

ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit

REF 760-501
05269814001

IVD Σ 250

URČENÉ POUŽITÍ

Detekční souprava *ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit* (detekční souprava *ultraView AP Red detection kit*) je nepřímý systém pro detekci myšího IgG, myšího IgM a králíčích primárních protilátek s použitím světelné mikroskopie. Souprava je určena k laboratornímu použití pro identifikaci cílů metodou imunohistochemie (IHC) v řezech tkáně fixované formalínem, zalité parafínem, které jsou barvené na přístrojích BenchMark IHC/ISH.

Tento produkt musí být interpretován kvalifikovaným patologem v kombinaci s histologickým vyšetřením, relevantními klinickými informacemi a správnými kontrolami.

Tento produkt je určen pro diagnostické použití in vitro (IVD).

SOUHRN A VYSVĚTLENÍ

Imunohistochemie je technika používaná v laboratořích k diagnostickým účelům. Technika IHC využívá specifické primární protilátky k lokalizaci a vazbě na antigeny ve fixovaných nebo zmrazených tkáňových řezech. Vazba protilátky na antigen je vizualizována metodou nepřímé detekce. Nejobvyklejší techniky pro nepřímé metody používají sekundární protilátku namířenou proti druhému primární protilátce a enzym s odpovídajícím systémem substrát-chromogen. Výsledkem této kombinace je barevný precipitát v místě specifické vazby protilátky. Detekční souprava *ultraView AP Red detection kit* používá nepřímou metodu k vizualizaci specifických protilátek vázaných na antigeny deponováním červeně zbarveného precipitátu.

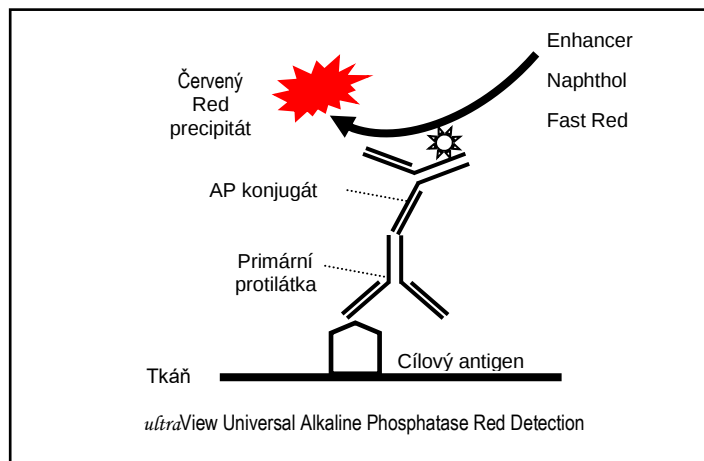
PRINCIP POSTUPU

Detekční souprava *ultraView AP Red detection kit* detekuje specifické myší a králíčí protilátky vázané na antigen v řezech tkáně fixované formalínem, zalité parafínem (FFPE). Specifická protilátka je lokalizována koktejem enzymem značených sekundárních protilátek, lokalizujících vazbu primární protilátky. Komplex pak lze zobrazit pomocí Naphthol substrátu a chromogenu Fast Red, který vytváří červený precipitát, jenž lze snadno pozorovat s použitím světelné mikroskopie.

Barvicí protokol se skládá z četných kroků, v nichž jsou reagenty inkubovány po předem určené doby při specifických teplotách. Na konci každého kroku inkubace přístroj BenchMark IHC/ISH promyje řezy pro odstranění nenavázaného materiálu a aplikuje kapalinu s funkcí krycího sklička, minimalizující vypařování vodných reagentů ze sklička. 1 Výsledky mohou být interpretovány s použitím světelného mikroskopu a mohou pomoci při diferenciální diagnóze patofyziologických procesů, které mohou, ale nemusí být spojeny s určitým antigenem.

Podrobnější informace o obsluze přístroje naleznete v příslušné uživatelské příručce.

Na obrázku 1 je znázorněna metoda nepřímé detekce.



Obr. 1. Reakce *ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection*.

MATERIÁL A METODY

Dodávaný materiál

Detekční souprava *ultraView AP Red detection kit* obsahuje dostatek reagentů pro 250 testů.

Jeden 25mL dávkovač	reagencie <i>ultraView Universal AP Red Enhancer</i> obsahuje přibližně 3 % (obj./obj.) $MgCl_2$ v pufru Tris s 0.05 % roztoku konzervačního prostředku ProClin 300.
Jeden 25mL dávkovač	reagencie <i>ultraView Universal AP Red Multimer</i> obsahuje koktejl protilátek značených alkalickou fosfatázou (AP) (přibližně 50 $\mu g/mL$) v pufru s 0.05 % roztoku konzervačního prostředku ProClin 300.
Jeden 25mL dávkovač	reagencie <i>ultraView Universal AP Red Naphthol</i> obsahuje přibližně 1.0 % (hm./obj.) naftolu Naphthol v pufru Tris s 0.10 % roztoku konzervačního prostředku ProClin 300.
Jeden 25mL dávkovač	reagencie <i>ultraView Universal AP Red Fast Red A</i> obsahuje přibližně 1.0 % (hm./obj.) chromogenu Fast Red v octanovém pufru s 0.05 % roztoku konzervačního prostředku ProClin 300.
Jeden 25mL dávkovač	<i>ultraView Universal AP Red Fast Red B</i> obsahuje přibližně 1.0 % (hm./obj.) chromogenu Fast Red v octanovém pufru s 0.05 % roztoku konzervačního prostředku ProClin 300.

Rekonstituce, mísení, ředění, titrace

Detekční souprava *ultraView AP Red detection kit* je optimalizována pro použití na přístrojích BenchMark IHC/ISH. Nevyžaduje se rekonstituce, mísení, ředění ani titrace reagentů ze soupravy.

Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky

Barvicí reagenty, například pro detekce VENTANA a pomocné materiály, včetně skliček pro negativní a pozitivní kontrolu tkáně, nejsou součástí dodávky.

Všechny produkty uvedené v metodickém listu nemusejí být dostupné ve všech zeměpisných oblastech. Obratťe se na místní servisní zastoupení.

Následující reagenty a materiály mohou být při barvení potřebné, nejsou však součástí dodávky detekční soupravy:

1. Primární protilátka
2. Reagencie negativní kontrola
3. Pozitivní a negativní kontrola tkáně (prostudujte si metodické listy protilátky pro doporučené typy)
4. Amplification Kit (kat. č. 760-080 / 05266114001)

5. OptiView DAB IHC Detection Kit (kat. č. 760-700 / 06396500001)
6. OptiView Amplification Kit (kat. č. 760-099 / 06396518001 (50 testů) nebo 860-099 / 06718663001 (250 testů))
7. *ultra*View Universal DAB Detection Kit (kat. č. 760-500 / 05269806001)
8. Protease 1 (kat. č. 760-2018 / 05266688001)
9. Protease 2 (kat. č. 760-2019 / 05266696001)
10. Protease 3 (kat. č. 760-2020 / 05266718001)
11. Hematoxylin (kat. č. 760-2021 / 05266726001)
12. Hematoxylin II (kat. č. 790-2208 / 05279650001)
13. Bluing Reagent (kat. č. 760-2037 / 05266769001)
14. Reaction Buffer Concentrate (10X) (kat. č. 950-300 / 05353955001)
15. Cell Conditioning Solution (CC1) (kat. č. 950-124 / 05279801001)
16. Cell Conditioning Solution (CC2) (kat. č. 950-123 / 05279798001)
17. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (kat. č. 950-224 / 05424569001)
18. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC2) (kat. č. 950-223 / 05424542001)
19. Antibody Diluent (kat. č. 251-018 / 05261899001)
20. EZ Prep Concentrate (10X) (kat. č. 950-102 / 05279771001)
21. LCS (Predilute) (kat. č. 650-010 / 05264839001)
22. ULTRA LCS (Predilute) (kat. č. 650-210 / 05424534001)
23. Přístroj BenchMark IHC/ISH
24. Mikroskopická sklička, kladně nabitá
25. Krycí skličko a metoda krycího sklička dostatečná k pokrytí tkáně
26. Obecné laboratorní vybavení

Skladování a stabilita

Po přijetí a mezi použitími uchovávejte při teplotě 2–8 °C. Nezmrazujte. Uživatel musí validovat veškeré skladovací podmínky, které se liší od podmínek uvedených v metodickém listu. Tuto detekční soupravu lze použít okamžitě po vyjmutí z chladničky.

Aby byla zajištěna správná funkčnost reagentie a stabilita každé reagentie, musí se dávkovač po každém použití uzavřít víčkem a okamžitě umístit ve vodorovné poloze do chladničky.

Každá detekční souprava má stanovenou dobu expirace. Při správném skladování zůstane produkt stabilní do data uvedeného na štítku. Po uplynutí data expirace pro předepsanou metodu skladování produkt nepoužívejte. Neexistují žádné jednoznačné známky nestability tohoto produktu, proto je vyšetření neznámých vzorků třeba provádět souběžně s pozitivními a negativními kontrolními vzorky. V případě jakýchkoli známek nestability reagentie kontaktujte okamžitě vaše místní servisní zastoupení.

Odběr vzorků a příprava pro analýzu

Pro použití s detekční soupravou *ultra*View AP Red detection a přístrojem BenchMark IHC/ISH jsou vhodné tkáně FFPE (viz odstavec Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky). Doporučeným fixativem na tkáně je 10% neutrální pufovaný formalin (NBF).² V důsledku tloušťky tkáňového řezu, typu fixace, nekompletní prodloužené fixace, případně speciálních procesů, například odvápnění preparátů kostní dřeviny, se mohou vyskytnout rozdílné výsledky.

Každý řez musí být odříznut na patřičnou tloušťku pro použitou primární protilátku a umístěn na kladně nabitě mikroskopické podložní skličko. Sklička obsahující tkáňový řez by měla být vysušena ve vodorovné poloze po dobu nejméně 15 minut při pokojové teplotě, aby se před sušením odvedla přebytečná voda zpod řezu. Sklička mohou být sušena/zahřívána po dobu nejméně 1 hodiny v sušárně při teplotě 60 °C ± 5 °C, případně sušena na vzduchu při teplotě 37 °C po dobu až 24 hodin. Sušení a zahřívání sklíček se používá k osušení tkáně po fixaci sklička a ke zvýšení adheze tkáně ke skličku. Omezení ohledně zahřívání naleznete v metodickém listu k primární protilátce. Delší zahřívání tkáně může mít za následek sníženou dostupnost antigenu.

Správně fixované a zalité tkáně exprimující antigen zůstanou stabilní, pokud jsou uchovávány na chladném místě (15–25 °C). Norma Clinical Laboratory Improvement Act (CLIA) z roku 1988, 42CFR493.1259 (b) vyžaduje, že „Laboratoř musí uchovávat sklička nejméně deset let od data vyšetření a uchovávat bloky vzorků nejméně dva roky od data vyšetření.“ Každá laboratoř by měla validovat stabilitu sklička s řezem pro své vlastní postupy a podmínky prostředí pro skladování.

VAROVÁNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

1. Určeno k diagnostickému použití in vitro (IVD).
2. Pouze k odbornému použití.
3. Nepoužívejte nad rámec specifikovaného počtu testů.
4. Roztok ProClin 300 je v tomto roztoku použit jako konzervační prostředek. Je klasifikován jako dráždivý a při styku s kůží může způsobit senzibilizaci. Při manipulaci dodržujte příslušná bezpečnostní opatření. Zamezte kontaktu reagentie s očima, kůží a sliznicemi. Používejte ochranný oděv a rukavice.
5. S materiálem lidského nebo živočišného původu je třeba nakládat jako s potenciálně nebezpečným biologickým materiálem a likvidovat jej v souladu s platnými bezpečnostními opatřeními. V případě expozice je potřeba se řídit zdravotnickými směrnicemi odpovědných orgánů.^{3,4}
6. Při manipulaci s reagentiemi dodržujte příslušná bezpečnostní opatření. Zamezte kontaktu reagentie s očima, kůží a sliznicemi. Při manipulaci s možnými karcinogeny nebo toxickými materiály používejte jednorázové rukavice a vhodný ochranný oděv.
7. Jestliže se reagentie dostanou do kontaktu s citlivými oblastmi, omyjte zasažené oblasti vydatným množstvím vody. Zabraňte vdechování reagentie.
8. Před spuštěním cyklu přístroje zkontrolujte, zda je odpadní nádoba prázdná. Pokud není zavedeno toto bezpečnostní opatření, odpadní nádoba může přetéct a uživatel riskuje uklouznutí a pád.
9. Zabraňte mikrobiální kontaminaci reagentie, mohla by způsobit nepresnost výsledků.
10. Další informace o používání tohoto prostředku obsahuje uživatelská příručka přístroje BenchMark IHC/ISH a metodické listy všech nezbytných součástí.
11. Doporučené metody likvidace jsou uvedeny v celostátních a/nebo místních předpisech.
12. Označení produktu bezpečnostními štítky se řídí hlavně pokyny GHS EU. Pro profesionální uživatele je na vyžádání k dispozici bezpečnostní list.
13. Pro nahlášení podezřelých závažných incidentů týkajících se tohoto prostředku se obraťte na místního zástupce společnosti Roche a kompetentní orgány členského státu nebo země, ve které uživatel provozuje činnost.

Tato detekční souprava obsahuje součásti klasifikované následovně podle směrnice (ES) č. 1272/2008:

Tab. 1. Informace o rizicích.

Riziko	Kód	Věta
	H317	Může vyvolat alergickou kožní reakci.
	P261	Zamezte vdechování prachu/dýmu/plynu/mlhy/par/aerosolů.
	P272	Kontaminovaný pracovní oděv neodnášejte z pracoviště.
	P280	Používejte ochranné rukavice.
	P333 + P313	Při podráždění kůže nebo vyrážce: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.
	P362 + P364	Kontaminovaný oděv svlékněte a před opětovným použitím vyperte.
	P501	Odstraňte obsah/obal předáním do schváleného zařízení k likvidaci odpadu.

Tento produkt obsahuje látku s č. CAS 55965-84-9, reakční směs 5-chlor-2-methyl-2H-isothiazolin-3-onu a 2-methyl-2H-isothiazol-3-onu (3 : 1).

POSTUP

Detekční souprava *ultraView* AP Red detection kit byla vyvinuta pro použití na přístrojích BenchMark IHC/ISH v kombinaci s primárními protilátkami a pomocnými komponentami VENTANA. Parametry automatických procesů lze zobrazit, vytisknout a upravovat podle postupů uvedených v uživatelské příručce přístroje. Ostatní provozní parametry přístroje jsou přednastaveny z výroby.

Postupy barvení na přístrojích BenchMark IHC/ISH jsou následující. Podrobnější pokyny a další možnosti protokolu jsou uvedeny v uživatelské příručce. To, zda vzorek vyžaduje úpravu buněk Cell Conditioning, závisí na protilátce. Pokyny jsou uvedeny v metodickém listu k protilátce.

Přístroje BenchMark IHC/ISH

1. Opatřete skříčko štítkem s čárovým kódem, který odpovídá protokolu, který má být proveden.
2. Naplňte primární protilátku, vhodné dávkovače detekční soupravy a požadované pomocné reagenty do zásobníku reagentů a umístěte je na přístroj.
3. Zkontrolujte velkoobjemové tekutiny a vyprázdněte odpad.
4. Umístěte skříčko na přístroj.
5. Spustíte barvicí cyklus.
6. Po dokončení cyklu odstraňte skříčko z přístroje.
7. Pokračujte na část Doporučené postupy zpracování po obarvení v přístroji.

Funkce dvojitého barvení (Dual)

Konfigurace dvojitého barvení sestává ze sekvenčního barvení, kde je první primární protilátka barvena s detekcí DAB s použitím buď detekční soupravy *ultraView* Universal DAB Detection Kit (detekční soupravy *ultraView* DAB), nebo detekční soupravy OptiView DAB IHC Detection Kit (detekční soupravy OptiView DAB) a s následnou detekcí druhé primární protilátky s použitím detekční soupravy *ultraView* AP Red detection kit. V konfiguraci dvojitého barvení byly detekční soupravy *ultraView* DAB a OptiView DAB optimalizovány pro specifické doby inkubace s použitím primární protilátky CONFIRM anti-CD20 (L26) Primary Antibody (protilátky CONFIRM anti-CD20 (L26)). Detekční souprava *ultraView* AP Red detection kit byla optimalizována pro specifické doby inkubace s použitím primární protilátky CONFIRM anti-CD3 (2GV6) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (protilátky CONFIRM anti-CD3 (2GV6)). Uživatel však musí výsledky získané pomocí této reagenty validovat. Doporučené protokoly pro dvojité barvení uvádějí tabulky níže.

