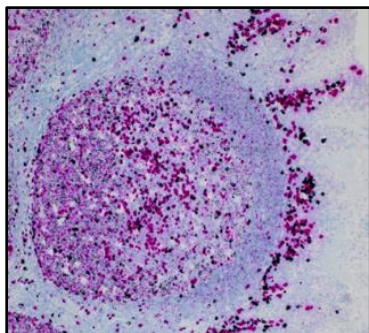


VENTANA Kappa and Lambda Dual ISH mRNA Probe Cocktail

REF

800-6054

08507023001

IVD
 30


Rys.1. Wzór barwienia wskazujący na ekspresję mRNA łańcuchów Kappa i Lambda w tkance migdałka.

PRZEZNACZENIE

Test VENTANA Kappa and Lambda Dual ISH mRNA Probe Cocktail jest przeznaczony do jakościowej detekcji mRNA łańcuchów Kappa i mRNA łańcuchów Lambda w utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie (FFPE) ludzkich próbkach szpiku kostnego i tkankach limfoidalnych wybarwionych w aparacie BenchMark IHC/ISH metodą chromogenicznej hybrydacji in situ (ISH) i uwidocznionych w celu obserwacji pod mikroskopem świetlnym. Test VENTANA Kappa and Lambda Dual ISH mRNA Probe Cocktail jest przeznaczony do wspomagania

identyfikacji chłoniaków z komórek B i nowotworów z komórek plazmatycznych.

Wyniki barwienia przy użyciu testu powinny zostać zinterpretowane przez wykwalifikowanego patomorfologa na podstawie badań histopatologicznych, odpowiednich danych klinicznych i właściwych kontroli.

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

STRESZCZENIE I INFORMACJE OGÓLNE

Ocena klonalności komórek B jest przydatnym narzędziem wspomagającym diagnostykę w przypadku podejrzenia występowania nowotworów z komórek B lub komórek plazmatycznych. Powszechnie stosowana metoda określania klonalności komórek B obejmuje ocenę ekspresji łańcuchów lekkich kappa i lambda w tkance FFPE. Poziomy ekspresji łańcuchów lekkich kappa i lambda w prawidłowych komórkach B i nowotworach z komórek B w znacznym stopniu zależą jednak od etapu różnicowania, dlatego użyteczność wielu dostępnych testów jest ograniczona ze względu na niewystarczającą czułość przy dolnych zakresach ekspresji.

Test VENTANA Kappa and Lambda Dual ISH mRNA Probe Cocktail (test VENTANA K/L Probe Cocktail) zapewnia czułą i dynamiczną detekcję mRNA zarówno łańcuchów lekkich kappa, jak i łańcuchów lekkich lambda na pojedynczym preparacie tkanki FFPE, rozszerzając tym samym użyteczność kliniczną poprzez oznaczanie komórek B na wszystkich etapach dojrzewania i odpowiadających im komórek nowotworowych.

Test VENTANA K/L Probe Cocktail to mieszanina 2'-O-metylowanych oligonukleotydowych sond znakowanych haptenami w formie digoksygeniny (DIG) i benzofurazanu (BF). Każda z sond obejmuje około 80 zasad transkryptu mRNA powiązanego z regionem łańcucha lekkiego kappa lub lambda. Docelowy transkrypt łańcucha kappa jest uwidaczniany w kolorze magenta przy użyciu zestawu VENTANA Magenta ISH DIG Detection Kit, natomiast docelowy transkrypt łańcucha lambda jest uwidaczniany w kolorze czarnym przy użyciu zestawu VENTANA Silver ISH BF Detection Kit. Status restrykcji jest określany poprzez ocenę stosunku sygnałów kappa do sygnałów lambda.

ZASADA DZIAŁANIA

Skład testu VENTANA K/L Probe Cocktail został opracowany do użytku z zestawami VENTANA Magenta ISH DIG Detection Kit, VENTANA Silver ISH BF Detection Kit i ISH TSA Ancillary Kit oraz dodatkowymi odczynnikami w aparacie BenchMark IHC/ISH.

Zestawy detekcyjne zawierają znakowane HRP przeciwciała pierwszorzędowe skierowane przeciwko haptenu, znakowany haptenu odczynnik tyramidowy przeznaczony do wzmocnienia sygnału oraz srebrny chromogen lub chromogen dający kolor magenta. Podczas barwienia metodą ISH sondy znakowane BF i DIG hybrydują do odpowiadających im sekwencji docelowych w tkance.

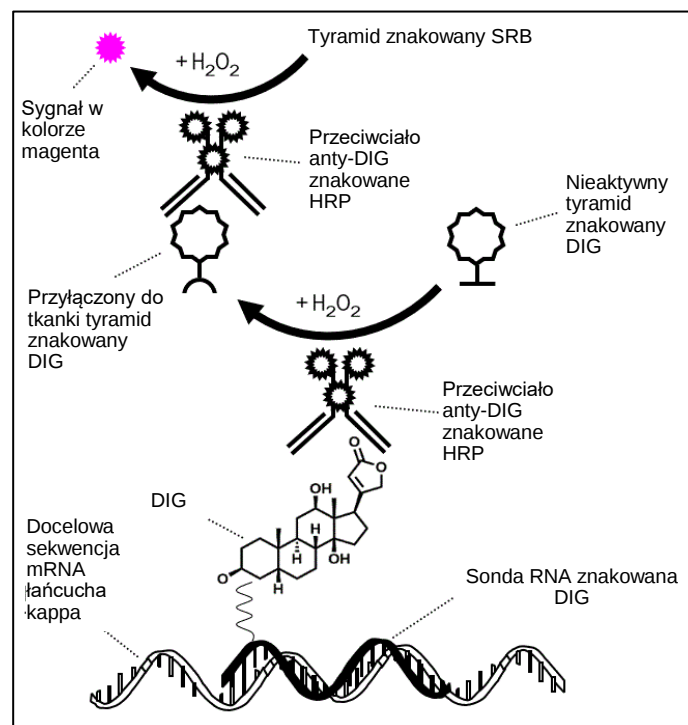
Sonda kappa znakowana DIG jest wykrywana przy użyciu zestawu VENTANA Magenta ISH DIG Detection Kit. Ten system detekcji wykorzystuje znakowane HRP mysie przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko DIG oraz wzmocnienie sygnału przy użyciu tyramidu znakowanego DIG w celu uwidocznienia cząsteczek docelowych jako sygnału w kolorze magenta poprzez kowalencyjne związanie tyramidu znakowanego sulforodaminą B (patrz Rys.2).

Sonda lambda znakowana BF jest wykrywana przy użyciu zestawu VENTANA Silver ISH BF Detection Kit. Ten system detekcji wykorzystuje znakowane HRP mysie przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko BF oraz wzmocnienie sygnału przy użyciu tyramidu znakowanego BF w celu uwidocznienia cząsteczek docelowych jako czarnego sygnału poprzez wytrącenie osadu srebra (patrz Rys.3).

