

ultraView Universal DAB Detection Kit

REF 760-500

05269806001

IVD  250

URČENÉ POUŽITÍ

Detekční souprava *ultraView Universal DAB Detection Kit* je nepřímý systém pro detekci biotinu k detekování myšního IgG, myšního IgM a králičích primárních protilátek. Souprava je určena k identifikaci cílů metodou imunohistochemie v řezech tkáně fixované formalinem, zalité parafinem anebo zmrazené tkáně, které jsou obarvené na přístroji BenchMark IHC/ISH.

Tento produkt musí být interpretován kvalifikovaným patologem v kombinaci s histologickým vyšetřením, relevantními klinickými informacemi a správnými kontrolami. Tento produkt je určen pro diagnostické použití in vitro (IVD).

SOUHRN A VYSVĚTLENÍ

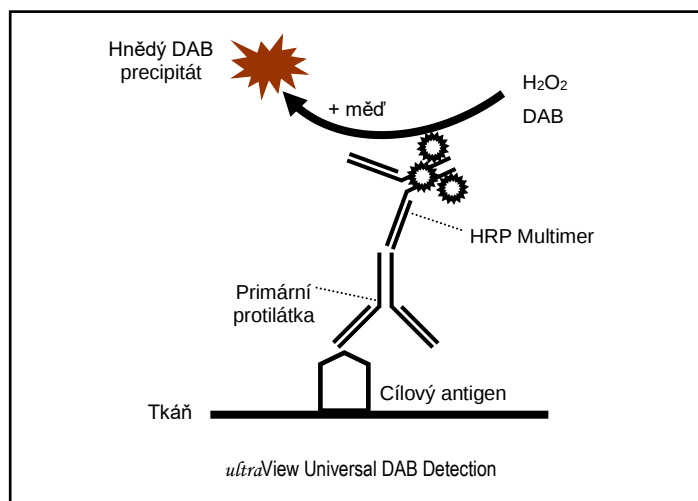
Imunohistochemie (IHC) je technika používaná v laboratořích k diagnostickým účelům. IHC využívá specifické primární protilátky k lokalizaci a vazbě na antigeny ve fixovaných nebo zmrazených tkáňových řezech. Vazba protilátky na antigen je vizualizována metodou nepřímé detekce. Nejobvyklejší techniky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

PRINCIP POSTUPU

Detekční souprava *ultraView Universal DAB Detection Kit* detekuje specifické myší a králičí primární protilátky vázané na antigen v řezech tkáně fixované formalinem, zalité parafinem (FFPE) anebo v řezech zmrazené tkáně. Specifická protilátka je lokalizována koktejem enzymem značených sekundárních protilátek. Komplex je pak vizualizován substrátem peroxidu vodíku a chromogenem 3,3'-diaminobenzidin-tetrahydrochloridem (DAB), který vytváří hnědý precipitát, který lze snadno pozorovat s použitím světelné mikroskopie.

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

Podrobnější informace o obsluze přístroje naleznete v příslušné uživatelské příručce. Na obrázku 1 je znázorněna metoda nepřímé detekce.



Obr. 1. Reakce s detekční soupravou *ultraView Universal DAB Detection Kit*

MATERIÁL A METODY

Dodávaný materiál

Detekční souprava *ultraView Universal DAB Detection Kit* obsahuje dostatek reagentů pro 250 testů.

Jeden 25 mL dávkovač	Inhibitor <i>ultraView Universal DAB Inhibitor</i> obsahuje 3 % roztoku peroxidu vodíku.
Jeden 25 mL dávkovač	Multimer <i>ultraView Universal HRP Multimer</i> obsahuje koktejl protilátek značených HRP (kozy anti-myší IgG, kozy anti-myší IgM a kozy anti-králičí) (přibližně 55 µg/mL) v pufru obsahujícím protein s konzervačním prostředkem ProClin 300.
Jeden 25 mL dávkovač	Chromogenu <i>ultraView Universal DAB Chromogen</i> obsahuje 0.2 % (hm./obj.) 3,3'-diaminobenzidin-tetrahydrochloridu ve vlastním roztoku stabilizátoru a vlastní konzervační prostředek.
Jeden 25 mL dávkovač	<i>ultraView Universal DAB H2O2</i> obsahuje 0.04 % peroxidu vodíku v roztoku fosforečnanového pufru.
Jeden 25 mL dávkovač	Reagencie <i>ultraView Universal DAB Copper</i> obsahuje síran měďnatý (5 g/L) v octanovém pufru s vlastním konzervačním prostředkem.

