

ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit

REF 760-501
05269814001

IVD Σ 250

USO PREVISTO

ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit (kit di rilevazione ultraView AP Red detection kit) è un sistema indiretto privo di biotina per la rilevazione di IgG di topo, IgM di topo e anticorpi primari di coniglio tramite microscopio ottico. Il kit è destinato all'uso di laboratorio per l'identificazione dei target tramite immunistochemica (IHC) in sezioni di tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina colorate su strumenti BenchMark IHC/ISH.

I risultati ottenuti tramite questo prodotto devono essere interpretati da un patologo qualificato in un quadro che consideri anche gli esami istologici, i dati clinici pertinenti e i controlli adeguati.

Questo prodotto è indicato per uso diagnostico in vitro (IVD).

RIEPILOGO E SPIEGAZIONE

L'immunistochemica è una tecnica utilizzata nei laboratori per scopi diagnostici. L'IHC utilizza anticorpi primari specifici, che localizzano e si legano agli antigeni in sezioni di tessuto fissate o congelate. Il legame dell'anticorpo all'antigene viene visualizzato con un metodo di rilevazione indiretta. Le tecniche più comuni per i metodi indiretti prevedono l'uso di un anticorpo secondario diretto contro la specie dell'anticorpo primario e di un enzima con un corrispondente sistema substrato-cromogeno. Questa combinazione dà come risultato un precipitato colorato presso il sito di legame dell'anticorpo specifico. ultraView AP Red detection kit utilizza un metodo indiretto per visualizzare anticorpi specifici legati agli antigeni mediante deposizione di un precipitato di colore rosso.

PRINCIPIO DELLA PROCEDURA

ultraView AP Red detection kit rileva anticorpi specifici di topo e di coniglio legati a un antigene in sezioni di tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE). L'anticorpo specifico viene localizzato con un cocktail di anticorpi secondari marcati con un enzima che sono in grado di localizzare l'anticorpo primario legato. Il complesso viene quindi visualizzato con il substrato Naphthol e il cromogeno Fast Red, che produce un precipitato rosso facilmente osservabile al microscopio ottico.

Il protocollo di colorazione è articolato in varie fasi nelle quali i reagenti vengono incubati per periodi di tempo pre-determinati a temperature specifiche. Al termine di ogni fase di incubazione, lo strumento BenchMark IHC/ISH lava le sezioni per rimuovere il materiale non legato e applica un coverslip (LCS) liquido che minimizza l'evaporazione dei reagenti acquosi dal vetrino. I risultati vengono interpretati utilizzando un microscopio ottico e possono fungere da supporto nella diagnosi differenziale di processi fisiopatologici, che possono essere associati a un particolare antigene o meno.

Per informazioni più dettagliate sul funzionamento dello strumento, fare riferimento all'opportuna guida per l'utilizzatore.

La Figura 1 illustra il metodo di rilevazione indiretta.

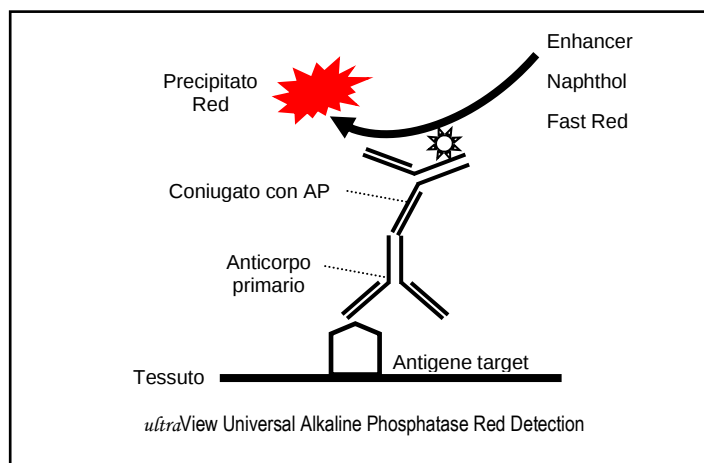


Figura 1. Reazione con ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection.

MATERIALI E METODI

Materiali forniti

ultraView AP Red detection kit contiene una quantità di reagente sufficiente per 250 test.

Un erogatore da 25 mL	ultraView Universal AP Red Enhancer contiene circa il 3% (v/v) di MgCl ₂ in tampone Tris con lo 0.05% di soluzione ProClin 300, un conservante.
Un erogatore da 25 mL	ultraView Universal AP Red Multimer contiene un cocktail di anticorpi marcati con fosfatasi alcalina (FA) (circa 50 µg/mL) in un tampone con lo 0.05% di soluzione ProClin 300, un conservante.
Un erogatore da 25 mL	ultraView Universal AP Red Naphthol contiene circa l'1.0% (p/v) di Naphthol in tampone Tris con lo 0.10% di soluzione ProClin 300, un conservante.
Un erogatore da 25 mL	ultraView Universal AP Red Fast Red A contiene circa l'1.0% (p/v) di Fast Red in tampone acetato con lo 0.05% di soluzione ProClin 300, un conservante.
Un erogatore da 25 mL	ultraView Universal AP Red Fast Red B contiene circa l'1.0% (p/v) di Fast Red in tampone acetato con lo 0.05% di soluzione ProClin 300, un conservante.

Ricostituzione, miscelazione, diluizione, titolazione

ultraView AP Red detection kit è ottimizzato per l'uso su strumenti BenchMark IHC/ISH. Non sono necessarie ricostituzione, miscelazione, diluizione o titolazione dei reagenti del kit.

