

VENTANA Kappa and Lambda Dual ISH mRNA Probe Cocktail

REF 800-6054
08507023001

IVD 30

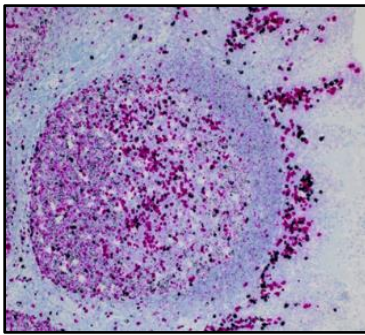


Abb. 1. Kappa- und Lambda-mRNA-Expressionsmuster in Tonsillen.

VERWENDUNGSZWECK

VENTANA Kappa und Lambda Dual ISH mRNA Probe Cocktail ist für den qualitativen Nachweis von Kappa-mRNA und Lambda-mRNA in formalinfixiertem, paraffineingebettetem (FFPE) menschlichem Knochenmark und lymphatischem Gewebe, das mit einem BenchMark IHC/ISH-Gerät mittels chromogener In-situ-Hybridisierung (ISH) gefärbt und lichtmikroskopisch sichtbar gemacht wurde. VENTANA Kappa und Lambda Dual ISH mRNA Probe Cocktail ist als Hilfsmittel für die Identifizierung von B-Zell-Lymphomen und Plasmazell-

Neoplasmen bestimmt.

Die Ergebnisse des Assays müssen von einem qualifizierten Pathologen in Verbindung mit histologischen Untersuchungen, klinisch relevanten Informationen und geeigneten Kontrollen interpretiert werden.

Dieses Produkt ist für die Verwendung in der In-vitro-Diagnostik (IVD) bestimmt.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Die Bewertung der B-Zell-Klonalität ist ein nützliches Hilfsmittel bei der Diagnose von vermuteten B-Zell- und Plasmazell-Neoplasmen. Eine gängige Methode zur Bestimmung der B-Zell-Klonalität ist die Bestimmung der Kappa- und Lambda-Leichtkettenexpression in FFPE-Gewebe. Das Expressionsniveau der Kappa- und Lambda-Leichtketten in normalen B-Zellen und B-Zell-Neoplasmen hängt jedoch stark vom Differenzierungsstadium ab, und viele verfügbare Assays sind aufgrund unzureichender Sensitivität für die unteren Expressionsbereiche nur von begrenztem Nutzen.

Der VENTANA Kappa and Lambda Dual ISH mRNA Probe Cocktail (VENTANA K/L Probe Cocktail) soll einen sensitiven und dynamischen Nachweis sowohl für Kappa- als auch für Lambda-Leichtketten-mRNA auf einem einzigen FFPE-Objektträger ermöglichen und so den klinischen Nutzen auf B-Zellen in allen Reifungsstadien und ihre neoplastischen Gegenstücke ausweiten.

Der VENTANA K/L Probe Cocktail ist eine Mischung aus mit Digoxigenin(DIG)- und Benzofurazan(BF)-Hapten markierten 2'-O-Methyl-Oligonukleotidsonden, die etwa 80 Basen entweder der Region der Kappa- oder Lambda-Leichtkette der zugehörigen mRNA-Transkripte umspannen. Das Kappa-Ziel wird mit dem VENTANA Magenta ISH DIG Detection Kit in Magenta und das Lambda-Ziel mit dem VENTANA Silver ISH BF Detection Kit in Schwarz visualisiert. Der Restriktionsstatus wird anhand des Verhältnisses von Kappa- zu Lambda-Signal bestimmt.

VERFAHRENSPRINZIP

VENTANA K/L Probe Cocktail wurde für die Verwendung mit dem VENTANA Magenta ISH DIG Detection Kit, dem VENTANA Silver ISH BF Detection Kit, dem ISH TSA Ancillary Kit und Zusatzreagenzien auf einem BenchMark IHC/ISH-Gerät formuliert.

Die Nachweiskits enthalten HRP-markierte Anti-Hapten-Primärantikörper, Hapten-markiertes Tyramid-Amplifikationsreagenz und Silber- oder Magenta-Chromogen. Während des Färbeprozesses im Rahmen der ISH werden BF- und DIG-markierte Sonden an ihre jeweiligen Zielsequenzen im Gewebe hybridisiert.

Die DIG-markierte Kappa-Sonde wird mit dem VENTANA Magenta ISH DIG Detection Kit nachgewiesen. Dieses Nachweissystem verwendet HRP-markierte monoklonale Anti-DIG-Maus-Antikörper und DIG-markierte Tyramid-Amplifikation, um das Ziel als Magentasignal durch die kovalente Bindung von Sulforhodamin-B-markiertem Tyramid mit dem Gewebe sichtbar zu machen (siehe Abb. 2).

Die BF-markierte Lambda-Sonde wird mit dem VENTANA Silver ISH BF Detection Kit nachgewiesen. Dieses Nachweissystem verwendet HRP-markierte monoklonale Anti-BF-Maus-Antikörper und BF-markierte Tyramid-Amplifikation, um das Ziel als ein schwarzes Signal durch den Niederschlag von Silber sichtbar zu machen (siehe Abb. 3).

Weitere Informationen finden Sie in den Methodenblättern für diese Nachweisreagenzien.

Das Färbeprotokoll besteht aus zahlreichen Schritten, in denen Reagenzien bei bestimmten Temperaturen für eine bestimmte Dauer inkubiert werden. Am Ende jedes Inkubationsschritts wäscht das BenchMark-Gerät die Schnitte, um ungebundenes Material zu entfernen, und trägt eine flüssige Deckglaslösung auf, um die Verdunstung der wässrigen Reagenzien vom Objektträger zu minimieren. Die Ergebnisauswertung erfolgt mithilfe eines Lichtmikroskops.

Weiterführende Hinweise zur Verwendung der Geräte sind dem jeweiligen Benutzerhandbuch zu entnehmen.