Rekonstituce, mísení, ředění, titrace

Detekční souprava je optimalizována pro použití na přístrojích BenchMark IHC/ISH. Nevyžaduje se rekonstituce, mísení, ředění ani titrace reagentů ze soupravy. Další ředění může mít za následek ztrátu barvení.

Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky

Barvicí reagenty, například primární protilátky VENTANA a pomocné materiály, včetně sklíček pro negativní a pozitivní kontrolu tkáně, nejsou součástí dodávky.

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

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

1. Primární protilátka
2. Reagencie negativní kontrola
3. Pozitivní a negativní kontrola tkáně (prostudujte si metodické listy protilátky pro doporučené typy)
4. Amplification Kit (kat. č. 760-080 / 05266114001)
5. Protease 1 (kat. č. 760-2018 / 05266688001)
6. Protease 2 (kat. č. 760-2019 / 05266696001)
7. Protease 3 (kat. č. 760-2020 / 05266718001)
8. Hematoxylin (kat. č. 760-2021 / 05266726001)
9. Hematoxylin II (kat. č. 790-2208 / 05277965001)

10. Bluing Reagent (kat. č. 760-2037 / 05266769001)
11. Reaction Buffer Concentrate (10X) (kat. č. 950-300 / 05353955001)
12. Cell Conditioning Solution 1 (CC1) (kat. č. 950-124 / 05279801001)
13. Cell Conditioning Solution 2 (CC2) (kat. č. 950-123 / 05279798001)
14. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (kat. č. 950-224 / 05424569001)
15. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC2) (kat. č. 950-223 / 05424542001)
16. Antibody Diluent (kat. č. 251-018 / 05261899001)
17. EZ Prep Concentrate (10X) (kat. č. 950-102 / 05279771001)
18. LCS (Predilute) (kat. č. 650-010 / 05264839001)
19. ULTRA LCS (Predilute) (kat. č. 650-210 / 05424534001)
20. Přístroj BenchMark IHC/ISH
21. Mikroskopická sklička, kladně nabitá
22. Krycí skličko a metoda krycího sklička dostatečná k pokrytí tkáně
23. Obecné laboratorní vybavení

Skladování a stabilita

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

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

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

Odběr vzorků a příprava pro analýzu

Běžným způsobem zpracované tkáně FFPE jsou vhodné pro použití s detekční soupravou *ultraView* Universal DAB Detection Kit a přístroji BenchMark IHC/ISH (viz odstavec Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky). Doporučeným fixativem na tkáně je 10 % neutrální pufovaný formalin (NBF).² V důsledku tloušťky tkáňového řezu, typu fixace, nekompletní prodloužené fixace, případně speciálních procesů, například odvápnování preparátů kostní dřeně, se mohou vyskytnout rozdílné výsledky.

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

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

K použití s detekční soupravou *ultraView* Universal DAB Detection Kit a přístroji BenchMark IHC/ISH jsou také vhodné zmrazené tkáně zpracované běžným způsobem. Doporučená fixace tkání je 10 minut ve studeném acetonu. Mohou se vyskytnout rozdílné výsledky jako důsledek prodloužené fixace nebo speciálních procesů, například odvápnování preparátů kostní dřeně.

UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

1. Určeno k diagnostickému použití in vitro (IVD).
2. Pouze k odbornému použití.
3. **UPOZORNĚNÍ:** Federální zákony USA omezují prodej tohoto prostředku pouze lékařům nebo na jejich objednávku. (Rx Only)
4. **Varování: Potenciální karcinogen.** Agentura International Agency for Research on Cancer (IARC) a US National Toxicology Program (NTP) uvádějí benzidin,

sloučeninu blízko 3, 3'-diaminobenzidin-tetrahydrochloridu (DAB), jako známý lidský karcinogen.

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

Tento produkt obsahuje součásti klasifikované následovně podle směrnice (ES) č. 1272/2008:

Tab. 1. Informace o rizicích.

