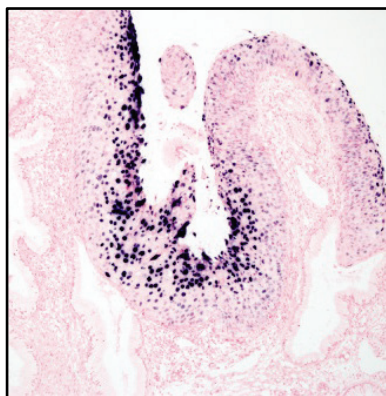


INFORM HPV III Family 16 Probe (B)

REF 800-4295
05278856001

IVD  50



Rysunek 1. Tkanka szyjki macicy barwiona sondą INFORM HPV III Family 16 Probe (B) i zestawem detekcyjnym ISH /VIEW_{Blue} Plus Detection Kit. Powiększenie 10x.

PRZEZNACZENIE

Odczynnik INFORM HPV III Family 16 Probe (B) firmy Ventana Medical Systems (Ventana) jest przeznaczony do użycia z zestawem detekcyjnym ISH /VIEW_{Blue} Plus Detection Kit oraz innymi odczynnikami pomocniczymi do wykonywania odczynów za pomocą aparatów VENTANA BenchMark IHC/ISH na skrawkach tkankowych utrwalonych w obojętnej zbuforowanej formalinie i zatopionych w parafinie.

Wystąpienie reakcji barwnej lub jej brak stwierdza się pod mikroskopem świetlnym. Dodatni wynik barwienia ułatwia

klasyfikację próbek prawidłowych i zmienionych chorobowo, służąc jako metoda uzupełniająca konwencjonalne badanie histopatologiczne. Interpretacja kliniczna każdego stwierdzonego wybarwienia lub jego braku powinna być uzupełniona badaniami morfologicznymi oraz wykonywaniem odpowiednich prób kontrolnych. Ocena wyniku powinna być dokonywana przez wykwalifikowanego patologa, z uwzględnieniem historii klinicznej pacjenta oraz wyników innych badań diagnostycznych.

Ten produkt jest przeznaczony do stosowania w diagnostyce *in vitro* (IVD).

PODSUMOWANIE I OBJAŚNIENIA

Odczynnik INFORM HPV III Family 16 Probe (B) zawiera koktajl znakowanych sond genomowych ludzkiego papillomawirusa (HPV)¹. Planowane cele to popularne genotypy HPV związane z rakiem szyjki macicy. Dla następujących genotypów uzyskano dodatnie wyniki hybrydyzacji: 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, 56, 58 i 66.

Rak szyjki macicy to drugi najczęściej występujący rak u kobiet na świecie – każdego roku globalnie występuje 529 000 nowych przypadków i 275 000 zgonów^{2,3}.

HPV to zawierający około 7900 par zasad wirus z dwuniciowym DNA o ponad 200 różnych genotypach⁴. Cykl życia wirusa HPV jest bezpośrednio związany z różnicowaniem keratynocytów. Kluczowym zdarzeniem w cyklu życiowym wirusa jest eskalacja jego replikacji powiązana z tym różnicowaniem. Nasilenie replikacji powoduje amplifikację genomu HPV z około 50 kopii na komórkę w keratynocytach podstawnych w subklinicznej fazie infekcji do tysięcy kopii genomów wirusa na komórkę w keratynocytach nadpodstawnych w klinicznej fazie infekcji⁵. Ustalono, że czynnikiem inicjującym proces onkogenezy prowadzący do rozwoju raka szyjki macicy jest infekcja nabłonka szyjki przez wirusa HPV⁶.

Ryzyko rozwoju choroby od dysplazji do raka szyjki macicy zależy od typu wirusa HPV. Dlatego typy wirusa HPV podzielono na grupy o różnym stopniu ryzyka onkogenezy. Grupom tym odpowiadają poziomy ryzyka rozwoju raka u pacjentek. Stwierdzono na przykład, że grupy wysokiego ryzyka – HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73 i 82 – powodują powstawanie nowotworów, natomiast z grupami niskiego ryzyka – HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 i 81 – wiąże się małe prawdopodobieństwo zezłośliwienia nowotworu^{7,8}. Identyfikacja grupy ryzyka HPV na podstawie testów metodą hybrydyzacji *in situ* (ISH) uzupełniających tradycyjną ocenę preparatów pod kątem morfologicznym może być czynnikiem dodatnio wpływającym na jakość decyzji klinicznych⁹.

