloration	Note	Surexpression de l'EGFr
Pas de coloration dans toutes les cellules tumorales.	Aucun	0	Négatif
Une coloration faible ou à peine visible de la membrane est observée. Une partie de la membrane est colorée, ou la coloration de la membrane complète est faible.	Très Faible à Faible	1+	Faible
Une coloration modérée de la membranaire est observée dans des cellules tumorales.	Modéré	2+	Modéré
Une coloration intense de la membrane est observée dans des cellules tumorales.	Intense	3+	Intense

* On observe habituellement la souillure membranous d'EGFr dans diverses tumeurs telles que la tête et le cou, le sein, l'intestin du côlon et l'ovaire. Cependant, on a observé la souillure membranous et cytoplasmique seul ou en association dans le glioma.¹⁻³ On a également observé la souillure cytoplasmique dans quelques cancers

squamous de cellules du poumon.⁴ Par conséquent, il peut être important de rapporter l'intensité de la souillure cytoplasmique dans le glioma et des carcinomas du poumon.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

Spécificité

Une expression d'EGFr dans des cellules A431 (cancer épidermoïde humain), soit stimulé soit non stimulé avec de l'EGF, a été détectée par l'anti-EGFr de souris (clone 31G7). Lors d'une analyse d'immunotransfert, le clone 31G7 a reconnu une bande protéique 170 kDa, correspondant au poids moléculaire publié de l'EGFr. Clone 31G7 ne réagit pas avec HER2. Clone 31G7 reconnaît EGFr vIII.

Reproductibilité

Le kit EGFr de Zymed a été testé sur 57 cas de spécimens de tissus de cancers de la tête et du cou. Chaque cas testé manifestait un accord constant dans la reproductibilité en ce qui concerne l'évaluation de la coloration par rapport à pas de coloration.

Immunoréactivité

Réactivité tissulaire anormale

Toutes les études citées ci-dessous ont utilisé l'anticorps anti-clone 31G7 et des tissus fixés dans du formol et incorporés dans de la paraffine.

La surexpression d'EGFr a été démontrée dans des néoplasmes pulmonaires. Dans une étude effectuée sur 92 tumeurs neuro-endocriniennes, 28 % de carcinoïdes typiques, 57 % de carcinoïdes atypiques, 42 % de cancers neuro-endocriniens à grandes cellules, 39 % de cancers neuro-endocriniens à petites et grandes cellules, et 22 % de cancers du poumon à petites cellules ont donné un score de 2+ à 4+ pour la coloration d'EGFr. Dans une autre étude, une surexpression de l'EGFr fut observée dans 56% des spécimens d'adénocarcinomes du poumon et 84 % des spécimens des cancers spino-cellulaires du poumon.

Dans une étude, le clone 31G7 a coloré 50 % des spécimens de carcinomes spino-cellulaires de la tête et du cou. Une expression d'EGFr variable a été reportée dans des spécimens de cancer du sein, malgré sa présence sur des cellules dérivées des trois feuilletts embryonnaires ; une étude a rapporté une surexpression de l'EGFr dans jusqu'à 35 % des cancers du sein. Le clone 31G7 a également été utilisé dans des études de cellules glandulaires de cancers de l'utérus et de la prostate. Dans une étude de 40 cas de carcinomes entométoïdes de l'utérus, l'anti-EGFr de souris (clone 31G7) a manifesté une coloration positive dans 65 % des spécimens.

DÉPANNAGE

Causes possibles d'une coloration négative sur des lames positives :

1. Les étapes du protocole de coloration n'ont pas été exécutées dans le bon ordre.
2. Les étapes d'incubation des anticorps primaires ou secondaires ont été omises.
3. Les antigènes labiles ont été détruits.
4. Le spécimen était mal attaché et/ou traité.
5. Le spécimen s'est déshydraté pendant la coloration.

Causes possibles pour une coloration faible sur toutes les lames :

1. Le spécimen a retenu un excès de liquide après les étapes de rinçage.
2. Les temps d'incubation n'étaient pas suffisants.
3. Le substrat était mal préparé.
4. La déparaffination était incomplète (la coloration peut être accompagnée d'une coloration de fond élevée).

Causes possibles pour une coloration de fond élevée :

1. L'activité de la peroxydase endogène n'était pas complètement bloquée.
2. La déparaffination était incomplète.
3. Application excessive de l'adhésif tissulaire.
4. Mauvais rinçage des lames.
5. Surdéveloppement du substrat.
6. Déshydratation du spécimen pendant la coloration.

LIMITATIONS SPECIFIQUES AU PRODUIT

1. L'anti-EGFr de souris (clone 31G7) de Zymed nécessite un prétraitement enzymatique des sections tissulaires FFIP pour obtenir une coloration appropriée. Si les sections tissulaires FFIP ne sont pas prétraitées, cela risque d'entraîner une coloration réduite de faux résultats négatifs.
2. Les réactifs ont été optimisés. Ne pas diluer davantage ni remplacer les réactifs par des lots de fabrication différente.
3. De faux résultats négatifs peuvent également être obtenus suite à une dégradation de l'antigène dans les tissus au fil du temps. Les spécimens doivent être colorés dans les 4 à 6 semaines après avoir été attachés aux lames lorsqu'ils sont conservés au sec à température ambiante (20 à 25 °C).

Références:

1. Marquez A, et al. Evaluation of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) by Chromogenic in Situ Hybridization (CISH) and Immunohistochemistry (IHC) in Archival Gliomas Using Bright-Field Microscopy. *Diagn Mol Pathol* 13(1):1-8, 2004.
2. Arita N, et al. Epidermal Growth Factor Receptor in human glioma. *J Neurosurg* 70:916-919, 1989.
3. Quezado MM, et al. Correlation of EGFR Gene Amplification and Overexpression by Chromogenic In Situ Hybridization (CISH) and Immunohistochemistry in High Grade Gliomas. USCAP Annual Meeting, Abstract 1334, 2003.
4. Piyathilake CJ, et al. Differential expression of growth factors in squamous cell carcinoma and precancerous lesions of the lung. *Clin Cancer Res* 8:734-744, 2002.