Tab. 2. Doporučený barvicí protokol pro detekční soupravu *ultraView* DAB (s použitím protilátky CONFIRM anti-CD20 (L26)) a pro detekční soupravu *ultraView* AP Red detection kit (s použitím protilátky CONFIRM anti-CD3 (2GV6)) na přístroji BenchMark IHC/ISH.

Typ postupu	Metoda		
	GX	XT	ULTRA nebo ULTRA PLUS*
Odparafinování	Zvoleno	Zvoleno	Zvoleno
Cell Conditioning (Odmaskování antigenu)	CC1, mírné	CC1, mírné	ULTRA CC1 36 minut, 95 °C
Protilátka (DAB)	6 minut, 37 °C	16 minut, 37 °C	16 minut, 36 °C
Protilátka DS (Red)	20 minut, 37 °C	20 minut, 37 °C	20 minut, 36 °C
Kontrastní barvivo	Hematoxylin II, 4 minuty		
Po kontrastním barvení	Bluing, 4 minuty		

* Shoda mezi přístroji BenchMark ULTRA a BenchMark ULTRA PLUS byla prokázána pomocí reprezentativních testů.

Tab. 3. Doporučený barvicí protokol pro detekční soupravu OptiView DAB (s použitím protilátky CONFIRM anti-CD20 (L26)) a pro detekční soupravu *ultraView* AP Red detection kit (s použitím protilátky CONFIRM anti-CD3 (2GV6)) na přístroji BenchMark IHC/ISH.

Typ postupu	Metoda		
	GX	XT	ULTRA nebo ULTRA PLUS*
Odparafinování	Zvoleno	Zvoleno	standardní
Cell Conditioning (Odmaskování antigenu)	CC1, 32 minut	CC1, 32 minut	ULTRA CC1, 32 minut, 100 °C
Preprimární inhibitor peroxidázy	Zvoleno	Zvoleno	Zvoleno
Protilátka (DAB)	6 minut, 37 °C	8 minut, 37 °C	16 minut, 36 °C
OptiView HQ Linker	8 minut (standardně)	8 minut (standardně)	8 minut (standardně)
OptiView HRP Multimer	8 minut (standardně)	8 minut (standardně)	8 minut (standardně)
Protilátka DS (Red)	20 minut, 37 °C	20 minut, 37 °C	20 minut, 36 °C
Kontrastní barvivo	Hematoxylin II, 4 minuty		
Po kontrastním barvení	Bluing, 4 minuty		

* Shoda mezi přístroji BenchMark ULTRA a BenchMark ULTRA PLUS byla prokázána pomocí reprezentativních testů.

Vzhledem k různým způsobům fixace a zpracování tkání, jakož i obecnému stavu přístroje a podmínkám laboratorního prostředí může být potřeba prodloužit nebo zkrátit dobu inkubace s primární protilátkou nebo dobu úpravy buněk v závislosti na jednotlivých vzorcích, použité metodě detekce a vlastní preferenci. Další informace o různých proměnných fixaci naleznete v příručce „Immunohistochemistry Principles and Advances“ (Zásady a postupy imunohistochemie).⁵

Doporučené postupy zpracování po obarvení v přístroji

Poznámka: Chromogen Fast Red je rozpustný v alkoholu a v acetonu. K dehydrataci a čištění sklíček nepoužívejte alkoholové či acetonové lázně ani prodloužené xyleneové promývání.

1. Pro odstranění roztoku Liquid Coverslip promyjte skříčko ve 2 sekvenčních roztocích jemného saponátu na mytí nádobí (nepoužíjte saponát určený pro automatické myčky nádobí).
2. Oplachujte skříčko důkladně deionizovanou vodou asi 1 minutu. Přebytkovou vodu vytřepajte.
3. Sušte skříčko v sušárně (doporučení: minimálně 15–30 minut v sušárně při teplotě 45–60 °C) nebo na vzduchu při okolní teplotě. Doba a teplota sušení se budou lišit v závislosti na okolních podmínkách. Před aplikací krycího skříčka musejí být skříčka zcela suchá.
4. Přemístěte skříčko do xyleneové lázně k rychlému umytí, asi na 30 sekund.
5. Umístěte krycí skříčko na podložní skříčko. Pro dosažení optimálních výsledků použijte fixační média kompatibilní se substráty alkalické fosfatázy.

Postupy kontroly kvality

Pozitivní kontrolní tkáň

S každým provedeným postupem barvení musí být provedena pozitivní kontrola tkáně. Nejvhodnějším laboratorním postupem je uložit řez pro pozitivní kontrolu na stejné skříčko jako tkáň pacienta. Tento postup pomůže identifikovat stav, kdy nebyla aplikována primární protilátka nebo jiná zásadní reagenty na testované skříčko s patientským vzorkem. Tkáň se slabým pozitivním zbarvením je pro optimální kontrolu kvality vhodnější. Složky tkáně s pozitivním zbarvením se používají k potvrzení, že byla použita protilátka a

že přístroj správně fungoval. Tato tkáň může obsahovat pozitivně i negativně zbarvené buňky nebo složky tkáně a sloužit jako tkáň pro pozitivní i negativní kontrolu. Kontrolními tkáněmi by měly být čerstvé vzorky z pítvy, biopsie nebo operace, zpracované nebo fixované co nejdříve stejným způsobem jako testované řezy. Takové tkáně mohou sledovat všechny kroky postupu, od přípravy tkáně až po barvení. Použití tkáňového řezu fixovaného nebo zpracovaného odlišně od testovaného vzorku poskytne kontrolu všech reagiencí a kroků metody kromě fixace a zpracování tkáně.