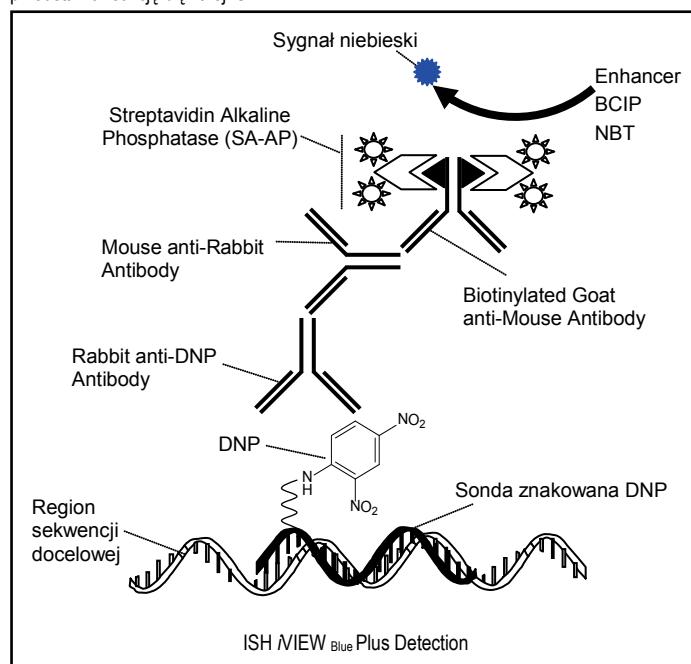
ISH oparte na preparatach to łatwa do przeprowadzenia, wiarygodna i powtarzalna metoda do wykrywania wirusa HPV na skrawkach tkanki zatopionych w parafinie¹⁰. Poziom detekcji znakowania radioizotopowego i nieizotopowego przy użyciu sond genomowych wynosi nawet od 10 do 50 kopii wirusa na komórkę w przypadku preparatów tkankowych utrwalanych w formalinie^{11,12}.

System ISH ma pod kilkoma względami przewagę nad innymi metodami, które wymagają zniszczenia badanych komórek, np. technika wychwytu kwasów nukleinowych lub łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). Zalety mogą obejmować: bezpośrednią korelację z wynikami cytologicznymi, możliwość testowania próbek archiwalnych i zdolność identyfikowania wyniku ISH HPV w kontekście morfologii tkanki.

ZASADA POSTĘPOWANIA

Sonda INFORM HPV III Family 16 Probe (B) jest formułowana do stosowania z zestawem detekcyjnym ISH /VIEW_{Blue} Plus Detection Kit i odczynnikami pomocniczymi na aparacie BenchMark XT IHC/ISH.

Zestaw detekcyjny ISH /VIEW_{Blue} Plus Detection Kit wykrywa swoiste sondy znakowane DNP i przeciwciała związane z sekwencją docelową lub antygenem w skrawkach tkanki zatopionych w parafinie. Znakowana sonda lub przeciwciało jest lokalizowane za pomocą przeciwciała anti-DNP, następnie za pomocą przeciwciała drugorzędowego znakowanego enzymem lub sprzężonego z biotyną. Kolejny etap stanowi dodanie koniugatu streptawidyna–enzym AP (fosfataza alkaliczna), który wiąże się z biotyną obecną na przeciwciałach drugorzędowych. Powstały kompleks jest następnie uwidaczniany za pomocą fosforanu 5-bromo-4-chloro-3-indolilu (BCIP) oraz błękitu tetrazolowego (NBT) w postaci niebieskiego osadu łatwego do wykrycia pod mikroskopem świetlnym. Rysunek 2 przedstawia reakcję błękitnej ISH.



Rysunek 2. Reakcja ISH /VIEW_{Blue} Plus Detection

MATERIAŁY I METODY

Dostarczany odczynnik

Produkt INFORM HPV III Family 16 Probe (B) zawiera ilość odczynnika wystarczającą do wykonania 50 testów.