Représentant Autorisé:

MDSS

Burckhardstr. 1

D-30163 Hannover

Germany

Représentant Autorisé pour IVDD 98/79/EC

Kit EGFr (Clone 31G7)

Sistema di rilevazione polimere (*SuperPicTure™*)

**Per l'immunocolorazione del recettore per il fattore di crescita dell'epidermide
(Epidermal Growth Factor Receptor, EGFr)**

N. Cat. 28-8763

Sufficiente per 35 vetrini/test



SCOPO D'UTILIZZO

Per uso diagnostico In Vitro. L'interpretazione deve essere effettuata da un patologo qualificato entro il contesto dell'anamnesi clinica del paziente ed in considerazione di altri test diagnostici.

Il Kit EGFr di Zymed (Clone 31G7) costituisce una prova immunoistochimica (IIC) per l'identificazione dell'espressione della proteina EGFr nei tessuti normali e neoplastici fissati in formalina ed inclusi in paraffina ai fini della valutazione istologica.

L'interpretazione degli esiti dell'analisi deve essere effettuata da un patologo qualificato entro il contesto dell'anamnesi clinica del paziente ed in considerazione di altri test diagnostici.

Principio di funzionamento

Il Kit EGFr di Zymed prevede l'impiego dell'anticorpo anti-EGFr di topo (clone 31G7) e della metodologia di rilevazione *SuperPicTure™* polimere brevettata da Zymed per rilevare la presenza di anticorpi primari legati ad antigeni in provini fissati in formalina ed inclusi in paraffina. Al presente kit sono acclusi dei vetrini di controllo contenenti delle serie cellulari fissate in formalina ed incluse in paraffina che presentano espressioni positive e negative di EGFr ai fini della convalida della performance di colorazione di ciascuna prova d'immunocolorazione.

REAGENTI ACCLUSI (Sufficienti per 35 test)

- | | |
|-----------------------------|--|
| Reagente 1. | Una boccetta contagocce (da 8 mL) di Soluzione a base di Proteinase K pronta per l'uso |
| Reagente 2. | Una boccetta contagocce (da 4 mL) di Anticorpo anti-EGFr di topo (Clone: 31G7) pronto per l'uso |
| Reagente 3. | Una boccetta contagocce (da 4 mL) di Coniugato di polimere-igG anti-topo HRP-capra pronto per l'uso |
| Reagente 4. | Una boccetta contagocce (da 4 mL) di Controllo isotipo negativo IgG1 di topo pronto per l'uso. |
| Reagente 5A. | Una boccetta contagocce (da 1 mL) di Concentrato di tampone (20X) |
| Reagente 5B. | Una boccetta contagocce (da 1 mL) di Cromogeno DAB (20X) |
| Reagente 5C. | Una boccetta contagocce (da 1 mL) di Perossido di idrogeno allo 0,6% (20X) |
| Vetrini di controllo | 5 vetrini di controllo (non colorati). Ciascun vetrino contiene 2 sezioni di serie cellulari fissate in formalina ed incluse in paraffina rappresentanti livelli positivi (2+) e negativi di espressione della proteina EGFr |

Linee guida per la valutazione dell'EGFr (1 set fotografici):

Sono acclusi un set di fotografie a colori di campioni di tessuto affetto da carcinoma del colon, quali linee guida per l'assegnazione di un punteggio ai vari livelli di espressione dell'EGFr.

REAGENTI E MATERIALI OCCORRENTI MA NON ACCLUSI

- Metanolo assoluto
- Coprivetrino
- Acqua distillata o deionizzata
- Etanolo
- Ematossilina di Mayer
- Perossido di idrogeno al 30%
- Microscopio ottico

- Mezzo di fissaggio, quale Clearmount™ (N. Cat.00-8010) o Histomount™ (N. Cat.00-8030).
- Soluzione fisiologica tamponata a base di fosfato (Phosphate Buffer Saline, PBS) a 10 mM, pH 7,4, con Tween-20 allo 0,05%
- Controlli tissutali positivi e negativi (Per le raccomandazioni specifiche relativamente alle fonti tissutali di controllo esterno, pregasi consultare la sezione Controllo della qualità a pagina 4)
- Bagni o vaschette per la colorazione
- Temporizzatore
- Xilene

CONSERVAZIONE

Conservare a 2-8 °C. Non usare dopo la data di scadenza.

Astenersi dall'usare i reagenti qualora si rilevino dei segni evidenti di deterioramento o un calo di attività sostanziale. Di norma, i reagenti acclusi al presente kit dovrebbero apparire quale liquido privo di materia particolata.

ISTRUZIONI PER L'USO

A. *Trattamento precolorazione delle sezioni tissutali*

Per una colorazione ottimale, le sezioni tissutali devono essere pretrattate con una soluzione a base di Proteinase K (Reagente 1), acclusa al Kit EGFR di Zymed. La procedura in oggetto contempla il preriscaldamento della soluzione a base di Proteinase K a temperatura ambiente, seguito dall'incubazione della medesima sulle sezioni tissutali per 10 minuti a temperatura ambiente (per le istruzioni, pregasi consultare la sezione C3, Fase 1 della Procedura di colorazione a pagina 4). Altri trattamenti enzimatici potrebbero attenuare l'intensità della colorazione dell'EGFR se non eliminarla del tutto. **Con l'anti-EGFR di topo (clone 31G7) di Zymed NON SI PUÒ usare il richiamo dei determinanti antigeni indotto mediante calore (Heat Induced Epitope Retrieval, HIER).**

B. *Preparazione dei reagenti*

Prima della colorazione, preparare i seguenti reagenti:

B1. Tampone di lavaggio (non accluso): soluzione fisiologica tamponata a base di fosfato (Phosphate Buffer Saline, PBS) a 10 mM, pH 7,4, con Tween-20 allo 0,05%

B2. Soluzione per il quenching di perossidasi (non acclusa): H₂O₂ al 3%

Aggiungere 1 parte di perossido di idrogeno al 30% per ogni 9 parti di metanolo assoluto. Miscelare accuratamente.

B3. Soluzione di substrato/cromogeno DAB (preparare dopo aver eseguito la Fase 3 del protocollo a pagina 4)

I reagenti 6A, 6B e 6C sono forniti in forma concentrata 20X.

Aggiungere 1 goccia del Reagente 6A, 1 goccia del Reagente 6B ed 1 goccia del Reagente 6C in 1 mL di acqua distillata o deionizzata. Miscelare accuratamente. Conservare lontano da fonti di luce ed usare **entro un'ora**. Un mL di Soluzione di substrato/cromogeno DAB è sufficiente per dieci sezioni tissutali.

