

ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit

REF

760-501

05269814001

IVD

Σ 250

ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit (ultraView AP Red detection kit) е непряка система без биотин за откриване на миши IgG, миши IgM и заешки първични антитела чрез светлинна микроскопия. Комплектът е предназначен за лабораторна употреба за идентифициране на таргети чрез имунохистохимия (IHC) в срезове от фиксирана с формалин тъкан в парафин, които са оцветени на инструменти BenchMark IHC/ISH.

Този продукт трябва да се интерпретира от квалифициран патолог във връзка с хистологично изследване, съответна клинична информация и подходящи контроли. Този продукт е предназначен за in vitro диагностична (IVD) употреба.

РЕЗЮМЕ И ОБЯСНЕНИЕ

Имунохистохимията е техника, използвана в лабораториите за диагностични цели. IHC използва специфични първични антитела за локализиране на и свързване с антигени във фиксирани или замразени тъкани срезове. Свързването на антитялото с антигена се визуализира с индиректен метод за откриване. Най-често срещаните техники за индиректни методи използват вторично антитяло, насочено срещу видовете първично антитяло и ензим със съответната система субстрат-хромоген. Тази комбинация води до оцветен преципитат на мястото на специфично свързване с антитялото. ultraView AP Red detection kit използва непряк метод за визуализиране на специфични антитела, свързани с антигени, чрез отлагане на преципитат с червен цвят.

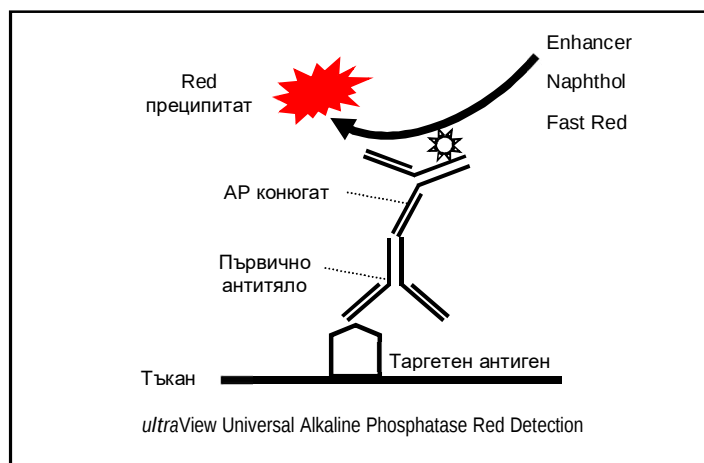
ПРИНЦИП НА ПРОЦЕДУРАТА

ultraView AP Red detection kit открива специфични миши и заешки антитела, свързани с антиген, в срезове от фиксирана с формалин тъкан в парафин (ФФТП). Специфичното антитяло се локализира чрез коктейл от белязани от ензими вторични антитела, които локализируют свързаното първично антитяло. След това комплексът се визуализира чрез субстрат Naphthol и хромоген Fast Red, като се получава червен преципитат, който лесно се наблюдава чрез светлинна микроскопия.

Протоколът за оцветяване се състои от множество етапи, при които реактивите се инкубират за предварително определени времена при специфични температури. В края на всяка стъпка на инкубация инструментът BenchMark IHC/ISH промива срезове, за да отстрани несвързания материал, и прилага течно покривно стъкло, което минимизира изпарението на водните реактиви от предметното стъкло.¹ Резултатите се интерпретират с помощта на светлинен микроскоп и подпомагат диференциалната диагноза на патологичните процеси, които могат да са свързани или не с конкретен антиген.

За по-подробна информация за работата на инструмента вижте съответното ръководство на потребителя.

Фигура 1 илюстрира индиректния метод за откриване.



Фиг. 1. Реакция на ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Предоставени материали

ultraView AP Red detection kit съдържа достатъчно реактив за 250 теста.

Един дозатор от 25 mL	ultraView Universal AP Red Enhancer съдържа приблизително 3% (v/v) MgCl ₂ в Tris буфер с разтвор 0.05% на консервант ProClin 300.
Един дозатор от 25 mL	ultraView Universal AP Red Multimer съдържа коктейл от маркирани с Alkaline Phosphatase (AP) антитела (приблизително 50 µg/mL) в буфер с разтвор 0.05% на консервант ProClin 300.
Един дозатор от 25 mL	ultraView Universal AP Red Naphthol съдържа приблизително 1.0% (w/v) Naphthol в буфер Tris с разтвор 0.10% на консервант ProClin 300.
Един дозатор от 25 mL	ultraView Universal AP Red Fast Red A съдържа приблизително 1.0% (w/v) Fast Red в ацетатен буфер с разтвор 0.05% на консервант ProClin 300.
Един дозатор от 25 mL	ultraView Universal AP Red Fast Red B съдържа приблизително 1.0% (w/v) Fast Red в ацетатен буфер с разтвор 0.05% на консервант ProClin 300.

Разтваряне, смесване, разреждане, титруване

ultraView AP Red detection kit е оптимизиран за употреба на инструменти BenchMark IHC/ISH. Не е необходимо разтваряне, смесване, разреждане или титруване на реактивите от комплекта.

Необходими, но непредоставени материали

Не са предоставени оцветяващи реактиви, като напр. комплекти за откриване и спомагателни компоненти VENTANA, включително предметни стъкла с отрицателни и положителни тъкани контроли.