Jeden dozownik 10 ml sondy INFORM HPV III Family 16 Probe (B) zawiera około 3,4 µg/ml koktajlu sondy znakowanego DNP i ludzkie DNA blokujące łożyska w buforze hybrydyzacyjnym opartym na formamidzie.

Należy zapoznać się z treścią właściwej ulotki firmy VENTANA, dołączonej do opakowania zestawu do detekcji, aby uzyskać szczegółowy opis następujących kwestii: (1) Zasady przeprowadzania procedury, (2) Potrzebne materiały i odczynniki niedołączone do zestawu, (3) Pobieranie próbek i przygotowanie do analizy, (4) Procedury kontroli jakości, (5) Rozwiązywanie problemów, (6) Interpretacja wyników i (7) Ogólne ograniczenia.

Odtwarzanie, mieszanie, rozcieńczanie, miareczkowanie

Nie jest wymagane odtwarzanie, mieszanie, rozcieńczanie ani miareczkowanie. Dalsze rozcieńczanie może powodować utratę swoistości odczynu. Użytkownik musi zwalidować wszelkie zmiany tego typu.

MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZANE

Razem z zestawem nie są dostarczane takie odczynniki jak zestawy detekcyjne VENTANA i składniki pomocnicze.

Wymienione niżej odczynniki i materiały mogą być wymagane, ale nie są dostarczane z zestawem:

1. VENTANA HPV System Control Slides
2. VENTANA Alu Positive Control Probe II
3. VENTANA ISH Negative Control
4. VENTANA ISH /VIEW^{Blue} Plus Detection Kit
5. VENTANA ISH Protease 1, 2 lub 3*
6. VENTANA Red Counterstain II
7. VENTANA Reaction Buffer (10X)
8. VENTANA SSC (10X)
9. VENTANA EZ Prep (10X)
10. VENTANA Cell Conditioning 2 (Pre-dilute)
11. VENTANA Liquid Coverslip (High Temperature)
12. Aparat BenchMark XT IHC/ISH
13. Etykiety z kodami kreskowymi (odpowiednie dla badanych sond i kontroli)
14. Obojętna zburowana formalina, 10%
15. Mikrotom
16. Szkiełka mikroskopowe odpowiednie do procedury ISH
17. Preparaty kontrolne, dodatnie i ujemne
18. Ksylen (klasy histologicznej)
19. Etanol lub alkohol do odczynników (klasy histologicznej)
20. Aceton
21. Woda dejonizowana lub destylowana
22. Środek do zatapiania i szkiełka nakrywkowe lub automat do nakrywania preparatów
23. Naczynia lub kąpiele do barwienia
24. Zegar
25. Mikroskop świetlny

* Zależnie od potrzeb w konkretnym zastosowaniu.

Nie wszystkie produkty przedstawione w ulotce dołączonej do opakowania są dostępne we wszystkich rejonach geograficznych. Należy skonsultować się z lokalnym przedstawicielem odpowiedzialnym za wsparcie techniczne.

PRZECHOWYWANIE

Po otrzymaniu preparat nieużywany przechowywać w temperaturze 2–8°C. Nie zamrażać. Użytkownik musi zweryfikować warunki przechowywania odbiegające od określonych w ulotce dołączonej do opakowania.

W celu zapewnienia właściwego dostarczenia odczynnika i stabilności sondy po każdej serii, należy założyć zatyczkę i niezwłocznie umieścić dozownik w lodówce w pozycji pionowej.

Na każdym dozowniku podana jest data ważności. Prawdopodobnie przechowywany odczynnik zachowuje trwałość do daty określonej na etykiecie. Pomimo zalecanej metody przechowywania nie należy stosować odczynnika po przekroczeniu daty ważności.

Ponieważ nie istnieją jednoznaczne objawy wskazujące na utratę stabilności produktu, równocześnie z badaniem próbek należy wykonywać dodatnie i ujemne barwienie kontrolne. W razie stwierdzenia objawów niestabilności odczynnika należy niezwłocznie skontaktować się z lokalnym biurem firmy Roche.