B4. Controcolorazione (non acclusa)

Per la controcolorazione si raccomanda l'uso della Ematossilina di Mayer (N. Cat.00-8001).

B5. Soluzione di fissaggio (non acclusa)

Si raccomanda l'impiego di un mezzo di fissaggio permanente non acquoso quale Histomount™ (N. Cat. 00-8030) o Clearmount™ (N. Cat. 00-8010).

C. *Procedura di colorazione*

Salvo indicazione contraria, tutti i reagenti dovrebbero essere equilibrati a temperatura ambiente (20-25°C) prima dell'immunocolorazione.

C1. Deparaffinizzazione e reidratazione

1. Immergere i vetrini in xilene due volte, per 5 min. alla volta.
2. Immergere i vetrini in etanolo al 100% due volte, per 2 min. alla volta.
3. Immergere i vetrini in etanolo al 95% per 2 min.
4. Immergere i vetrini in etanolo all'80% per 2 min., quindi eseguire il quenching di perossidasi.

C2. Protocollo di immunoistocolorazione (Tabella 1)

Nota: Non eseguire il richiamo dei determinanti antigeni indotto mediante calore (Heat Induced Epitope Retrieval, HIER) giacché ciò potrebbe causare la perdita completa dell'antigenicità EGFr.

Procedura di colorazione	
Fase 1. Quenching di perossidasi	Per i tessuti inclusi in paraffina, aggiungere il 30% di perossido di idrogeno a 9 parti di metanolo assoluto. Mescolare bene. Immergere vetrini in soluzione quenching di perossidasi per 10 minuti. Lavare con PBS 2 min., 3 volte. Procedere al Passaggio 2.
Fase 2. Digestione enzimatica	Preriscaldare la soluzione a base di Proteinase K (Reagente 1) a temperatura ambiente. Applicare su ciascun provino 2 gocce (100 µL) della Proteinase K preriscaldata. Incubare per 10 min. a temperatura ambiente. Risciacquare in PBS/Tween fresca tre volte, per 2 min. a volta.
Fase 3. Anticorpo primario o Controllo isotipo negativo	Asciugare il liquido in eccesso presente sul vetrino. Applicare su ciascun provino 2 gocce (100 µL) dell'anti-EGFr di topo (Reagente 2) o del Controllo isotipo negativo (Reagente 4). Incubare per 30 min. Risciacquare in PBS/Tween fresca tre volte, per 2 min. a volta.
Fase 4. Coniugato di polimere-igG anti-topo HRP	Asciugare il liquido in eccesso presente sul vetrino. Applicare su ciascun provino 2 gocce (100 µL) del Coniugato di polimere-igG anti-topo HRP-capra (Reagente 3) Incubare per 10 min. Risciacquare in PBS/Tween fresca tre volte, per 2 min. a volta.
Fase 5. Soluzione di substrato/ cromogeno DAB (Per la preparazione del DAB, pregasi consultare la sezione B3.)	Asciugare il liquido in eccesso presente sul vetrino. Applicare su ciascun provino 2 gocce (100 µL) della Soluzione di substrato/cromogeno DAB (Reagente 5). Incubare per 5 min. Risciacquare con acqua di rubinetto corrente per 3 min.
Fase 6. Controcolorazione	Immergere i vetrini in ematossilina per 1-3 minuti. Risciacquare i vetrini con acqua di rubinetto corrente, quindi immergerli in acqua ammoniacale diluita allo 0,25% o in PBS a 10 mM, pH 7,4, per tingere di blu i nuclei. Nota: la controcolorazione darà adito ad una colorazione dei nuclei delle cellule la cui tonalità può variare da azzurro chiaro a blu scuro a seconda del tempo di incubazione osservato e della potenza dell'ematossilina impiegata. Una colorazione eccessiva o incompleta potrebbe compromettere la correttezza dell'interpretazione dei risultati.
Fase 7. Coprivetrino	Risciacquare brevemente i vetrini in acqua distillata o deionizzata. Disidratare i vetrini in una serie graduata di etanolo (70%, 80%, 95%, 100%), quindi lavare immergendoli una volta in xilene. Si raccomanda l'impiego di un mezzo di fissaggio permanente non acquoso. Applicare sul vetrino 2 gocce (100 µL) della Soluzione fissativa Histomount™ o Clearmount™, quindi inserire nel coprivetrino.

CONTROLLO DELLA QUALITÀ

Vetrini di controllo: Il Kit EGFr di Zymed contiene 5 vetrini di controllo (non colorati). Ciascun vetrino contiene 2 sezioni di serie cellulari fissate in formalina ed incluse in paraffina rappresentanti livelli positivi (2+) e negativi di espressione della proteina EGFr. Si dovrebbe colorare un vetrino di controllo per ciascuna procedura di colorazione eseguita onde confermarne la validità.

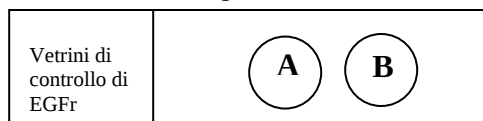


Immagine 1. Vetrini di controllo di EGFr con la serie cellulari positiva (2+) A e la serie cellulari negazione B. Noti prego quello las series cellulari non sono disegnati alla scala, e sia più piccolo de quanto indicto nello schema.

I campioni di tessuto affetto da carcinoma colon-rettale potrebbero risultare utili quali fonti per il controllo tissutale positivo.

Qualsiasi colorazione controversa dovrebbe essere comunicata al Reparto di assistenza tecnica Zymed Laboratories, Inc.

Lo scopo del Kit EGFr di Zymed non consiste nel fornire a pazienti e/o medici informazioni prognostiche e non ne è stato convalidato l'uso per tale scopo. I vetrini dovrebbero essere valutati conformemente a quanto riportato nella Tabella 2 ai fini della conferma della validità di ciascuna procedura di colorazione.