Някои от продуктите, изброени в листовката за метода, могат да липсват в някои географски райони. Консултирайте се с местния представител за поддръжка.

Следните реактиви и материали може да са необходими за оцветяване, но да не са предоставени с комплекта за откриване:

1. Първично антитяло
2. Реактив за отрицателна контрола
3. Положителни и отрицателни тъкани контроли (консултирайте се с листовките за методи за антитялото за препоръчани видове)
4. Amplification Kit (кат. номер 760-080 / 05266114001)
5. OptiView DAB IHC Detection Kit (кат. номер 760-700 / 06396500001)
6. OptiView Amplification Kit (кат. номер 760-099 / 06396518001 (50 теста) или 860-099 / 06718663001 (250 теста))
7. ultraView Universal DAB Detection Kit (кат. номер 760-500 / 05269806001)

8. Protease 1 (кат. номер 760-2018 / 05266688001)
9. Protease 2 (кат. номер 760-2019 / 05266696001)
10. Protease 3 (кат. номер 760-2020 / 05266718001)
11. Hematoxylin (кат. номер 760-2021 / 05266726001)
12. Hematoxylin II (кат. номер 790-2208 / 05277965001)
13. Bluing Reagent (кат. номер 760-2037 / 05266769001)
14. Reaction Buffer Concentrate (10X) (кат. номер 950-300 / 05353955001)
15. Cell Conditioning Solution (CC1) (кат. номер 950-124 / 05279801001)
16. Cell Conditioning Solution (CC2) (кат. номер 950-123 / 05279798001)
17. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (кат. номер 950-224 / 05424569001)
18. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC2) (кат. номер 950-223 / 05424542001)
19. Antibody Diluent (кат. номер 251-018 / 05261899001)
20. EZ Prep Concentrate (10X) (кат. номер 950-102 / 05279771001)
21. LCS (Predilute) (кат. номер 650-010 / 05264839001)
22. ULTRA LCS (Predilute) (кат. номер 650-210 / 05424534001)
23. Инструмент BenchMark IHC/ISH
24. Предметни стъкла за микроскоп, заредени положително
25. Покривно стъкло и метод за покривно стъкло, достатъчни за покриване на тъкан
26. Лабораторно оборудване с общо предназначение

Съхранение и стабилност

При получаване и когато не се използва, съхранявайте при 2 – 8 °C. Не замразявайте. Потребителят трябва да потвърди всички условия за съхранение, различни от посочените в листовката за метода. Този комплект за откриване може да се използва веднага след изваждането от хладилника.

За да осигурите правилното доставяне на реактива и стабилността на всеки реактив, сменяйте капачката на дозатора след всяка употреба и веднага поставяйте дозатора в хладилника в изправено положение.

Всеки комплект за откриване е с обозначен срок на годност. Когато се съхранява правилно, продуктът е стабилен до датата, посочена на етикета. Не използвайте продукта след срока на годност за предписания метод на съхранение. Няма категорични признаци, които да показват нестабилност на този продукт; следователно положителните и отрицателните контроли трябва да се провеждат едновременно с неизвестни проби. Свържете се незабавно с местния представител за поддръжка, ако има индикации за нестабилност на реактива.

Взимане на проби и подготовка за анализ

ФФТП са подходящи за употреба с *ultraView AP Red detection kit* и инструмент BenchMark IHC/ISH (вижте раздела „Необходими, но не предоставени материали“). Препоръчителният фиксатор на тъкани е 10% неутрален буферизиран формалин (NBF).² Промениливи резултати могат да се получат в резултат на дебелина на тъканния срез, типа на фиксация, непълна продължителна фиксация или специални процеси, като декалцификация на препарати с костен мозък.

Всеки срез трябва да се нареже с подходящата дебелина за използваното първично анти тяло и да се постави върху положително заредено предметно микроскопско стъкло. Предметните стъкла с тъканния срез трябва да се изсушат в изправено положение в продължение на най-малко 15 минути при стайна температура, за да се отцеди излишната вода, намираща се под среза, преди изпичането. Предметните стъкла могат да се изпичат/загряват в продължение на най-малко 1 час в пещ при 60 °C ± 5 °C или да се изсушават на въздух при 37 °C до 24 часа. Изсушаването и нагряването на предметното стъкло се използват за изсушаване на тъканта след приклепването на среза към предметното стъкло и за подобряване на адхезията на тъканта към стъклото. Консултирайте се с листовката за метода за първичното анти тяло, за да определите ограниченията за нагряване. Продължителното нагряване на тъканта може да доведе до намалена наличност на антиген.