PRZYGOTOWANIE PRÓBK

Ten odczynnik może być stosowany do standardowo przetworzonych próbek tkankowych utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie. W celu uzyskania prawidłowego wybarwienia należy pociąć materiał tkankowy na skrawki o odpowiedniej grubości.

OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

1. Do stosowania w diagnostyce *in vitro* (IVD).
2. Wyłącznie do zastosowania profesjonalnego.
3. Czułość kliniczna testu musi zostać zweryfikowana w laboratorium użytkownika.
4. **Ostrzeżenie, produkt zawiera formamid.** Formamid jest toksyczny w przypadku inhalacji i umiarkowanie toksyczny w przypadku połykania. Jest drażniący dla skóry, oczu i błon śluzowych oraz jest wchłaniany przez skórę. Może być szkodliwy dla płodu. Podczas pracy z odczynnikami należy zachować środki ostrożności. W razie kontaktu z materiałami podejrzanymi o rakotwórczość lub toksyczność należy nosić jednorazowe rękawice i odpowiednią odzież ochronną.
5. Przed rozpoczęciem pomiarów w urządzeniu należy upewnić się, że pojemnik na zlewki jest pusty. W razie zaniedbania tego środka ostrożności pojemnik na zlewki może przepelnić się, stwarzając dla użytkownika ryzyko poślizgnięcia i upadku.
6. Materiały pochodzenia ludzkiego lub zwierzęcego należy traktować jak materiały potencjalnie niebezpieczne biologicznie i utylizować z zachowaniem właściwych środków ostrożności.
7. Unikać kontaktu odczynników z oczami i błonami śluzowymi. W przypadku kontaktu odczynników z wrażliwymi miejscami splukiwać obfitą ilością wody.
8. Należy unikać mikrobiologicznego zanieczyszczenia odczynników, gdyż może to być powodem nieprawidłowych wyników.
9. Odczynniki zostały optymalnie rozcieńczone i dalsze rozcieńczanie może doprowadzić do zaniku barwienia docelowego. W razie zmian któregokolwiek z parametrów konieczna jest walidacja przez użytkownika.
10. W celu uzyskania informacji na temat zalecanej metody utylizacji produktu należy skontaktować się z władzami lokalnymi lub krajowymi.
11. Dodatkowe informacje na temat bezpieczeństwa można znaleźć w Karcie charakterystyki produktu oraz w Przewodniku po symbolach i zwrotach dotyczących zagrożeń na stronie www.ventana.com.

INSTRUKCJA STOSOWANIA

Przetwarzanie preparatu po serii

Po zakończeniu każdej serii w celu prawidłowego odwodnienia wybarwionych preparatów należy wykonać następujące czynności (prawidłowe odwodnienie pomoże zapewnić optymalną wizualizację sygnału).

Procedura odwadniania

1. Aby usunąć roztwór nakrywający, opłukać szkiełka w 2 zmianach łagodnego roztworu detergentu do mycia naczyń (nie używać detergentów przeznaczonych do zmywarek automatycznych).
2. Dokładnie przepłukać preparaty wodą destylowaną. Płukać przez około 1 minutę. Strząsnąć nadmiar wody.
3. Przenieść preparaty do kąpiele 80% etanolu na około 1 minutę.
4. Przenieść preparaty do kąpiele 90% etanolu na około 1 minutę.
5. Przenieść preparaty do kąpiele 100% etanolu na około 1 minutę.
6. Przenieść preparaty do drugiej kąpiele 100% etanolu na około 1 minutę.
7. Zanurzyć szkiełka 10-krotnie w 100% acetonie (acetonu używać tylko raz; po każdym barwieniu wymienić aceton). Nie pozostawiać szkiełek w acetonie.
8. Przenieść preparaty do pierwszej kąpiele ksylenu na około 30 sekund.
9. Przenieść preparaty do drugiej kąpiele ksylenu na około 30 sekund.
10. Umieścić szkiełka nakrywkowe na preparatach.

Uwaga: Aby zagwarantować całkowite odwodnienie, należy często zmieniać kąpiele etanolowe. Można także dodać trzecią kąpiel w 100% etanolu.