Materiali necessari ma non forniti

I reagenti di colorazione, quali i componenti ausiliari e per la rilevazione VENTANA, compresi i vetrini dei tessuti di controllo positivi e negativi, non sono forniti.

È possibile che non tutti i prodotti elencati nella scheda metodologica siano disponibili in tutte le aree geografiche. Rivolgersi al rappresentante dell'assistenza locale.

I reagenti e materiali seguenti possono essere necessari per la colorazione ma non sono forniti con il kit di rilevazione:

1. Anticorpo primario
2. Reagente di controllo negativo
3. Tessuti di controllo positivo e negativo (consultare le schede metodologiche degli anticorpi per conoscere i tipi consigliati)
4. Amplification Kit (n. di cat. 760-080 / 05266114001)
5. OptiView DAB IHC Detection Kit (n. di cat. 760-700 / 06396500001)
6. OptiView Amplificati on Kit (n. di cat. 760-099 / 06396518001 (50 test) o 860-099 / 06718663001 (250 test))
7. ultraView Universal DAB Detection Kit (n. di cat. 760-500 / 05269806001)
8. Protease 1 (n. di cat. 760-2018 / 05266688001)

9. Protease 2 (n. di cat. 760-2019 / 05266696001)
10. Protease 3 (n. di cat. 760-2020 / 05266718001)
11. Hematoxylin (n. di cat. 760-2021 / 05266726001)
12. Hematoxylin II (n. di cat. 790-2208 / 05277965001)
13. Bluing Reagent (n. di cat. 760-2037 / 05266769001)
14. Reaction Buffer Concentrate (10X) (n. di cat. 950-300 / 05353955001)
15. Cell Conditioning Solution (CC1) (n. di cat. 950-124 / 05279801001)
16. Cell Conditioning Solution (CC2) (n. di cat. 950-123 / 05279798001)
17. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (n. di cat. 950-224 / 05424569001)
18. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC2) (n. di cat. 950-223 / 05424542001)
19. Antibody Diluent (n. di cat. 251-018 / 05261899001)
20. EZ Prep Concentrate (10X) (n. di cat. 950-102 / 05279771001)
21. LCS (Predilute) (n. di cat. 650-010 / 05264839001)
22. ULTRA LCS (Predilute) (n. di cat. 650-210 / 05424534001)
23. Strumento BenchMark IHC/ISH
24. Vetrini per microscopia, caricati positivamente
25. Coverslip (LCS) e metodo di coverslip sufficiente per coprire il tessuto
26. Attrezzatura di laboratorio per uso generico

Conservazione e stabilità

Alla ricezione e quando non è in uso, il prodotto va conservato a 2-8 °C. Non congelare. L'utilizzatore deve convalidare qualsiasi condizione di conservazione diversa da quelle specificate nella scheda metodologica. Questo kit di rilevazione può essere utilizzato subito dopo la rimozione dal frigorifero.

Per garantire la corretta erogazione di reagente e la stabilità di ogni reagente, dopo ogni utilizzo riposizionare il tappo dell'erogatore e riporre immediatamente l'erogatore in frigorifero in posizione verticale.

Su ogni kit di rilevazione è riportata la scadenza. Se conservato adeguatamente, il prodotto resta stabile fino alla data indicata sull'etichetta. Non utilizzare il prodotto oltre la data di scadenza per il metodo di conservazione indicato. Non esistono segni che indichino con certezza l'instabilità di questo prodotto; pertanto, i controlli positivi e negativi devono essere eseguiti contemporaneamente ai campioni sconosciuti. Contattare immediatamente il rappresentante dell'assistenza locale in caso di indicazioni di instabilità del reagente.

Prelievo dei campioni e preparazione per l'analisi

I tessuti FFPE sono adatti per l'uso con *ultraView AP Red detection kit* e uno strumento BenchMark IHC/ISH (vedere la sezione Materiali necessari ma non forniti). Il fissativo per i tessuti consigliato è formalina neutra tamponata al 10% (NBF).² Si possono ottenere risultati variabili dovuti allo spessore della sezione di tessuto, al tipo di fissazione, a una fissazione prolungata o incompleta o a processi particolari come la decalcificazione di preparazioni di midollo osseo.

Ogni sezione deve essere tagliata allo spessore appropriato per l'anticorpo primario utilizzato e collocata su un vetrino di vetro per microscopio caricato positivamente. I vetrini contenenti la sezione di tessuto devono essere lasciati ad asciugare in posizione verticale per almeno 15 minuti a temperatura ambiente, in modo tale da rimuovere l'acqua in eccesso sotto la sezione di tessuto prima della cottura. I vetrini possono essere cotti/riscaldati per almeno 1 ora in un forno, a una temperatura di 60 °C ± 5 °C, oppure possono essere lasciati ad asciugare all'aria a 37 °C per un massimo di 24 ore. L'asciugatura e il riscaldamento dei vetrini sono impiegati per asciugare il tessuto dopo il montaggio sul vetrino e per migliorare l'adesione del tessuto al vetro. Consultare la scheda metodologica dell'anticorpo primario per individuare le limitazioni relative al riscaldamento. Il riscaldamento prolungato del tessuto può determinare una riduzione della disponibilità dell'antigene.