Riziko	Kód	Věta
	H317	Může vyvolat alergickou kožní reakci.
	H319	Způsobuje vážné podráždění očí.
	H350	Může způsobit rakovinu.
	H412	Škodlivý pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky.
	P201	Před použitím si obzortějte speciální pokyny.
	P261	Zamezte vdechování mlhy a par.
	P273	Zabraňte uvolnění do životního prostředí.
	P280	Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranné brýle / obličejový štít / ochranu sluchu.
	P308 + P313	PŘI expozici nebo podezření na ni: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.
	P333 + P313	Při podráždění kůže nebo vyrážce: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.

POSTUP

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

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

Přístroje BenchMark IHC/ISH

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

Doporučené postupy zpracování po obarvení v přístroji

1. Umyjte sklíčka v jemném saponátu na mytí nádobí pro odstranění roztoku s funkcí krycího sklíčka.
2. Sklíčka důkladně opláchněte v destilované vodě pro odstranění veškerého saponátu.
3. Dehydratujte, vyčistěte a pokryjte trvalým fixačním médiem s funkcí krycího sklíčka.

POSTUP KONTROLY KVALITY

Pozitivní kontrola tkáně

S každým provedeným postupem barvení musí být provedena pozitivní kontrola tkáně. Nejvhodnějším laboratorním postupem je uložit řez pro pozitivní kontrolu na stejné sklíčko jako tkáň pacienta. Tento postup pomůže identifikovat stav, kdy nebyla aplikována primární protilátka nebo jiná zásadní reagenty na testované sklíčko s patientským vzorkem. Tkáň se slabým pozitivním zbarvením je pro optimální kontrolu kvality vhodnější. Složky tkáně s pozitivním zbarvením se používají k potvrzení, že byla použita protilátka a že přístroj správně fungoval. Tato tkáň může obsahovat pozitivně i negativně zbarvené buňky nebo složky tkáně a sloužit jako tkáň pro pozitivní i negativní kontrolu. Kontrolními tkáněmi by měly být čerstvé vzorky z pitvy, biopsie nebo operace, zpracované nebo fixované co nejdříve stejným způsobem jako testované řezy. Takové tkáně mohou sledovat všechny kroky postupu, od přípravy tkáně až po barvení. Použití tkáňového řezu fixovaného nebo zpracovaného odlišně od testovaného vzorku poskytne kontrolu všech reagentů a kroků metody kromě fixace a zpracování tkáně.

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

Negativní kontrola tkáně

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

Nevysvětlitelné rozpory

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

Negativní reagenční kontrola

K usnadnění interpretace výsledků je třeba provést pro každý vzorek cyklus s negativní reagenční kontrolou. Negativní reagenční kontrola se používá namísto primární protilátky k vyhodnocování nespecifického zbarvení. Sklíčko má být podle potřeby barveno negativní kontrolou Negative Control Mouse nebo Negative Control Rabbit. Jako alternativu k dříve popsáným negativním reagenčním kontrolám lze používat samotné ředidlo. Doba inkubace pro negativní reagenční kontrolu by měla být stejná jako doba inkubace u primární protilátky.

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

Ověření testu

Před prvním použitím primární protilátky nebo barvicího systému v diagnostické proceduře je třeba ověřit specifitu primární protilátky jejím testováním na řadě tkání se známými imunohistochemickými funkčními charakteristikami reprezentujícími známé pozitivní

a negativní tkáně (viz část Pozitivní kontrola tkáně v metodickém listu k primární protilátce a doporučení ke kontrole kvality College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist,⁵ nebo CLSI Approved Guideline⁶ nebo oba dokumenty). Postupy kontroly kvality je třeba opakovat pro každou novou šarži protilátky, případně když dojde ke změně parametrů testu. Pro ověření testu jsou vhodné tkáně uvedené v části Funkční charakteristiky primární protilátky.

Interpretace výsledků

Detekční souprava *ultraView* Universal DAB Detection Kit způsobí, že se hnědě zbarvený precipitát vysráží v místech antigenu lokalizovaných primární protilátkou. Kvalifikovaný patolog se zkušeností s imunohistochemickými postupy musí před interpretací výsledků nejprve vyhodnotit kontroly a posoudit obarvený produkt. Barvení negativních kontrol musí být zaznamenáno jako první a tyto výsledky musejí být porovnány s obarveným materiálem k ověření, že generovaný signál není výsledkem nespecifických interakcí.