PROCEDURY KONTROLI JAKOŚCI

Dodatknie preparaty kontrolne

W każdej wykonywanej serii barwienia należy barwić dodatnią próbkę kontrolną (kontrola poziomu systemowego). Kontrola poziomu systemowego służy do potwierdzania, że sonda została zastosowana i aparat działał prawidłowo. Preparat powinien zawierać zarówno komórki bądź składniki tkankowe dające dodatnią, jak i ujemną reakcję barwną. W charakterze preparatów kontrolnych należy używać materiału biopsyjnego lub chirurgicznego przygotowanego i utrwalonego w identyczny sposób jak próbki pochodzące od pacjenta. Dzięki takim kontrolom można monitorować wszystkie etapy procedury, począwszy od przygotowania próbek do barwienia. W wyniku zastosowania preparatu utrwalanego lub traktowanego w ten sam sposób, co próbka pacjenta, zostaje zapewniona dodatkowa kontrola w celu potwierdzenia, że odczynnik i instrument działają prawidłowo. Próbka ze słabym barwieniem dodatnim (tj. wykazująca wzorec barwienia punktowego) może wymagać badania mikroskopowego przy powiększeniach nawet 20× lub 40×; jest zalecana do optymalnej kontroli jakości i wykrywania mniejszych stężeń degradacji odczynnika. Jeżeli za pomocą dodatknych kontroli nie udaje się potwierdzić dodatniego wyniku barwienia, należy uznać, że wyniki preparatów testowych są nieważne.

Ujemne preparaty kontrolne

Każda wykonywana procedura barwienia musi uwzględniać badanie ujemnych preparatów kontrolnych. Ma to na celu monitorowanie niepożądanego reaktywności krzyżowej sond i przeciwciał ze składnikami komórkowymi. W charakterze ujemnego i dodatniego preparatu kontrolnego można używać tego samego preparatu. W charakterze wewnętrznej kontroli ujemnej można wykorzystywać różne próbki pochodzące z większości tkanek. Preparaty do kontroli ujemnej powinny zostać zweryfikowane przez użytkownika. Składniki z założenia niepodlegające barwieniu powinny wykazywać brak odczynu swoistego i dostarczać informacji o odczynie tła. Jeżeli w badaniu preparatów stanowiących ujemną próbkę kontrolną uzyskuje się niepożądane wybarwienie, wyniki uzyskane dla próbek pochodzących od pacjenta należy uznać za nieważne.

Odczynnik do kontroli dodatniej

Do weryfikacji testu i przy rozwiązywaniu problemów powinien być używany dodatni odczynnik kontrolny, ponieważ dostępność DNA może zależeć od metody utrwalania i sposobu obróbki wstępnej preparatu. W charakterze kontroli dodatniej dla tego testu można używać odczynnika Ventana Alu Positive Control Probe II.

Odczynnik do kontroli ujemnej

Dla każdego barwionego preparatu należy zastąpić sondę ISH odczynnikiem do kontroli ujemnej. Kontrola ujemna pomoże w interpretacji wyników badań materiału pochodzącego od pacjentów. Preparat ten wskazuje na nieswoiste barwienie dla każdej próbki. Zamiast sondy ISH należy do barwienia użyć kontroli ujemnej Ventana ISH Negative Control. Okres inkubacji powinien być taki sam jak dla sondy.

Kontrola ujemna jest szczególnie ważna wobec faktu, że jelitowa postać fosfatazy zasadowej może występować w komórkach innych niż komórki nabłonkowe rąbka szczołeczkowego jelita. Ponadto w procesie utrwalania mogą zachować się enzymy zdolne do rozkładu błękitu tetrazolowego.

Niewyjaśnione rozbieżności

Niewyjaśnione rozbieżności w wynikach kontroli należy niezwłocznie zgłaszać do lokalnego przedstawiciela serwisu. Jeśli wyniki kontroli jakości nie są zgodne ze specyfikacją, wyniki uzyskane dla próbek pochodzących od pacjentów są nieważne. Zob. sekcja Rozwiązywanie problemów w niniejszej ulotce. Należy zidentyfikować i wyeliminować problem, a następnie powtórzyć badanie próbek pochodzących od pacjenta.