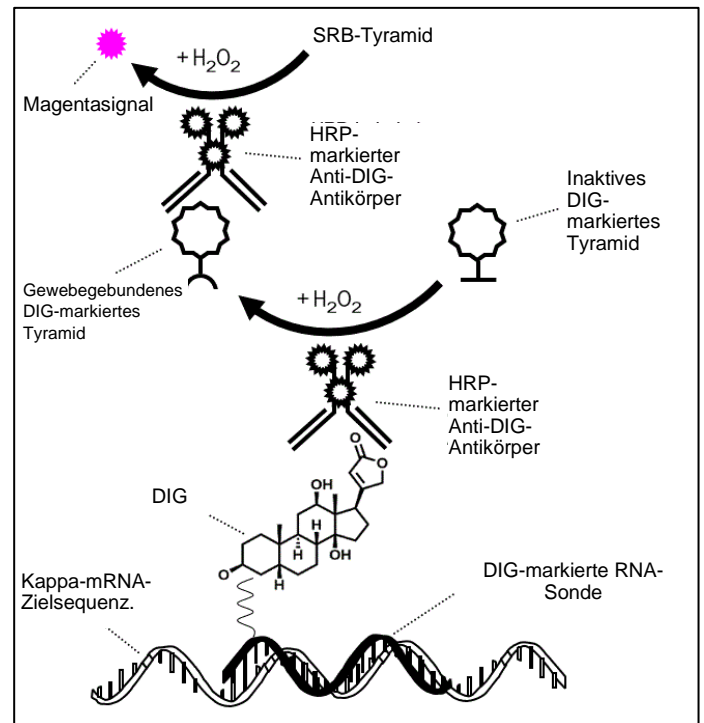


Abb. 2. VENTANA Magenta ISH DIG Detection Kit

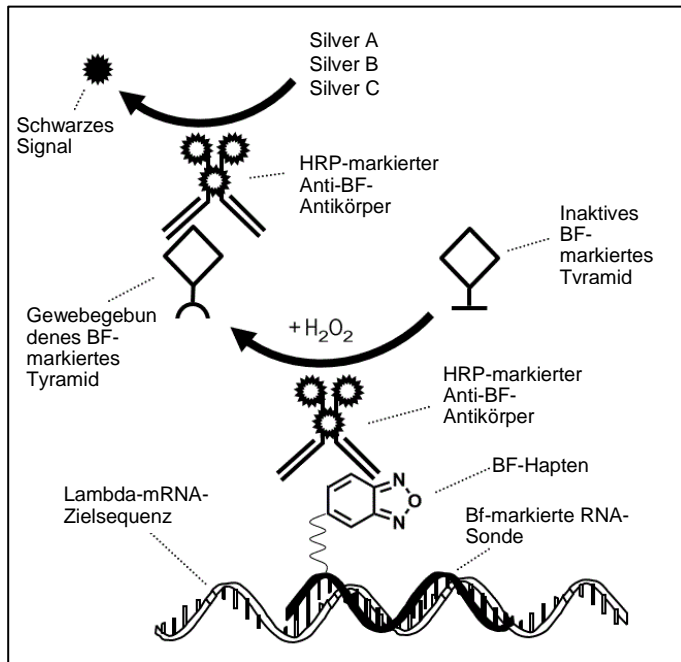


Abb. 3. VENTANA Silver ISH BF Detection Kit

MATERIALIEN UND METHODEN

Im Lieferumfang enthaltenes Material

Der VENTANA K/L Probe Cocktail enthält ausreichendes Reagenzmaterial für 30 Tests.

Ein 6-mL-Spender enthält etwa 0.120 µg/mL markierte Sonde in einem Hybridisierungspuffer auf Formamidbasis (etwa 50 % CH₃NO).

Rekonstitution, Mischen, Verdünnung, Titration

Die Sonde ist für den Einsatz auf BenchMark IHC/ISH-Geräten optimiert. Rekonstitution, Mischen, Verdünnung und Titration sind nicht erforderlich. Eine weitere Verdünnung könnte zu einer Verschlechterung der Färbequalität führen.

Nicht im Lieferumfang enthaltene, aber erforderliche Materialien

Färbereagenzien wie die VENTANA-Nachweiskits und Hilfskomponenten werden nicht bereitgestellt. Möglicherweise sind nicht alle in dem Methodenblatt aufgeführten Produkte in allen Regionen verfügbar. Wenden Sie sich an den zuständigen Kundendienst.

Die folgenden möglicherweise für die Färbung benötigten Reagenzien und Materialien sind nicht im Lieferumfang enthalten:

1. VENTANA U6 BF Probe (Art.-Nr. 760-7062 / 08773866001)
2. ISH Negative Control (Art.-Nr. 780-2902 / 05272165001)
3. VENTANA Silver ISH BF Detection Kit (Art.-Nr. 760-513 / 08507031001)
4. VENTANA Magenta ISH DIG Detection Kit (Art.-Nr. 760-514 / 08507201001)
5. ISH TSA Ancillary Kit (Art.-Nr. 760-515 / 08507082001)
6. ISH Peroxidase Inhibitor (Art.-Nr. 780-5061 / 07729014001)
7. HybReady Solution (Art.-Nr. 780-4409 / 05917557001)
8. ISH Protease 3 (Art.-Nr. 780-4149 / 05273331001)
9. Hematoxylin II (Art.-Nr. 790-2208 / 05277965001)
10. Bluing Reagent (Art.-Nr. 760-2037 / 05266769001)
11. Reaction Buffer Concentrate (10X) (Art.-Nr. 950-300 / 05353955001)
12. SSC (10X) (Art.-Nr. 950-110 / 05353947001)
13. EZ Prep Concentrate (10X) (Art.-Nr. 950-102 / 05279771001)
14. ULTRA CC1 (Art.-Nr. 950-224 / 05424569001)
15. ULTRA LCS (Art.-Nr. 650-210 / 05424534001)
16. *ultraView* Silver Wash II (Art.-Nr. 780-003 / 05446724001)
17. Mikroskopobjektträger, Superfrost™ Plus
18. BenchMark IHC/ISH-Gerät
19. Allgemeine Laborgeräte

Lagerung und Haltbarkeit

Bei Annahme, und wenn nicht verwendet, bei 2–8 °C lagern. Nicht einfrieren. Diese Sonde kann sofort nach dem Herausnehmen aus dem Kühlschrank verwendet werden.

Um die ordnungsgemäße Abgabe der Reagenzien und Stabilität der Sonde zu gewährleisten, muss die Spender-Verschlusskappe nach jedem Gebrauch wieder aufgesetzt und der Spender sofort in aufrechter Position in den Kühlschrank gestellt werden.

Jeder Sondenspender ist mit einem Verfallsdatum versehen. Bei korrekter Lagerung ist das Reagenz bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil. Das Reagenz darf nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden.

Probensammlung und -vorbereitung zur Analyse

Für die Verwendung mit dem VENTANA K/L Probe Cocktail eignet sich routinemäßig verarbeitetes FFPE-Gewebe. Als Gewebefixierungsmittel wird 10%iges neutral gepuffertes Formalin (NBF) für 6 bis 72 Stunden¹ empfohlen. Bei Geweben, die einen Entkalkungsschritt erfordern, ist VENTANA K/L Probe Cocktail nachweislich mit HCl-, Ameisensäure- und EDTA-Entkalkungsreagenzien kompatibel, wobei diese Kompatibilität stark von der Reagenzienkonzentration sowie der Behandlungszeit abhängt. Es sind möglicherweise nicht alle Entkalkungsreagenzien mit der Sonde kompatibel. Die geprüften spezifischen Fixier- und Entkalkungsreagenzien sind in Tabelle 5 und Tabelle 6 aufgeführt. Die Behandlungsdauer sollte vor der Verwendung validiert werden.

Die Proben sollten in 4-µm-Schnitte geschnitten und auf positiv geladene Mikroskopobjektträger (*Superfrost™ Plus*) aufgebracht werden. Die Objektträger sollten schräg gestellt oder getrocknet werden, um überschüssiges Wasser zwischen Objektträger und Gewebe vor der Färbung mit dem BenchMark IHC/ISH-Gerät zu entfernen. In Abhängigkeit von der Dicke des Gewebeschnitts, der Art der Fixierung, einer unvollständigen/verlängerten Fixierung oder besonderen Bearbeitungen, z. B. der Entkalkung von Knochenmarkpräparaten, können unterschiedliche Ergebnisse auftreten. Die Objektträger sollten sofort gefärbt werden, da die Qualität der Ziel-RNA in Gewebeschnitten mit der Zeit abnehmen kann. Interne Studien haben gezeigt, dass bei Raumtemperatur aufbewahrte geschnittene Objektträger mindestens 60 Tage lang haltbar sind.

Positiv geladene Objektträger können Umgebungseinflüssen ausgesetzt sein, die in einem ISH-Assay zu unangemessenen Färbeergebnissen führen (z. B. fehlende Färbung oder Gegenfärbung des Gewebes). Bitte Sie Ihren Roche-Vertreter um ein Exemplar des Informationsblattes „Impact of environmental stress on IHC positively charged slides“ (Einfluss der Umweltbelastung auf verschiedene Histologie-Objektträgertypen), um besser zu verstehen, wie diese Art von Objektträgern zu verwenden ist.

Es wird empfohlen, alle Kontrollobjektträger gleichzeitig mit den Patientenproben zu analysieren.

Beachten Sie, dass die Magenta- und Silbersignale bei längerer Lichteinwirkung mit der Zeit ihre Farbtöne verändern oder verblassen können. Dies sollte die normale klinische Praxis nicht beeinträchtigen, aber die Objektträger sollten vor direktem Licht geschützt aufbewahrt werden, wenn sie nicht in Gebrauch sind.


WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

1. Zur Verwendung in der In-vitro-Diagnostik (IVD).
2. Nur zur professionellen Verwendung.
3. **WICHTIGER HINWEIS:** In den USA ist der Verkauf dieses Produkts laut Bundesgesetz nur durch einen Arzt oder auf Anordnung eines Arztes zulässig (Rx Only [verschreibungspflichtig]).
4. Nur für die angegebene Testanzahl verwenden.
5. Materialien menschlichen oder tierischen Ursprungs müssen als biogefährliche Stoffe behandelt und mit den erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen entsorgt werden. Im Falle einer Exposition sind die Richtlinien der zuständigen Gesundheitsbehörden zu beachten.^{2,3}
6. Beim Umgang mit Reagenzien angemessene Vorsichtsmaßnahmen treffen. Kontakt mit Augen, Haut und Schleimhäuten vermeiden. Bei der Arbeit mit vermutlich krebserregenden oder giftigen Substanzen Einweghandschuhe und geeignete Schutzkleidung tragen.
7. Bei Kontakt von Reagenzien mit empfindlichen Körperteilen mit reichlich Wasser spülen. Das Einatmen von Reagenzien vermeiden.
8. Sicherstellen, dass der Abfallbehälter leer ist, bevor ein Lauf auf dem Gerät gestartet wird. Wenn diese Vorsichtsmaßnahme nicht beachtet wird, könnte der Abfallbehälter überlaufen und Benutzer ausrutschen und stürzen.

9. Mikrobielle Kontamination der Reagenzien vermeiden, da dies zu fehlerhaften Versuchsergebnissen führen kann.
10. Weiterführende Informationen zur Verwendung dieses Produkts sind im Benutzerhandbuch des BenchMark IHC/ISH-Geräts und den Methodenblättern der benötigten Komponenten auf navifyportal.roche.com enthalten.
11. Anweisungen zur vorschriftsmäßigen Entsorgung sind bei den zuständigen kommunalen und/oder staatlichen Behörden erhältlich.
12. Die Kennzeichnung der Produktsicherheit erfolgt in erster Linie nach der EU-GHS-Verordnung. Sicherheitsdatenblätter sind für professionelle Benutzer auf Anfrage erhältlich.
13. Bei Verdacht auf ein schwerwiegendes Ereignis im Zusammenhang mit diesem Produkt wenden Sie sich an den Roche-Vertreter vor Ort und melden das Ereignis bei der zuständigen Behörde des EU-Mitgliedstaats bzw. des Landes, in dem sich der Benutzer befindet.

Dieses Produkt enthält Bestandteile, die nach Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 wie folgt eingestuft sind:

Tabelle 1. Gefahrenhinweis.

Gefahr	Code	Hinweis
	H351	Kann vermutlich Krebs erzeugen.
	H360D	Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
	H373	Kann die Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition.
	P201	Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
	P202	Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.
	P260	Nebel oder Dämpfe nicht einatmen.
	P280	Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Ge-sichtsschutz/Gehörschutz tragen.
	P308 + P313	Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P501	Inhalt/Behälter einer zugelassenen Müllentsorgungsanlage zuführen.	

FÄRBEVERFAHREN

VENTANA KL Probe Cocktail wurde zur Verwendung auf einem BenchMark IHC/ISH-Gerät in Kombination mit VENTANA Nachweis kits und Zubehör entwickelt. Die Parameter für die automatisierten Verfahren können gemäß dem Verfahren im Benutzerhandbuch des Geräts angezeigt, gedruckt und bearbeitet werden.

Das Verfahren „U Kappa Lambda DISH PRB-CKT“ wird für die Färbung mit den Geräten BenchMark ULTRA und ULTRA Plus verwendet.

Tabelle 2. Empfohlene Bedingungen des Färbeprotokolls. „Kurze Vorbehandlung“ kann auf der Grundlage der einzelnen Proben oder der Präferenz des Ablesers gewählt werden. „Kurze Vorbehandlung“ verringert die Intensität aller spezifischen Signale, einschließlich des Signals für das nukleare Immunglobulin Lambda Wie Polypeptid 5 (IGLL5, siehe Abschnitt „INTERPRETATION DER ERGEBNISSE“).

Färbung wählbar	Einstellung
Kurze Vorbehandlung	Nicht ausgewählt

BenchMark IHC/ISH-Geräte

1. Ein Barcode-Etikett auf dem Objektträger anbringen, das dem durchzuführenden Protokoll entspricht.
2. Den Sondenspender, die entsprechenden Nachweis kit-Spender und die erforderlichen Zusatzreagenzien in den Reagenzträger laden und diesen in das Gerät stellen.
3. Die Vorratsflüssigkeiten überprüfen und den Abfall leeren.
4. Die Objektträger in das Gerät laden.
5. Den Färbelauf starten.
6. Nach Abschluss des Laufs die Objektträger aus dem Gerät nehmen.
7. Mit dem empfohlenen Verfahren zur Geräte-Nachbehandlung fortfahren.

Empfohlene Verfahren zur Geräte-Nachbehandlung

Hinweis: Um eine vollständige Dehydratisierung sicherzustellen, müssen die Ethanolbäder häufig gewechselt werden, und es kann ein drittes Bad mit 100 % Ethanol hinzugefügt werden.

1. Zum Entfernen der Liquid Coverslip-Lösung die Objektträger in zwei aufeinanderfolgenden Lösungen eines milden Detergens waschen (kein für automatische Geschirrspüler vorgesehenes Detergens verwenden).
2. Die Objektträger etwa 1 Minute lang gut in destilliertem Wasser abspülen. Überschüssiges Wasser durch Schütteln entfernen.
3. Die Objektträger etwa 1 Minute lang in ein Bad mit 90 % Ethanol überführen.
4. Die Objektträger etwa 1 Minute lang in ein Bad mit 100 % Ethanol überführen.
5. Die Objektträger etwa 1 Minute lang in ein zweites Bad mit 100 % Ethanol überführen.
6. Die Objektträger etwa 1 Minute lang in ein Bad mit Xylol überführen.
7. Die Objektträger etwa 1 Minute lang in ein zweites Bad mit Xylol überführen.
8. Den Objektträger eindecken. Beachten Sie, dass einige Eindeckmedien nicht mit dem VENTANA K/L Probe Cocktail kompatibel sind (siehe Abschnitt Einschränkungen).

QUALITÄTSKONTROLLVERFAHREN

Positives Kontrollgewebe

Es wird empfohlen, jedem Patientenobjektträger ein laborspezifisches Tonsillen-Kontrollgewebe beizufügen, um sicherzustellen, dass der Assay wie erwartet funktioniert. Normale Tonsillen weisen die gesamte Bandbreite der Kappa- und Lambda-Expression auf, während das Stroma als negatives Färberelement dient. Ein stark vermindertes Signal oder ein übermäßiger Hintergrund weist darauf hin, dass auf diesem Objektträger möglicherweise ein Fehler aufgetreten ist. Der Objektträger sollte daher nicht ausgewertet werden.

Tabelle 3. Bewertungskriterien für die Beurteilung der Färbung von Tonsillen-Kontrollgewebe.

Färberelement	Akzeptable Färbung	Nicht akzeptable Färbung
Bekannt positiv	Punktförmige zytoplasmatische Punktfärbung fast aller B-Zellen in der Mantelzone, deutlich sichtbar bei 10X, mit physiologischem K/L-Verhältnis (2-3:1)	Deutlich verringerte Färbung der meisten B-Zellen in der Mantelzone, die nur mit 20-facher Vergrößerung sichtbar gemacht werden kann
Bekannt negativ	Fehlende oder geringfügige, zufällig verstreute Färbung im Stroma	Übermäßige unspezifische Hintergrundfärbung des Plattenepithels oder Stromas, die die Auszählung des K/L-Verhältnisses verdeckt

RNA-Integritätsmarker

Der VENTANA K/L Probe Cocktail-Assay kann in Geweben, in denen die mRNA-Integrität beeinträchtigt wurde, weniger leistungsfähig sein. Da RNA für den Abbau anfällig ist, wird das ubiquitär exprimierte U6-Transkript üblicherweise als Ersatz zur Bewertung des Zielabbaus in Gewebeproben verwendet. Die VENTANA U6 BF Probe (Kat.-Nr. 760-7062 / 08773866001) ist zwar für die Interpretation des Restriktionsstatus nicht erforderlich, kann aber zur Bewertung der RNA-Integrität bei Patienten verwendet werden, bei denen auf dem K/L-Objektträger kein ausreichendes Signal vorhanden ist. Eine negative Färbung mit der VENTANA U6 BF Probe zeigt an, dass eine neue Patientenprobe erforderlich sein könnte.