I tessuti fissati e inclusi correttamente che esprimono l'antigene rimangono stabili se conservati in un luogo fresco (15-25 °C). I requisiti del Clinical Laboratory Improvement Act (CLIA) del 1988, 42CFR493.1259 (b) prevedono che "il laboratorio deve conservare i vetrini per almeno dieci anni dalla data dell'esame e i blocchi di campioni per almeno due anni dalla data dell'esame". Ogni laboratorio deve convalidare la stabilità delle sezioni montate su vetrino in base alle proprie procedure e condizioni ambientali di conservazione.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

1. Per uso diagnostico in vitro (IVD).
2. Solo per uso professionale.
3. Non usare oltre il numero di test specificato.
4. La soluzione ProClin 300 è utilizzata come conservante in questa soluzione. È classificata come irritante e può causare sensibilizzazione tramite contatto cutaneo. Adottare precauzioni ragionevoli durante la manipolazione. Evitare il contatto dei reagenti con occhi, cute e membrane mucose. Indossare guanti e indumenti di protezione adeguati.
5. I materiali di origine umana o animale devono essere maneggiati come materiali a potenziale rischio biologico e smaltiti adottando precauzioni appropriate. In caso di esposizione, attenersi alle direttive sanitarie delle autorità responsabili.^{3,4}
6. Adottare precauzioni ragionevoli durante la manipolazione dei reagenti. Evitare il contatto dei reagenti con occhi, cute e membrane mucose. Utilizzare guanti monouso e indossare indumenti protettivi adeguati durante la manipolazione di possibili cancerogeni o materiali tossici.
7. Se i reagenti entrano in contatto con aree sensibili, lavare con acqua abbondante. Evitare l'inalazione dei reagenti.
8. Assicurarsi che il contenitore dei rifiuti sia vuoto prima di avviare una corsa di colorazione sullo strumento. Se non si prende questa precauzione, il contenitore dei rifiuti potrebbe traboccare e l'utilizzatore rischia di scivolare e cadere.
9. Evitare la contaminazione microbica dei reagenti poiché può causare risultati non corretti.
10. Per ulteriori informazioni sull'uso di questo dispositivo, fare riferimento alla guida per l'utilizzatore dello strumento BenchMark IHC/ISH e alle schede metodologiche di tutti i componenti necessari.
11. Consultare le autorità locali e/o statali per determinare il metodo di smaltimento consigliato.
12. Le etichette di sicurezza dei prodotti seguono principalmente le linee guida GHS dell'UE. La scheda dati di sicurezza è disponibile su richiesta per gli utilizzatori professionali.
13. Per segnalare sospetti incidenti gravi correlati a questo dispositivo, contattare il rappresentante locale Roche e l'autorità competente dello Stato membro o del paese in cui risiede l'utilizzatore.

Questo kit di rilevazione contiene componenti classificati come segue in conformità con il regolamento (CE) n. 1272/2008:

Tabella 1. Informazioni sui pericoli.

Pericolo	Codice	Indicazione
	H317	Può provocare una reazione allergica cutanea.
	P261	Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol.
	P272	Gli indumenti da lavoro contaminati non devono essere portati fuori dal luogo di lavoro.
	P280	Indossare guanti.
	P333 + P313	In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.
	P362 + P364	Togliersi di dosso gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.
	P501	Smaltire il prodotto/recipiente in un impianto autorizzato per lo smaltimento dei rifiuti.

Questo prodotto contiene il numero CAS 55965-84-9, massa di reazione di: 5-cloro-2-metil-2H-isotiazol-3-one e 2-metil-2H-isotiazol-3-one in rapporto 3:1.

PROCEDURA

ultraView AP Red detection kit è stato sviluppato per l'uso su strumenti BenchMark IHC/ISH in combinazione con anticorpi primari e componenti ausiliari VENTANA. È possibile visualizzare, stampare e modificare i parametri delle procedure automatizzate conformemente alla procedura descritta nella guida per l'utilizzatore dello strumento. Altri parametri operativi per lo strumento sono stati preimpostati in fabbrica.

Le procedure per la colorazione su strumenti BenchMark IHC/ISH sono le seguenti. Per istruzioni più dettagliate e ulteriori opzioni di protocollo, fare riferimento alla guida per l'utente. L'eventuale utilizzo di Cell Conditioning per un campione dipende dall'anticorpo. Controllare la scheda metodologica dell'anticorpo per indicazioni in proposito.

Strumenti BenchMark IHC/ISH

1. Applicare l'etichetta del vetrino con codice a barre corrispondente al protocollo da eseguire.
2. Caricare l'anticorpo primario, gli appositi erogatori del kit di rilevazione e il reagente accessorio richiesto sul vassoio reagenti e posizionarli sullo strumento.
3. Controllare i liquidi consumabili e svuotare il contenitore dei rifiuti.
4. Caricare i vetrini nello strumento.
5. Avviare la corsa di colorazione.
6. Al termine della corsa di colorazione, rimuovere i vetrini dallo strumento.
7. Passare alla sezione Procedure consigliate di processazione dopo l'utilizzo dello strumento.

Funzionalità di dual colorazione

La configurazione di doppia colorazione consiste in una colorazione sequenziale, con colorazione del primo anticorpo primario e rilevazione mediante DAB utilizzando *ultraView* Universal DAB Detection Kit (kit di rilevazione *ultraView* DAB) o OptiView DAB IHC Detection Kit (kit di rilevazione OptiView DAB), seguita dalla rilevazione del secondo anticorpo primario utilizzando *ultraView* AP Red detection kit. Nella configurazione di doppia colorazione, il kit di rilevazione *ultraView* DAB e il kit di rilevazione OptiView DAB sono stati ottimizzati per tempi di incubazione specifici utilizzando CONFIRM anti-CD20 (L26) Primary Antibody (anticorpo CONFIRM anti-CD20 (L26)). *ultraView* AP Red detection kit è stato ottimizzato per tempi di incubazione specifici utilizzando CONFIRM anti-CD3 (2GV6) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (anticorpo CONFIRM anti-CD3 (2GV6)). L'utilizzatore deve convalidare i risultati ottenuti con questo reagente. Fare riferimento alle tabelle seguenti per i protocolli di doppia colorazione consigliati.