Weryfikacja oznaczenia

Przed pierwszym użyciem odczynnika w procedurze diagnostycznej należy zweryfikować jego działanie w drodze testów na szeregu preparatów kontrolnych o znanej charakterystyce w badaniach ISH. Procedury kontroli jakości należy powtarzać dla każdej nowej partii odczynników lub każdorazowo po zmianie parametrów testu.

INTERPRETACJA WYNIKÓW

Przed przystąpieniem do interpretacji właściwych wyników kontrole powinny zostać zweryfikowane przez wykwalifikowanego patologa z doświadczeniem w mikroskopowej interpretacji próbek patologii anatomicznych, procedurach ISH i rozpoznawaniu wyników hybrydyzacji *in situ* (co wymaga badania mikroskopowego z zastosowaniem obiektywów 20×, 40× i/lub 60×)¹³. Obecność niebieskiego produktu reakcji w jądrze nabłonka szyjki macicy z wzorcem barwienia jednorodnego lub punktowego wskazuje na reaktywność dodatnią. Odczyn homogeniczny ma postać dużego, jednolitego, kulistego

ciemnoniebieskiego osadu w jądrach komórek nabłonka. Odczyn jest zwykle najlepiej widoczny w powierzchownie zrogowaciałym obszarze nabłonka, często w kolicocytach. Odczyn punktowy ma formę odrębnych ciemnoniebieskich kropek, które są widoczne w jądrach komórek. Częściej występuje w grupach komórek umieszczonych głębiej w nabłonku. W niektórych przypadkach odczyn punktowy jest widoczny dopiero przy dużym powiększeniu (obiektyw 40×).

Za wynik dodatni uznawane być powinno wyłącznie barwienie jąder komórek nabłonka, co pozwoli uniknąć interpretacji fałszywie dodatnich. Osad w zrębie poza komórkami oraz odczyn cytoplazmatyczny neutrofilii i komórek plazmatycznych należy traktować jako artefakt nieswoisty.

Dokonując interpretacji wyników ISH, należy także ocenić morfologię każdej próbki na podstawie preparatu wybarwionego hematoksylina i eozyną. Wyniki badań morfologii oraz istotne dane kliniczne powinny być interpretowane łącznie z wynikami barwienia ISH.

Uwaga: Nie zaleca się stosowania obiektywu 100×. Wszystkie weryfikacje projektu i testy walidacyjne przeprowadzono z zastosowaniem obiektywów 20×, 40× i/lub 60×.

Kontrole

W pierwszej kolejności należy zbadać kontrolę dodatnią (odczynnik i preparat), aby upewnić się, że wszystkie odczynniki działają prawidłowo. Obecność odrębnego niebieskiego wytrąconego produktu reakcji w docelowych jądrach komórkowych zawierających wykrywane fragmenty świadczy o zaistnieniu reakcji dodatniej.

Kontrolę ujemną (odczynnik i preparat) należy zbadać po kontroli dodatniej, aby zweryfikować swoistość reakcji. W kontroli ujemnej nie powinien występować odczyn swoisty. Występowanie zabarwienia może świadczyć o nieswoistej reaktywności krzyżowej z komórkami lub składnikami komórkowymi. Do interpretacji odczynu należy wybierać jedynie komórki nienaruszone, gdyż w komórkach martwiczych lub zdegenerowanych często występują odczyn nieswoiste.

Jeżeli nie udaje się potwierdzić prawidłowego barwienia w dodatnich lub ujemnych preparatach kontrolnych, należy uznać, że wyniki preparatów testowych są nieważne.

Próbka pacjenta

Próbki pochodzące od pacjenta należy zbadać jako ostatnie. Intensywność odczynu dodatniego należy oceniać w kontekście barwienia tła występującego w próbce z odczynnikiem kontroli ujemnej. Wynik ujemny oznacza, że nie wykryto poszukiwanej sekwencji DNA, a nie że sekwencja taka nie występuje w badanych komórkach. W czasie interpretacji dowolnego wyniku ISH należy także ocenić morfologię każdej próbki, stosując barwienie hematoksylina i eozyną. Wyniki badań morfologii oraz istotne dane kliniczne powinny być interpretowane przez wykwalifikowanego patologa.