Tabella 2: Valutazione del vetrino di controllo e del vetrino campione

Ordine di lettura dei vetrini	Valutazione
1. Vetrini di controllo (Acclusi) (Per verificare la validità della macchiatura serie.)	La presenza di una colorazione marrone positiva della membrana nel vetrino del controllo positivo indica una prova valida. La presenza di una colorazione marrone nel vetrino del controllo negativo indica che nella prova in oggetto si è verificata una colorazione aspecifica. I risultati di una prova potrebbero risultare non validi a causa di una colorazione eccessiva.
2. Controllo tissutale positivo esterno	Per i controlli tissutali positivi esterni standard si dovrebbe poter osservare la colorazione marrone della membrana, con o senza colorazione citoplasmatica, normalmente attesa.
3. Controllo tissutale negativo esterno	L'assenza di una colorazione marrone specifica nel controllo tissutale negativo conferma la mancata cross-reazione del kit con le componenti cellulari. Qualora si rilevi una colorazione marrone specifica nel controllo tissutale negativo, i risultati ottenuti per il provino del paziente interessato dovrebbero essere ritenuti non validi.
4. Tessuto di paziente colorato con controllo reagente negativo	L'assenza di una colorazione marrone specifica indica la specificità della colorazione dell'antigene bersaglio da parte dell'anticorpo primario. Altre eventuali colorazioni marroni rilevate nel provino di un paziente colorato con il controllo reagente negativo, a livello di tessuto connettivo, leucociti, eritrociti o tessuto necrotico, dovrebbero essere considerate quali colorazioni di fondo aspecifiche.
5. Tessuto di paziente colorato con anticorpo primario	Alla rilevazione di una sovraespressione dell'EGFr, si osserverà una colorazione marrone della membrana, con o senza colorazione citoplasmatica, delle cellule tumorali trattate con anticorpo primario.

INTERPRETAZIONE DELLA COLORAZIONE

Sistema di punteggio dell'EGFr di Zymed

La proteina EGFr è espressa in una gamma variegata di tessuti normali e neoplastici. La colorazione delle cellule può apparire omogenea o eterogenea (ovvero, colorazione della membrana, colorazione citoplasmatica o entrambe). Anche la distribuzione delle cellule colorate e l'intensità della colorazione tissutale potrebbero apparire eterogenee. Per la determinazione della sovraespressione della proteina EGFr, si può eseguire una valutazione combinata del modello e dell'intensità della colorazione attenendosi ai criteri riportati nella Tabella 3. Per agevolare la differenziazione dell'intensità della colorazione, pregasi far riferimento alle fotografie a colori riportate nelle Linee guida Zymed per la valutazione dell'EGFr (accluse al Kit EGFr Zymed).

Tabella 3: Sistema di punteggio dell'EGFr per sezioni tissutali rappresentative

Modello di colorazione: Membrana	Intensità di colorazione	Punteggio	Sovraespressione dell'EGFr
Nessuna colorazione in tutte le cellule tumorali.	Nessuna	0	Negativo
Si osserva una colorazione lieve o appena percettibile della membrana. Colorazione solo parziale della membrana, oppure una debole colorazione totale della membrana.	Molto Debole a Debole	1+	Debole
Si osserva una colorazione moderata della membrana delle cellule tumorali.	Moderata	2+	Moderata
Si osserva una forte colorazione della membrana delle cellule tumorali.	Forte	3+	Forte

* Solitamente in vari tumori quali mammella, colon, ovario, testa e collo si osserva una colorazione di membrana per l'EGFr. Nel glioma, si sono talvolta evidenziate marcature di membrana e/o citoplasmatiche.¹⁻³ Una colorazione citoplasmatica è stata osservata anche in alcuni tumori a cellule squamose del polmone.⁴ Risulta quindi importante analizzare l'intensità della colorazione citoplasmatica in gliomi e carcinomi polmonari.

CARATTERISTICHE DELLA PERFORMANCE

Specificità

Nelle cellule A431 (carcinoma epidermoide umano), stimulate o non stimulate con EGF, l'espressione dell'EGFr è stata rilevata tramite anti-EGFr di topo (clone 31G7). Nelle analisi di trasferimento di proteine secondo il metodo di Western, il clone 31G7 ha identificato una banda proteica da 170 kDa, corrispondente al peso molecolare pubblicato dell'EGFr. Clone 31G7 non reagisce HER2. Clone 31G7 riconoscerà EGFr VIII.

Riproducibilità

Il Kit EGFr di Zymed è stato testato su campioni tissutali tratti da 57 casi di carcinoma della testa e del collo. Ciascun caso testato ha dimostrato l'esistenza di una concordanza coerente nella riproducibilità, nella valutazione della colorazione rispetto alla mancata colorazione

Immunoreattività

Reattività nei tessuti anomali

In tutti gli studi menzionati qui di seguito si sono usati l'anticorpo del clone 31G7 e tessuti fissati in formalina ed inclusi in paraffina.

Nei neoplasmi polmonari è stata dimostrata una sovraespressione dell'EGFr. In uno studio condotto su 92 casi di tumore neuroendocrino, il 28% dei casi di carcinoma tipico, il 57% dei casi di carcinoma atipico, il 42% dei casi di carcinoma neuroendocrino a grandi cellule, il 39% dei casi di carcinoma neuroendocrino a cellule miste piccole e grandi e il 22% dei casi di carcinoma polmonare a piccole cellule, hanno riportato un punteggio di colorazione EGFr compreso tra 2+ e 4+. In un altro studio, la sovraespressione dell'EGFr è stata osservata nel 56% dei campioni tratti da soggetti affetti da adenocarcinoma polmonare e nell'84% dei campioni derivati da pazienti affetti da carcinoma polmonare a cellule squamose.

In uno studio il clone 31G7 ha colorato il 50% dei campioni di tessuto affetto da carcinoma a cellule squamose della testa e del collo. In alcuni campioni di tessuto affetto da carcinoma mammario si è rilevata una espressione dell'EGFr variabile, nonostante ne sia stata osservata la presenza in cellule derivate da tutti e tre gli strati germinativi; in uno studio la sovraespressione dell'EGFr è stata rilevata fino al 35% dei casi di carcinoma mammario. Il clone 31G7 è inoltre stato usato in studi condotti su cellule ghiandolari affette da carcinoma endometriale e prostatico. In uno studio condotto su 40 casi di carcinoma endometriale endometriale, l'anti-EGFr di topo (clone 31G7) ha manifestato una colorazione positiva nel 65% dei campioni.

RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

Cause possibili di colorazione negativa nei vetrini positivi:

1. Le fasi previste dal protocollo di colorazione non sono state eseguite nell'ordine corretto.
2. Sono state omesse le fasi di incubazione dell'anticorpo primario e secondario.
3. Sono stati distrutti degli anticorpi labili.
4. I provini non sono stati debitamente fissati e/o trattati.

5. I provini si sono disidratati nel corso della colorazione.

Cause possibili di colorazione debole in tutti i vetrini:

1. I provini hanno trattenuto il liquido in eccesso accumulatosi durante le fasi di risciacquo.
2. Sono stati osservati tempi di incubazione insufficienti.
3. Il substrato non è stato preparato correttamente.
4. Deparaffinizzazione incompleta (la colorazione potrebbe essere accompagnata da fondo elevato).

Cause possibili di colorazione con fondo elevato:

1. L'attività perossidasi endogena non è stata bloccata completamente.
2. Deparaffinizzazione incompleta.
3. Applicazione di un quantitativo eccessivo di adesivo per tessuti.
4. Risciacquo inadeguato dei vetrini.
5. Sovrasviluppo del substrato.
6. Disidratazione dei provini durante la colorazione.

LIMITAZIONI SPECIFICHE DEL PRODOTTO

1. Ai fini della debita colorazione, l'anti-EGFr di topo (clone 31G7) di Zymed richiede il pretrattamento enzimatico delle sezioni tissutali fissate in formalina ed incluse in paraffina (formalin-fixed, paraffin-embedded, FFPE). Il mancato pretrattamento delle sezioni tissutali FFPE potrebbe comportare una riduzione della colorazione dei risultati falsi-negativi.
2. I reagenti sono stati ottimizzati. Astenersi dal diluire ulteriormente i reagenti o dal sostituirli con reagenti provenienti da un diverso lotto di fabbricazione.
3. Si possono ottenere dei risultati falsi-negativi a causa della degradazione graduale dell'antigene nei tessuti. I provini dovrebbero essere colorati entro 4-6 settimane dalla data di fissaggio sui vetrini, se conservati in un luogo asciutto a temperatura ambiente (20-25°C).

Riferimenti:

1. Marquez A, et al. Evaluation of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) by Chromogenic In Situ Hybridization (CISH) and Immunohistochemistry (IHC) in Archival Gliomas Using Bright-Field Microscopy. *Diagn Mol Pathol* 13(1):1-8, 2004.
2. Arita N, et al. Epidermal Growth Factor Receptor in human glioma. *J Neurosurg* 70:916-919, 1989.
3. Quezado MM, et al. Correlation of EGFR Gene Amplification and Overexpression by Chromogenic In Situ Hybridization (CISH) and Immunohistochemistry in High Grade Gliomas. USCAP Annual Meeting, Abstract 1334, 2003.
4. Piyathilake CJ, et al. Differential expression of growth factors in squamous cell carcinoma and precancerous lesions of the lung. *Clin Cancer Res* 8:734-744, 2002.

Rappresentante Autorizzato:

MDSS

Burckhardstr. 1

D-30163 Hannover

Germany

Rappresentante Autorizzato per IVDD 98/79/EC

EGFr Kit (Klon 31G7)

SuperPicTure™ Detektionssystem (Polymer)

Für immunohistochemische Färbung von epidermalem Wachstumsfaktor-Rezeptor (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFr)

Kat.- Nr. 28-8763

Reicht für 35 Objektträger/Tests



VERWENDUNGSZWECK

Für In Vitro Diagnostischem Gebrauch. Die Interpretation muss im Zusammenhang mit der klinischen Vorgeschichte des Patienten und anderen Diagnostiktests eines qualifizierten Pathologen vorgenommen werden.

Beim EGFr Kit (Klon 31G7) von Zymed handelt es sich um einen immunohistochemischen (IHC-) Assay zur Identifizierung einer EGFr-Proteinexpression in normalen und neoplastischen Geweben, die zur histologischen Beurteilung in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet wurden.

Die test-Ergebnisse müssen im Rahmen der klinischen Anamnese des Patienten und in Verbindung mit anderen diagnostischen Tests von qualifizierten Pathologen interpretiert werden.

Verfahrensprinzip

Das EGFr Kit von Zymed verwendet den Zymed Mausantikörper Anti-EGFr (Klon 31G7) und Zymeds patentrechtlich geschützte *SuperPicTure™* Detektionsmethode zur Erkennung der Gegenwart von den an Antigenen angelagerten primären Antikörpern in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Proben. Die in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte müssen deparaffiniert und rehydriert werden. Kontrollobjektträger mit in Formalin fixierten, in Paraffin eingebetteten Zellreihen, die positive und negative EGFr-Expressionen anzeigen, sind für die Validierung der Färbleistung jedes IHC-Assay im Kit enthalten.

MITGELIEFERTE REAGENZIEN (Ausreichend für 35 Tests)

- | | |
|--------------------|--|
| Reagenz 1. | Ein Tropferfläschchen (8 mL) gebrauchsfertige Proteinase-K-lösung |
| Reagenz 2. | Ein Tropferfläschchen (4 mL) gebrauchsfertiger Anti-EGFr (Klon: 31G7) Mausantikörper |
| Reagenz 3. | Ein Tropferfläschchen (4 mL) gebrauchsfertiges HRP-Ziegen Anti-Maus IgG-Polymerkonjugat |
| Reagenz 4. | Ein Tropferfläschchen (4 mL) gebrauchsfertige Maus IgG ₁ negative Isotypkontrolle |
| Reagenz 5A. | Ein Tropferfläschchen (1 mL) Pufferkonzentrat (20X) |
| Reagenz 5B. | Ein Tropferfläschchen (1 mL) DAB-Chromogen (20X) |
| Reagenz 5C. | Ein Tropferfläschchen (1 mL) 0,6 % Hydrogenperoxid (20X) |

Kontrollobjektträger 5 Kontrollobjektträger (ungefärbt). Jeder Objektträger enthält 2 in Formalin fixierte, in Paraffin eingebettete Zellreihenschnitte für positive (2+) und negative Levels der EGFr Proteinexpression

EGFr Bewertungsrichtlinien (1 Foto):

Als Richtlinien für die Bewertung eines Kolonkarzinoms.