Tabella 2. Protocollo di colorazione consigliato per il kit di rilevazione *ultraView* DAB (utilizzando l'anticorpo CONFIRM anti-CD20 (L26)) e *ultraView* AP Red detection kit (utilizzando l'anticorpo CONFIRM anti-CD3 (2GV6)) su uno strumento BenchMark IHC/ISH.

Tipo di procedura	Metodo		
	GX	XT	ULTRA o ULTRA PLUS*
Sparaffinatura	Selezionata	Selezionata	Selezionata
Cell Conditioning (smascheramento dell'antigene)	CC1 lieve	CC1 lieve	ULTRA CC1 36 minuti, 95°C
Anticorpo (DAB)	6 minuti, 37°C	16 minuti, 37°C	16 minuti, 36°C
Anticorpo DS (Red)	20 minuti, 37°C	20 minuti, 37°C	20 minuti, 36°C
Controcolorazione	Hematoxylin II, 4 minuti		
Post-controcolorazione	Bluing, 4 minuti		

* La concordanza tra strumenti BenchMark ULTRA e BenchMark ULTRA PLUS è stata dimostrata utilizzando analisi rappresentative.

Tabella 3. Protocollo di colorazione consigliato per il kit di rilevazione OptiView DAB (utilizzando l'anticorpo CONFIRM anti-CD20 (L26)) e *ultraView* AP Red detection kit (utilizzando l'anticorpo CONFIRM anti-CD3 (2GV6)) su uno strumento BenchMark IHC/ISH.

Tipo di procedura	Metodo		
	GX	XT	ULTRA o ULTRA PLUS*
Sparaffinatura	Selezionata	Selezionata	standard
Cell Conditioning (smascheramento dell'antigene)	CC1, 32 minuti	CC1, 32 minuti	ULTRA CC1, 32 minuti, 100°C
Inibitore della perossidasi pre-primario	Selezionata	Selezionata	Selezionata
Anticorpo (DAB)	6 minuti, 37°C	8 minuti, 37°C	16 minuti, 36°C
OptiView HQ Linker	8 minuti (predefinito)	8 minuti (predefinito)	8 minuti (predefinito)
OptiView HRP Multimer	8 minuti (predefinito)	8 minuti (predefinito)	8 minuti (predefinito)
Anticorpo DS (Red)	20 minuti, 37°C	20 minuti, 37°C	20 minuti, 36°C
Controcolorazione	Hematoxylin II, 4 minuti		
Post-controcolorazione	Bluing, 4 minuti		

* La concordanza tra strumenti BenchMark ULTRA e BenchMark ULTRA PLUS è stata dimostrata utilizzando analisi rappresentative.

A causa della variabilità nella fissazione e processazione dei tessuti, così come della variabilità delle condizioni ambientali e degli strumenti di laboratorio, può essere necessario aumentare o diminuire il tempo di incubazione dell'anticorpo primario o lo smascheramento dell'antigene in base ai singoli campioni, alla rilevazione utilizzata e alla preferenza del patologo. Per ulteriori informazioni sulle variabili di fissazione, fare riferimento a "Immunohistochemistry Principles and Advances".⁵

Procedure consigliate di processazione dopo l'utilizzo dello strumento

Nota: Il cromogeno Fast Red è solubile in alcol e acetone. Non ricorrere a bagni in alcol o acetone né a lavaggi prolungati con xilene per la disidratazione e la chiarificazione dei vetrini.

1. Per rimuovere la soluzione Liquid Coverslip, lavare i vetrini in 2 soluzioni sequenziali di un detergente per piatti delicato (non utilizzare detergenti progettati per lavastoviglie automatiche).
2. Risciacquare bene i vetrini con acqua deionizzata per circa 1 minuto. Agitare per rimuovere l'acqua in eccesso.
3. Asciugare i vetrini in un forno (si raccomanda per un minimo di 15-30 minuti a 45-60 °C) o lasciarli asciugare all'aria a temperatura ambiente. La temperatura e il tempo di asciugatura variano a seconda delle condizioni ambientali. Assicurarsi che i vetrini siano completamente asciutti prima di applicare il coverslip (LCS).
4. Trasferire i vetrini in un bagno di xilene per un lavaggio rapido di circa 30 secondi.
5. Applicare il coverslip (LCS) sul vetrino. Per risultati ottimali, utilizzare un montante compatibile con i substrati con fosfatasi alcalina.

Procedure di controllo qualità

Tessuto di controllo positivo

Acquisire un tessuto di controllo positivo per ogni procedura di colorazione eseguita. La pratica di laboratorio ottimale prevede l'inclusione di una sezione di tessuto di controllo positivo sullo stesso vetrino del tessuto del paziente. Questa pratica aiuta nell'identificazione di una mancata applicazione dell'anticorpo primario o di un altro

reagente critico al vetrino di test del paziente. Un tessuto con una colorazione positiva debole è più adatto per un controllo qualità ottimale. I componenti del tessuto a colorazione positiva vengono utilizzati per confermare l'applicazione dell'anticorpo e il funzionamento corretto dello strumento. Questo tessuto può contenere cellule o componenti del tessuto con colorazione positiva e negativa e serve come controllo sia positivo che negativo. I tessuti di controllo devono provenire da un'autopsia recente, da una biopsia o da campioni chirurgici preparati o fissati il prima possibile, in modo identico alle sezioni da testare. Tali tessuti possono consentire di controllare tutte le fasi della procedura, dalla preparazione del tessuto fino alla colorazione. L'uso di una sezione di tessuto fissata o processata diversamente rispetto al campione sottoposto a test servirà come controllo per tutti i reagenti e le fasi del metodo, tranne che per la fissazione e la processazione del tessuto.