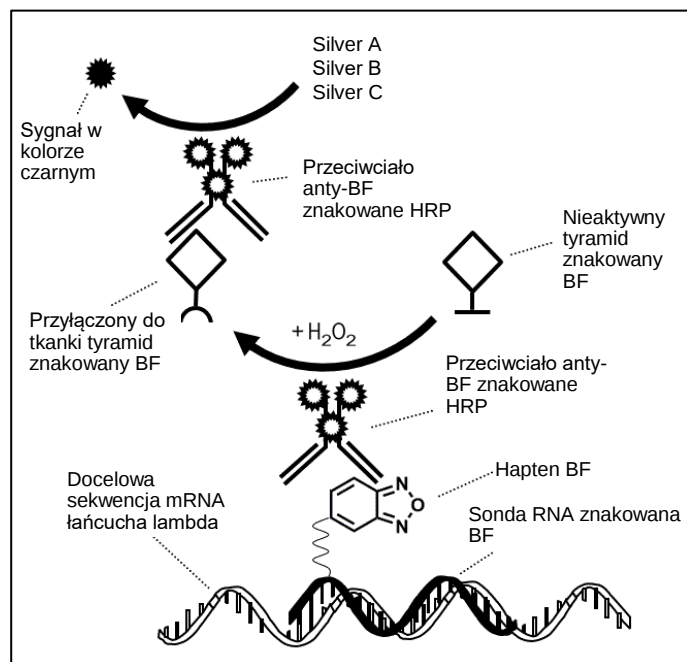
Dodatkowe informacje na temat tych odczynników do detekcji można znaleźć w odpowiednich arkuszach metody.

Protokół barwienia obejmuje wiele kroków inkubacji odczynników przez określony czas w określonej temperaturze. Pod koniec każdego kroku inkubacji aparat BenchMark przepłukuje skrawki w celu usunięcia niezwiązanego materiału i nanosi roztwór płynnego szkiełka nakrywkowego, który minimalizuje parowanie odczynników wodnych z preparatu. Interpretacji wyników dokonuje się przy użyciu mikroskopu świetlnego.

Szczegółowe informacje dotyczące obsługi aparatu zawiera odpowiedni przewodnik użytkownika.



Rys.2. VENTANA Magenta ISH DIG Detection Kit



Rys.3. VENTANA Silver ISH BF Detection Kit

MATERIAŁY I METODY

Dostarczone materiały

Test VENTANA K/L Probe Cocktail dostarczany jest w ilości wystarczającej do przeprowadzenia 30 testów.

Jeden dozownik 6 mL zawiera około 0.120 µg/mL znakowanej sondy w buforze hybrydizacyjnym na bazie formamidu (CH₃NO w stężeniu wynoszącym około 50%).

Odtwarzanie, mieszanie, rozcieńczanie, miareczkowanie

Sonda została zoptymalizowana do użytku w aparatach BenchMark IHC/ISH. Odtwarzanie, mieszanie, rozcieńczanie lub miareczkowanie odczynnika nie jest konieczne. Dalsze rozcieńczanie może prowadzić do pogorszenia jakości barwienia.

Materiały wymagane, ale niedostarczane

W skład dostarczonego zestawu nie wchodzi odczynnik do barwienia, takie jak zestawy detekcyjne lub elementy pomocnicze firmy VENTANA. Nie wszystkie produkty przedstawione w arkuszu metody są dostępne we wszystkich regionach geograficznych. Odpowiednich informacji udzieli lokalny przedstawiciel działu pomocy technicznej.

Wymienione niżej odczynniki i materiały mogą być potrzebne do przeprowadzenia barwienia, ale nie są dostarczane:

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

19. Sprzęt laboratoryjny do ogólnego użytku

Przechowywanie i stabilność

Produkt, bezpośrednio po odebraniu i zawsze, gdy nie jest używany, należy przechowywać w temperaturze 2–8°C. Nie zamrażać. Sondy można użyć bezpośrednio po wyjęciu z lodówki.

W celu zapewnienia właściwego dozowania odczynnika i stabilności sondy po każdym użyciu na dozownik należy założyć zatyczkę i niezwłocznie umieścić go w lodówce w pozycji pionowej.

Na każdym dozowniku sondy podana jest data ważności. Prawidłowo przechowywany odczynnik zachowuje stabilność do daty podanej na etykiecie. Nie należy używać odczynnika po upływie daty ważności.

Pobieranie próbek i przygotowanie ich do analizy

Do stosowania z testem VENTANA K/L Probe Cocktail nadają się rutynowo przygotowane tkanki FFPE. Zalecany środkiem do utrwalania tkanek jest obojętna zbuforowana formalina (NBF) w stężeniu 10% (czas utrwalania od 6 do 72 godzin)¹. W przypadku tkanek, dla których wymagany jest krok odpapniania, wykazano, że test VENTANA K/L Probe Cocktail jest zgodny z odczynnikami do odpapniania na bazie HCl, kwasu mrówkowego oraz EDTA, jednak jego zgodność w dużym stopniu zależy od stężenia i czasu stosowania odczynnika. Niektóre odczynniki do odpapniania mogą być niezgodne z sondą. W Tabelach 5 i 6 przedstawiono określone przetestowane środki utrwalające i odczynniki do odpapniania. Przed użyciem należy zwalidować czas stosowania odczynnika lub środka.

Próbki tkanek należy pociąć na skrawki o grubości 4 µm i umieścić na dodatnio naładowanych szkiełkach mikroskopowych (Superfrost™ Plus). Przed barwieniem w aparacie BenchMark IHC/ISH preparaty należy odsączyć lub osuszyć w celu usunięcia nadmiaru wody z obszaru pomiędzy szkiełkiem a tkanką. Grubość skrawków tkanek, metoda utrwalania, niepełne/długotrwałe utrwalanie lub procesy specjalne, np. odpapnianie preparatów ze szpiku kostnego, mogą być przyczyną zmienności wyników.

Preparaty należy niezwłocznie wybarwić, ponieważ jakość docelowego RNA w ciętych skrawkach tkanek może z czasem ulegać pogorszeniu. Badania wewnętrzne wykazały, że preparaty ciętych skrawków przechowywane w temperaturze pokojowej mogą zachować stabilność przez co najmniej 60 dni.

Dodatnio naładowane szkiełka mogą być podatne na działanie czynników środowiskowych, co może doprowadzić do nieprawidłowego wybarwienia preparatów metodą ISH (np. brak barwienia lub wybarwienia kontrastowego w tkance). Od przedstawiciela firmy Roche można uzyskać kopię dokumentu „Impacts of environmental stress on various histology slide types”, ułatwiającego zrozumienie sposobu stosowania szkiełek tych typów.

Zalecane jest, aby podczas badania próbek pochodzących od pacjentów jednocześnie badać wszystkie preparaty kontrolne.

Należy pamiętać, że w przypadku długotrwałej ekspozycji na światło sygnały srebra lub w kolorze magenta mogą z czasem zmienić odcień lub powoli zanikać. Nie powinno to mieć wpływu na standardową praktykę kliniczną, jednak gdy preparaty nie są używane, należy je przechowywać z dala od bezpośredniego światła.

OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

1. Do stosowania w diagnostyce in vitro (IVD)
2. Wyłącznie do użytku profesjonalnego.
3. **PRZESTROGA:** W Stanach Zjednoczonych prawo federalne zezwala na sprzedaż tego wyrobu wyłącznie lekarzom lub na zlecenie lekarza (Rx Only).
4. Nie wykonywać większej liczby testów niż liczba określona na etykiecie.
5. Materiały pochodzenia ludzkiego lub zwierzęcego należy traktować jako materiały stanowiące zagrożenie biologiczne i usuwać je z zachowaniem właściwych środków ostrożności. W przypadku narażenia należy przestrzegać wytycznych określonych w dyrektywach wydanych przez właściwe organy.^{2,3}
6. Podczas pracy z odczynnikami należy stosować uzasadnione środki ostrożności. Unikać kontaktu odczynników z oczami, skórą i błonami śluzowymi. Podczas pracy z materiałami o domniemanym działaniu rakotwórczym lub materiałami toksycznymi należy nosić rękawiczki jednorazowe i odpowiednią odzież ochronną.
7. W przypadku kontaktu odczynników z wrażliwymi miejscami splukiwać obficie dużą ilością wody. Unikać wdychania odczynników.
8. Przed rozpoczęciem cyklu w aparacie upewnić się, że pojemnik na zlewki jest pusty. W przypadku niepodjęcia tego środka ostrożności może dojść do przepełnienia pojemnika na zlewki i zaistnienia ryzyka poślizgnięcia się i upadku użytkownika.