ERFORDERLICHE, JEDOCH NICHT MITGELIEFERTE REAGENZIEN UND MATERIALIEN

- Absolutes Methanol
- Coverslips
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Ethanol
- Mayer Hämatoxylin
- 30 % Hydrogenperoxid
- Lichtmikroskop
- Fixativ, wie z. B. Clearmount™ (Kat.- Nr. 00-8010) oder Histomount™ (Kat.- Nr. 00-8030)
- 10 mL phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7.4, mit 0,05 % Tween-20

- Positive und negative Gewebekontrollen (unter Qualitätskontrolle auf Seite 4 sind Empfehlungen für externe Kontrollgewebequellen aufgeführt)
- Färbebecher oder -bäder
- Zeitgeber
- Xylen

AUFBEWAHRUNG

Bei 2-8°C aufbewahren. Nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.

Reagenzien sollten nicht mehr verwendet werden, wenn ein Zerfall oder wesentlicher Verlust der Aktivität zu bemerken sind. Im normalen Zustand sind die Reagenzien in diesem Kit eine partikelfreie Flüssigkeit.

GEBRAUCHSANLEITUNG

A. Behandlung der Gewebeschnitte vor der Färbung

Zur Erzielung einer optimalen Färbung müssen die Gewebeschnitte mit einer Proteinase K-lösung (Reagenz 1), die ebenfalls im Zymed EGFr Kit enthalten ist, vorbehandelt werden. Bei diesem Verfahren wird die Proteinase K-lösung auf Zimmertemperatur erwärmt und dann auf den Gewebeschnitten 10 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert (Anweisungen sind unter C3, Schritt 1 des Färbungsverfahrens auf Seite 4 aufgeführt). Bei Verwendung anderer Enzyme kann die Intensität der EGFr-Färbung reduziert oder vollkommen eliminiert werden. **Durch Wärmeeinwirkung induzierte Wiedergewinnung der Epitope (HIER) darf mit Maus-Anti-EGFr (Klon 31G7) von Zymed nicht eingesetzt werden.**

B. Vorbereitung des Reagenz

Vor der Färbung müssen folgende Reagenzien vorbereitet werden:

B1. Waschpuffer (nicht enthalten): 10 mL phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7.4, mit 0,05 % Tween-20

B2. Peroxidase-Löschlösung (nicht enthalten): 3 % H₂O₂

Zu 1 Teil 30% Hydrogenperoxid 9 Teile absolutes Methanol hinzugeben. Gut vermischen.

B3. DAB-Substrat/Chromogenlösung (nach dem 3. Protokollschritt auf Seite 4 zubereiten)

Reagenzien 6A, 6B und 6C sind Reagenzien mit 20-facher Konzentration.

1 Tropfen Reagenz 6A, 1 Tropfen Reagenz 6B und 1 Tropfen Reagenz 6C in 1 mL destilliertes oder entionisiertes Wasser geben. Gut vermischen. Vor Licht schützen und **innerhalb einer Stunde verwenden**. Ein mL DAB-Substrat/Chromogenlösung reicht für zehn Gewebeschnitte.

B4. Gegenfärbung (nicht enthalten)

Mayer Hämatoxylin Kat.- Nr. 00-8001) wird für die Gegenfärbung empfohlen.

B5. Fixativ (nicht enthalten)

Ein wasserfreies, permanentes Fixativ wie z. B. Histomount™ (Kat.- Nr. 00-8030) oder Clearmount™ (Kat.- Nr. 00-8010) wird empfohlen.

C. Färbungsverfahren

Wenn nicht anderweitig angegeben, sollten alle Reagenzien vor der Immunfärbung an die Raumtemperatur (20-25°C) angeglichen werden.

C1. Entparafinisierung und Rehydrierung

1. Die Objektträger zweimal für jeweils 5 Minuten in Xylen eintauchen.
2. Die Objektträger zweimal für jeweils 2 Minuten in 100 % Ethanol eintauchen.
3. Die Objektträger 2 Minuten in 95 % Ethanol eintauchen.
4. Die Objektträger 2 Minuten in 80 % Ethanol eintauchen und dann mit der Peroxidase-Löschung fortfahren.

C2. Immunhistochemisches Färbungsprotokoll (Tabelle 1)

Hinweis: Keine durch Wärmeeinwirkung induzierte Wiedergewinnung der Epitope (HIER) durchführen. Dadurch kann die EGFr-Antigenität vollkommen verloren gehen.

Färbungsverfahren	
Schritt 1. Peroxidase lösung	Teil 30%iges Hydrogen Peroxid zu 9 Teilen reinem Methanol geben. Gut mischen. Die Objektträger für 10 Min. in Peroxidase - lösung - lösung tauchen. Mit PBS 2 Min., 3 mal waschen. Mit Schritt 2 fortfahren.
Schritt 2. Enzym-Digestion	Die Proteinase K-lösung (Reagenz 1) auf Zimmertemperatur erwärmen. Jeder Probe 2 Tropfen (100 µL) vorgewärmtes Proteinase K zugeben. Für 10 Minuten bei Zimmertemperatur inkubieren. Die Objektträger dreimal für jeweils 2 Minuten in frischer phosphatgepufferter Kochsalz-/Tween-Lösung waschen.
Schritt 3. Primäntikörper oder negative Isotypkontrolle	Überschüssige Flüssigkeit vom Objektträger abtupfen. Jeder Probe 2 Tropfen (100 µL) Maus anti-EGFr (Reagenz 2) oder negative Isotypkontrolle (Reagenz 4) zugeben. 30 Minuten inkubieren. Die Objektträger dreimal für jeweils 2 Minuten in frischer phosphatgepufferter Kochsalz-/Tween-Lösung waschen.
Schritt 4. HRP-Ziegen Anti-Maus IgG-Polymerkonjugat	Überschüssige Flüssigkeit vom Objektträger abtupfen. Jeder Probe 2 Tropfen (100 µL) HRP-Ziegen Anti-Maus IgG-Polymerkonjugat (Reagenz 3) zugeben. 10 Minuten inkubieren. Die Objektträger dreimal für jeweils 2 Minuten in frischer phosphatgepufferter Kochsalz-/Tween-Lösung waschen.
Schritt 5. DAB-Substrat/ Chromogenlösung (Die DAB-Zubereitung ist in Abschnitt B3 beschrieben.)	Überschüssige Flüssigkeit vom Objektträger abtupfen. Jeder Probe 2 Tropfen (100 µL) DAB-Substrat/Chromogenlösung (Reagenz 5) zugeben. 5 Minuten inkubieren. Unter fließendem Leitungswasser 3 Minuten abspülen.
Schritt 6. Gegenfärbung	Die Objektträger 1 - 3 Minuten in Hämatoxylin eintauchen. Die Objektträger unter fließendem Leitungswasser abspülen und dann entweder in 0,25 % verdünnten Ammoniak in Wasser oder in 10 mL phosphatgepufferte Kochsalzlösung (pH 7.4) eintauchen, um den Nukleus blau zu färben. Hinweis: Bei der Gegenfärbung wird je nach Inkubationszeit und Hämatoxylinpotenz eine hell- bis dunkelblaue Färbung des Zellkerns erzeugt. Eine übermäßige oder unvollständige Gegenfärbung beeinträchtigt die richtige Interpretation der Ergebnisse.
Schritt 7. Coverslip	Die Objektträger kurz mit destilliertem oder entionisiertem Wasser abspülen. Dann die Objektträger stufenweise (70 %, 80 %, 95 %, 100 %) in Ethanol dehydrieren und einmal in Xylen klären. Es wird ein wasserfreies permanentes Fixativ empfohlen. 2 Tropfen (100 µL) Histomount™ oder Clearmount™ Fixativlösung auf den Objektträger geben und den Coverslip anbringen.