Znamé pozitivní kontroly tkání je nutno používat pouze ke sledování správné funkce zpracovaných tkání a testovacích reagiencí, nikoli jako pomůcku ke stanovení konkrétní diagnózy patientských vzorků. Pokud pozitivní kontroly tkání pozitivní zbarvení nevykazují, je třeba považovat výsledky u testovaných vzorků za neplatné.

Negativní kontrolní tkáň

Stejná tkáň použitá pro pozitivní kontrolní tkáň může být použita jako negativní kontrolní tkáň. Rozmanitost typů buněk přítomných ve většině tkáňových řezů nabízí místa pro interní negativní kontrolu, toto by však měl uživatel ověřit. Složky, které se nezbarví, by měly vykazovat nepřítomnost specifického zbarvení, a poskytnout indikaci specifického zbarvení pozadí (tzn. skvrnitě nebo zčervenale). Dojde-li ke specifickému zbarvení v místech negativní kontroly tkáně, měly by být výsledky u patientských vzorků považovány za neplatné.

Nevysvětlitelné rozpory

Nevysvětlitelné rozpory v kontrolách je třeba neprodleně nahlásit na vaše místní servisní zastoupení. Pokud výsledky kontroly kvality nesplňují specifikace, výsledky pacienta jsou neplatné. Viz část Řešení problémů tohoto metodického listu. Identifikujte a napravte problém a pak opakujte patientské vzorky.

Negativní reagenční kontrola

K usnadnění interpretace výsledků je třeba provést pro každý vzorek cyklus s negativní reagenční kontrolou. Negativní reagenční kontrola se používá namísto primární protilátky k vyhodnocení nespecifického zbarvení (tzn. skvrnitosti nebo zčervenání). Sklička by měla být obarvena vhodnou reagiencí negativní kontroly. Jako alternativu k dříve popsaným negativním reagenčním kontrolám lze používat samotné ředidlo. Doba inkubace pro negativní reagenční kontrolu by měla být stejná jako doba inkubace u primární protilátky.

Pokud jsou na sériových řezech použity panely několika protilátek, může negativní reagenční kontrola na jednom skličku sloužit jako negativní nebo nespecifická kontrola vazebného pozadí pro další protilátky.

Ověření testu

Před prvním použitím primární protilátky nebo barvicího systému při diagnostickém postupu je třeba ověřit specifitu primární protilátky, a to jejím testováním na řadě tkání se známými imunohistochemickými funkčními charakteristikami reprezentujícími známé pozitivní a negativní tkáně (viz část Pozitivní kontrolní tkáň v metodickém listu k primární protilátce a Doporučení ke kontrole kvality College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist,⁶ nebo CLSI Approved Guideline⁷ nebo oba dokumenty). Postupy kontroly kvality je třeba opakovat pro každou novou šarži protilátky nebo vždy, když dojde ke změně parametrů testu. Pro ověření testu jsou vhodné tkáně uvedené v části Funkční charakteristiky primární protilátky.

Interpretace výsledků

Detekční souprava *ultraView AP Red detection kit* způsobí, že se červeně zbarvený reakční produkt vyzráží v místech antigenu lokalizovaných primární protilátkou. Kvalifikovaný patolog se zkušeností s imunohistochemickými postupy musí před interpretací výsledků nejprve vyhodnotit kontroly a posoudit obarvený produkt. Barvení negativních kontrol musí být zaznamenáno jako první a tyto výsledky musejí být porovnány s obarveným materiálem k ověření, že generovaný signál není výsledkem nespecifických interakcí.

Pozitivní kontrolní tkáň

Nejprve by měla být vyšetřena obarvená pozitivní kontrola tkáně, aby se zjistilo, zda všechny reagenty fungují správně. Přítomnost patřičně zbarveného reakčního produktu v cílových buňkách indikuje pozitivní reaktivitu. Podle délky inkubace a síly použitého hematoxylinu bude výsledkem kontrastního barvení světlemodré až tmavomodré zbarvení buněčných jader. Nadměrné nebo neúplné kontrastní barvení může narušit správnou interpretaci výsledků.

Pokud pozitivní kontrolní tkáň pozitivní zbarvení nevykazuje, je třeba považovat veškeré výsledky u testovaných vzorků za neplatné.

Negativní kontrolní tkáň

Po pozitivní kontrole tkáně by měla být vyšetřena negativní kontrola tkáně, aby se ověřilo specifické značení cílového antigenu primární protilátkou. Absence specifického zbarvení v negativní kontrole tkáně potvrzuje nedostatek křížové reaktivity protilátky s buňkami nebo buněčnými složkami. Dojde-li ke specifickému zbarvení u negativní kontrolní tkáně, měly by být výsledky u patientského vzorku považovány za neplatné.

Nespecifické zbarvení, pokud je přítomno, bude mít rozptýlený vzhled. V tkáních, které jsou nadměrně fixovány formálním, lze rovněž pozorovat sporadické lehké zbarvení pojivové tkáně. K interpretaci výsledků barvení je třeba používat pouze intaktní buňky. Nekrotické nebo degenerované buňky se často barví nespecificky.

Tkáň pacienta

Patientské vzorky by měly být vyšetřeny jako poslední. Intenzita pozitivního zbarvení by měla být hodnocena v kontextu jakéhokoli nespecifického barvení pozadí (tzn. skvrnitost a zčervenání) u negativní reagenční kontroly. Stejně jako u jiných imunohistochemických testů, negativní výsledek znamená, že nebyl detekován dotyčný antigen, nikoli že antigen nebyl v testovaných buňkách nebo tkáních přítomen. V případě potřeby použijte panel protilátek pro pomoc s identifikací falešně negativních reakcí. Při interpretaci jakéhokoli imunohistochemického výsledku by měla být také vyšetřena morfologie jednotlivých tkáňových vzorků za použití řezu obarveného hematoxylinem a eosinem. Morfologické nálezy u pacienta a příslušná klinická data musejí být interpretovány kvalifikovaným patologem.