Patientenproben, die mit der VENTANA U6 BF Probe gefärbt wurden, sollten mit dem gleichen Färbeverfahren und der gleichen Vorbehandlung durchgeführt werden, die für den VENTANA K/L Probe Cocktail-Test verwendet wurden.

Negative Sondenkontrolle

ISH Negative Control (Art.-Nr. 780-2902 / 05272165001) kann anstelle des VENTANA K/L Probe Cocktail verwendet werden, um den Nachweis gesteuerten Hintergrund in einer Patientenprobe zu ermitteln. Die Verwendung einer negativen Sondenkontrolle ist für die Interpretation des Restriktionsstatus nicht erforderlich.

Ungeklärte Diskrepanzen

Wenn ungeklärte Diskrepanzen in Kontrollen auftreten, umgehend den zuständigen Kundendienst benachrichtigen. Wenn die Ergebnisse der Qualitätskontrolle nicht den Spezifikationen entsprechen, sind die Patientenergebnisse ungültig. Das Problem muss identifiziert und behoben werden. Anschließend sind die Patientenproben erneut zu testen (siehe hierzu den Abschnitt „Fehlerbehebung“).

Assay-Verifizierung

Vor der ersten Verwendung eines Reagenz in einem Diagnoseverfahren muss die Reagenzleistung überprüft werden. Zu diesem Zweck wird das Reagenz mit einer Reihe von Gewebeproben mit bekannten ISH-Leistungsmerkmalen getestet (siehe hierzu die Empfehlungen zur Qualitätskontrolle in der College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program Anatomic Pathology Checklist⁴ und die CLSI Approved Guideline⁵). Diese Qualitätskontrollverfahren sollten bei jeder neuen Reagenziencharge, bei jeder Änderung der Assayparameter oder bei jeder Änderung der Probenvorbereitung wiederholt werden.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Vor der Interpretation der Ergebnisse muss/müssen die Kontrolle(n) von einem qualifizierten Pathologen, der über Erfahrung in der mikroskopischen Bewertung anatomischer Pathologieproben beurteilt werden. Siehe „Interpretationshilfe für VENTANA Kappa and Lambda Dual ISH mRNA Probe Cocktail für B-Zell-Lymphome und Plasmazellneoplasien“ (Kat.-Nr. 102202118DE) für zusätzliche Hilfsmittel zur Auswertung der Patienten- und Kontrollfärbung. Die morphologischen Ergebnisse eines Patienten und die dazugehörigen klinischen Daten müssen von einem qualifizierten Pathologen ausgewertet werden.

Mit dem Assay färben sich Kappa-Ziele magentafarben und Lambda-Ziele schwarz. Das typische positive Färbemuster für B-Zellen ist ein teilweiser bis vollständiger Ring aus punktförmiger zytoplasmatischer Färbung, während Plasmazellen aufgrund der reichlich vorhandenen mRNA typischerweise eine vollständige Füllung des Zytoplasmas aufweisen.

Das Färbemuster wird als Verhältnis von Kappa- zu Lambda-exprimierenden Zellen interpretiert, um den Restriktionsstatus zu bestimmen. Die normale Immunreaktion erzeugt in der Regel eine Kappa-lastige polyklonale Population mit einem Verhältnis von etwa 2-3:1 Kappa zu Lambda. Bei VENTANA K/L Probe Cocktail wird ein Verhältnis von mehr als 4:1 als Kappa-restringiert und ein Verhältnis von weniger als 1:2 als Lambda-restringiert interpretiert (siehe Tabelle 4 und Abb. 4).

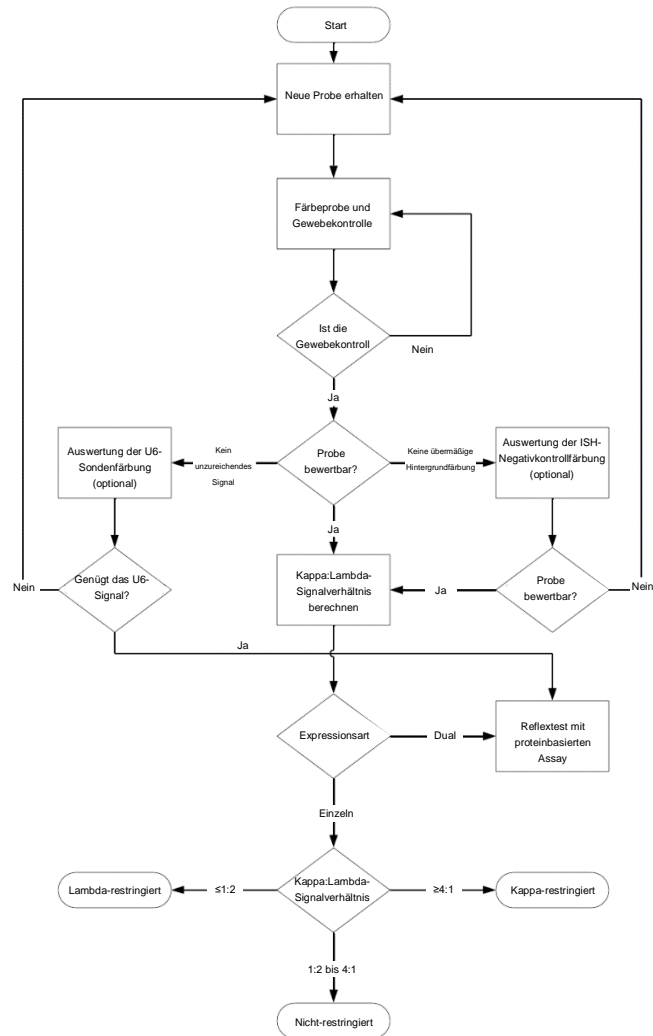
Das Transkript für IGLL5 ist zu 100 % homolog mit der Lambda-Leichtkettensequenz. Aufgrund dieser Homologie kann der VENTANA K/L Probe Cocktail IGLL5 mRNA färben. Die Expression von IGLL5 ist überwiegend nukleär. Sein Signal wird als schwarze, punktförmige Punkte sichtbar gemacht. Auf der Grundlage interner Tests wird ein ausgeprägtes IGLL5-Signal in etwa 15 % der Fälle beobachtet und sollte nicht zur Bestimmung des Restriktionsstatus herangezogen werden.

Interne Tests haben ergeben, dass bei etwa 5 % der Lymphom- und Myelomfälle sowohl Kappa- als auch Lambda-mRNA im Zytoplasma der gleichen Zellen vorhanden ist. Die Klonalität kann in diesen Fällen nicht durch ISH bestimmt werden, und es sollte ein Reflextest mit einem proteinbasierten Assay durchgeführt werden. Die Koexpression von Signalen wird in nicht eingeschränkten Geweben nicht beobachtet.

Tabelle 4. Bewertungskriterien für die Bestimmung des Restriktionsstatus.

Klinischer Status	Kappa:Lambda-Verhältnis
Kappa-restringiert	Größer als oder gleich 4:1
Nicht-restringiert	Weniger als 4:1 und mehr als 1:2
Lambda-restringiert	Weniger als oder gleich 1:2

Abb. 4. Entscheidungsbaum für die Interpretation der VENTANA K/L Probe Cocktail-Färbung in Kontrollen und Patientenfällen.