- Unikać skażenia mikrobiologicznego odczynników ze względu na możliwość otrzymania nieprawidłowych wyników.
- Aby uzyskać więcej informacji dotyczących użycia tego wyrobu, należy zapoznać się z przewodnikiem użytkownika aparatu BenchMark IHC/ISH oraz arkuszami metody wszystkich wymaganych elementów. Arkusze te można znaleźć pod adresem navifyportal.roche.com.
- W celu uzyskania informacji na temat zalecanej metody usuwania produktu należy skontaktować się z władzami lokalnymi i/lub krajowymi.
- Oznakowanie dotyczące bezpieczeństwa produktu jest przede wszystkim zgodne z wytycznymi GHS UE. Karta charakterystyki jest dostępna na życzenie profesjonalnego użytkownika.
- W celu zgłoszenia podejrzenia wystąpienia poważnych incydentów związanych z tym wyrobem należy skontaktować się z lokalnym przedstawicielem firmy Roche i właściwym organem państwa członkowskiego lub kraju, którego rezydentem jest użytkownik.

Ten produkt zawiera elementy sklasyfikowane w określony poniżej sposób zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 1272/2008:

Tab. 1. Informacje o zagrożeniach.

Zagrożenie	Kod	Zwrot
 Niebezpieczeństwo	H351	Podejrza się, że powoduje raka
	H360D	Może działać szkodliwie na dziecko w łonie matki.
	H373	Może powodować uszkodzenie narządów poprzez długotrwałe lub powtarzane narażenie.
	P201	Przed użyciem zapoznać się ze specjalnymi środkami ostrożności.
	P202	Nie używać przed zapoznaniem się i zrozumieniem wszystkich środków bezpieczeństwa.
	P260	Nie wdychać mgły ani par.
	P280	Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy/ochronę słuchu.
	P308 + P313	W przypadku narażenia lub styczności: Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.
	P501	Zawartość/pojemnik usuwać, przekazując je do zatwierdzonej placówki utylizacji odpadów.

PROCEDURA BARWIENIA

Test VENTANA KL Probe Cocktail opracowano do stosowania w aparacie BenchMark IHC/ISH razem z zestawami detekcyjnymi i akcesoriami firmy VENTANA. Parametry procedur zautomatyzowanych mogą być wyświetlane, drukowane i edytowane zgodnie z procedurą opisaną w przewodniku użytkownika aparatu.

Procedura „U Kappa Lambda DISH PRB-CKT” służy do barwienia tkanek w aparatach BenchMark ULTRA i ULTRA Plus.

Tab. 2. Zalecane warunki protokołu barwienia. W zależności rodzaju próbki lub preferencji badacza można wybrać opcję krótkiej obróbki wstępnej. Krótka obróbka wstępna powoduje obniżenie intensywności wszystkich swoistych sygnałów, w tym sygnału jądrowego generowanego dla genu IGLL5 (Immunoglobulin Lambda Like Polypeptide 5; patrz część „INTERPRETACJA WYNIKÓW”).

Barwienie dostępne do wyboru	Ustawienie
Krótką obróbkę wstępną	Niewybrane

Aparaty BenchMark IHC/ISH

- Na preparat nakleić etykietę z kodem kreskowym odpowiadającą protokołowi, który ma zostać wykonany.
- Dozownik sondy, odpowiednie dozowniki zestawów detekcyjnych oraz wymagane odczynniki dodatkowe umieścić na tacy na odczynniki, a następnie umieścić załadowaną tacę w aparacie.
- Sprawdzić płyny i wyrzucić odpady.

- Umieścić preparaty w aparacie.
- Rozpocząć cykl barwienia.
- Po zakończeniu cyklu barwienia wyjąć preparaty z aparatu.
- Przystąpić do przeprowadzenia zalecanych procedur postępowania po obróbce w urządzeniu.

Zalecane procedury postępowania po obróbce w urządzeniu

Uwaga: W celu zapewnienia całkowitego odwodnienia preparatów należy często wymieniać roztwory w wanienkach z etanolem; można również dodać dodatkową, trzecią kąpiel w 100-procentowym etanolu.

- Aby usunąć roztwór Liquid Coverslip, preparaty kolejno przepłukać w dwóch roztworach łagodnego płynu do mycia naczyń (nie używać płynu przeznaczonego do użycia w zmywarkach automatycznych).
- Dokładnie płukać preparaty wodą destylowaną przez około 1 minutę. Strząsnąć nadmiar wody.
- Przenieść preparaty do kąpeli w 90-procentowym etanolu na około 1 minutę.
- Przenieść preparaty do kąpeli w 100-procentowym etanolu na około 1 minutę.
- Przenieść preparaty do drugiej kąpeli w 100-procentowym etanolu na około 1 minutę.
- Przenieść preparaty do kąpeli w ksylenie na około 1 minutę.
- Przenieść preparaty do drugiej kąpeli w ksylenie na około 1 minutę.
- Na preparat nałożyć szkło nakrywkowe. Należy pamiętać, że niektóre środki do zatapiania nie są zgodne z testem VENTANA K/L Probe Cocktail (patrz część Ograniczenia metody).

PROCEDURA KONTROLI JAKOŚCI

Dodatnia kontrola tkankowa

Zalecane jest, aby na każdym szkiełku z preparatem pacjenta uwzględnić kontrolną tkankę migdałka odpowiednią dla danego laboratorium w celu zapewnienia, że test działa zgodnie z oczekiwaniami. Prawidłowa tkanka migdałka wykazuje pełen zakres ekspresji łańcuchów kappa i lambda, natomiast podścielisko może posłużyć jako element wykazujący barwienie ujemne. Wyraźne obniżony sygnał lub nadmierne wybarwienie tła wskazuje, że mógł wystąpić błąd związany z badanym preparatem. W takim przypadku preparatu nie należy poddawać ocenie.

Tab. 3. Kryteria oceny barwienia kontrolnej tkanki migdałka.

Element barwienia	Akceptowalne barwienie	Nieakceptowalne barwienie
Znane barwienie dodatnie	Punktowy odczyn cytoplazmatyczny w postaci zabarwionych kropek w niemalże wszystkich komórkach B w strefie płaszczu, wyraźnie widoczny przy powiększeniu 10X, przy fizjologicznym stosunku K/L (2–3:1)	Wyraźne obniżenie intensywności barwienia w większości komórek B w strefie płaszczu, wymagające powiększenia 20X w celu uwidocznienia
Znane barwienie ujemne	Brak lub niewielka ilość losowo rozproszonych obszarów barwienia w podścielisku	Nadmierne nieswoiste barwienie tła nabłonka płaskiego lub podścieliska, utrudniające obliczenie stosunku K/L

Marker integralności RNA

Skuteczność testu VENTANA K/L Probe Cocktail może być obniżona w przypadku tkanek o naruszonej integralności mRNA. RNA jest podatny na degradację, dlatego powszechnie ekspresjonowany transkrypt cząsteczki U6 jest często wykorzystywany jako zamiennik do oceny degradacji materiału docelowego w próbkach tkanek. Sonda VENTANA U6 BF Probe (nr kat. 760-7062 / 08773866001) nie jest wymagana do oceny statusu restrikcji, ale można ją wykorzystać do oceny integralności RNA u pacjentów, w przypadku których na preparacie K/L uzyskano niewystarczający sygnał. Negatywne barwienie przy użyciu sondy VENTANA U6 BF Probe wskazuje, że konieczne może być użycie nowej próbki pacjenta.