OGRANICZENIA

1. Procedura ISH jest wieloetapowym procesem diagnostycznym wymagającym specjalistycznego przeszkolenia w doborze odpowiednich odczynników, wyborze tkanek, obróbce, przygotowaniu preparatów ISH i interpretacji wyników.
2. Wybarwienie tkanek zależy od traktowania i przygotowania tkanek przed barwieniem. Nieprawidłowe utrwalanie, zamrażanie, rozmrażanie, przemywanie, suszenie, ogrzewanie, wykonywanie skrawków lub ich zanieczyszczenie domieszką innych tkanek lub płynów może powodować artefakty lub wyniki fałszywie ujemne bądź dodatnie.
3. Niespójne wyniki mogą być konsekwencją zmian w metodach utrwalania i zatapiania albo wynikać z nieprawidłowości samej tkanki.
4. Nadmierne lub niecałkowite barwienie kontrastowe może utrudniać prawidłową interpretację wyników.
5. Interpretacja kliniczna dodatniego lub ujemnego odczynu musi być prowadzona w kontekście historii klinicznej i morfologii oraz uzupełniona o odpowiednie badania preparatów kontrolnych oraz inne testy diagnostyczne. Odpowiedzialność związana ze stosowaniem sond, odczynników i metod przygotowania barwionych preparatów spoczywa na wykwalifikowanym histopatologu. Barwienie należy wykonać pod nadzorem histopatologa odpowiedzialnego za przeglądanie wybarwionych preparatów i właściwe wykonanie dodatknych i ujemnych prób kontrolnych.
6. We wcześniej nietestowanych próbkach mogą wystąpić nieoczekiwane reakcje odczynników. Ze względu na biologiczną różnorodność docelowej sekwencji w próbkach biologicznych nie można całkowicie wykluczyć możliwości wystąpienia nieoczekiwanych reakcji nawet w grupach badanych próbek. Udokumentowane nieoczekiwane reakcje należy zgłaszać do lokalnego biura firmy Ventana.
7. Ze względu na różnice w preparatyce próbek może być konieczne zwiększenie lub zmniejszenie czasu działania proteazy ISH dla indywidualnych próbek. Każda taka zmiana musi być zweryfikowana przez użytkownika.

PODSUMOWANIE SPODZIEWANYCH WYNIKÓW

1. Ventana INFORM HPV III Family 16 Probe (B), ISH *VIEW* Blue Plus Detection Kit i odczynniki pomocnicze stosowane w aparacie BenchMark IHC/ISH powodują wytrącanie niebieskiego osadu w miejscach występowania wykrywanych sekwencji zlokalizowanych przez sondy ISH.
2. W firmie Ventana zoptymalizowano i przetestowano swoistość i czułość detekcji sekwencji. Dla następujących genotypów HPV uzyskano dodatnie wyniki hybrydyzacji w preparatach z biopsjach szyjki macicy: 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, 56, 58 i 66 (dla materiału z biopsji pobranego z szyjki macicy). Można wykrywać zarówno wzór barwienia jednorodnego, jak i punktowego (obserwowanego w przypadku komórek HeLa, 10–50 kopii wirusa¹⁵) HPV.
3. Powtarzalność w obrębie oraz między seriami barwienia sondą INFORM HPV III Family 16 Probe (B) określono barwiąc 60 preparatów wieloblokowych (obejmujących skrawki przygotowane z utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie linii komórek CaSki, HeLa i T24). Preparaty barwiono na 2 różnych aparatach BenchMark i 2 różnych aparatach BenchMark XT IHC/ISH – 3 serie na aparat. We wszystkich preparatach uzyskano wybarwienie o porównywalnym nasileniu. Użytkownicy powinni zweryfikować powtarzalność w ramach jednej serii, wykonując w jednej serii barwienia dla kilku zestawów skrawków seryjnych z małą, średnią i dużą ilością sekwencji wykrywanych.