EINSCHRÄNKUNGEN

Allgemeine Einschränkungen

- Die ISH ist eine aus mehreren Schritten bestehende Methode, die hinsichtlich der Wahl der geeigneten Reagenzien sowie bezüglich Probenvorbereitung, Aufbereitung und Vorbereitung des Objektträgers und der Interpretation der Ergebnisse eine besondere Schulung erfordert.
- Die Gewebefärbung hängt von der Handhabung und Verarbeitung des Gewebes vor der Färbung ab. Unsachgemäßes Fixieren, Einfrieren, Auftauen, Waschen, Trocknen, Erhitzen, Schneiden oder die Kontamination mit anderen Geweben oder mit Flüssigkeiten kann zu Artefakten, Abfangen von Reagenzien, falsch-negativen oder falsch-positiven Ergebnissen führen. Inkonsistente Ergebnisse können die Folge von Abweichungen bei Fixierungs- und Einbettungsmethoden oder von inhärenten Unregelmäßigkeiten im Gewebe sein.
- Eine übermäßige oder unvollständige Gegenfärbung kann die korrekte Interpretation der Ergebnisse beeinträchtigen.
- Die klinische Interpretation einer Färbung muss im Kontext der klinischen Vorgeschichte, der Morphologie und sonstiger histopathologischer Kriterien erfolgen. Es liegt in der Verantwortung des qualifizierten Pathologen, zum Erhalt der gefärbten Präparate mit den zur Färbung verwendeten Reagenzien und Methoden vertraut zu sein. Die Färbung muss in einem zertifizierten, lizenzierten Labor unter der Aufsicht eines Pathologen durchgeführt werden, der für die Überprüfung der

gefärbten Objektträger sowie die Sicherstellung adäquater Kontrollen verantwortlich ist.

- VENTANA liefert Reagenzien in der optimalen Verdünnung zur Verwendung entsprechend der Gebrauchsanweisung. Abweichungen von den empfohlenen Testverfahren können die erwarteten Ergebnisse ungünstig machen. Es müssen entsprechende Kontrollen durchgeführt und dokumentiert werden. Benutzer, die von den empfohlenen Testverfahren abweichen, tragen die Verantwortung für die Interpretation der Patientenergebnisse.
- Bei Gewebe, das im Vorfeld nicht getestet wurde, können unerwartete Reaktionen mit den verwendeten Reagenzien auftreten. Aufgrund der biologischen Variabilität von Geweben können unerwartete Reaktionen auch bei getesteten Gewebegruppen nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Wenn unerwartete Reaktionen dokumentiert werden, ist der zuständige Kundendienst zu benachrichtigen.

Spezifische Einschränkungen

- Nicht alle Fixiermittel sind möglicherweise mit dem VENTANA K/L Probe Cocktail-Assay kompatibel. Ventana empfiehlt eine Fixierung mit 10%igem NBF für 6 bis 72 Stunden. Die geprüften Fixiermittel sind in Tabelle 5 aufgeführt. Die Fixierdauer sollte vor der Verwendung validiert werden.
- VENTANA K/L Probe Cocktail ist nachweislich mit HCl-, Ameisensäure- und EDTA-Entkalkungsreagenzien kompatibel, wobei diese Kompatibilität stark von der Reagenzienkonzentration sowie der Behandlungszeit abhängt. Es sind möglicherweise nicht alle Entkalkungsreagenzien mit der Sonde kompatibel. Die geprüften spezifischen Reagenzien sind in Tabelle 6 aufgeführt. Die Entkalkungsdauer sollte vor der Verwendung validiert werden.
- Der VENTANA K/L Probe Cocktail ist nicht für die Diagnose von B-Zell-Lymphomen oder reaktiven B-Zell-Prozessen in Knochenmarkskernen bestimmt, da die mRNA durch viele üblicherweise verwendete Entkalkungslösungen abgebaut wird.
- Interne Tests haben ergeben, dass bei etwa 5 % der Lymphom- und Myelomfälle sowohl Kappa- als auch Lambda-mRNA im Zytoplasma der gleichen Zellen vorhanden ist. Die Klonalität kann in diesen Fällen nicht durch ISH bestimmt werden, und es sollte ein Reflextest mit einem proteinbasierten Assay durchgeführt werden.
- Der VENTANA K/L Probe Cocktail-Assay wurde für die Verwendung von Gewebe mit einer Dicke von 4 µm entwickelt. Bei dünneren/dickeren Abschnitten kann es zu unangemessener Färbung und/oder Gewebeverlust kommen.
- Die Gewebe sollten innerhalb von 60 Tagen nach dem Schneiden gefärbt werden. Bei Geweben, die nach 60 Tagen gefärbt werden, kann ein Verlust der Färbung beobachtet werden.
- Nicht alle Eindeckmedien sind möglicherweise mit den im VENTANA K/L Probe Cocktail-Assay verwendeten Chromogenen kompatibel. Insbesondere kann es bei bestimmten Marken von Eindeckmedien zu Oxidation, Verblässen und/oder Verschwinden des Silbersignals kommen. Die geprüften Eindeckmedien sind in Tabelle 7 aufgeführt.
- Gefärbte Objektträger sollten bei Nichtgebrauch im Dunkeln gelagert werden, um ein Verblässen oder eine Veränderung des Farbtönen der Magenta- und Silberchromogene zu verhindern.
- In Kombination mit den VENTANA Detection Kits und Zubehör erkennt die Sonde eine Nukleinsäuresequenz, die auch nach routinemäßiger Formalinfixierung, Gewebeaufbereitung und Schneiden noch vorhanden ist. Wie bei jedem Test bedeutet ein negatives Ergebnis lediglich, dass das spezifische Ziel in der Gewebeprobe nicht nachgewiesen wurde, und nicht, dass das Ziel im ursprünglichen, unfixierten Gewebe nicht vorhanden war.
- Durch die Unterschiede in der Probenverarbeitung oder der Präferenz des Pathologen kann es erforderlich sein, die Option „Kurze Vorbehandlung“ im Protokoll zu wählen. Dies muss vom Benutzer validiert werden. Benutzer, die vom empfohlenen Testverfahren abweichen, tragen die Verantwortung für die Interpretation der Patientenergebnisse unter den jeweiligen Bedingungen.
- Diese Sonde wurde für die Verwendung mit VENTANA Reagenzien auf BenchMark IHC/ISH Geräten optimiert. Benutzer, die von den empfohlenen Testverfahren abweichen, tragen die Verantwortung für die Interpretation der Patientenergebnisse unter den jeweiligen Bedingungen.
- Es sind möglicherweise nicht alle Assays auf jedem Gerät registriert. Weitere Informationen sind vom zuständigen Kundendienst erhältlich.

Tabelle 5. Kompatibilität von Fixiermitteln.

Fixiermittel	Kompatibel?
10 % neutral gepuffertes Formalin	Ja
20 % neutral gepuffertes Formalin	Ja
10 % nicht-gepuffertes Formalin	Ja
Bouin's	Ja
Zink-Formalin	Ja
Alkoholische Formalin-Essigsäure	Nein
Prefer	Nein
Alkoholisches Formalin	Nein
Diff-Quik	Nein

Tabelle 6. Kompatibilität der getesteten Entkalkungsreagenzien.

Entkalker	Hersteller	Typ	Kompatibel?
Decal Decalcifier	StatLab	HCl/EDTA	Ja
Decalcifying Solution B	Fisher Scientific	HCl/EDTA	Ja
Formical 2000	StatLab	Ameisensäure/EDTA	Ja
Immunocal	StatLab	Ameisensäure	Ja

Tabelle 7. Kompatibilität des Eindeckmediums.

Eindeckmedium	Hersteller	Kompatibel?
Acrytol	Electron Microscopy Sciences	Ja
Consul-Mount	Epredia	Ja
Cytoseal XYL	Richard Allan Scientific	Ja
Cytoseal 60	Richard Allan Scientific	Ja
Dako Mounting Medium	Dako	Ja
Diamount	Diapath	Ja
DPX Mountant	CDH	Ja
Entellan	Merck	Ja
Glycergel	Dako	Ja
HE600	Roche	Ja
HistoCore Spectra CV X1	Leica	Ja
Histomount	National Diagnostics	Ja
MicroMount	Leica	Ja
Canada Balsam	Elabscience	Ja
Permunt	Electron Microscopy Sciences	Ja
Pertex	Histolab	Ja
Epredia Synthetic Mountant	Epredia	Ja
Sub-X Mounting	Leica	Ja
Tissue-Tek Film	Sakura	Ja
Entellan New	Merck	Nein
Eukitt	Merck	Nein

LEISTUNGSMERKMALE

Die Leistung von VENTANA K/L Probe Cocktail wurde im Rahmen von klinischen und analytischen Studien untersucht. Alle Färbungen wurden unter Verwendung des

VENTANA K/L Probe Cocktail-Protokolls, wie in Tabelle 2 beschrieben, auf einem BenchMark IHC/ISH-Gerät durchgeführt, sofern nichts anderes angegeben ist.