Próbki pacjentów należy wybarwić przy użyciu sondy VENTANA U6 BF Probe z zastosowaniem tej samej procedury i tych samych warunków obróbki wstępnej jak w przypadku barwienia przy użyciu testu VENTANA K/L Probe Cocktail.

Sonda do kontroli ujemnej

W celu oceny tła uzyskanego podczas detekcji w próbce pacjenta można używać odczynnika ISH Negative Control (nr kat. 780-2902 / 05272165001) zamiast sondy VENTANA K/L Probe Cocktail. Użycie sondy do kontroli ujemnej nie jest wymagane do zinterpretowania statusu restrykcji.

Niewyjaśnione rozbieżności

Niewyjaśnione rozbieżności w tkankach kontrolnych należy niezwłocznie zgłosić lokalnemu przedstawicielowi działu pomocy technicznej. Jeśli kontrola jakości nie spełnia wymogów, wyniki pacjentów są nieważne. Zidentyfikować i rozwiązać problem, a następnie powtórzyć test dla próbek pacjentów (patrz część Rozwiązywanie problemów).

Weryfikacja badania

Przed pierwszym użyciem odczynnika w procedurze diagnostycznej należy zweryfikować działanie odczynnika poprzez wybarwienie serii próbek, dla których znana jest charakterystyka wyników badań ISH (patrz zalecenia dotyczące kontroli jakości opracowane w ramach programu College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program i zawarte w dokumencie Anatomic Pathology Checklist⁴ oraz wytyczne CLSI Approved Guideline⁵). Te procedury kontroli jakości należy powtarzać dla każdej nowej partii odczynników, każdorazowo w przypadku zmiany parametrów testu oraz zmiany sposobu przygotowania próbki.

INTERPRETACJA WYNIKÓW

Przed przystąpieniem do interpretacji wyników wykwalifikowany patomorfolog z doświadczeniem w mikroskopowej interpretacji próbek patomorfologicznych musi dokonać oceny kontroli. Więcej materiałów ułatwiających ocenę barwienia próbek pacjentów oraz próbek kontrolnych zawiera „Podręcznik interpretacji wyników uzyskanych za pomocą testu VENTANA Kappa and Lambda Dual ISH mRNA Probe Cocktail przeznaczonych do oceny tkanek chłoniaków z komórek B i nowotworów z komórek plazmatycznych” (nr kat. 102202118PL). Cechy morfologiczne próbki pacjenta i odnośne dane kliniczne muszą zostać zinterpretowane przez wykwalifikowanego patomorfologa.

Przy użyciu testu docelowe transkrypty łańcucha kappa barwią się na kolor magenta, a docelowe transkrypty łańcucha lambda barwią się na kolor czarny. Typowy wzór barwienia dodatniego w przypadku komórek B to punktowy odczyn cytoplazmatyczny przybierający formę częściowego lub pełnego pierścienia, natomiast w przypadku komórek plazmatycznych zazwyczaj obserwuje się całkowite wypełnienie cytoplazmy spowodowane dużą ilością mRNA.

Wzór barwienia jest interpretowany jako stosunek komórek wykazujących ekspresję łańcuchów kappa do komórek wykazujących ekspresję łańcuchów lambda umożliwiając określenie statusu restrykcji. W ramach prawidłowej odpowiedzi immunologicznej zazwyczaj wytwarzana jest poliklonalna populacja zawierająca dużą ilość łańcuchów kappa o stosunku łańcuchów kappa do lambda wynoszącym w przybliżeniu 2–3:1. W przypadku testu VENTANA K/L Probe Cocktail stosunek większy niż 4:1 jest interpretowany jako restrykcja łańcucha kappa, a stosunek mniejszy niż 1:2 jest interpretowany jako restrykcja łańcucha lambda (patrz Tab. 4 i 0).

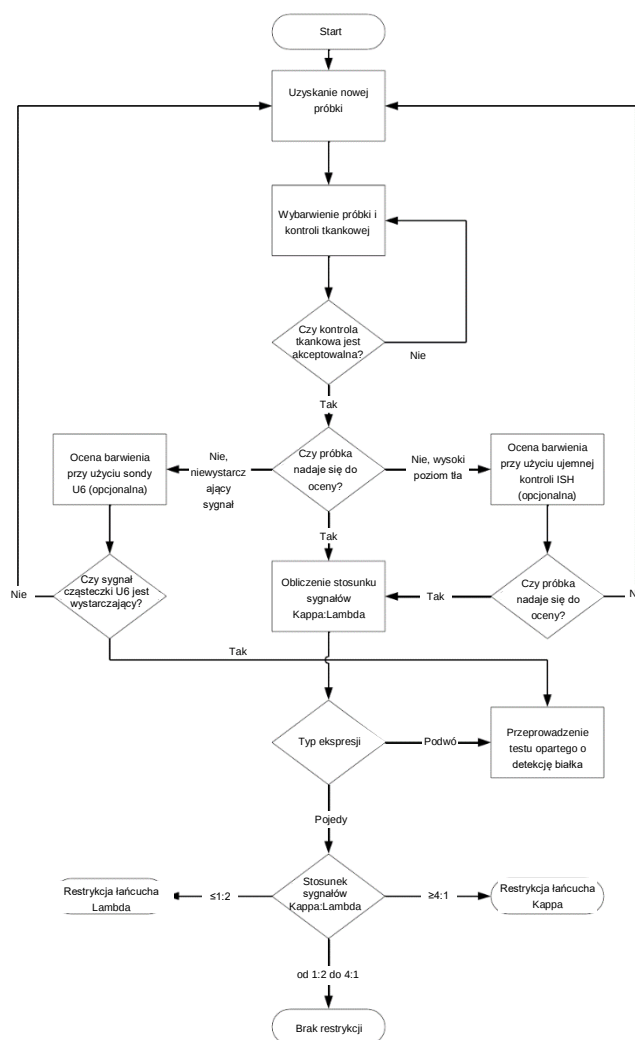
Transkrypt genu IGLL5 jest w 100% homologiczny z sekwencją łańcucha lekkiego lambda. Z powodu tej homologii test VENTANA K/L Probe Cocktail może barwić mRNA genu IGLL5. Ekspresja genu IGLL5 głównie ma charakter jądrowy, a jej sygnał uwidacznia się w formie punktowego barwienia w postaci zabarwionych na czarno kropek. Na podstawie badań wewnętrznych stwierdzono, że w około 15% przypadków obserwuje się wyraźny sygnał IGLL5, którego nie należy brać pod uwagę podczas określania statusu restrykcji.

Na podstawie badań wewnętrznych stwierdzono, że około 5% przypadków chłoniaka i szpiczaka jednocześnie wykazywało obecność mRNA zarówno łańcuchów kappa, jak i łańcuchów lambda w cytoplazmie tych samych komórek. W takich przypadkach ocena klonalności metodami ISH jest niemożliwa i należy przeprowadzić test oparty o detekcję białka. Sygnały wskazujące na koekspresję nie są obserwowane w przypadku tkanek, w których nie występuje restrykcja.

Tab. 4. Kryteria oceny służące do określania statusu restrykcji.