I tessuti di controllo positivi noti devono essere utilizzati solo per il monitoraggio delle prestazioni corrette di tessuti trattati e reagenti di test, non come ausilio nella determinazione della diagnosi specifica dei campioni del paziente. Se i tessuti di controllo positivi non si colorano positivamente, i risultati ottenuti con i campioni del test devono essere considerati non validi.

Tessuto di controllo negativo

Lo stesso tessuto utilizzato per il tessuto di controllo positivo può essere utilizzato come tessuto di controllo negativo. Anche se la varietà di tipi cellulari presente nella maggior parte delle sezioni di tessuto offre siti di controllo negativo interni, è necessario che ciò sia verificato dall'utilizzatore. I componenti che non mostrano colorazione devono dimostrare l'assenza di colorazione specifica e fornire un'indicazione di colorazione di fondo (ossia chiazzeria o arrossamento). Se i siti del tessuto di controllo negativo mostrano una colorazione specifica, i risultati ottenuti con i campioni del paziente devono essere considerati non validi.

Discrepanze inspiegabili

Eventuali discrepanze inspiegabili nei controlli devono essere immediatamente riferite al rappresentante dell'assistenza locale. Se i risultati del controllo qualità non soddisfano le specifiche, i risultati dei pazienti non sono validi. Vedere la sezione Risoluzione dei problemi di questa scheda metodologica. Identificare e correggere il problema e ripetere quindi l'analisi dei campioni del paziente.

Controllo negativo del reagente

Acquisire un controllo negativo del reagente per ogni campione come ausilio all'interpretazione dei risultati. Per valutare la colorazione non specifica (ossia chiazzeria o arrossamento), al posto dell'anticorpo primario si utilizza un controllo negativo del reagente. Il vetrino deve essere colorato con l'opportuno controllo negativo del reagente. È possibile utilizzare il solo diluente in alternativa ai controlli negativi del reagente descritti in precedenza. Il periodo di incubazione del controllo negativo del reagente deve essere uguale al periodo di incubazione dell'anticorpo primario.

Quando si utilizzano pannelli di diversi anticorpi su sezioni in serie, un controllo negativo del reagente su un vetrino può servire come controllo di fondo negativo o del legame non specifico per gli altri anticorpi.

Verifica dell'analisi

Prima dell'uso iniziale di un anticorpo primario o di un sistema di colorazione in una procedura diagnostica, è necessario verificare la specificità dell'anticorpo primario testandolo su una serie di tessuti con caratteristiche prestazionali immunoistochimiche note che rappresentano tessuti positivi e negativi noti (fare riferimento alla sezione Tessuto di controllo positivo della scheda metodologica dell'anticorpo primario e alle indicazioni per il controllo qualità del College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist,⁶ o del CLSI Approved Guideline⁷ oppure di entrambi i documenti). Ripetere queste procedure di controllo qualità per ciascun nuovo lotto di anticorpo od ogni volta che si modificano i parametri dell'analisi. I tessuti elencati nella sezione Caratteristiche prestazionali dell'anticorpo primario sono adatti per la verifica dell'analisi.

Interpretazione dei risultati

ultraView AP Red detection kit provoca la precipitazione di un prodotto di reazione di colore rosso in corrispondenza dei siti dell'antigene individuati dall'anticorpo primario. Un patologo qualificato con esperienza nelle procedure immunoistochimiche dovrà valutare i controlli e qualificare il prodotto colorato prima di interpretare i risultati. La colorazione dei controlli negativi deve essere controllata per prima e questi risultati devono essere confrontati con il materiale colorato per verificare che il segnale generato non sia il risultato di interazioni non specifiche.

Tessuto di controllo positivo

Il tessuto di controllo positivo colorato deve essere esaminato per primo, per verificare che tutti i reagenti funzionino correttamente. La presenza di un prodotto di reazione colorato in maniera appropriata nelle cellule target è indicativa di una reattività positiva. A seconda della durata del periodo di incubazione e della potenza dell'ematossilina utilizzata, la controcolorazione determina una colorazione dei nuclei cellulari da blu pallido a blu scuro. Una controcolorazione eccessiva o incompleta può compromettere la corretta interpretazione dei risultati.

Se i tessuti di controllo positivi non si colorano positivamente, tutti i risultati ottenuti con i campioni del test devono essere considerati non validi.

Tessuto di controllo negativo

Il tessuto di controllo negativo deve essere esaminato dopo il tessuto di controllo positivo per verificare la marcatura specifica dell'antigene target da parte dell'anticorpo primario. L'assenza di colorazione specifica nel tessuto di controllo negativo conferma l'assenza di cross-reattività dell'anticorpo alle cellule o ai componenti cellulari. Se il tessuto di controllo negativo mostra una colorazione specifica, i risultati ottenuti con il campione del paziente devono essere considerati non validi.

Una colorazione non specifica, se presente, avrà un aspetto diffuso. È possibile osservare anche una lieve colorazione sporadica del tessuto connettivo in sezioni provenienti da tessuti fissati in formalina in misura eccessiva. Utilizzare cellule intatte per l'interpretazione dei risultati di colorazione. Le cellule necrotiche o degradate spesso si colorano in modo non specifico.