KLINISCHE LEISTUNG

Methodenvergleichsstudie der VENTANA Kappa/Lambda Dual ISH mRNA Probe Cocktail Assay-Leistung, bei Verwendung auf dem BenchMark ULTRA-Gerät mit VENTANA Silver ISH BF und Magenta ISH DIG Nachweiskits, im Vergleich zur Durchflusszytometrie bei der Bestimmung des Kappa/Lambda-Restriktionsstatus

Es wurde eine externe multizentrische Studie durchgeführt, um die Übereinstimmung des VENTANA K/L Probe Cocktail-Assays mit der Durchflusszytometrie zur Bestimmung des Leichtkettenrestriktionsstatus in Lymphoid- und Knochenmarksproben zu bewerten. Drei klinische Zentren untersuchten insgesamt 1019 Fälle, die in die Studie aufgenommen werden sollten. In den klinischen Zentren wurden 869 dieser Fälle mit dem VENTANA K/L Probe Cocktail auf einem BenchMark ULTRA-Gerät angefärbt, und 811 der 869 angefärbten Fälle wiesen akzeptable H&E-Werte auf und wurden vom Screening-Pathologen auf K/L-Färbung untersucht. Insgesamt wurden 742 Fälle, die die Aufnahmekriterien erfüllten, in die Studie aufgenommen, und bis zu vier Pathologen aus den Einrichtungen beurteilten jeweils alle aufgenommenen Fälle.

Die Leistung des VENTANA K/L Dual ISH-Assays wurde als prozentuale Übereinstimmung zwischen dem ISH-Assay und den historischen Flussergebnissen für jede Restriktionskategorie (Kappa-restringiert, Lambda-restringiert oder nicht-restringiert) und als prozentuale Gesamtübereinstimmung (OPA) für alle Fälle bewertet.

Tabelle 8. Übereinstimmung des Restriktionsstatus zwischen VENTANA K/L Probe Cocktail und Durchflusszytometrie für alle gepoolten Leser.

VENTANA K/L Dual ISH-Ergebnis	Durchflusszytometrie-Ergebnis			
	Kappa-restringiert	Lambda-restringiert	Nicht-restringiert	Gesamt
Kappa-restringiert	824	16	23	863
Lambda-restringiert	16	742	18	776
Nicht-restringiert	76	37	810	923
Gesamt	916	795	851	2562

Tabelle 9. Gepoolte Übereinstimmung des K/L-Restriktionsstatus zwischen dem VENTANA K/L Dual ISH-Assay und der Durchflusszytometrie (alle auswertbaren Fälle).

Restriktionskategorie	Übereinstimmung % (n/N)	95 %-CI
Kappa-restringiert	90.0 % (824/916)	86.7-93.2 %
Lambda-restringiert	93.3 % (742/795)	90.1-96.2 %
Nicht-restringiert	95.2 % (810/851)	93.3-96.8 %
Gesamt	92.7 % (2376/2562)	91.1-94.2 %

ANALYTISCHE LEISTUNG

Sensitivität und Spezifität

Zur Prüfung der Sensitivität und Spezifität wurde der VENTANA K/L Probe Cocktail zum Anfärben eines Panels von normalem und neoplastischem FFPE-Gewebe verwendet. Die gefärbten Objektträger wurden von einem Pathologen als positiv/negativ für Kappa- und Lambda-Signale bewertet. Bei keinem der angefärbten Fälle wurde eine unerwartete Färbung festgestellt.

Tabelle 10. VENTANA K/L Probe Cocktail-Färbung in normalen Geweben. Die mit einem Sternchen gekennzeichneten Gewebe wiesen vereinzelt normale B-Lymphozytenfärbung auf.

Pathologie	Anzahl positiver/aller Fälle
Gehirn	0/1
Großhirn	0/3
Kleinhirn	0/4
Nebenniere*	0/4

Pathologie	Anzahl positiver/aller Fälle
Eierstock*	0/4
Bauchspeicheldrüse*	0/4
Lymphknoten	15/15
Nebenschilddrüse	0/3
Hirnanhangsdrüse	0/3
Hoden*	0/4
Schilddrüse	0/4
Brust*	0/5
Milz*	0/4
Tonsille	5/5
Skelettmuskel*	0/3
Peripherer Nerv	0/4
Blase	0/4
Thymus*	0/4
Knochenmark	5/5
Lunge*	0/5
Herz	0/4
Speiseröhre*	0/4
Magen*	0/4
Dünndarm*	0/4
Dickdarm*	0/6
Leber*	0/4
Speicheldrüse*	0/4
Niere*	0/5
Prostata*	0/4
Gebärmutterhals	0/6
Haut	0/4
Mesothelial	0/4
Rektum	0/1
Plazenta	0/3
Gebärmutter*	0/4

Tabelle 11. VENTANA K/L Probe Cocktail-Färbung in neoplastischen Geweben.

Pathologie	Anzahl positiver/aller Fälle
Astrozytom (Gehirn)	0/1
Meningeom, (Gehirn)	0/3
Adenokarzinom (Kopf und Hals)	0/1
Melanom (Nasenhöhle)	0/1
Nasopharynxkarzinom, (Nasopharynx)	0/1
Platteneithelkarzinom (Zunge)	0/1
Adenom (Nebenniere)	0/1
Adrenokortikales Karzinom (Nebenniere)	0/1
Kolon-Siegelringzellkarzinom, metastasiert (Ovarien)	0/1
Adenokarzinom (Ovarien)	0/2
Granulosazelltumor (Ovarien)	0/1
Adenokarzinom (Pankreas)	0/1
Seminom (Hoden)	0/1
Adenom (Schilddrüse)	0/3
Follikuläres Karzinom (Schilddrüse)	0/1
Follikuläres, papilläres Adenokarzinom (Schilddrüse)	0/1
Invasives duktales Karzinom (Brust)	0/3
Fibroadenom (Brust)	0/2
Osteosarkom (Knochen)	0/1
Chondrosarkom (Knochen)	0/1
Adenokarzinom (Lunge)	0/1
Kleinzelliges Karzinom (Lunge)	0/1
Platteneithelkarzinom (Lunge)	0/1
Gastrointestinales Karzinom, metastasiert (Lunge)	0/1
Platteneithelkarzinom (Ösophagus)	0/2
Adenokarzinom (Magen)	0/3
Adenom (Dünndarm)	0/1
Adenokarzinom (Dünndarm)	0/1
Adenom (Kolon)	0/1
Adenokarzinom (Kolon)	0/3
Kolon-Adenokarzinom, metastasiert (Leber)	0/1
Hepatozelluläres Karzinom (Leber)	0/4
Pleomorphes Adenom (Ohrspeicheldrüse)	0/1
Adenoid-zystisches Karzinom (Speicheldrüse)	0/1
Klärzellkarzinom (Niere)	0/2
Adenokarzinom (Prostata)	0/2

Pathologie	Anzahl positiver/aller Fälle
Adenokarzinom (Uterus)	0/2
Platteneithelkarzinom (Zervix)	0/2
Platteneithelkarzinom (Haut)	0/1
Anaplastisches großzelliges Lymphom (Lymphknoten)	0/2
T-lymphoblastisches Lymphom	0/1
T-Zell-Lymphom, Mycosis fungoides	0/1
T-Zell-Lymphom, Lennert-Lymphom	0/2
T-Zell-Lymphom, Enteropathie-assoziiert	0/5
T-Zell-Lymphom, angioimmunoblastisch	0/6
T-Zell-Lymphom, NOS	0/20
NK/T-Zell-Lymphom, nasaler Typ	0/5
NK/T-Zell-Lymphom (Hoden)	0/1
Hodgkin-Lymphom	0/1
B-Zell-Lymphom, NOS	1/1
Folikellymphom	7/7
Mantelzelllymphom	4/4
Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom	11/11
Plasmazellmyelomneoplasien	4/4
Randzonen-Lymphom	3/3
Chronische lymphozytäre Leukämie/kleinzelliges lymphozytisches Lymphom	5/5
Urothelkarzinom (Blase)	0/2
Ösophagus-Platteneithelkarzinom, metastasiert (Lymphknoten)	0/1
Adenokarzinom (Rektum)	0/3

Wiederholbarkeit innerhalb eines Laufs, Inter-Tages-Laborpräzision und Inter-Geräte-Laborpräzision

Die Wiederholbarkeit und Präzision des VENTANA K/L Probe Cocktail wurde durch Färbung eines Panels von 26 Fällen auf mehreren BenchMark ULTRA-Geräten bewertet. Das Fallpanel enthielt sowohl normale als auch neoplastische Proben und repräsentierte eine Reihe von Restriktionsstatus und mRNA-Expressionsniveaus. Die randomisierten Objektträger wurden von einem gegenüber der Falldiagnose verblindeten Pathologen auf ihren Restriktionsstatus untersucht.