Правилно фиксираните и вградени тъкани, експресиращи антигена, ще останат стабилни, ако се съхраняват на хладно място (15–25 °C). Clinical Laboratory Improvement Act (CLIA) (Закон за подобряване на клиничната лаборатория) от 1988 г., 42CFR493.1259 (b), изисква следното: „Лабораторията трябва да съхранява предметните стъкла поне десет години от датата на изследването и да съхранява блокчетата от проби поне две години от датата на изследването“. Всяка лаборатория трябва да валидира стабилността на предметните стъкла за своите собствени процедури и условия околната среда за съхранение.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ

1. За *in vitro* диагностична (IVD) употреба.
2. Само за професионална употреба.
3. Не използвайте за повече от определения брой тестове.
4. Разтворът ProClin 300 се използва като консервант в този разтвор. Той е класифициран като иритант и може да причини сенсibiliзация при контакт с кожата. При работа вземете разумни предпазни мерки. Избягвайте контакт на реактивите с очите, кожата и лигавиците. Използвайте защитно облекло и ръкавици.
5. Материалите от човешки или животински произход трябва да се третират като потенциално биологично опасни и да се изхвърлят при подходящи предпазни мерки. В случай на експозиция трябва да се спазват здравните директиви на отговорните органи.^{3,4}
6. Вземете разумни предпазни мерки при работа с реактиви. Избягвайте контакт на реактивите с очите, кожата и лигавиците. Използвайте ръкавици за еднократна употреба и носете подходящо защитно облекло при работа с материали със съмнения за канцерогенност или токсични материали.
7. Ако реактивите влязат в контакт с чувствителни зони, измийте обилно с вода. Избягвайте вдишването на реактиви.
8. Уверете се, че контейнерът за отпадъци е празен, преди да започнете цикъл с инструмента. Ако тази предпазна мярка не бъде взета, контейнерът за отпадъци може да прелее и потребителят рискува да се хлъзне и да падне.
9. Избягвайте микробно замърсяване на реактивите, тъй като това може да доведе до неправилни резултати.
10. За допълнителна информация относно употребата на това изделие вижте Ръководството на потребителя за инструмента BenchMark IHC/ISH, както и листовките за методи на всички необходими компоненти.
11. Консултирайте се с местните и/или държавните власти за определяне на препоръчителния метод за изхвърляне.
12. Етикетването за безопасност на продуктите следва основно насоките на ЕС за GHS. Информационен лист за безопасност е на разположение на професионалния потребител при поискване.
13. За да съобщите подозирани сериозни инциденти, свързани с това изделие, свържете се с местния представител на Roche и компетентния орган на държавата членка или държавата, в която е установен потребителят.

Този комплект за откриване съдържа компоненти, класифицирани, както следва, в съответствие с Регламент (ЕО) № 1272/2008:

Таб. 1. Информация за опасност.

Опасност	Код	Изявление
	H317	Може да причини алергична кожна реакция.
	P261	Избягвайте вдишването на прах/дим/газ/мъгла/пари/спрей.
	P272	Замърсеното работно облекло не трябва да се допуска извън работното място.
	P280	Носете защитни ръкавици.
	P333 + P313	При поява на кожно дразнене или обрив на кожата: Потърсете медицински съвет/помощ.
	P362 + P364	Свалете замърсеното облекло и го изперете преди повторна употреба.
	P501	Изхвърлете съдържанието/контейнера в одобрено депо за обезвреждане на отпадъци.

Този продукт съдържа CAS # 55965-84-9, реакционна маса на 5-хлоро-2-метил-2Н-изотиазол-3-он и 2-метил-2Н-изотиазол-3-он (3:1).

ПРОЦЕДУРА

ultraView AP Red detection kit е разработен за употреба на инструменти BenchMark IHC/ISH в комбинация с първични антитела VENTANA и допълнителни материали. Параметрите за автоматизирани процедури може да бъдат показани, отпечатани и редактирани в съответствие с процедурата в Ръководство на потребителя за инструмента. Други работни параметри на инструмента са предварително зададени фабрично.

Процедурите за оцветяване на инструментите BenchMark IHC/ISH са, както следва. За по-подробни инструкции и допълнителни опции за протокол вижте Ръководството на потребителя. Дали дадена проба ще изисква Cell Conditioning, зависи от анти тялото. Моля, проверете листовката за метода на анти тялото за указания.

Инструменти BenchMark IHC/ISH

1. Приложете етикет с баркод на предметното стъкло, съответстващ на протокола, който трябва да се извърши.
2. Заредете първичното анти тяло, подходящите дозатори за комплекти за откриване и необходимия допълнителен реактив в тавата за реактиви и ги поставете върху инструмента.
3. Проверете налягането и изхвърлете отпадъците.
4. Заредете предметните стъкла върху инструмента.
5. Пуснете цикъла на оцветяване.
6. След завършване на цикъла отстранете предметните стъкла от инструмента.
7. Преминете към Препоръчителни процедури за обработка след инструмента.

Възможност за Dual оцветяване

Конфигурацията с двойно оцветяване се състои от последователно оцветяване, като първото първично анти тяло се оцветява с DAB откриване, използвайки или *ultraView Universal DAB Detection Kit (ultraView DAB detection kit)*, или *OptiView DAB IHC Detection Kit (OptiView DAB detection kit)*, последвано от откриване на второто първично анти тяло чрез *ultraView AP Red detection kit*. В конфигурацията с двойно оцветяване *ultraView DAB detection kit* и *OptiView DAB detection kit* са оптимизирани за специфични времена на инкубация чрез CONFIRM anti-CD20 (L26) Primary Antibody (анти тяло CONFIRM anti-CD20 (L26)). *ultraView AP Red detection kit* е оптимизиран за специфични времена на инкубация чрез CONFIRM anti-CD3 (2GV6) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (анти тяло CONFIRM anti-CD3 (2GV6)). Потребителят трябва да потвърди резултатите, получени с този реактив. Вижте таблиците по-долу за препоръчителни протоколи за двойно оцветяване.