OMEZENÍ

Obecná omezení

1. IHC je vícestupňový diagnostický proces, který vyžaduje specializované školení ve výběru vhodných reagiencí, výběru tkání, fixaci, zpracování, v přípravě imunohistochemického sklička a v interpretaci výsledků barvení.
2. Barvení tkáně závisí na zacházení s tkání a na jejím zpracování před barvením. Nesprávná fixace, zmrazení, rozmrazení, promytí, sušení, zahřívání, řezání nebo kontaminace jinými tkáněmi či tekutinami mohou způsobit artefakty, zachycení protilátek nebo falešně negativní výsledky. Nekonzistentní výsledky mohou být důsledkem odchylek metod fixace a zalévání nebo z inherentních nepravdivostí v tkáni.
3. Nadměrné nebo neúplné kontrastní barvení může narušit správnou interpretaci výsledků.
4. Klinická interpretace pozitivního zbarvení nebo jeho nepřítomnosti musí být vyhodnocena v kontextu klinické anamnézy, morfologie a dalších histopatologických kritérií. Klinický výklad jakéhokoli zbarvení nebo jeho nepřítomnosti musí být doplněn morfologickými studiemi a vhodnými kontrolami, jakož i dalšími diagnostickými testy. Je odpovědností kvalifikovaného patologa seznámit se s protilátkami, reagiencemi a metodami používanými k interpretaci obarveného přípravku. Barvení musí být prováděno v certifikované a licencované laboratoři pod dohledem patologa, který je odpovědný za kontrolu obarvených sklíček a zajištění adekvátnosti pozitivních a negativních kontrol.
5. Společnost VENTANA poskytuje protilátky a reagenty v optimálním ředění pro použití, pokud jsou dodrženy uvedené pokyny. Jakákoli odchylka od doporučených postupů testu může očekávané výsledky zneplatnit. Musejí být použity a zdokumentovány příslušné kontroly. Uživatelé, kteří se odchylují od doporučených postupů testu, musejí přijmout odpovědnost za interpretaci výsledků u pacientů.
6. Reagenty mohou v dříve netestovaných tkáních vykazovat neočekávané reakce. Možnost neočekávaných reakcí nelze zcela vyloučit ani u testovaných skupin tkání, a to z důvodu biologické variability exprese antigenu v neoplasmu nebo jiných patologických tkáních.⁸ Se zdokumentovanými neočekávanými reakcemi se obraťte na místní servisní zastoupení.
7. Při použití v blokačních krocích mohou normální séra ze stejného živočišného zdroje jako sekundární antiséra způsobit v důsledku autoprotilátek nebo přírodních protilátek falešně negativní nebo falešně pozitivní výsledky.
8. Falešně pozitivní výsledky lze pozorovat v důsledku neimunologické vazby proteinů nebo produktů reakce substrátu. Mohou být také způsobeny aktivitou pseudoperoxidázy (erytrocyty) nebo endogenní peroxidázy,⁹ případně endogenní alkalické fosfatázy.
9. Negativní výsledek, stejně jako u jiných imunohistochemických testů, znamená, že antigen nebyl detekován, nikoli že antigen nebyl v testovaných buňkách nebo tkáních přítomen.

Specifická omezení

- Každý krok postupu pro detekční soupravu byl optimalizován na přístrojích BenchMark IHC/ISH a přednastaven. Vzhledem k různým způsobům fixace a zpracování tkání může být potřeba prodloužit nebo zkrátit dobu inkubace primární protilátky pro individuální vzorky. Další informace o různých fixacích naleznete v příručce „Immunohistochemistry Principles and Advances“ (Zásady a postupy imunohistochemie)⁵ nebo „Immunomicroscopy: A Diagnostic Tool for the Surgical Pathologist“ (Imunomikroskopie: diagnostický nástroj pro chirurgického patologa).¹⁰
- Tato detekční souprava v kombinaci s primárními protilátkami a příslušenstvím VENTANA detekuje antigen, který přežije rutinní fixaci formalinem, zpracování tkání a řezání.
- Tato detekční souprava je optimalizována pro použití s promývacím roztokem Reaction Buffer, primárními protilátkami, příslušenstvím a přístroji BenchMark IHC/ISH. Použití promývacího roztoku Reaction Buffer je pro správné fungování této detekční soupravy důležité. Uživatelé, kteří se odchylují od doporučených postupů testu, jsou odpovědní za interpretaci výsledků u pacientů za těchto okolností.
- Tato detekční souprava je optimalizována pro použití s roztoky LCS (Predilute) nebo ULTRA LCS (Predilute). Bariéra LCS snižuje vypařování a poskytuje stabilní vodné prostředí pro IHC reakce prováděné na přístrojích BenchMark IHC/ISH.
- Mohou být pozorovány mírné posuny odstínu jednotlivých chromogenů z důvodu křížové reaktivity mezi reakcemi chromogenu při použití dvojitého barvení.
- Všechny testy nemusejí být registrovány na každém přístroji. Pro více informací kontaktujte místní servisní zastoupení.

FUNKČNÍ CHARAKTERISTIKY

Výkonnost detekční soupravy *ultraView* AP Red detection kit byla vyhodnocována z hlediska preciznosti a dalšími relevantními studii. Veškeré barvení bylo prováděno pomocí protokolu uvedeného v metodickém listu k detekční soupravě *ultraView* AP Red detection kit na přístrojích BenchMark IHC/ISH, není-li uvedeno jinak.