Tessuto del paziente

I campioni del paziente devono essere esaminati per ultimi. L'intensità della colorazione positiva deve essere valutata tenendo in considerazione qualunque colorazione di fondo (ossia chiazzeria o arrossamento) non specifica del controllo negativo del reagente. Come in qualsiasi altro test immunoistochimico, un risultato negativo indica che l'antigene non è stato rilevato, non che l'antigene è assente nelle cellule o nei tessuti sottoposti al test. Se necessario, utilizzare una serie di anticorpi per facilitare l'identificazione di reazioni false negative. La morfologia di ogni campione di tessuto deve essere esaminata anche utilizzando una sezione colorata con ematossilina ed eosina quando si interpretano i risultati immunoistochimici. I riscontri morfologici del paziente e i dati clinici pertinenti devono essere interpretati da un patologo qualificato.

LIMITAZIONI

Limitazioni generali

1. L'IHC è un processo diagnostico in più fasi che necessita di formazione specialistica su scelta dei reagenti appropriati, selezione dei tessuti, fissazione, processazione, preparazione del vetrino per immunoistochimica e interpretazione dei risultati della colorazione.
2. La colorazione dei tessuti dipende dalla loro manipolazione e processazione prima della colorazione. Condizioni inappropriate di fissazione, congelamento, scongelamento, lavaggio, asciugatura, riscaldamento, taglio o la contaminazione con altri tessuti o fluidi possono produrre artefatti, intrappolamento degli anticorpi o risultati falsi negativi. Variazioni nella fissazione e nei metodi di inclusione o le irregolarità intrinseche del tessuto possono provocare risultati incoerenti.
3. Una controcolorazione eccessiva o incompleta può compromettere la corretta interpretazione dei risultati.
4. L'interpretazione clinica di qualunque colorazione positiva o della sua assenza deve essere valutata nel contesto dell'anamnesi clinica, della morfologia e di altri criteri istopatologici. L'interpretazione clinica di qualsiasi colorazione o della sua assenza deve essere integrata da studi morfologici, controlli appropriati e da altri test diagnostici. È responsabilità del patologo qualificato aver acquisito familiarità con gli anticorpi, i reagenti e i metodi utilizzati per interpretare la preparazione colorata. È necessario eseguire la colorazione in un laboratorio certificato e autorizzato, sotto la supervisione di un patologo responsabile della revisione dei vetrini colorati e che garantisca l'adeguatezza dei controlli positivi e negativi.
5. Gli anticorpi e i reagenti VENTANA sono forniti a una diluizione ottimale per l'uso, purché le istruzioni fornite siano rispettate. Qualsiasi deviazione dalle procedure di test consigliate può inficiare i risultati attesi. È indispensabile utilizzare e documentare controlli appropriati. Gli utilizzatori che modificano le procedure di test consigliate si devono assumere ogni responsabilità relativamente all'interpretazione dei risultati dei pazienti.
6. I reagenti possono dare luogo a reazioni inattese in tessuti non testati precedentemente. La possibilità di reazioni inattese, anche in gruppi di tessuti già

esaminati, non può essere completamente esclusa a causa della variabilità biologica dell'espressione dell'antigene nei neoplasmi e altri tessuti patologici.⁸ Contattare il rappresentante dell'assistenza locale per segnalare reazioni inattese documentate.

- Quando sono utilizzati in fasi di blocco, i sieri normali provenienti dalla stessa fonte animale degli antisieri secondari possono causare risultati falsi negativi o falsi positivi a causa di autoanticorpi o di anticorpi naturali.
- I risultati falsi positivi possono essere identificati grazie al legame non immunologico delle proteine o ai prodotti di reazione del substrato. Questi risultati possono anche dipendere dall'attività della pseudoperossidasi (eritrociti), dalla perossidasi endogena⁹ o dalla fosfatasi alcalina endogena.
- Come in qualsiasi altro test immunoistochimico, un risultato negativo indica che l'antigene non è stato rilevato, non che l'antigene è assente nelle cellule o nei tessuti sottoposti al test.

Limitazioni specifiche

- Ogni fase della procedura del kit di rilevazione è stata ottimizzata su strumenti BenchMark IHC/ISH ed è preimpostata. A causa della variabilità nella fissazione e processazione dei tessuti, può essere necessario aumentare o diminuire il tempo di incubazione dell'anticorpo primario su singoli campioni. Per ulteriori informazioni sulle variabili della fissazione, fare riferimento a "Immunohistochemistry Principles and Advances"⁵ oppure a "Immunomicroscopy: A Diagnostic Tool for the Surgical Pathologist".¹⁰
- Questo kit di rilevazione, in combinazione con gli anticorpi primari e gli accessori VENTANA, rileva l'antigene che sopravvive alla fissazione in formalina, alla processazione del tessuto e al taglio normali.
- Questo kit di rilevazione è stato ottimizzato per l'uso con la soluzione di lavaggio Reaction Buffer, anticorpi primari, accessori e strumenti BenchMark IHC/ISH. L'uso della soluzione di lavaggio Reaction Buffer è importante per il corretto funzionamento del kit di rilevazione. Gli utilizzatori che modificano le procedure di test consigliate sono responsabili per l'interpretazione dei risultati del paziente in tali circostanze.
- Questo kit di rilevazione è stato ottimizzato per l'uso con LCS (Predilute) o ULTRA LCS (Predilute). La barriera LCS riduce l'evaporazione e fornisce un ambiente acquoso stabile per le reazioni di IHC condotte su strumenti BenchMark IHC/ISH.
- Lievi variazioni di tonalità dei singoli cromogeni possono essere osservate a causa della cross-reattività tra le reazioni cromogeniche quando si utilizza la doppia colorazione.
- Non tutte le analisi potrebbero essere registrate su ogni strumento. Contattare il rappresentante dell'assistenza locale per ulteriori informazioni.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Le prestazioni di *ultraView AP Red detection kit* sono state valutate mediante studi sulla precisione e altri studi pertinenti. Se non altrimenti specificato, tutte le colorazioni sono state eseguite seguendo il protocollo indicato nella scheda metodologica di *ultraView AP Red detection kit* su strumenti BenchMark IHC/ISH.