Таб. 2. Препоръчителен протокол за оцветяване за *ultraView DAB detection kit* (чрез анти тяло CONFIRM anti-CD20 (L26)) и *ultraView AP Red detection kit* (чрез анти тяло CONFIRM anti-CD3 (2GV6)) на инструмент BenchMark IHC/ISH.

Тип на процедурата	Метод		
	GX	XT	ULTRA или ULTRA PLUS*
Депарафинизация	Избрана	Избрана	Избрана
Cell Conditioning (разкриване на антиген)	CC1 мек	CC1 мек	ULTRA CC1 36 минути, 95 °C
Анти тяло (DAB)	6 минути, 37 °C	16 минути, 37 °C	16 минути, 36 °C
Анти тяло за двойно оцветяване (Red)	20 минути, 37 °C	20 минути, 37 °C	20 минути, 36 °C
Контраст	Hematoxylin II, 4 минути		
След контраст	Bluing, 4 минути		

* Беше демонстрирано съответствие между инструментите BenchMark ULTRA и BenchMark ULTRA PLUS с помощта на представителни анализи.

Таб. 3. Препоръчителен протокол за оцветяване за *OptiView DAB detection kit* (чрез анти тяло CONFIRM anti-CD20 (L26)) и *ultraView AP Red detection kit* (чрез анти тяло CONFIRM anti-CD3 (2GV6)) на инструмент BenchMark IHC/ISH.

Тип на процедурата	Метод		
	GX	XT	ULTRA или ULTRA PLUS*
Депарафинизация	Избрана	Избрана	Стандартно
Cell Conditioning (разкриване на антиген)	CC1, 32 минути	CC1, 32 минути	ULTRA CC1, 32 минути, 100 °C
Предварителен пероксидазен инхибитор	Избрана	Избрана	Избрана
Анти тяло (DAB)	6 минути, 37 °C	8 минути, 37 °C	16 минути, 36 °C
OptiView HQ Linker	8 минути (по подразбиране)	8 минути (по подразбиране)	8 минути (по подразбиране)
OptiView HRP Multimer	8 минути (по подразбиране)	8 минути (по подразбиране)	8 минути (по подразбиране)
Анти тяло за двойно оцветяване (Red)	20 минути, 37 °C	20 минути, 37 °C	20 минути, 36 °C
Контраст	Hematoxylin II, 4 минути		
След контраст	Bluing, 4 минути		

* Беше демонстрирано съответствие между инструментите BenchMark ULTRA и BenchMark ULTRA PLUS с помощта на представителни анализи.

Поради вариация във фиксирането и обработката на тъканите, както и в общите условия на лабораторните инструменти и околната среда, може да се наложи да се увеличи или намали инкубацията с първично анти тяло или клетъчното кондициониране според отделните проби, използваното откриване и предпочитанията на разчитания. За повече информация относно променливите на фиксация вижте „Immunohistochemistry Principles and Advances“.⁵

Препоръчителни процедури за обработка след инструмента

Забележка: Хромогенът Fast Red е разтворим в алкохол и ацетон. Не използвайте вани със спирт или алкохол или удължено измиване с ксилол, за да дехидратирате и почистите предметните стъкла.

1. За да премахнете разтвора Liquid Coverslip, измийте предметните стъкла в 2 последователни разтвора на мек препарат за миене на съдове (не използвайте препарат, предназначен за автоматични съдомиялни машини).
2. Изплакнете предметните стъкла добре с дейонизирана вода за около 1 минута. Изтръскайте излишната вода.
3. Изсушете предметните стъкла в печ (препоръчително за минимум 15 – 30 минути в печ при 45–60 °C) или изсушете на въздух при стайна температура. Времето и температурата на изсушаване варират в зависимост от условията на околната среда. Уверете се, че предметните стъкла са напълно сухи, преди да приложите покривното стъкло.
4. Прехвърлете предметните стъкла в баня с ксилен за бързо измиване за приблизително 30 секунди.
5. Поставете покривно стъкло върху предметното стъкло. За оптимални резултати използвайте среда за закрепване, съвместима със субстрати с алкална фосфатаза.

Процедури за контрол на качеството

Положителна тъканна контрола

Положителна тъканна контрола трябва да се провежда при всяка извършена процедура на оцветяване. Оптималната лабораторна практика е да се включи

положителен контролен срез на същото предметно стъкло като пациентската тъкан. Тази практика помага да се идентифицира неуспех в прилагането на първично анти тяло или друг критичен реактив върху тестовото предметно стъкло на пациента. Тъкан със слабо положително оцветяване е по-подходяща за оптимален контрол на качеството. Положителните оцветяващите се тъканни компоненти се използват, за да се потвърди, че анти тялото е приложено и инструментът функционира правилно. Тази тъкан може да съдържа както положителни, така и отрицателни оцветяващи се клетки или тъканни компоненти, и служи едновременно като положителна и отрицателна контролна тъкан. Контролните тъкани трябва да бъдат от пресни аутопсионни, биопсични или хирургични проби, подготвени или фиксирани възможно най-скоро по начин, идентичен на тестовите срезове. Такива тъкани могат да проследяват всички стъпки на процедурата – от подготовката на тъканта до оцветяването. Използване на тъканен срез, фиксиран или обработен по различен начин от тестовата проба, ще осигури контрол за всички реактиви и етапи на метода, с изключение на фиксирането и обработката на тъкани.