Studie preciznosti – jedno barvení

Testování preciznosti bylo prováděno barvením řady řezů mandle neutrálně pufovaných, FFPE, s primární protilátkou anti-Ki67 na přístrojích BenchMark IHC/ISH, pokud není uvedeno jinak.

Doba inkubace primární protilátky byla 16 minut a všechna sklička byla kontrastně nabarvena s použitím Hematoxylin II a následně Bluing Reagent. Všechna sklička barvená primární protilátkou byla vzájemně porovnávána na vhodnost a intenzitu barvení byla hodnocena kvalifikovanou osobou pro odečítání skliček.

- Preciznost v rámci cyklu (stejná primární protilátka barvená na platformě) porovnávala v rámci barvicího cyklu sklička barvená ve stejný den na jedné platformě. Pro toto kritérium byla sklička barvena na přístroji BenchMark XT a výsledky byly porovnávány. Preciznost v rámci cyklu byla pro přístroj BenchMark XT 100 %.
- Preciznost mezi cykly byla vypočítána na základě řady skliček barvených ve 3 cyklech na jeden typ přístroje. Barvicí cykly byly prováděny jeden za den ve 3 oddělených dnech s použitím jednoho přístroje BenchMark XT. Preciznost mezi cykly pro přístroj BenchMark XT byla 100 % (30 ze 30 skliček, 10 skliček obarveno pro jednu primární protilátku napříč 3 oddělenými cykly).
- Preciznost mezi přístroji byla vypočítána na základě řady skliček barvených v 9 cyklech na všech typech přístrojů. Barvicí cykly byly prováděny 1 za den ve 3 oddělených dnech s použitím 3 různých přístrojů: BenchMark GX, BenchMark XT a BenchMark ULTRA pro IHC. Detekční souprava *ultraView* AP Red detection kit měla preciznost mezi přístroji 100 % (90 z 90 obarvených skliček).

S detekční soupravou *ultraView* AP Red detection kit bylo vyvinuto několik primárních protilátek VENTANA. V rámci zkoušek těchto testů byly pro detekční soupravu *ultraView* AP Red detection kit prokázány následující funkční charakteristiky:

- Preciznost v rámci jednoho cyklu, mezi dny, mezi přístroji a mezi platformami na přístrojích BenchMark GX, BenchMark XT a BenchMark ULTRA.
- Senzitivita a specifita barvení v řadě běžných a neoplastických tkání a cílových tkání specifických pro test.

Všechny studie splnily kritéria přijatelnosti.

Preciznost na přístroji BenchMark ULTRA PLUS byla prokázána pomocí reprezentativních testů. Studie zahrnovaly opakovanost v rámci cyklu, mezilehlou preciznost mezi dny a mezi cykly. Všechny studie splnily kritéria přijatelnosti.

Studie preciznosti – barvení Dual

Byly provedeny studie preciznosti pro detekční soupravu *ultraView* AP Red detection kit (s použitím protilátky CONFIRM anti-CD3 (2GV6)) s detekční soupravou *ultraView* DAB (s použitím protilátky CONFIRM anti-CD20 (L26)) k prokázání následujícího:

- Preciznost v rámci cyklu a mezi cykly na přístrojích BenchMark IHC/ISH.
- Preciznost v rámci platformy na přístrojích BenchMark IHC/ISH.
- Preciznost mezi platformami mezi přístroji BenchMark GX, BenchMark XT a BenchMark ULTRA.

Všechny studie splnily kritéria přijatelnosti.

Byly provedeny studie preciznosti pro detekční soupravu *ultraView* AP Red detection kit (s použitím protilátky CONFIRM anti-CD3 (2GV6)) s detekční soupravou OptiView DAB IHC (s použitím protilátky CONFIRM anti-CD20 (L26)) k prokázání následujícího:

- Preciznost v rámci cyklu a mezi cykly na přístrojích BenchMark IHC/ISH.
- Preciznost v rámci platformy na přístrojích BenchMark IHC/ISH.
- Preciznost mezi platformami mezi přístroji BenchMark GX, BenchMark XT a BenchMark ULTRA.

Všechny studie splnily kritéria přijatelnosti.

Studie shody – barvení Dual

Studie byla provedena na přístrojích BenchMark GX, BenchMark XT a BenchMark ULTRA k prokázání shody mezi dvojité obarveným skličkem s použitím detekční soupravy *ultraView* DAB (s použitím protilátky CONFIRM anti-CD20 (L26)) s detekční soupravou *ultraView* AP Red detection kit (s použitím protilátky CONFIRM anti-CD3 (2GV6)) a jedné protilátky CONFIRM anti-CD3 (2GV6) a protilátkou CONFIRM anti-CD20 (L26) obarvenými skličky. Cyklus jedenkrát obarvených skliček byl proveden s použitím detekční soupravy *ultraView* DAB za podmínek uvedených v metodickém listu.

Studie byla provedena na přístrojích BenchMark GX, BenchMark XT a BenchMark ULTRA k prokázání shody mezi dvojité obarveným skličkem s použitím detekční soupravy OptiView DAB (s použitím protilátky CONFIRM anti-CD20 (L26)) s detekční soupravou *ultraView* AP Red detection kit (s použitím protilátky CONFIRM anti-CD3 (2GV6)) a jedné protilátky CONFIRM anti-CD3 (2GV6) a protilátkou CONFIRM anti-CD20 (L26) obarvenými skličky. Cyklus jedenkrát obarvených skliček byl proveden s použitím detekční soupravy *ultraView* DAB za podmínek uvedených v metodickém listu.

Všechny studie splnily kritéria přijatelnosti.

ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ

- Pokud pozitivní kontrola vykazuje slabší zabarvení, než se očekávalo, je třeba zkontrolovat cyklus ostatních pozitivních kontrol na stejném přístroji, abyste zjistili, zda je to způsobeno primární protilátkou nebo jednou z běžných sekundárních reagentů.
- Pokud je pozitivní kontrola negativní, je třeba ji zkontrolovat, aby bylo zajištěno, že má skličko správný štítek s čárovým kódem. Pokud je skličko správně označeno, je třeba zkontrolovat cyklus ostatních pozitivních kontrol na stejném přístroji, abyste zjistili, zda je to způsobeno primární protilátkou nebo jednou z běžných sekundárních reagentů. Tkáně mohly být nesprávně odebrány, fixovány nebo odparafinovány. Při odběru, skladování a fixaci je třeba dodržovat správný postup.
- Neúplné odstranění parafinu může mít za následek artefakty barvení anebo absenci barvení.
 - Pokud nebyl ze sklička odstraněn veškerý parafin, barvicí cyklus je třeba opakovat s použitím rozšířené možnosti odparafinování, pokud je k dispozici.
 - Alternativně lze provést ruční odparafinování přístroje. Pokud je použita možnost ručního odparafinování, zrušte volbu online odparafinování z barvicího protokolu před vložením skliček do přístroje. Zvláštní péči je třeba věnovat tomu, aby sklička nevyschla před provedením barvicího cyklu.
- Pokud je barvení specifické protilátky příliš intenzivní, cyklus je třeba opakovat s dobou inkubace zkrácenou po 4minutových intervalech do dosažení požadované intenzity barvení.
- Pokud se tkáňové řezy ze sklička vymývají, je třeba sklička zkontrolovat a zajistit, aby byla kladně nabitá.
- Nápravná opatření najdete v uživatelské příručce přístroje v části Postup, případně se obraťte na místní servisní zastoupení.
- Pokud dávkovač reagencie nedávkuje tekutinu, zkontrolujte, jestli v napouštěcí komůrce nebo na menisku nejsou cizorodé materiály či pevné částičky, jako např.

vlákna nebo precipitáty. Pokud je dávkovač zablokovaný, dávkovač nepoužívejte a kontaktujte své místní servisní zastoupení. Jinak znovu naplňte dávkovač a miřte jím nad odpadní nádobu, odstraňte víčko trysky a zatlačte na horní stranu dávkovače směrem dolů. Informace o správném použití najdete v souvisejícím metodickém listu ke vkladacímu dávkovači.

8. Občas je možné zaznamenat krystalizaci pocházející z dávkovače Naphthol fosfátu. Šetření a testování neprokázalo, že by tyto krystaly jakkoli narušovaly interpretaci výsledků. Pokud jsou na sklíčkách pozorovány krystaly, očistěte špičku trysky a naplňte dávkovač, abyste odstranili veškeré krystalické nečistoty. Pokud krystaly přetrvávají, přestaňte dávkovač používat a požádejte místního servisního zastoupení o výměnu dávkovače.
9. Chromogen Fast Red je rozpustný v alkoholu a v acetonu. Pokud jsou obarvená sklíčka vystavena působení alkoholu a/nebo acetonu, může to mít za následek ztrátu specifického signálu.

LITERATURA

1. Elias JM, Gown AM, Nakamura RM, Wilbur DC, Herman GE, Jaffe ES, Battifora H, Brigati DJ. Quality control in immunohistochemistry. Report of a workshop sponsored by the Biological Stain Commission. Am J Clin Pathol. 1989;92(6):836-843.
2. Sheehan DC, Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. 2nd edition. St. Louis, MO: The C.V. Mosby Company; 1980.
3. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
4. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 24 Jun 2020 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
5. Roche PC, Hsi ED. Immunohistochemistry: Principles and Advances. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. In: NR Rose, ed. ASM Press; 2002.
6. College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2009.
7. (CLSI) formerly NCCLS. Quality Assurance for Immunocytochemistry: Approved Guideline. CLSI document MM4-A (ISBN 1-56238-396-5). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA, 1999.
8. Herman GE, Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech Histochem. 1991;66(4):194-199.
9. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase: part 1. The technique and its pitfalls. Lab Med. 1983;14:767.
10. Taylor C, Cote RJ. Immunomicroscopy: A Diagnostic Tool for the Surgical Pathologist. 2nd Edition. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Company; 1986.

POZNÁMKA: V tomto dokumentu se jako symbol pro oddělování celého čísla a desetinných míst používá vždy tečka. Oddělovače pro tisíce se nepoužívají.

Symboly

Společnost Ventana používá následující symboly a znaky nad rámec uvedený v normě ISO 15223-1 (pro USA: definici použitých symbolů naleznete na internetových stránkách dialog.roche.com):



Globální číslo obchodní položky

(Rx Only)

Pro USA: Upozornění: Federální zákony omezují prodej tohoto prostředku pouze lékařům nebo na jejich objednávku.

HISTORIE REVIZÍ

Rev.	Aktualizace
L	Aktualizován oddíl Upozornění a bezpečnostní opatření. Aktualizace současné šablony.

DUŠEVNÍ VLASTNICTVÍ

VENTANA, BENCHMARK, CONFIRM, OPTIVIEW a ULTRAVIEW jsou ochranné známky společnosti Roche. Všechny ostatní názvy produktů a ochranné známky jsou majetkem příslušných vlastníků.

© 2024 Ventana Medical Systems, Inc.

For USA: Rx only

KONTAKTNÍ ÚDAJE



Ventana Medical Systems, Inc.
1910 E. Innovation Park Drive
Tucson, AZ 85755
USA
+1 520 887 2155
+1 800 227 2155 (USA)

www.roche.com



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim
Germany
+800 5505 6606