Studi sulla precisione: colorazione singola

I test sulla precisione sono stati eseguiti colorando sezioni seriali di tonsille fissate in formalina neutra tamponata e incluse in paraffina con l'anticorpo primario anti-Ki67 su strumenti BenchMark IHC/ISH, se non altrimenti specificato.

Il tempo di incubazione dell'anticorpo primario è stato di 16 minuti e tutti i vetrini sono stati controcolorati utilizzando Hematoxylin II seguita da Bluing Reagent. Tutti i vetrini colorati con un anticorpo primario sono stati confrontati l'uno con l'altro per verificare l'adeguatezza e l'intensità della colorazione e sono stati valutati da parte di un operatore qualificato.

- Nella corsa di colorazione per verificare la precisione all'interno della stessa corsa (lo stesso anticorpo primario colorato su una piattaforma) sono stati confrontati vetrini colorati lo stesso giorno durante una stessa corsa su una singola piattaforma. Per questa analisi, i vetrini sono stati colorati su uno strumento BenchMark XT e i risultati sono stati confrontati. La precisione all'interno della stessa corsa di colorazione è stata del 100% per lo strumento BenchMark XT.
- La precisione tra diverse corse di colorazione è stata calcolata in base al numero di vetrini colorati in 3 corse di colorazione per un tipo di strumento. Le corse di colorazione sono state eseguite una al giorno in 3 giorni diversi utilizzando uno strumento BenchMark XT. La precisione tra corse di colorazione diverse per lo

strumento BenchMark XT è stata del 100% (30 vetrini su 30, 10 vetrini colorati per un anticorpo primario in 3 corse separate).

- La precisione tra strumenti è stata calcolata in base al numero di vetrini colorati in 9 corse di colorazione su tutti gli strumenti. Le corse di colorazione sono state eseguite una al giorno in 3 giorni diversi utilizzando 3 strumenti diversi: strumenti BenchMark GX, BenchMark XT e BenchMark ULTRA per IHC. La precisione tra strumenti di *ultraView AP Red detection kit* è stata del 100% (90 su 90 vetrini colorati).

Numerosi anticorpi primari VENTANA sono stati sviluppati con *ultraView AP Red detection kit*. Nell'ambito dei test eseguiti per queste analisi, sono state dimostrate le seguenti caratteristiche prestazionali di *ultraView AP Red detection kit*:

- Precisione intra-corsa, tra giorni diversi, tra strumenti e tra piattaforme sugli strumenti BenchMark GX, BenchMark XT e BenchMark ULTRA.
- Sensibilità e specificità della colorazione su diversi tipi di tessuti normali e neoplastici e tessuti target specifici per l'analisi.

Tutti gli studi hanno soddisfatto i rispettivi criteri di accettabilità.

La precisione sullo strumento BenchMark ULTRA PLUS è stata dimostrata usando analisi rappresentative. Gli studi hanno incluso ripetibilità intra-corsa di colorazione, precisione intermedia tra giorni diversi e tra corse di colorazione. Tutti gli studi hanno soddisfatto i rispettivi criteri di accettabilità.

Studi sulla precisione: colorazione dual

Sono stati condotti studi sulla precisione di *ultraView AP Red detection kit* (utilizzando l'anticorpo CONFIRM anti-CD3 (2GV6)) con il kit di rilevazione *ultraView DAB* (utilizzando l'anticorpo CONFIRM anti-CD20 (L26)), al fine di dimostrare quanto segue:

- Precisione intra-corsa e tra corse di colorazione su strumenti BenchMark IHC/ISH.
- Precisione all'interno della stessa piattaforma su strumenti BenchMark IHC/ISH
- Precisione tra piattaforme tra gli strumenti BenchMark GX, BenchMark XT e BenchMark ULTRA

Tutti gli studi hanno soddisfatto i rispettivi criteri di accettabilità.

Sono stati condotti studi sulla precisione di *ultraView AP Red detection kit* (utilizzando l'anticorpo CONFIRM anti-CD3 (2GV6)) con il kit di rilevazione *OptiView DAB IHC* (utilizzando l'anticorpo CONFIRM anti-CD20 (L26)), al fine di dimostrare quanto segue:

- Precisione intra-corsa e tra corse di colorazione su strumenti BenchMark IHC/ISH.
- Precisione all'interno della stessa piattaforma su strumenti BenchMark IHC/ISH
- Precisione tra piattaforme tra gli strumenti BenchMark GX, BenchMark XT e BenchMark ULTRA

Tutti gli studi hanno soddisfatto i rispettivi criteri di accettabilità.

Studi sulla concordanza: colorazione dual

È stato condotto uno studio su strumenti BenchMark GX, BenchMark XT e BenchMark ULTRA al fine di dimostrare la concordanza tra un vetrino sottoposto a doppia colorazione utilizzando il kit di rilevazione *ultraView DAB* (utilizzando l'anticorpo CONFIRM anti-CD20 (L26)) con *ultraView AP Red detection kit* (utilizzando l'anticorpo CONFIRM anti-CD3 (2GV6)) e i vetrini sottoposti a colorazione con l'anticorpo singolo CONFIRM anti-CD3 (2GV6) e l'anticorpo singolo CONFIRM anti-CD20 (L26). I vetrini sottoposti a colorazione singola sono stati processati utilizzando il kit di rilevazione *ultraView DAB* nelle condizioni indicate nella scheda metodologica.