Известните положителни тъканни контроли трябва да се използват само за проследяване на правилното функциониране на обработените тъкани и тестовите реактиви, а не като помощ при определяне на конкретна диагноза на пациентски проби. Ако положителните тъканни контроли не показват положително оцветяване, резултатите с тестовите проби трябва да се считат за невалидни.

Отрицателна тъканна контрола

Същата тъкан, използвана за положителна тъканна контрола, може да се използва като отрицателна тъканна контрола. Разнообразието от типове клетки, присъстващи в повечето тъканни срезове, предлага вътрешни отрицателни контролни места, но това трябва да бъде проверено от потребителя. Компонентите, които не се оцветяват, трябва да демонстрират липсата на специфично оцветяване и да показват индикация за фоново оцветяване (т.е. покриване с петна или почервяване). Ако се появи специфично оцветяване в отрицателните тъканни контролни места, резултатите с пробите от пациента трябва да се считат за невалидни.

Необясними несъответствия

Необясними несъответствия по отношение на контролите трябва незабавно да бъдат отнесени до местния представител за поддръжка. Ако резултатите от контрола на качеството не отговарят на спецификациите, пациентските резултати са невалидни. Вижте раздела „Отстраняване на неизправности“ в тази листовка за метода. Идентифицирайте и коригирайте проблема, след което повторете пациентските проби.

Отрицателна реактивна контрола

За всяка проба трябва да се проведе отрицателна контрола на реактива, за да се подпомогне интерпретирането на резултатите. За оценка на неспецифичното оцветяване се използва отрицателна контрола на реактива вместо първичното анти тяло (т.е. покриване с петна или почервяване). Предметното стъкло трябва да бъде оцветено с подходяща отрицателна контрола на реактива. Разредителят сам по себе си може да се използва като алтернатива на описаните по-горе отрицателни контроли на реактива. Инкубационният период за отрицателната контрола на реактива трябва да бъде равен на инкубационния период за първичното анти тяло.

Когато панели от няколко анти тела се използват върху серийни срезове, отрицателната контрола на реактива на едно предметно стъкло може да служи като отрицателна или неспецифична контрола за свързване на фона за други анти тела.

Проверка на анализа

Преди първоначалната употреба на първично анти тяло или система за оцветяване в диагностична процедура специфичността на първичното анти тяло трябва да бъде проверена, като се тества върху серия от тъкани с известни работни характеристики при имунохистохимия, представяващи известни положителни и отрицателни тъкани (вижте раздела „Положителна тъканна контрола“ в листовката за метода на първичното анти тяло и препоръките за контрол на качеството на College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist,⁶ или CLSI Approved Guideline⁷, или двата документа). Тези процедури за контрол на качеството трябва да бъдат повтаряни за всяка нова партида анти тела или когато има промяна в параметрите на анализа. Тъканите, изброени в раздел „Работни характеристики“ на първичното анти тяло, са подходящи за проверка на анализа.

Интерпретиране на резултатите

ultraView AP Red detection kit предизвиква преципитация на оцветен в червено реакционен продукт на антигенните места, локализиращи първичното анти тяло. Квалифициран патолог, който има опит в процедурите по имунохистохимия, трябва да оцени контролите и да класифицира оцветения продукт, преди да интерпретира резултатите. Първо трябва да се отбележи оцветяване на отрицателни контроли и тези резултати трябва да се сравнят с оцветения материал, за да се провери дали генерираният сигнал не е резултат от неспецифични взаимодействия.

Положителна тъканна контрола

Оцветената положителна тъканна контрола трябва първо да бъде изследвана, за да се установи, че всички реактиви функционират правилно. Наличието на подходящо оцветен реакционен продукт в целевите клетки е показателно за положителна реактивност. В зависимост от продължителността на инкубация и мощността на използвания хематоксилин оцветяването с контраст ще доведе до бледо до тъмносиво оцветяване на клетъчните ядра. Прекомерното или непълно оцветяване с контраст може да компрометира правилното интерпретиране на резултатите.

Ако положителната тъканна контрола не успее да покаже положително оцветяване, всички резултати с тестовите проби трябва да се считат за невалидни.

Отрицателна тъканна контрола

Отрицателната тъканна контрола трябва да се изследва след положителната тъканна контрола, за да се провери специфичното маркиране на таргетния антиген от първичното анти тяло. Липсата на специфично оцветяване в отрицателната тъканна контрола потвърждава липсата на кръстосана реактивност на анти тела към клетки или клетъчни компоненти. Ако се появи специфично оцветяване в отрицателната тъканна контрола, резултатите с пробите от пациента трябва да се считат за невалидни.

Неспецифичното оцветяване, ако има такова, ще има дифузен вид. Може също така да се наблюдава спорадично леко оцветяване на съединителната тъкан в срезове от тъкани, които са прекомерно фиксирани с формалин. За интерпретиране на резултатите от оцветяването трябва да се използват интактни клетки. Некротичните или дегенерираните клетки често се оцветяват неспецифично.