Pozitivní kontrola tkáně

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

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

Negativní kontrola tkáně

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

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

Tkáň pacienta

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

OMEZENÍ

Obecná omezení

1. IHC je vícestupňový diagnostický proces, který vyžaduje specializované školení ve výběru vhodných reagentů výběru tkání, fixaci, zpracování, v přípravě imunohistochemického sklíčka a v interpretaci výsledků barvení.
2. Barvení tkáně závisí na zacházení s tkání a na jejím zpracování před barvením. Nesprávná fixace, zmrazení, rozmrazení, promytí, sušení, zahřívání, řezání nebo kontaminace jinými tkáněmi či tekutinami mohou způsobit artefakty, zachycení protilátek nebo falešně negativní výsledky. Nekonzistentní výsledky mohou být důsledkem odchylek metod fixace a zalévání nebo z inherentních nepravdivostí v tkáni.
3. Nadměrné nebo neúplné kontrastní barvení může narušit správnou interpretaci výsledků.
4. Klinická interpretace pozitivního zbarvení nebo jeho nepřítomnosti musí být vyhodnocena v kontextu klinické anamnézy, morfologie a dalších histopatologických kritérií. Klinický výklad jakéhokoli zbarvení nebo jeho nepřítomnosti musí být doplněn morfologickými studiemi a vhodnými kontrolami, jakož i dalšími diagnostickými testy. Je odpovědností kvalifikovaného patologa seznámit se s protilátkami, reagenty a metodami používanými k interpretaci obarveného přípravku. Barvení musí být prováděno v certifikované a licencované laboratoři pod dohledem patologa, který je odpovědný za kontrolu obarvených sklíček a zajištění adekvátnosti pozitivních a negativních kontrol.

- Společnost VENTANA poskytuje protilátky a reagenty v optimálním ředění pro použití, pokud jsou dodrženy uvedené pokyny. Jakákoli odchylka od doporučených postupů testu může očekávané výsledky zneplatnit. Musejí být použity a zdokumentovány příslušné kontroly. Uživatelé, kteří se odchylují od doporučených postupů testu, musejí přijmout odpovědnost za interpretaci výsledků u pacientů.
- Reagenty mohou v dřívě netestovaných tkáních vykazovat neočekávané reakce. Možnost neočekávaných reakcí nelze zcela vyloučit ani u testovaných skupin tkání, a to z důvodu biologické variability exprese antigenu v novotvarech nebo jiných patologických tkáních.⁷ Se zdokumentovanými neočekávanými reakcemi se obraťte na místní servisní zastoupení.
- Tkáně osob infikovaných virem hepatitidy B a obsahující povrchový antigen hepatitidy B (HBsAg) mohou vykazovat nespecifické zabarvení s křenovou peroxidázou.⁸
- Při použití v blokačních krocích mohou normální séra ze stejného živočišného zdroje jako sekundární antiséra způsobit v důsledku autoprotilátek nebo přírodních protilátek falešně negativní nebo falešně pozitivní výsledky.
- Negativní výsledek, stejně jako u jiných imunohistochemických testů, znamená, že antigen nebyl detekován, nikoli že antigen nebyl v testovaných buňkách nebo tkáních přítomen.

Specifická omezení

- Každý krok postupu pro detekční soupravu byl optimalizován na přístrojích BenchMark IHC/ISH a přednastaven. Vzhledem k různým způsobům fixace a zpracování tkání může být potřeba prodloužit nebo zkrátit dobu inkubace primární protilátky pro individuální vzorky. Doba inkubace primární protilátky závisí na stupni fixace tkáně a může se pohybovat od 8 do 32 minut. Další informace o různých fixacích naleznete v příručce „Immunohistochemistry Principles and Advances“⁹ nebo „Immunomicroscopy: A Diagnostic Tool for the Surgical Pathologist“.¹⁰
- Detekční souprava v kombinaci s primárními protilátkami a příslušenstvím VENTANA detekuje antigen, který přežije rutinní fixaci formalinem, zpracování tkání a řezání.
- Tato detekční souprava je optimalizována pro použití s promývacím roztokem Reaction Buffer, primárními protilátkami, příslušenstvím a přístroji BenchMark IHC/ISH. Použití promývacího roztoku Reaction Buffer je důležité pro správné fungování této detekční soupravy. Uživatelé, kteří se odchylují od doporučených postupů testu, jsou odpovědní za interpretaci výsledků u pacientů za těchto okolností.
- Tato detekční souprava je optimalizována pro použití s roztoky LCS (Predilute) nebo ULTRA LCS (Predilute). LCS je předředěný roztok s funkcí krycího sklička určený k použití jako bariéra mezi vodnými reagenty a vzduchem i jako reagentie k odstranění parafinu z tkáňových vzorků v průběhu procesu odparafinování. Bariéra LCS snižuje odparafinování a poskytuje stabilní vodné prostředí pro reakce IHC nebo reakce hybridizace in situ (ISH), které se provádějí na přístrojích VENTANA.
- Jiné než specifikované doby a teploty inkubace mohou způsobit chybné výsledky. Jakoukoli takovou změnu musí validovat uživatel.
- Všechny detekční soupravy nemusejí být registrovány na každém přístroji. Pro více informací kontaktujte místního zástupce společnosti Roche.