Status kliniczny	Stosunek Kappa:Lambda
Restrykcja łańcucha Kappa	Równy lub większy od wartości 4:1
Brak restrykcji	Mniejszy niż wartość 4:1 i większy od wartości 1:2
Restrykcja łańcucha Lambda	Równy lub mniejszy od wartości 1:2

Rys.4. Drzewo decyzyjne przeznaczone do interpretacji próbek pacjentów i próbek kontrolnych wybarwionych przy użyciu testu VENTANA K/L Probe Cocktail.



OGRANICZENIA METODY

Ograniczenia ogólne

1. Metoda ISH to wieloetapowy proces, który wymaga odbicia specjalistycznego szkolenia w zakresie doboru odpowiednich odczynników, przygotowania próbek, obróbki, przygotowania preparatu oraz interpretacji wyników.
2. Wybarwienie tkanki zależy od sposobu postępowania z tkanką i obróbki tkanki przed barwieniem. Nieprawidłowe utrwalanie, zamrażanie, rozmrażanie, przemywanie, suszenie, podgrzewanie, wykonywanie skrawków lub zanieczyszczenie próbki innymi tkankami lub płynami może prowadzić do powstania artefaktów, wychwytywania odczynników lub uzyskania fałszywie ujemnych lub fałszywie dodatnich wyników. Nieśpójne wyniki mogą być skutkiem różnic w metodach utrwalania i zatapiania lub naturalnych nieregularności w obrębie tkanki.
3. Nadmierne lub niepełne wybarwienie kontrastowe może utrudnić właściwą interpretację wyników.
4. Interpretacja kliniczna wybarwienia musi być dokonywana w kontekście danych z wywiadu klinicznego, cech morfologicznych tkanki oraz innych kryteriów histopatologicznych. Wykwalifikowany patomorfolog ma obowiązek zapoznać się z działaniem odczynników oraz metodami stosowanymi w celu wybarwienia preparatu. Barwienie musi być wykonywane w certyfikowanym, licencjonowanym laboratorium pod nadzorem patomorfologa odpowiedzialnego za ocenę wybarwionych preparatów i zapewnienie adekwatności kontroli.

- Odczynniki firmy VENTANA są dostarczane w rozcieńczeniu optymalnym do użytku, gdy przestrzegane są dostarczone instrukcje. Wszelkie odchylenia od zalecanych procedur badawczych mogą doprowadzić do unieważnienia oczekiwanych wyników. Do badania należy włączyć odpowiednie kontrole i udokumentować ten fakt. Użytkownicy, którzy odstępują od zalecanych procedur badawczych, muszą przyjąć odpowiedzialność za interpretację wyników badań pacjenta.
- Odczynniki mogą wykazywać nieoczekiwane reakcje w uprzednio niebadanych tkankach. Nie można całkowicie wyeliminować możliwości wystąpienia nieoczekiwanych reakcji nawet w przebadanych grupach tkanek ze względu na biologiczną zmienność tkanek. W przypadku wystąpienia nieoczekiwanych reakcji należy udokumentować ten fakt i skontaktować się z lokalnym przedstawicielem działu pomocy technicznej.

Szczególne ograniczenia

- Niektóre środki utrwalające mogą być niezgodne z testem VENTANA K/L Probe Cocktail. Środkiem utrwalającym zalecanym przez firmę Ventana jest formalina NBF w stężeniu 10% (czas utrwalania od 6 do 72 godzin). W Tab. 5 przedstawiono przetestowane środki utrwalające. Przed użyciem należy zwalidować czas utrwalania.
- Wykazano, że test VENTANA K/L Probe Cocktail jest zgodny z odczynnikami do odpapniania na bazie HCl, kwasu mrówkowego oraz EDTA, jednak jego zgodność w dużym stopniu zależy od stężenia i czasu stosowania odczynnika. Niektóre odczynniki do odpapniania mogą być niezgodne z sondą. W Tabeli 6 przedstawiono określone przetestowane odczynniki. Przed użyciem należy zwalidować czas odpapniania.
- Test VENTANA K/L Probe Cocktail nie jest przeznaczony do diagnozowania chłoniaków z komórek B lub reaktywnych procesów z udziałem komórek B w próbkach z gruboigłowej biopsji szpiku kostnego w związku z degradacją mRNA powodowaną przez wiele powszechnie stosowanych roztworów do odpapniania.
- Na podstawie badań wewnętrznych stwierdzono, że około 5% przypadków chłoniaka i szpiczaka jednocześnie wykazywało obecność mRNA zarówno łańcuchów kappa, jak i łańcuchów lambda w cytoplazmie tych samych komórek. W takich przypadkach ocena klonalności metodami ISH jest niemożliwa i należy przeprowadzić test oparty o detekcję białka.
- Test VENTANA K/L Probe Cocktail opracowano do stosowania ze skrawkami tkanek o grubości 4 µm. W przypadku skrawków o mniejszej lub większej grubości może dochodzić do nieprawidłowego barwienia i/lub utraty tkanki.
- Tkanki należy wybarwić w ciągu 60 dni od wykonania skrawków. W przypadku tkanek wybarwionych po upływie 60 dni może dochodzić do utraty barwienia.
- Niektóre środki do zatapiania mogą być niezgodne z chromogenami wykorzystywanymi w teście VENTANA K/L Probe Cocktail. Środki do zatapiania niektórych marek mogą w szczególności prowadzić do utlenienia, wyblaknięcia i/lub zaniku srebrnego sygnału. W Tabeli 7 przedstawiono przetestowane środki do zatapiania.
- Wybarwione preparaty należy przechowywać w ciemności, gdy nie są używane, aby zapobiec blaknięciu lub zmianie odcienia srebrnego chromogenu i chromogenu dającego kolor magenta.
- Sonda, w połączeniu z zestawami detekcyjnymi i akcesoriami firmy VENTANA, umożliwia detekcję sekwencji kwasu nukleinowego, która przetrwa rutynowe procesy utrwalania w formalinie, obróbki tkanek i wykonywania skrawków. Jak w przypadku każdego testu, wynik ujemny oznacza, że swoista sekwencja docelowa nie została wykryta w próbce tkanki — nie można jednak wykluczyć obecności sekwencji docelowej w pierwotnej, nieutrwalonej tkance.
- Ze względu na zmienność obróbki próbek lub preferencje patomorfologa może być konieczne uwzględnienie w protokole opcji krótkiej obróbki wstępnej. Zmiana ta musi zostać zwalidowana przez użytkownika. Użytkownicy, którzy odstępują od zalecanych procedur badawczych, są odpowiedzialni za interpretację otrzymanych w ten sposób wyników badań pacjentów.
- Sonda została zoptymalizowana do użytku z odczynnikami firmy VENTANA w aparatach BenchMark IHC/ISH. Użytkownicy, którzy odstępują od zalecanych procedur badawczych, są odpowiedzialni za interpretację otrzymanych w ten sposób wyników badań pacjenta.
- Niektóre testy mogą nie być zarejestrowane na każdym aparacie. Aby uzyskać więcej informacji, należy skontaktować się z lokalnym przedstawicielem działu pomocy technicznej.

Tab. 5. Zgodność środków utrwalających.

Środek utrwalający	Zgodny?
Obojętna zbuforowana formalina w stężeniu 10%	Tak
Obojętna zbuforowana formalina w stężeniu 20%	Tak
Niezbuforowana formalina w stężeniu 10%	Tak
Bouin's	Tak
Formalina z cynkiem	Tak
Środek AFA (mieszanina alkoholu-formalina-kwas octowy)	Nie
Prefer	Nie
Formalina z alkoholem	Nie
Diff-Quik	Nie

Tab. 6. Zgodność przetestowanych odczynników do odpapniania.