Um die Wiederholbarkeit innerhalb eines Laufs zu gewährleisten, wurden in 7 unabhängigen Geräteläufen doppelte Schnitte von jeder Probe gefärbt. Die Wiederholpräzision wurde durch OPA für alle Objektträger berechnet, wie sie durch den modalen Restriktionsstatus auf Einzelfallebene bestimmt wurde.

Zur Ermittlung der Inter-Tages-Laborpräzision wurden doppelte Schnitte von jeder Probe auf einem einzigen BenchMark ULTRA-Gerät an 5 nicht aufeinanderfolgenden Tagen gefärbt. Die Laborpräzision wurde durch OPA für alle Objektträger berechnet, wie sie durch den modalen Restriktionsstatus auf Einzelfallebene bestimmt wurde.

Zur Ermittlung der Inter-Geräte-Laborpräzision wurden doppelte Schnitte von jeder Probe auf drei unterschiedlichen BenchMark ULTRA-Geräten gefärbt. Die Laborpräzision wurde durch OPA für alle Objektträger berechnet, wie sie durch den modalen Restriktionsstatus auf Einzelfallebene bestimmt wurde.

Tabelle 12. Ergebnisse für Wiederholpräzisions- und Laborpräzisionstests der BenchMark ULTRA-Plattform.

Studie	n/N	OPA	95 %-CI
Wiederholbarkeit innerhalb eines Laufs	178/178	100 %	97.9-100.0 %
Inter-Tages-Laborpräzision	256/256	100 %	98.5-100.0 %
Inter-Geräte-Laborpräzision	156/156	100 %	97.6-100.0 %

BenchMark Plattform-Konkordanz

Die Plattform-Konkordanz des VENTANA K/L Probe Cocktail-Assays wurde durch Färbung eines Panels von 59 Fällen sowohl auf dem BenchMark ULTRA als auch auf dem ULTRA PLUS Gerät bewertet. Das Fallpanel enthielt sowohl normale als auch neoplastische Proben und repräsentierte eine Reihe von Restriktionsstatus und mRNA-Expressionsniveaus. Die randomisierten Objektträger wurden von einem gegenüber der Falldiagnose verblindeten Pathologen auf ihren Restriktionsstatus untersucht.

Tabelle 13. Ergebnisse für BenchMark ULTRA und ULTRA PLUS Plattform-Konkordanz.

Studie	n/N	OPA	95 %-CI
Plattform-Konkordanz	59/59	100 %	93.9-100.0 %

Ableserpräzision

Die Intra- und Inter-Ableserpräzision des VENTANA K/L Probe Cocktail wurde durch den Vergleich der Restriktionsstatus-Bewertungen von 3 Pathologen für ein Panel von 60 gefärbten Objektträgern bewertet. Das Fallpanel enthielt sowohl normale als auch neoplastische Proben und repräsentierte eine Reihe von Restriktionsstatus und mRNA-Expressionsniveaus. Für die Studie wurden randomisierte Objektträger von 3 gegenüber der Falldiagnose verblindeten Pathologen auf ihren Restriktionsstatus untersucht. Nach einer zweiwöchigen Auswaschphase wurden die angefärbten Objektträger erneut randomisiert und von denselben drei Pathologen erneut auf ihren Restriktionsstatus hin beurteilt.

Um die Intra-Ableserpräzision zu ermitteln, wurden die Bewertungen der ersten Runde mit den Bewertungen der zweiten Runde für jeden einzelnen Pathologen verglichen. Intra-Ableserpräzision wurde durch OPA für die gepoolten Konkordanzdaten aller 3 Pathologen berechnet.

Um die Inter-Ableserpräzision zu ermitteln, wurden die Bewertungen der einzelnen Pathologen mit den Bewertungen der beiden anderen Leser verglichen. Die Inter-Ableserpräzision wurde durch OPA für alle Objektträger für alle 3 Pathologen berechnet, wie durch den modalen Restriktionsstatus auf Fallebene bestimmt.

Tabelle 14. Ergebnisse der Ableserpräzisionstests.

Studie	n/N	OPA %	95 %-CI
Intra-Ableserpräzision	180/180	100 %	97.9-100.0 %
Inter-Ableserpräzision	352/360	97.8 %	94.4-100.0 %

Inter-Chargen-Präzision

Die Inter-Chargen-Präzision des VENTANA K/L Probe Cocktail wurde durch Färbung eines Panels von 26 Fällen mit 3 Produktionschargen des Sondencocktails bewertet. Das Fallpanel enthielt sowohl normale als auch neoplastische Proben und repräsentierte eine Reihe von Restriktionsstatus und mRNA-Expressionsniveaus. Die randomisierten Objektträger wurden von einem gegenüber der Falldiagnose verblindeten Pathologen auf ihren Restriktionsstatus untersucht.

Die Inter-Chargen-Präzision wurde durch OPA für alle Objektträger berechnet, wie sie durch den modalen Restriktionsstatus auf Einzelfallebene bestimmt wurde.

Tabelle 15. Ergebnisse der Inter-Chargen-Präzisionstests.

Studie	n/N	OPA %	95 %-CI
Inter-Chargen-Präzision	78/78	100 %	95.3-100.0 %

Inter-Labor-Reproduzierbarkeit

Eine Studie zur Inter-Labor-Reproduzierbarkeit wurde durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit des VENTANA K/L Probe Cocktail-Assays zur Bestimmung des Restriktionsstatus zu bewerten. Für diese Studie färbten 3 externe Labors jeweils ein Panel von 28 Fällen an 5 nicht aufeinanderfolgenden Tagen über einen Zeitraum von 21 Tagen mit einem BenchMark ULTRA. Das Fallpanel enthielt sowohl normale als auch neoplastische Proben (8 Kappa-restringierte, 8 Lambda-restringierte und 12 nicht-restringierte Fälle) und repräsentierte eine Reihe von Restriktionsstatus und mRNA-Expressionsniveaus.

Die randomisierten Objektträger wurden von 2 gegenüber der Falldiagnose verblindeten Pathologen pro Einrichtung (insgesamt 6) unabhängig voneinander auf ihren Restriktionsstatus hin untersucht. Mit VENTANA K/L Probe Cocktail gefärbte Objektträger wurden zur Auswertung zusammen mit fallgleichen H&E- und ISH Negative Control gefärbten Objektträgern vorgelegt.

Die Reproduzierbarkeit wurde als prozentuale Übereinstimmung zwischen den einzelnen Restriktionsbewertungen für jeden Fall und dem modalen Restriktionsstatus für diesen Fall für jede Restriktionskategorie (Kappa-restringiert, Lambda-restringiert oder nicht-restringiert) und als prozentuale Gesamtübereinstimmung für alle Fälle (Tabelle 16) bewertet.

Zusätzlich wurde die durchschnittliche paarweise Übereinstimmungsrate für jeden Restriktionsstatus zwischen Einrichtungen, zwischen Lesern und zwischen Tagen angegeben (Tabelle 17).

Tabelle 16. Ergebnisse für die Übereinstimmung zwischen Einzelbewertungen und modalem Fallrestriktionsstatus (KRPA = kappa restricted percent agreement, LRPA = lambda restricted percent agreement, NRPA = non-restricted percent agreement)

Restriktionskategorie	Übereinstimmung % (n/N)	95 %-CI
KRPA	98.8 % (237/240)	97.5-99.6 %
LRPA	99.6 % (239/240)	98.8-100.0 %
NRPA	97.5 % (351/360)	96.1-99.0 %
OPA	98.5 % (827/840)	97.7-99.2 %

Tabelle 17. Ergebnisse für allgemeine paarweise Übereinstimmungen zwischen Einrichtungen, zwischen Ablesern und zwischen Tagen für den Restriktionsstatus.