FUNKČNÍ CHARAKTERISTIKY

ANALYTICKÁ VÝKONNOST

Výkonnost detekční soupravy *ultraView* Universal DAB Detection Kit byla vyhodnocována z hlediska preciznosti a dalšími relevantními studii. Veškeré barvení bylo prováděno pomocí protokolu uvedeného v metodickém listu k protilátce na přístrojích BenchMark IHC/ISH, není-li uvedeno jinak.

Studie preciznosti

Testování preciznosti detekční soupravy *ultraView* Universal DAB Detection Kit bylo prováděno barvením řady řezů ze 3 neutrálně pufovaných tkání FFPE s použitím 3 primárních protilátek, myšího IgG (anti-Ki67) barveného na karcinomu prsu, myšího IgM (anti-CD15) barveného na xenogenním štěpu Hodgkinova lymfomu a králíčího IgG (anti-S100) na melanomu s použitím přístrojů BenchMark a BenchMark XT. Všechny primární protilátky byly inkubovány 16 minut a sklička byla kontrastně nabarvena s použitím reagentu Hematoxylin II a následně Bluing Reagent. Všechna sklička barvená primární protilátkou byla vzájemně porovnáována na vhodnost a intenzitu barvení:

- Cykly barvení pro stanovení preciznosti v rámci cyklu (porovnávána stejná primární protilátka barvená na platformě) byly prováděny jedenkrát za den ve 3 oddělených

dnech s použitím 2 různých přístrojů: přístroje BenchMark a BenchMark XT; celkem 6 barvicích cyklů. Preciznost v rámci cyklu pro přístroj BenchMark XT byla 100 % (30 ze 30 skliček na primární protilátku na cyklus, celkem 90 skliček barvených na protilátku ve 3 cyklech) a 100 % (20 ze 20 skliček na primární protilátku na cyklus, celkem 60 skliček na protilátku ve 3 cyklech) pro přístroj BenchMark.

- Preciznost mezi cykly byla vypočítána na základě řady skliček barvených ve 3 cyklech na typ přístroje. Barvicí cykly byly prováděny jeden za den ve 3 oddělených dnech s použitím 2 různých přístrojů: přístroje BenchMark a BenchMark XT. Preciznost mezi cykly pro přístroj BenchMark XT byla 100 % (90 z 90 skliček, 30 skliček pro každou primární protilátku ve 3 oddělených cyklech) a 100 % (60 ze 60 skliček, 20 skliček pro každou primární protilátku ve 3 oddělených cyklech pro každou platformu) pro přístroj BenchMark.
- Preciznost mezi přístroji byla vypočítána na základě řady skliček barvených v 6 cyklech na všech typech přístrojů. Barvicí cykly byly prováděny 1 za den ve 3 oddělených dnech s použitím 2 různých přístrojů: přístroje BenchMark a BenchMark XT. Preciznost mezi přístroji pro detekční soupravu *ultraView* Universal DAB Detection Kit je 100 % (150 ze 150 obarvených skliček, hodnocená sklička zahrnovala všechny 3 primární protilátky).

S detekční soupravou *ultraView* Universal DAB Detection Kit bylo vyvinuto několik primárních protilátek VENTANA. V rámci zkoušek těchto testů byly pro detekční soupravu *ultraView* Universal DAB Detection Kit prokázány následující funkční charakteristiky:

- Preciznost v rámci jednoho cyklu, mezi dny, mezi přístroji a mezi platformami na přístrojích BenchMark GX, BenchMark XT a BenchMark ULTRA.
- Senzitivita a specifita barvení v řadě běžných a neoplastických tkání a cílových tkání specifických pro test
- Preciznost na přístroji BenchMark ULTRA PLUS byla prokázána pomocí reprezentativních testů. Studie zahrnovaly studie preciznosti v rámci cyklu, mezi dny a mezi přístroji. Všechny studie splnily kritéria přijatelnosti.

ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ

- Pokud pozitivní kontrola vykazuje slabší zabarvení, než se očekávalo, je třeba zkontrolovat cyklus ostatních pozitivních kontrol na stejném přístroji, abyste zjistili, zda je to způsobeno primární protilátkou nebo jednou z běžných sekundárních reagentů.
- Pokud je pozitivní kontrola negativní, je třeba ji zkontrolovat, aby bylo zajištěno, že má skličko správný štítek s čárovým kódem. Pokud je skličko správně označeno, je třeba zkontrolovat cyklus ostatních pozitivních kontrol na stejném přístroji, abyste zjistili, zda je to způsobeno primární protilátkou nebo jednou z běžných sekundárních reagentů. Tkáně mohly být nesprávně odebrány, fixovány nebo odparafinovány. Při odběru, skladování a fixaci je třeba dodržovat správný postup.
- Neúplné odstranění parafinu může mít za následek artefakty barvení anebo absenci barvení.
 - Pokud nebyl ze sklička odstraněn veškerý parafin, barvicí cyklus je třeba opakovat s použitím rozšířené možnosti odparafinování, pokud je k dispozici.
 - Alternativně lze provést ruční odparafinování přístroje. Pokud je použita možnost ručního odparafinování, zrušte volbu online odparafinování z barvicího protokolu před vložením skliček do přístroje. Zvláštní péči je třeba věnovat tomu, aby sklička nevyschla před provedením barvicího cyklu.
- Pokud je barvení specifické protilátky příliš intenzivní, cyklus je třeba opakovat s dobou inkubace zkrácenou po 4minutových intervalech do dosažení požadované intenzity barvení.
- Pokud se tkáňové řezy ze sklička vymývají, je třeba sklička zkontrolovat a zajistit, aby byla kladně nabitá.
- Nápravná opatření najdete v uživatelské příručce přístroje v části Postup, případně se obraťte na místní servisní zastoupení.
- Pokud dávkovač reagentie nedávkuje tekutinu, zkontrolujte, jestli v napouštěcí komůrce nebo na menisku nejsou cizorodé materiály či pevné částčky, jako např. vlákna nebo precipitáty. Pokud je dávkovač zablokovaný, dávkovač nepoužívejte a kontaktujte své místní servisní zastoupení. Jinak znovu naplňte dávkovač a miřte jím nad odpadní nádobu, odstraňte víčko trysky a zatlačte na horní stranu dávkovače směrem dolů. Informace o správném použití najdete v souvisejícím metodickém listu ke vkladacímu dávkovači (P/N 760-500).

LITERATURA

1. Elias JM, Gown AM, Nakamura RM, et al. 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 June 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
5. College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2009.
6. (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.
7. Herman GE, Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech Histochem. 1991;66(4):194-199.
8. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen. A possible source of error in immunohistochemistry. Am J Clin Pathol. 1980;73(5):626-32.
9. Roche PC, Hsi ED. Immunohistochemistry-Principles and Advances. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. In: NR Rose, ed. ASM Press; 2002.
10. Taylor C, Cote RJ. Immunomicroscopy: A Diagnostic Tool for the Surgical Pathologist. 2nd Edition. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Company; 1986.

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

Symboly

Společnost Ventana používá následující symboly a znaky nad rámec uvedený v normě ISO 15223-1 (pro USA: více informací naleznete na internetových stránkách elabdoc.roche.com/symbols).



Číslo položky Global Trade



Jedinečný identifikátor prostředku



Označuje subjekt dovážející zdravotnický prostředek do Evropské unie

HISTORIE REVIZÍ

Rev.	Aktualizace
K	Aktualizace oddílu Upozornění a bezpečnostní opatření a odkazů na návod k použití a reference symbolů v oddílech Upozornění a bezpečnostní opatření a Symboly. Aktualizace příslušného oddílu Literatura

DUŠEVNÍ VLASTNICTVÍ

VENTANA, BENCHMARK, *ultraView* a logo VENTANA jsou ochranné známky společnosti Roche. Všechny ostatní ochranné známky jsou majetkem příslušných vlastníků.

© 2023 Ventana Medical Systems, Inc.

KONTAKTNÍ INFORMACE



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

www.roche.com



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