È stato condotto uno studio su strumenti BenchMark GX, BenchMark XT e BenchMark ULTRA al fine di dimostrare la concordanza tra un vetrino sottoposto a doppia colorazione utilizzando il kit di rilevazione *OptiView DAB* (utilizzando l'anticorpo CONFIRM anti-CD20 (L26)) con *ultraView AP Red detection kit* (utilizzando l'anticorpo CONFIRM anti-CD3 (2GV6)) e i vetrini sottoposti a colorazione con l'anticorpo singolo CONFIRM anti-CD3 (2GV6) e l'anticorpo singolo CONFIRM anti-CD20 (L26). I vetrini sottoposti a colorazione singola sono stati processati utilizzando il kit di rilevazione *ultraView DAB* nelle condizioni indicate nella scheda metodologica.

Tutti gli studi hanno soddisfatto i rispettivi criteri di accettabilità.

RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

- Se il controllo positivo mostra una colorazione più debole rispetto alle previsioni, verificare gli altri controlli positivi analizzati contemporaneamente sullo strumento per determinare se la causa è l'anticorpo primario o uno dei reagenti secondari in comune.

2. Se il controllo positivo è negativo, assicurarsi che il vetrino abbia l'etichetta con codice a barre corretta. Se l'etichetta del vetrino è corretta, verificare gli altri controlli positivi analizzati contemporaneamente sullo strumento per determinare se la causa è l'anticorpo primario o uno dei reagenti secondari in comune. I tessuti potrebbero essere stati raccolti, fissati o sparaffinati non correttamente. Seguire la procedura corretta per la raccolta, la conservazione e la fissazione.
3. La rimozione incompleta della paraffina può produrre artefatti di colorazione o causare l'assenza di colorazione.
 - Se non è stata rimossa tutta la paraffina dal vetrino, ripetere la corsa di colorazione utilizzando l'opzione di sparaffinatura prolungata, se disponibile.
 - In alternativa, è possibile eseguire una sparaffinatura manuale fuori strumento. Se si sceglie la sparaffinatura manuale, deselezionare la sparaffinatura online dal protocollo di colorazione prima di caricare i vetrini sullo strumento. Prestare particolare attenzione affinché i vetrini non si asciugano prima della corsa di colorazione.
4. Se la colorazione specifica con l'anticorpo è troppo intensa, ripetere la corsa riducendo il periodo di incubazione a intervalli di 4 minuti fino a raggiungere l'intensità di colorazione desiderata.
5. In caso di dilavamento delle sezioni di tessuto dal vetrino, controllare i vetrini per assicurarsi che siano caricati positivamente.
6. Per le azioni correttive, consultare la sezione Procedura, la guida per l'utilizzatore dello strumento o contattare il rappresentante dell'assistenza locale.
7. Se un erogatore di reagente non eroga liquido, controllare la camera di caricamento o il menisco per verificare l'eventuale presenza di corpi estranei o particolato, ad esempio fibre o precipitati. Se l'erogatore è bloccato, non utilizzarlo e contattare il rappresentante dell'assistenza locale. In caso contrario, caricare nuovamente l'erogatore puntandolo verso un contenitore dei rifiuti, rimuovendo il tappo dell'ugello e premendo verso il basso sulla parte superiore dell'erogatore. Fare riferimento alla scheda metodologica dell'erogatore in linea associato per informazioni sull'uso corretto.
8. Occasionalmente, sull'erogatore di fosfato di Naphthol si può osservare la formazione di cristalli. Gli esami effettuati indicano che i cristalli non interferiscono con l'interpretazione dei risultati. Se si osservano cristalli sui vetrini, pulire il puntale dell'ugello e caricare l'erogatore per assicurarsi di aver rimosso qualsiasi detrito cristallino. Se continuano a essere presenti cristalli, interrompere l'uso dell'erogatore e rivolgersi al rappresentante dell'assistenza locale per ottenerne uno di ricambio.
9. Il cromogeno Fast Red è solubile in alcol e acetone. L'esposizione dei vetrini colorati ad alcol e/o acetone può causare una perdita di segnale specifico.

BIBLIOGRAFIA

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.

NOTA: nel presente documento si utilizza sempre un punto come separatore decimale per separare la parte intera di un numero decimale da quella frazionaria. I separatori per le migliaia non sono utilizzati.

Simboli

Ventana usa i seguenti simboli e segni in aggiunta a quelli elencati nello standard ISO 15223-1 (per gli Stati Uniti: visitare il sito dialog. Roche.com per le definizioni dei simboli utilizzati):



Global Trade Item Number (numero prodotto globale)

Rx only

Per gli USA: Attenzione: Le leggi federali consentono la vendita di questo dispositivo solo da parte di un medico o solo su prescrizione medica.

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Rev	Aggiornamenti
L	Aggiornamenti alla sezione Avvertenze e precauzioni. Aggiornato all'attuale modello.

PROPRIETÀ INTELLETTUALE

VENTANA, BENCHMARK, CONFIRM, OPTIVIEW e ULTRAVIEW sono marchi commerciali di Roche. Tutti gli altri nomi di prodotto e marchi commerciali sono di proprietà dei rispettivi titolari.

© 2024 Ventana Medical Systems, Inc.

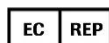
For USA: Rx only

INFORMAZIONI DI CONTATTO



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