Odczynnik do odpapniania	Producent	Typ	Zgodny?
Decal Decalcifier	StatLab	HCl/EDTA	Tak
Decalcifying Solution B	Fisher Scientific	HCl/EDTA	Tak
Formical 2000	StatLab	Kwas mrówkowy/EDTA	Tak
Immunocal	StatLab	Kwas mrówkowy	Tak

Tab. 7. Zgodność środków do zatapiania.

Środek do zatapiania	Producent	Zgodny?
Acrytol	Electron Microscopy Sciences	Tak
Consul-Mount	Epredia	Tak
Cytoseal XYL	Richard Allan Scientific	Tak
Cytoseal 60	Richard Allan Scientific	Tak
Dako Mounting Medium	Dako	Tak
Diamount	Diapath	Tak
DPX Mountant	CDH	Tak
Entellan	Merck	Tak
GlycerGel	Dako	Tak
HE600	Roche	Tak
HistoCore Spectra CV X1	Leica	Tak
Histomount	National Diagnostics	Tak
MicroMount	Leica	Tak
Canada Balsam	Elabscience	Tak
Permunt	Electron Microscopy Sciences	Tak
Pertex	Histolab	Tak
Epredia Synthetic Mountant	Epredia	Tak
Sub-X Mounting	Leica	Tak
Tissue-Tek Film	Sakura	Tak
Entellan New	Merck	Nie
Eukitt	Merck	Nie

CHARAKTERYSTYKA WYNIKÓW

Skuteczność testu VENTANA K/L Probe Cocktail oceniono w badaniach analitycznych i klinicznych. Wszystkie cykle barwienia wykonywano zgodnie z protokołem testu VENTANA K/L Probe Cocktail (który przedstawia Tab. 2) w aparacie BenchMark IHC/ISH (o ile nie wskazano inaczej).

SKUTECZNOŚĆ KLINICZNA

Badanie porównania metod polegające na ocenie skuteczności testu VENTANA Kappa/Lambda Dual ISH mRNA Probe Cocktail wykonywanego w aparacie BenchMark ULTRA (stosowanego w połączeniu z zestawami VENTANA Silver ISH BF i Magenta ISH DIG Detection Kit) w odniesieniu do cytometrii przepływowej podczas określania statusu restrykcji Kappa/Lambda

Zewnętrzne, wieloośrodkowe badanie zostało przeprowadzone w celu oceny zgodności wyników testu VENTANA K/L Probe Cocktail i cytometrii przepływowej podczas określania statusu restrykcji łańcuchów lekkich w próbkach tkanek limfoidalnych i szpiku kostnego. W trzech ośrodkach klinicznych w ramach badań przesiewowych oceniono łącznie 1019 przypadków pod kątem ich potencjalnego włączenia do badania. W ośrodkach klinicznych 869 z tych przypadków wybarwiono przy użyciu testu VENTANA K/L Probe Cocktail w aparacie BenchMark ULTRA, a 811 z 869 wybarwionych przypadków wykazało akceptowalne wybarwienie H&E i zostało ocenionych pod kątem barwienia K/L przez patomorfologa zajmującego się klasyfikacją przypadków do badania. Łącznie do badania zaklasyfikowano 742 przypadki, które spełniły odpowiednie kryteria. Każdy z maksymalnie 4 patomorfologów z ośrodków ocenił wszystkie zaklasyfikowane przypadki.

Skuteczność testu VENTANA K/L Dual ISH oceniano na podstawie procentowej zgodności wyników testu ISH i uzyskanych w przeszłości wyników cytometrii przepływowej dla każdej kategorii restrykcji (restrykcja łańcuchów kappa, restrykcja łańcuchów lambda lub brak restrykcji) oraz na podstawie procentowej zgodności wszystkich wyników ogółem (OPA) dla wszystkich przypadków.

Tab. 8. Zgodność statusów restrykcji uzyskanych przy użyciu testu VENTANA K/L Probe Cocktail i cytometrii przepływowej dla wszystkich badaczy rozpatrywanych łącznie.

Wynik testu VENTANA K/L Dual ISH	Wynik cytometrii przepływowej			
	Restrykcja łańcucha Kappa	Restrykcja łańcucha Lambda	Brak restrykcji	Łącznie
Restrykcja łańcucha Kappa	824	16	23	863
Restrykcja łańcucha Lambda	16	742	18	776
Brak restrykcji	76	37	810	923
Łącznie	916	795	851	2562

Tab. 9. Zbiorcza zgodność statusów restrykcji K/L uzyskanych przy użyciu testu VENTANA K/L Dual ISH i cytometrii przepływowej (dla wszystkich przypadków, które nadawały się do oceny).

Kategoria restrykcji	Procentowa zgodność (n/N)	95-procentowy CI
Restrykcja łańcucha Kappa	90.0% (824/916)	86.7–93.2%
Restrykcja łańcucha Lambda	93.3% (742/795)	90.1–96.2%
Brak restrykcji	95.2% (810/851)	93.3–96.8%
Ogółem	92.7% (2376/2562)	91.1–94.2%

SKUTECZNOŚĆ ANALITYCZNA

Czułość i swoistość

W ramach badań czułości i swoistości test VENTANA K/L Probe Cocktail został wykorzystany do wybarwienia panelu składającego się z prawidłowych i nowotworowych tkanek FFPE. Wybarwione preparaty zostały ocenione przez patomorfologa jako dodatnie/ujemne względem sygnałów łańcuchów kappa i lambda. Dla żadnego z wybarwionych przypadków nie zaobserwowano nieoczekiwanego barwienia.

Tab. 10. Tkanki prawidłowe wybarwione przy użyciu testu VENTANA K/L Probe Cocktail. Tkanki oznaczone gwiazdką wykazywały rozproszone, normalne wybarwienie limfocytów B.

Tkanka	Liczba dodatnich/wszystkich przypadków
Mózgowie	0/1
Mózg	0/3
Mózdzek	0/4
Nadnercze*	0/4
Jajnik*	0/4
Trzustka*	0/4
Węzeł chłonny	15/15
Gruczoł przytarczowy	0/3
Przysadka mózgowa	0/3
Jądro*	0/4
Tarczycza	0/4
Sutek*	0/5
Śledziona*	0/4
Migdałek	5/5
Mięsień szkieletowy*	0/3
Nerw obwodowy	0/4
Pęcherz moczowy	0/4
Grasica*	0/4
Szpik kostny	5/5
Pluco*	0/5
Serce	0/4
Przełyk*	0/4
Żołądek*	0/4
Jelito cienkie*	0/4
Okrężnica*	0/6
Wątroba*	0/4
Gruczoł ślinowy*	0/4
Nerka*	0/5
Gruczoł krokowy*	0/4
Szyjka macicy	0/6
Skóra	0/4
Mezotelium	0/4
Odbytnica	0/1
Łożysko	0/3
Macica*	0/4

Tab. 11. Tkanki nowotworowe wybarwione przy użyciu testu VENTANA K/L Probe Cocktail.