Paarweiser Faktor	Restriktionskategorie	Übereinstimmung	95 %-CI
Inter-Einrichtung	Kappa-restringiert	95.6 %	89.3-98.1 %
	Lambda-restringiert	98.8 %	96.2-100.0 %
	Nicht-restringiert	96.6 %	94.2-98.4 %
	OPA	96.9 %	95.2-98.6 %
Inter-Ableser	Kappa-restringiert	95.5 %	89.2-98.1 %
	Lambda-restringiert	98.8 %	96.2-100.0 %
	Nicht-restringiert	96.6 %	94.2-98.4 %
	OPA	96.9 %	95.1-98.6 %
Inter-Tage	Kappa-restringiert	95.5 %	89.2-98.1 %
	Lambda-restringiert	98.8 %	96.2-100.0 %
	Nicht-restringiert	96.6 %	94.2-98.4 %
	OPA	96.9 %	95.1-98.6 %

FEHLERBEHEBUNG

Tabelle 18. Lösungen zur Fehlerbehebung.

Problem	Lösung
Fehlender/schwacher oder ungeeigneter Hintergrund im präqualifizierten Tonsillen-Kontrollgewebe auf dem Objektträger	<ol style="list-style-type: none"> 1. Prüfen, dass der Objektträger mit dem korrekten Barcode-Etikett gekennzeichnet ist und dass die richtige Sonde im Protokoll ausgewählt wurde. Wenn das Protokoll eine „kurze Vorbehandlung“ vorsieht, stellen Sie sicher, dass die Tonsille mit einem Protokoll qualifiziert wurde, das dieselbe Bedingung erfüllt. 2. Stellen Sie sicher, dass der Schnitt auf 4 µm geschnitten und ein kompatibles Eindeckmedium verwendet wurde. 3. Stellen Sie sicher, dass die Reagenzienspender nicht blockiert oder leer sind. Testen Sie, ob der Spender funktioniert, indem Sie ihn auf einen Abfallbehälter richten und fest auf die Oberseite des Zylinders drücken, um sicherzustellen, dass ein einzelner Tropfen abgegeben wird. Wenn der Spender blockiert ist oder nicht richtig dosiert, wenden Sie sich an den zuständigen Kundendienst und verwenden Sie den Spender nicht. 4. Wenn die Kontrollen auf anderen VENTANA K/L Probe Cocktail-gefärbten Objektträgern, die zur gleichen Zeit gefärbt wurden, ordnungsgemäß durchgeführt wurden, liegt möglicherweise ein unbekannter Objektträger-spezifischer Fehler vor. Bereiten Sie einen neuen Objektträger vor und färben Sie ihn neu. 5. Wenden Sie sich an den zuständigen Kundendienst, wenn andere VENTANA K/L Probe Cocktail-gefärbte Objektträger, die zur gleichen Zeit getestet wurden, ebenfalls eine unzureichende Färbung aufweisen und keine offensichtliche Fehlerquelle ermittelt werden kann (z. B. haben sich die Färbeeigenschaften des qualifizierten Tonsillengeweblocks beim Durchschneiden des Gewebelocks verändert).
Fehlende/schwache Färbung in der Patientenprobe mit entsprechender Färbung in der vorqualifizierten Tonsillenkontrolle auf dem Objektträger	<ol style="list-style-type: none"> 1. Stellen Sie sicher, dass der Schnitt bei 4 µm geschnitten wurde und dass bei der Bearbeitung der Probe kompatible Fixierungs- und/oder Entkalkungsmethoden verwendet wurden. Ungeeignete Entkalkungsprozesse können die Ziel-RNA zerstören. 2. Wenn der Objektträger mit einem Protokoll mit der Auswahl „Kurze Vorbehandlung“ gefärbt wurde, kann eine erneute Färbung mit normaler Vorbehandlung ein dunkleres Signal ergeben. 3. Färben Sie einen Objektträger aus der Patientenprobe mit der VENTANA U6 BF Sonde, um die mRNA-Integrität zu ermitteln. Wird ein Verlust von mRNA festgestellt, kann eine neue Patientenprobe erforderlich sein. 4. Wenn die mRNA-Integrität nicht beeinträchtigt zu sein scheint, kann die mRNA-Expression von Kappa und/oder Lambda fehlen oder unterhalb der Nachweisgrenze des Assays liegen.

Problem	Lösung
Ungeeigneter Hintergrund in der Patientenprobe mit entsprechender Färbung in der vorqualifizierten Tonsillenkontrolle auf dem Objektträger	<ol style="list-style-type: none"> 1. Stellen Sie sicher, dass der Schnitt bei 4 µm geschnitten wurde und dass bei der Bearbeitung der Probe kompatible Fixierungs- und/oder Entkalkungsmethoden verwendet wurden. 2. Wenn der Objektträger nach dem empfohlenen Protokoll gefärbt wurde, kann eine erneute Färbung mit der Option „Kurze Vorbehandlung“ das Hintergrundsignal verringern. 3. Färben Sie einen Objektträger aus der Patientenprobe mit der ISH Negative Control, um den mit dem Nachweiskit verbundenen Hintergrund zu ermitteln. Ziehen Sie den Detektionshintergrund von dem mit VENTANA K/L Probe Cocktail gefärbten Objektträger ab, um den Restriktionsstatus zu interpretieren. 4. Wenn der Hintergrund die Bestimmung des Restriktionsstatus weiterhin beeinträchtigt, kann eine neue Probe erforderlich sein.
Das IGLL5-Signal stört die Kappa/Lambda-Signalauswertung	<ol style="list-style-type: none"> 1. Wenn der Objektträger nach dem empfohlenen Protokoll gefärbt wurde, kann eine erneute Färbung mit der Option „Kurze Vorbehandlung“ das IGLL5-Signal verringern. 2. Wenn das IGLL5-Signal immer noch die Interpretation des Kappa/Lambda-Signals beeinträchtigt, kann zur Beurteilung des Restriktionsstatus ein Reflextest mit einem proteinbasierten Assay erforderlich sein.
Gewebeschnitte lösen sich vom Objektträger ab.	Stellen Sie sicher, dass Superfrost™ Plus Objektträger verwendet werden.

LITERATURANGABEN

1. Carson FL, Cappellano C. Histotechnology; A Self-Instructional Text, 5th edition. American Society for Clinical Pathology Press; 2020, 2022.
2. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
3. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 24 June 2020 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
4. College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2007.
5. CLSI (formerly NCCLS). Quality Assurance for Design Control and Implementation of Immunocytochemistry Assays: Approved Guideline-Second Edition. CLSI document I/LA28-A2 (ISBN 1-56238-745-6). CLSI, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087-1898 USA, 2011.

HINWEIS: In diesem Dokument wird statt einem Komma ein Punkt als Dezimaltrennzeichen verwendet, um die Vorkomma- von den Nachkommastellen zu trennen. Es werden keine Tausendertrennzeichen verwendet.

Eine Zusammenfassung der Sicherheit und Leistung ist verfügbar auf:
<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>

Symbole

Ventana verwendet die folgenden Symbole und Zeichen zusätzlich zu den Symbolen und Zeichen gemäß Norm ISO 15223-1 (für die USA: elabdoc.roche.com/symbols für weitere Informationen):



Globale Artikelidentnummer



Eindeutige Geräteerkennung



Verweist auf den Importeur des medizinischen Produkts in die Europäische Union

GEISTIGES EIGENTUM

VENTANA, BENCHMARK, HYBREADY, ULTRAVIEW und das VENTANA Logo sind Marken von Roche. Alle sonstigen Produktnamen und Marken sind Eigentum der jeweiligen Inhaber.

© 2024 Ventana Medical Systems, Inc.

KONTAKTDATEN



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

www.roche.com



0123