Тъкан от пациента

Пробите от пациенти трябва да бъдат изследвани последни. Интензитетът на положително оцветяване трябва да се оценява в контекста на всяко неспецифично фоново оцветяване (т.е. покриване с петна или почервяване) на отрицателната контрола на реактива. Както при всеки тест с имунохистохимия, отрицателен резултат означава, че конкретният антиген не е бил открит, а не че антигенът липсва в изследваните клетки или тъкани. Ако е необходимо, използвайте панел от анти тела, за да подпомогнете идентифицирането на фалшиво отрицателни реакции. Когато се интерпретира всеки имунохистохимичен резултат, също така трябва да се изследва морфологията на всяка тъканна проба, като се използва оцветен с хематоксилин и еозин срез. Морфологичните находки при пациента и съответните клинични данни трябва да бъдат интерпретирани от квалифициран патолог.

ОГРАНИЧЕНИЯ

Общи ограничения

1. ИНС е многоетапен диагностичен процес, който изисква специализирано обучение за подбор на подходящите реактиви, тъканни селекции, фиксация, обработка, подготовка на имунохистохимичното предметно стъкло и интерпретация на резултатите от оцветяването.
2. Оцветяването на тъкани зависи от начина на работа с и обработка на тъканите преди оцветяване. Неправилната фиксация, замразяване, размразяване, измиване, изсушаване, нагряване, нарязване или замърсяване с други тъкани или течности може да доведе до артефакти, улавяне на анти тяло или фалшиво отрицателни резултати. Непоследователните резултати могат да бъдат следствие от вариации в методите за фиксация и вграждане или от присъщи нередности в тъканта.
3. Прекомерното или непълно оцветяване с контраст може да компрометира правилното интерпретиране на резултатите.
4. Клиничната интерпретация на всяко положително оцветяване или липсата му трябва да бъде оценена в контекста на клиничната анамнеза, морфологията и други хистопатологични критерии. Клиничната интерпретация на всяко оцветяване или неговото отсъствие трябва да бъде допълнена с морфологични изследвания и подходящи контроли, както и с други диагностични тестове. Задължение на квалифициран патолог е да се запознае

с антителата, реактивите и методите, използвани за интерпретиране на оцветения препарат. Оцветяването трябва да се извършва в сертифицирана, лицензирана лаборатория под наблюдението на патолог, който е отговорен за прегледа на оцветените предметни стъкла и който гарантира адекватността на положителните и отрицателните контроли.

- Антителата и реактивите VENTANA се предоставят при оптимално разреждане за употреба при спазване на предоставените инструкции. Всяко отклонение от препоръчаните тестови процедури може да направи невалидни очакваните резултати. Трябва да се използват и документират подходящи контроли. Потребителите, които се отклоняват от препоръчаните тестови процедури, трябва да поемат отговорност за тълкуването на пациентските резултати.
- Реактивите могат да демонстрират неочаквани реакции в нетествани до този момент тъкани. Възможността за неочаквани реакции дори в тестови тъканни групи не може да бъде напълно елиминирана поради биологичната променливост на експресията на даден антиген в новообразувания или други патологични тъкани.⁸ Свържете се с местния представител за поддръжка по отношение на документирани неочаквани реакции.
- Когато се използват в стъпки за блокиране, нормалните серуми от един и същи животински източник като вторичните антисеруми, могат да доведат до фалшиво отрицателни или фалшиво положителни резултати поради автоантитела или естествени антитела.
- Фалшиво положителни резултати могат да се получат от неимунологичното свързване на протеини или продукти на субстратни реакции. Те могат също така да бъдат причинени от псевдопероксидазна активност (еритроцити), ендогенна пероксидаза⁹ или ендогенна алкална фосфатаза.
- Както при всеки имунохистохимичен тест, отрицателен резултат означава, че антигенът не е бил открит, а не че антигенът липсва в анализираният клетки или тъкан.

Специфични ограничения

- Всяка стъпка от процедурата на комплекта за откриване е оптимизирана на инструментите BenchMark IHC/ISH и е налична. Поради вариациите във фиксирането и обработката на тъканите може да се наложи да се увеличи или намали времето на инкубиране на първичното анти тяло на отделните проби. За повече информация относно променливите на фиксация вижте „Immunohistochemistry Principles and Advances“⁵ или „Immunomicroscopy: A Diagnostic Tool for the Surgical Pathologist“.¹⁰
- Този комплект за откриване в комбинация с първичните антитела и аксесоари VENTANA открива антиген, който оцелява при рутинна фиксация с формалин, обработка на тъкани и нарязване.
- Този комплект за откриване е оптимизиран за употреба с промивен разтвор Reaction Buffer, първични антитела, аксесоари и инструменти BenchMark IHC/ISH. Употребата на промивен разтвор Reaction Buffer е важна за правилната работа на този комплект за откриване. Потребителите, които се отклоняват от препоръчаните тестови процедури, са отговорни за тълкуването на пациентските резултати при тези обстоятелства.
- Този комплект за откриване е оптимизиран за употреба с LCS (Predilute) или ULTRA LCS (Predilute). Барьерата LCS намалява изпарението и предоставя стабилна водна среда за реакциите на IHC, провеждани на инструменти BenchMark IHC/ISH.
- При използване на двойно оцветяване могат да се наблюдават леки разлики в оттенъка при отделните хромогени поради кръстосана реактивност между хромогенните реакции.
- Възможно е не всички анализи да са регистрирани на всеки инструмент. Моля, свържете се с Вашия местен представител за повече информация.

РАБОТНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Работата на *ultraView AP Red detection kit* е оценена чрез изследвания на точността и други съответни проучвания. Всички оцветявания са проведени според протокола, както е отбелязано в листовката за метода на *ultraView AP Red detection kit* на инструментите BenchMark IHC/ISH, освен ако не е посочено друго.

Проучвания на точността – единично оцветяване

Тестването на точността е извършено чрез оцветяване на серийни срезове от неутрално буферизирана сливица като ФТП с първично анти тяло anti-Ki67 на инструменти BenchMark IHC/ISH, освен ако не е посочено друго.

Времето за инкубация на първичното анти тяло е 16 минути и всички предметни стъкла са контрастирани чрез Hematoxylin II, последвано от Bluing Reagent. Всички предметни стъкла, оцветени с първично анти тяло, са сравнени помежду си за целесъобразност и интензивност на оцветяването и са оценени от квалифицирано разчитачо предметни стъкла лице.

- Цикъл на оцветяване за точност в рамките на цикъла (едно и също първично анти тяло, оцветено на платформа) е сравнил предметни стъкла, оцветени в един и същи ден в рамките на цикъл на една платформа. За този критерий предметните стъкла са оцветени на инструмент BenchMark XT и резултатите са сравнени. Точността в рамките на цикъла е 100 % за инструмента BenchMark XT.
- Точността между циклите е изчислена според броя предметни стъкла, оцветени в 3 цикъла за един тип инструмент. Циклите на оцветяване са проведени по един на ден в 3 отделни дни на един инструмент BenchMark XT. Точността между циклите за инструмента BenchMark XT е 100 % (30 от 30 предметни стъкла, 10 оцветени предметни стъкла за едно първично анти тяло за 3 отделни цикъла).
- Точността между инструментите е изчислена според броя предметни стъкла, оцветени в 9 цикъла на всички инструменти. Циклите на оцветяване са проведени по 1 на ден в 3 отделни дни на 3 различни инструмента: инструменти BenchMark GX, BenchMark XT и BenchMark ULTRA за IHC. Точността между инструментите на *ultraView AP Red detection kit* е 100% (90 от 90 оцветени предметни стъкла).

С *ultraView AP Red detection kit* са разработени множество първични антитела VENTANA. Като част от тестването за тези анализи са демонстрирани следните работни характеристики за *ultraView AP Red detection kit*:

- Точност в рамките на цикъла, между дните, между инструментите и между платформите на инструменти BenchMark GX, BenchMark XT и BenchMark ULTRA.
- Чувствителност и специфичност на оцветяването в рамките на обхват от нормални и неопластични типове тъкани и специфични за анализа таргетни тъкани.

Всички проучвания отговарят на критериите за приемане.

Точността на инструмента BenchMark ULTRA PLUS е демонстрирана с помощта на представителни анализи. Проучванията включват повторемост в рамките на цикъла, точност между дните и между инструментите. Всички проучвания отговарят на критериите за приемане.

Проучвания на точността – Dual оцветяване

Проведени са проучвания на точността за *ultraView AP Red detection kit* (чрез анти тяло CONFIRM anti-CD3 (2GV6)) с *ultraView DAB detection kit* (чрез анти тяло CONFIRM anti-CD20 (L26)), за да демонстрират:

- Точност в рамките на цикъла и между циклите на инструменти BenchMark IHC/ISH.
- Точност в рамките на платформата на инструменти BenchMark IHC/ISH.
- Точност между платформите между инструменти BenchMark GX, BenchMark XT и BenchMark ULTRA.

Всички проучвания отговарят на критериите за приемане.

Проведени са проучвания на точността за *ultraView AP Red detection kit* (чрез анти тяло CONFIRM anti-CD3 (2GV6)) с *OptiView DAB detection kit* IHC (чрез анти тяло CONFIRM anti-CD20 (L26)), за да демонстрират:

- Точност в рамките на цикъла и между циклите на инструменти BenchMark IHC/ISH.
- Точност в рамките на платформата на инструменти BenchMark IHC/ISH.
- Точност между платформите между инструменти BenchMark GX, BenchMark XT и BenchMark ULTRA.

Всички проучвания отговарят на критериите за приемане.

Проучвания на съгласуваността – Dual оцветяване

Проведено е проучване на инструменти BenchMark GX, BenchMark XT и BenchMark ULTRA, за да демонстрира съгласуваност между предметното стъкло с двойно оцветяване чрез *ultraView DAB detection kit* (чрез анти тяло CONFIRM anti-CD20 (L26)) с *ultraView AP Red detection kit* (чрез анти тяло CONFIRM anti-CD3 (2GV6)) и предметните стъкла с единично оцветяване с анти тяло CONFIRM anti-CD3 (2GV6) и

антитяло CONFIRM anti-CD20 (L26). Единично оцветените предметни стъкла се обработват чрез *ultraView* DAB detection kit при условията в листовката за метода. Проведено е проучване на инструменти BenchMark GX, BenchMark XT и BenchMark ULTRA, за да демонстрира съгласуваност между предметното стъкло с двойно оцветяване чрез OptiView DAB detection kit (чрез антитяло CONFIRM anti-CD20 (L26)) с *ultraView* AP Red detection kit (чрез антитяло CONFIRM anti-CD3 (2GV6)) и предметните стъкла с единично оцветяване с антитяло CONFIRM anti-CD3 (2GV6) и антитяло CONFIRM anti-CD20 (L26). Единично оцветените предметни стъкла се обработват чрез *ultraView* DAB detection kit при условията в листовката за метода. Всички проучвания отговарят на критериите за приемане.