Tkanka patologiczna	Liczba dodatnich/wszystkich przypadków
Gwiaździk (mózgowia)	0/1
Oponiak (mózgowia)	0/3
Gruzołakorak (głowy i szyi)	0/1
Czerniak (jamy nosowej)	0/1
Rak nosowo-gardłowy (nosogardzieli)	0/1
Rak płaskonabłonkowy (języka)	0/1
Gruzołak (nadnercza)	0/1
Rak korowonadnerczowy (nadnercza)	0/1
Rak z komórek sygnetywatychnych okrężnicy, przerzutowy (jajnika)	0/1
Gruzołakorak (jajnika)	0/2
Guz komórek warstwy ziarnistej (jajnika)	0/1
Gruzołakorak (trzustki)	0/1
Nasieniak (jąder)	0/1
Gruzołak (tarczycy)	0/3
Rak pęcherzykowy (tarczycy)	0/1
Gruzołakorak pęcherzykowy, brodawkowaty (tarczycy)	0/1
Inwazyjny rak przewodowy (sutka)	0/3
Włóknkogruzołak (sutka)	0/2
Kostniakomięsak (kości)	0/1
Chrzęstniakomięsak (kości)	0/1
Gruzołakorak (płuca)	0/1
Rak drobnokomórkowy (płuca)	0/1
Rak płaskonabłonkowy (płuca)	0/1
Rak przewodu pokarmowego, przerzutowy (płuca)	0/1
Rak płaskonabłonkowy (przetyku)	0/2
Gruzołakorak (żółądka)	0/3
Gruzołak (jelita cienkiego)	0/1
Gruzołakorak (jelita cienkiego)	0/1
Gruzołak (okrężnicy)	0/1
Gruzołakorak (okrężnicy)	0/3
Gruzołakorak okrężnicy, przerzutowy (wątroby)	0/1
Rak wątrobowokomórkowy (wątroby)	0/4
Gruzołak wielopostaciowy (przysadki gruczołu ślinowego)	0/1

Tkanka patologiczna	Liczba dodatnich/wszystkich przypadków
Rak gruczołowato-torbielowaty (gruczołu ślinowego)	0/1
Rak jasnokomórkowy (nerki)	0/2
Gruzołakorak (gruczołu krokowego)	0/2
Gruzołakorak (macicy)	0/2
Rak płaskonabłonkowy (szyjki macicy)	0/2
Rak płaskonabłonkowy (skóry)	0/1
Chłoniak anaplastyczny z dużych komórek (węzła chłonnego)	0/2
Chłoniak limfoblastyczny z komórek T	0/1
Chłoniak z komórek T, ziarniniak grzybiasty	0/1
Chłoniak z komórek T, chłoniak Lennerta	0/2
Chłoniak z komórek T, powiązany z enteropatią	0/5
Chłoniak z komórek T, angioimmunoblastyczny	0/6
Chłoniak z komórek T, BNO	0/20
Chłoniak z komórek NK/T, typ nosowy	0/5
Chłoniak z komórek NK/T (jądra)	0/1
Chłoniak Hodgkina	0/1
Chłoniak z komórek B, BNO	1/1
Chłoniak grudkowy	7/7
Chłoniak z komórek płaszcza	4/4
Chłoniak rozlany z dużych komórek B	11/11
Nowotwory z komórek plazmatycznych	4/4
Chłoniak strefy brzeżnej	3/3
Przewlekła białaczka limfocytowa/chłoniak z małych limfocytów	5/5
Rak nabłonka dróg moczowych (pęcherza moczowego)	0/2
Rak płaskonabłonkowy przetyku, przerzutowy (węzła chłonnego)	0/1
Gruzołakorak (odbytnicy)	0/3

Powtarzalność w ramach cyklu, precyzja pośrednia między dniami i precyzja pośrednia między aparatami

Powtarzalność i precyzję testu VENTANA K/L Probe Cocktail oceniono poprzez wybarwienie panelu składającego się z 26 przypadków w wielu aparatach BenchMark ULTRA. Panel składał się z przypadków próbek prawidłowych i nowotworowych i reprezentował zakres różnych statusów restrikcji i poziomów ekspresji mRNA. Preparaty zostały poddane randomizacji, a następnie ocenione pod kątem statusu restrikcji przez patomorfologa nieznanego rozpoznania dla poszczególnych przypadków.

W przypadku powtarzalności w ramach cyklu skrawki tkanek (w dwóch powtórzeniach) wykonane z każdej próbki zostały wybarwione w 7 niezależnych cyklach barwienia wykonywanych w aparatach. Powtarzalność została określona na podstawie wartości OPA wszystkich preparatów, obliczonej w oparciu o modalny status restrikcji wyznaczony na poziomie przypadku.

W przypadku precyzji pośredniej między dniami skrawki tkanek (w dwóch powtórzeniach) wykonane z każdej próbki zostały wybarwione przy użyciu jednego aparatu BenchMark ULTRA w 5 nienastępujących bezpośrednio po sobie dniach. Precyzja pośrednia została określona na podstawie wartości OPA wszystkich preparatów, obliczonej w oparciu o modalny status restrykcji wyznaczony na poziomie przypadku.

W przypadku precyzji pośredniej między aparatami skrawki tkanek (w dwóch powtórzeniach) wykonane z każdej próbki zostały wybarwione przy użyciu 3 różnych aparatów BenchMark ULTRA. Precyzja pośrednia została określona na podstawie wartości OPA wszystkich preparatów, obliczonej w oparciu o modalny status restrykcji wyznaczony na poziomie przypadku.

Tab. 12. Wyniki badań powtarzalności i precyzji pośredniej przeprowadzonych przy użyciu platformy BenchMark ULTRA.

Badanie	n/N	OPA	95-procentowy CI
Powtarzalność w ramach cyklu	178/178	100%	97.9–100.0%
Precyzja pośrednia między dniami	256/256	100%	98.5–100.0%
Precyzja pośrednia między aparatami	156/156	100%	97.6–100.0%

Zgodność wyników między platformami BenchMark

Zgodność wyników testu VENTANA K/L Probe Cocktail między platformami oceniono poprzez wybarwienie panelu składającego się z 59 przypadków w aparatach BenchMark ULTRA i ULTRA PLUS. Panel składał się z przypadków próbek prawidłowych i nowotworowych i reprezentował zakres różnych statusów restrykcji i poziomów ekspresji mRNA. Preparaty zostały poddane randomizacji, a następnie ocenione pod kątem statusu restrykcji przez patomorfologa nieznającego rozpoznać dla poszczególnych przypadków.

Tab. 13. Wyniki porównania zgodności między platformami BenchMark ULTRA i ULTRA PLUS.

Badanie	n/N	OPA	95-procentowy CI
Zgodność między platformami	59/59	100%	93.9–100.0%

Precyzja badacza

Precyzję wyników uzyskiwanych przez jednego badacza i między badaczami dla przypadków wybarwionych przy użyciu testu VENTANA K/L Probe Cocktail oceniono poprzez porównanie ocen statusów restrykcji dokonanych przez 3 patomorfologów dla panelu składającego się z 60 wybarwionych preparatów. Panel składał się z przypadków próbek prawidłowych i nowotworowych i reprezentował zakres różnych statusów restrykcji i poziomów ekspresji mRNA. Na potrzeby badania preparaty zostały poddane randomizacji, a następnie ocenione pod kątem statusu restrykcji przez 3 patomorfologów nieznających rozpoznać dla poszczególnych przypadków. Po 2-tygodniowej przerwie wybarwione preparaty zostały ponownie poddane randomizacji i ocenione pod kątem statusu restrykcji przez tych samych 3 patomorfologów.

Podczas badania precyzji wyników uzyskiwanych przez jednego badacza odczyty danego patomorfologa z 1. oceny przypadków zostały porównane z odczytami tego samego patomorfologa z 2. oceny przypadków. Precyzja badacza została określona na podstawie wartości OPA obliczonej z wykorzystaniem zbiorczych danych zgodności wszystkich 3 patomorfologów.

W przypadku precyzji między badaczami oceny poszczególnych patomorfologów były porównywane z ocenami pozostałych 2 badaczy. Precyzja między badaczami została określona na podstawie wartości OPA wszystkich ocen dokonanych przez 3 patomorfologów, obliczonej w oparciu o modalny status restrykcji wyznaczony na poziomie przypadku.