QUALITÄTSKONTROLLE

Kontrollobjektträger: Das EGFr Kit von Zymed enthält 5 Kontrollobjektträger (ungefärbt). Jeder Kontrollobjektträger enthält 2 in Formalin fixierte, in Paraffin eingebettete Zellreihenschnitte für positive (2+) und negative Levels der EGFr Proteinexpression Für jedes Färbungsverfahren sollte ein Kontrollobjektträger mitgefärbt werden, um die Färbung zu validieren.

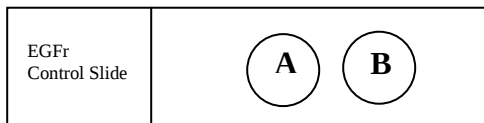


Bild 1. EGFr Kontrollobjektträger mit positiv Zelllinie A und negativ Zelllinie B. Es ist zu beachten, dass die Zelllinien nicht maßstabsgetreu dargestellt sind und kleiner als in dieser Zeichnung sind.

Kolorektalkarzinome eignen sich gut als positive Kontrollgewebe.

Kontroverse Färbungsergebnisse sollten dem Technical Service Department der Zymed Laboratories, Inc. gemeldet werden.

Das Zymed EGFr Kit ist nicht für prognostische Informationen für Patienten und/oder Ärzte vorgesehen und wurde auch nicht für solche Zwecke validiert. Die Objektträger sollten gemäß Tabelle 2 bewertet werden, um die Gültigkeit jeder Färbung zu validieren.

Tabelle 2: Bewertung der Kontrollobjektträger und Kontrollobjektträger

Reihenfolge der Objektträgerablesung	Bewertung
1. Kontrollobjektträger (mitgeliefert) (Gültigkeit jeder Färbung zu validieren)	Eine positive braune Membranfärbung auf dem positiven Kontrollobjektträger weist auf einen gültigen Assay hin. Eine braune Färbung auf dem negativen Kontrollobjektträger weist auf eine nicht spezifische Färbung im Assay hin. Die Assay-Ergebnisse sind eventuell aufgrund einer übermäßigen Färbung ungültig.
2. Externe positive Gewebekontrolle	Eine braune Membranfärbung mit oder ohne zytoplasmischer Färbung sollte gemäß der Erwartungen für etablierte externe positive Gewebekontrollen beobachtet werden.
3. Externe negative Gewebekontrolle	Die Abwesenheit einer braunen spezifischen Färbung in der negativen Gewebekontrolle bestätigt die fehlende Kreuzreaktion des Kits auf zelluläre Komponenten. Wenn die negative Gewebekontrolle eine braune spezifische Färbung aufweist, sollten die für die Patientenprobe gewonnen Ergebnisse als ungültig betrachtet werden.
4. Mit negativer Reagenzkontrolle gefärbtes Patientengewebe	Die Abwesenheit der braunen spezifischen Färbung zeigt die Spezifität der Zielantigenfärbung durch den primären Antikörper an. Andere braunen Färbungen in der mit negativer Reagenzkontrolle gefärbten Patientenprobe (z.B. in Bindegewebe, Leukozyten, Erythrozyten oder nekrotischem Gewebe) sollten als nicht spezifische Hintergrundfärbung betrachtet werden.
5. Mit primärem Antikörper gefärbtes Patientengewebe	Eine EGFr-Überexpression zeigt sich als braune Membranfärbung mit oder ohne zytoplasmischer Färbung der Tumorzellen, die mit primärem Antikörper behandelt wurden.

INTERPRETATION DER FÄRBUNG

Zymed EGFr Bewertungssystem

EGFr Protein wird in verschiedenen normalen und neoplastischen Geweben ausgedrückt. Die zellulären Färbungsmuster können homogen oder heterogen ausfallen (d.h. Membranfärbung, zytoplasmische Färbung oder Beides). Die Verteilung der gefärbten Zellen und die Intensität der Gewebefärbung kann ebenfalls heterogen sein. Zur Bestimmung einer EGFr Protein-Überexpression kann eine Kombination von Membranfärbungsmuster und Intensität auf Basis der in Tabelle 3 aufgeführten Kriterien bewertet werden. Zur Unterstützung der Differenzierung der Färbungsintensität kann auf die in den Zymed EGFr Bewertungsrichtlinien beiliegenden Farbfotos (im Zymed EGFr Kit enthalten) Bezug genommen werden.