ОТСТРАНЯВАНЕ НА НЕИЗПРАВНОСТИ

- Ако положителната контрола показва по-слабо оцветяване от очакваното, трябва да се проверят други положителни контроли, пускани при един и същ цикъл на инструмента, за да се определи дали това се дължи на първичното антитяло или на един от общите вторични реактиви.
- Ако положителната контрола е отрицателна, трябва да се провери дали предметното стъкло е с правилния етикет с баркод. Ако предметното стъкло е етикетирано правилно, трябва да се проверят други положителни контроли, изпълнени при един и същ цикъл на инструмента, за да се определи дали това се дължи на първичното антитяло или на един от общите вторични реактиви. Тъканите може да са взети, фиксирани или депарафинизирани неправилно. Трябва да се спазва правилната процедура за вземане, съхранение и фиксация.
- Непълно отстраняване на парафин може да доведе до оцветяване на артефакти или липса на оцветяване.
 - Ако целият парафин не е отстранен от предметното стъкло, цикълът на оцветяване трябва да се повтори, като се използва опцията за удължена депарафинизация, ако е налична.
 - Като алтернатива може да се извърши ръчна депарафинизация извън инструмента. Ако се използва ръчната опция, премахнете онлайн депарафинизация от протокола за оцветяване, преди да заредите предметните стъкла на инструмента. Трябва да се обърне особено внимание, за да се гарантира, че предметните стъкла не са изсъхнали преди цикъла на оцветяване.
- Ако оцветяването със специфично антитяло е твърде интензивно, цикълът трябва да се повтори, като времето на инкубиране се съкращава с интервали от 4 минути, докато се постигне желаната интензивност на оцветяване.
- Ако тъканните срезове се отмиват от предметното стъкло, предметните стъкла трябва да се проверят, за да се гарантира, че са заредени положително.
- За коригиращи действия вижте раздела „Процедура“, Ръководството на потребителя за инструмента или се свържете с Вашия местен представител за поддръжка.
- Ако дозаторът за реактива не дозира течност, проверете камерата за пълнене или менисуса за наличие на чужди материали или частици, като влакна или преципитати. Ако дозаторът е блокиран, не използвайте дозатора и се свържете с местния представител за поддръжка. В противен случай напълнете повторно дозатора, като завъртите дозатора над контейнер за отпадъци, премахнете капачката на дюзата и натиснете върху горната част на дозатора. Вижте листовката за метод за вграден дозатор за информация относно правилната употреба.
- Понякога може да се наблюдава кристализация, произхождаща от дозатора на Naphthol фосфат. Изследванията не показват намеса на кристалите при интерпретирането на резултатите. Ако на предметните стъкла се наблюдават кристали, почистете върха на дюзата и напълнете дозатора, за да сте сигурни, че всички кристални остатъци са отстранени. Ако кристалите все още присъстват, прекратете употребата и се свържете с Вашия местен представител за поддръжка за подмяна на дозатора.
- Хромогенът Fast Red е разтворим в алкохол и ацетон. Оцветените предметни стъкла, изложени на алкохол и/или ацетон, могат да доведат до загуба на специфичен сигнал.

РЕФЕРЕНЦИИ

- 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.

- Sheehan DC, Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. 2nd edition. St. Louis, MO: The C.V. Mosby Company; 1980.
- Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
- 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.
- Roche PC, Hsi ED. Immunohistochemistry: Principles and Advances. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. In: NR Rose, ed. ASM Press; 2002.
- College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2009.
- (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.
- Herman GE, Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech Histochem. 1991;66(4):194-199.
- Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase: part 1. The technique and its pitfalls. Lab Med. 1983;14:767.
- Taylor C, Cote RJ. Immunomicroscopy: A Diagnostic Tool for the Surgical Pathologist. 2nd Edition. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Company; 1986.

ЗАБЕЛЕЖКА: В този документ винаги се използва точка като десетичен разделител за маркиране на границата между интегралната и дробната част на десетично число. Разделители за хиляди не се използват.

Символи

Ventana използва следните символи и знаци в допълнение към изброените в стандарта ISO 15223-1 (за САЩ: вижте dialog.roche.com за дефиниция на използваните символи):



Глобален номер на търговска единица

Rx only

За САЩ: Внимание: Федералният закон ограничава продажбата на това изделие от или по указание на лекар.

ИСТОРИЯ НА РЕДАКЦИИТЕ

Ред.	Актуализации
L	Актуализации на раздела „Предупреждения и предпазни мерки“. Актуализации съгласно текущия шаблон.

ИНТЕЛЕКТУАЛНА СОБСТВЕНОСТ

VENTANA, BENCHMARK, CONFIRM, OPTIVIEW и ULTRAVIEW са търговски марки на Roche. Всички останали продуктови названия и търговски марки са собственост на съответните им собственици

© 2024 Ventana Medical Systems, Inc.

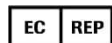
For USA: Rx only

ИНФОРМАЦИЯ ЗА КОНТАКТ



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

www.ventanamedical.com



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