ROZWIĄZYWANIE PROBLEMÓW

1. Jeśli kontrola dodatnia daje wynik ujemny, należy sprawdzić, czy preparat został opatrzony właściwym kodem kreskowym.
2. Jeżeli kontrola dodatnia jest ujemna albo charakteryzuje się słabszym barwieniem niż oczekiwano, dodatkowe kontrole dodatnie (np. dodatnie kontrole tkankowe na preparacie próbki pacjenta) barwione w tej samej serii powinny być sprawdzone w celu określenia, czy usterka jest spowodowana stosowaną kontrolą lub odczynnikami. Próbkę nieprawidłowo pobraną, utrwaloną, przechowywaną lub odparafinowaną mogą nie wykazywać prawidłowego wybarwienia.
3. Jeżeli próbka została zmyta ze szkiełka, należy sprawdzić, czy szkiełka są dodatnio naładowane.
4. Jeżeli na skrawkach występuje artefakt typu „pajęczyna pęknięć” związany z chemicznymi reakcjami wykrywania, proces odwadniania nie został w pełni wykonany. Należy zapoznać się z rozdziałem Procedura odwadniania.
5. W przypadku zaobserwowania nieswoistego barwienia szkiełka lub nieswoistego barwienia obszarów tkanki (zwłaszcza innych niż nabłonek płaski), należy barwić dodatkowy skrawek próbki pacjenta.
6. Środki zaradcze opisano w sekcji Procedura postępowania w Instrukcji obsługi aparatu BenchMark IHC/ISH. Odpowiednie informacje można też uzyskać w lokalnym biurze firmy Roche.

PIŚMIENICTWO

1. HPV Sequence Database (<http://www.stdgen.lanl.gov/stdgen/virus/hpv/>).
2. WHO/ICO HPV Information Center. Human Papilloma Virus and Related Cancers. Summary Report Update. November 15, 2010. p8. http://apps.who.int/hpvcentre/statistics/dynamic/ico/country_pdf/XWX.pdf?CFID=5730279&CFTOKEN=65827281.
3. HPV Information Centre. <http://www.hpvcentre.net/aboutus.php>
4. Clinical Microbiology and Infection © 2015 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved, CMI, 21, 808-816.
5. Birner P, Schindl M, Stani J, Oberhuber G, Czerwenka K, Vutuc C, Breitenecker G. Hybrid capture based human papillomavirus typing in cervical screening compared to cytology and histology. Wien Klin Wochenschr. 2000;112(17):761-766.
6. Nindl I, Greinke C, Zahm DM, Stockfleth E, Hoyer H, Schneider A. Human papillomavirus distribution in cervical tissues of different morphology as determined by hybrid capture assay and PCR. Int J Gynecol Pathol. 1997;16(3):197-204.
7. zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers – a brief historical account. Virology. 2009;384(2):260-265.
8. Munoz N, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus type associated with cervical cancer. N Engl J Med. 2003;348(6):518-527.
9. Delvenne P, Fontaine MA, Delvenne C, Nikkels A, Boniver J. Detection of human papillomaviruses in paraffin-embedded biopsies of cervical intraepithelial lesions: analysis by immunohistochemistry, in situ hybridization, and the polymerase chain reaction. Mod Pathol. 1994;7(1):113-119.

10. Zehbe I, Hacker GW, Su H, Hauser-Kronberger C, Hainfeld JF, Tubbs R. Sensitive in situ hybridization with catalyzed reporter deposition, streptavidin-Nanogold and silver acetate autometallography: detection of single-copy human papillomavirus. Am J Pathol. 1997;150(5):1553-1561.
11. Zehbe I, Rylander E, Strand, A, Wilander E. Use of Probemix and OmniProbe biotinylated cDNA probes for detecting HPV infection in biopsy specimens from the genital tract. J Clin Pathol. 1993;46(5):437-440.
12. Unger, ER. In situ diagnosis of human papillomaviruses. Clin Lab Med. 2000;20(2):289-301.
13. Evans MF, Aliesky HA, Cooper K. Optimization of biotinyl-tyramide-based in situ hybridization for sensitive background-free applications on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens. BMC Clin Pathol. 2003;3(1):2.

WŁASNOŚĆ INTELEKTUALNA

VENTANA, BENCHMARK oraz INFORM są zarejestrowanymi znakami towarowymi firmy Roche.

Wszystkie pozostałe znaki towarowe stanowią własność odpowiednich właścicieli.

© 2017 Ventana Medical Systems, Inc.

DANE KONTAKTOWE



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany

www.ventana.com