Tabelle 3: EGFr Bewertungssystem für repräsentative Gewebeschnitte

Färbungsmuster: Membran	Färbungsintensität	Bewertung	EGFr Überexpression
Keine Färbung in allen Tumorzellen.	Keine	0	Negativ
Schwache oder kaum wahrnehmbare Membranfärbung gefärbt. Teilweises Beflecken im Teil der Membran, oder die schwache komplette befleckende Membran wird beobachtet.	Sehr Schwach bis Schwach	1+	Schwach
Mäßige Membranfärbung in der Tumorzellen.	Mäßig	2+	Mäßig
Starke Membranfärbung in der Tumorzellen.	Stark	3+	Stark

*Die befleckende EGFr Membran wird normalerweise in den verschiedenen Tumoren wie Kopf und Hals, Brust, Kolon und Eierstock beobachtet.¹⁻³ Das cytoplasmatisch Beflecken ist auch in etwas squamous Zelle Krebsen beobachtet worden des Lungenflügels.⁴ Folglich kann es wichtig sein, über die Intensität des cytoplasmatisch Befleckens Glioma und Lungenflügel in den carcinomas zu berichten.

LEISTUNGSMERKMALE

Spezifität

EGFr Expression in A431 (humanen Epidermoidkarzinom) Zellen, mit oder ohne EGF-Stimulation wurde von dem Maus-Anti-EGFr (Klon 31G7) entdeckt. Bei der Western-Blotanalyse erkannte Klon 31G7 ein 170 kDa-Proteinband⁽²⁹⁻³¹⁾, das dem veröffentlichten Molekulargewicht von EGFr entspricht. EGFr erkennt nicht mit HER2. Clone 31G7 erkennt mit EGFr vIII.

Reproduzierbarkeit

Das EGFr Kit von Zymed wurde in 57 Fällen von Kopf- und Halzkarzinomgewebeproben geprüft. Bei jedem Testfall zeigte sich übereinstimmende Reproduzierbarkeit der Bewertung von Färbungen im Vergleich zu Nichtfärbungen.

Immunreaktivität

Abnormale Gewebereaktivität

In allen unten aufgeführten Studien wurden Klon 31G7 Antikörper und in Formalin fixierte, in Paraffin eingebettete Gewebe verwendet.

EGFr Überexpression wurde in pulmonalen Neoplasmen nachgewiesen. In einer Studie von 92 neuroendokrinen Tumoren wurde mit 28 % typisches Karzinoid, 57 % atypisches Karzinoid, 42 % großzelliges neuroendokrines Karzinom, 39 % Mischung aus klein- und großzelligen neuroendokrinen Karzinomen und 22 % kleinzelliges Lungenkarzinom eine Bewertung von 2+ bis 4+ EGFr Färbung nachgewiesen. In einer anderen Studie wurde EGFr Überexpression in 56 % Lungen-Adenokarzinom und 84 % Lungen-Plattenepithelkarzinomproben beobachtet.

Klon 31G7 färbte 50 % der Kopf- und Hals-Plattenepithelkarzinomproben einer Studie. Variable EGFr Expression wurde bei Brustkarzinomen gemeldet, trotz seiner Gegenwart an den Zellen, die aus allen drei Keimblättern gewonnen wurden. Eine Studie meldete EGFr Überexpression in bis zu 35 % aller Brustkrebs. Klon 31G7 wurde auch in Studien der glandulären Zellen von Endometrie- und Prostatakarzinomen verwendet. In einer Studie von 40 Fällen endometrioider Endometriekarzinome zeigte der Maus-Anti-EGFr (Klon 31G7) bei 65 % der Proben eine positive Färbung.

FEHLERBEHEBUNG

Mögliche Ursachen für eine negative Färbung auf positiven Objektträgern:

1. Die Reihenfolge der Schritte des Färbungsprotokolls wurde nicht eingehalten.
2. Die Inkubationsschritte für den primären oder sekundären Antikörper wurden ausgelassen.
3. Labile Antigene wurden zerstört.
4. Die Probe wurde nicht richtig fixiert und/oder verarbeitet.
5. Die Probe trocknete während der Färbung aus.

Mögliche Ursachen für eine schwache Färbung auf allen Objektträgern:

1. Nach der Spülung blieb zuviel Flüssigkeit in der Probe zurück.

2. Die Inkubationszeiten waren nicht ausreichend.
3. Das Substrat wurde falsch vorbereitet.
4. Unvollständige Deparaffinierung (Färbung ist von einer starken Hintergrundfärbung begleitet).

Mögliche Ursachen für starke Hintergrundfärbung:

1. Endogene Peroxidase-Aktivität wurde unvollständig blockiert.
2. Unvollständige Deparaffinierung.
3. Übermäßiger Gebrauch von Gewebefixiermittel.
4. Unzureichende Spülung der Objektträger.
5. Überentwicklung des Substrats.
6. Dehydrierung der Probe während der Färbung.

PRODUKTSPEZIFISCHE GRENZEN

1. Zymeds Maus-Anti-EGFr (Klon 31G7) erfordert eine Enzym-Vorbehandlung der FFPE-Gewebeschnitte, um eine richtige Färbung zu gewährleisten. Auslassung der Vorbehandlung von FFPE-Gewebeschnitten kann eine reduzierte Färbung falscher negativer Ergebnisse zur Folge haben.
2. Die Reagenzien wurden optimiert. Nicht erneut verdünnen und keine Ersatzreagenzien anderer Herstellerlose verwenden.
3. Bei einem Zerfall des Antigens im Gewebe im Verlauf der Zeit sind falsche negative Ergebnisse möglich. Die Proben sollten innerhalb von 4 - 6 Wochen nach der Fixierung auf den Objektträgern gefärbt werden. In diesem Zeitraum müssen die Proben trocken bei Raumtemperatur (20-25°C) aufbewahrt werden.

Literatur:

1. Marquez A, et al. Evaluation of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) by Chromogenic in Situ Hybridization (CISH) and Immunohistochemistry (IHC) in Archival Gliomas Using Bright-Field Microscopy. *Diagn Mol Pathol* 13(1):1-8, 2004.
2. Arita N, et al. Epidermal Growth Factor Receptor in human glioma. *J Neurosurg* 70:916-919, 1989.
3. Quezado MM, et al. Correlation of EGFR Gene Amplification and Overexpression by Chromogenic In Situ Hybridization (CISH) and Immunohistochemistry in High Grade Gliomas. USCAP Annual Meeting, Abstract 1334, 2003.
4. Piyathilake CJ, et al. Differential expression of growth factors in squamous cell carcinoma and precancerous lesions of the lung. *Clin Cancer Res* 8:734-744, 2002.

Bevollmächtigter Repräsentant:

MDSS

Burckhardstr. 1

D-30163 Hannover

Germany

Bevollmächtigter Repräsentant für IVDD 98/79/EC