Tab. 14. Wyniki badania precyzji badacza.

Badanie	n/N	% OPA	95-procentowy CI
Precyzja badacza	180/180	100%	97.9–100.0%
Precyzja między badaczami	352/360	97.8%	94.4–100.0%

Precyzja między seriami

Precyzję między seriami testu VENTANA K/L Probe Cocktail oceniono poprzez wybarwienie panelu składającego się z 26 przypadków przy użyciu 3 partii produkcyjnych koktajlu sond. Panel składał się z przypadków próbek prawidłowych i nowotworowych i reprezentował zakres różnych statusów restrykcji i poziomów ekspresji mRNA. Preparaty zostały poddane randomizacji, a następnie ocenione pod kątem statusu restrykcji przez patomorfologa nieznającego rozpoznać dla poszczególnych przypadków.

Precyzja między seriami została określona na podstawie wartości OPA wszystkich preparatów, obliczonej w oparciu o modalny status restrykcji wyznaczony na poziomie przypadku.

Tab. 15. Wyniki badania precyzji między seriami.

Badanie	n/N	% OPA	95-procentowy CI
Precyzja między seriami	78/78	100%	95.3–100.0%

Odtwarzalność międzylaboratoryjna

Badanie odtwarzalności międzylaboratoryjnej zostało przeprowadzone w celu oceny odtwarzalności wyników testu VENTANA K/L Probe Cocktail podczas określania statusu restrykcji. Na potrzeby badania w każdym z 3 zewnętrznych laboratoriów panel składający się z 28 przypadków barwiono w aparacie BenchMark ULTRA przez 5 nienastępujących bezpośrednio po sobie dni w okresie wynoszącym 21 dni. Panel składał się z przypadków próbek prawidłowych i nowotworowych (8 przypadków restrykcji łańcucha kappa, 8 przypadków restrykcji łańcucha lambda i 12 przypadków braku restrykcji) i reprezentował zakres różnych statusów restrykcji i poziomów ekspresji mRNA.

Preparaty zostały poddane randomizacji, a następnie niezależnie ocenione pod kątem statusu restrykcji przez 2 patomorfologów (na jeden ośrodek, co łącznie dawało 6 patomorfologów) nieznających rozpoznać dla poszczególnych przypadków. Preparaty wybarwione przy użyciu testu VENTANA K/L Probe Cocktail były interpretowane razem z wykonanymi z tego samego przypadku preparatami wybarwionymi H&E i odczynnikiem ISH Negative Control.

Odtwarzalność oceniano na podstawie procentowej zgodności poszczególnych ocen restrykcji każdego przypadku i odpowiadających temu przypadkowi poszczególnych statusów modalnych dla każdej kategorii restrykcji (restrykcji łańcuchów kappa, restrykcji łańcuchów lambda lub braku restrykcji) oraz na podstawie procentowej zgodności wszystkich wyników ogółem dla wszystkich przypadków (Tab. 16).

Dodatkowo określono średnią procentową zgodność porównań parami dla każdego statusu restrykcji między ośrodkami, badaczami i dniami (Tab. 17).

Tab. 16. Wyniki zgodności między poszczególnymi ocenami i modalnymi statusami restrykcji (KRPA = procentowa zgodność restrykcji łańcuchów kappa, LRPA = procentowa zgodność restrykcji łańcuchów lambda, NRPA = procentowa zgodność braku restrykcji)

Kategoria restrykcji	Procentowa zgodność (n/N)	95-procentowy CI
KRPA	98.8% (237/240)	97.5–99.6%
LRPA	99.6% (239/240)	98.8–100.0%
NRPA	97.5% (351/360)	96.1–99.0%
OPA	98.5% (827/840)	97.7–99.2%

Tab. 17. Wyniki procentowej zgodności porównań parami dla każdego statusu restrykcji między ośrodkami, badaczami i dniami — wszystkie wyniki rozpatrywane ogółem.

Sposób dobierania par	Kategoria restrykcji	Zgodność	95-procentowy CI
Między ośrodkami	Restrykcja łańcucha Kappa	95.6%	89.3–98.1%
	Restrykcja łańcucha Lambda	98.8%	96.2–100.0%
	Brak restrykcji	96.6%	94.2–98.4%
	OPA	96.9%	95.2–98.6%
Między badaczami	Restrykcja łańcucha Kappa	95.5%	89.2–98.1%
	Restrykcja łańcucha Lambda	98.8%	96.2–100.0%
	Brak restrykcji	96.6%	94.2–98.4%
	OPA	96.9%	95.1–98.6%
Między dniami	Restrykcja łańcucha Kappa	95.5%	89.2–98.1%
	Restrykcja łańcucha Lambda	98.8%	96.2–100.0%
	Brak restrykcji	96.6%	94.2–98.4%
	OPA	96.9%	95.1–98.6%

ROZWIĄZYWANIE PROBLEMÓW

Tab. 18. Rozwiązywanie problemów.

Problem	Rozwiązanie
Brak/słabe lub nieodpowiednie tło we wstępnie zakwalifikowanej tkance migdałka służącej jako kontrola na szkiełku	1. Sprawdzić, czy preparat został oznaczony właściwą etykietą z kodem kreskowym oraz czy wybrano sondę odpowiednią dla wykonywanego protokołu. Jeśli w protokole wykorzystywana jest opcja krótkiej obróbki wstępnej, należy upewnić się, że tkanka migdałka została zakwalifikowana do testu z zastosowaniem protokołu o tych samych warunkach. 2. Upewnić się, że używany skrawek ma 4 µm grubości oraz zastosowano zgodny środek do zatapiania. 3. Upewnić się, że dozowniki odczynników nie są zatłkane lub puste. Sprawdzić działanie dozownika, kierując go nad pojemnik na zlewki i mocno naciskając górną część cylindra. Z dozownika powinna wypłynąć pojedyncza kropla. Jeśli dozownik jest zatłkany lub zawarta w nim ciecz nie jest dozowana w prawidłowy sposób, należy skontaktować się z przedstawicielem działu pomocy technicznej i zaprzestać używania dozownika. 4. Jeśli kontrole na pozostałych szkiełkach z preparatami wybarwionymi przy użyciu testu VENTANA K/L Probe Cocktail, które były barwione w tym samym czasie, wybarwiły się w odpowiedni sposób, mogło dojść do niepowodzenia barwienia spowodowanego nieznaną przyczyną związaną z konkretnym preparatem. Przygotować nowy preparat i wybarwić go ponownie. 5. Jeśli dla pozostałych preparatów wybarwionych przy użyciu testu VENTANA K/L Probe Cocktail w tym samym czasie również uzyskano nieodpowiednie barwienie, w przypadku którego nie można było zidentyfikować żadnej oczywistej przyczyny niepowodzenia (np. właściwości barwienia zakwalifikowanego błočka tkanki migdałka zmieniły się podczas cięcia błočka), należy skontaktować się z lokalnym przedstawicielem działu pomocy.
Brak barwienia lub słabe barwienie w próbce pacjenta przy odpowiednim barwieniu we wstępnie zakwalifikowanej tkance migdałka służącej jako kontrola na szkiełku	1. Upewnić się, że używany skrawek ma 4 µm grubości oraz, że do obróbki próbki zastosowano zgodny środek do utrwalania i/lub odpowiednią metodę odwapniania. Nieprawidłowy proces odwapniania może zniszczyć docelowy RNA. 2. Jeśli preparat został wybarwiony przy użyciu protokołu uwzględniającego opcję krótkiej obróbki wstępnej, ponowne wybarwienie z zastosowaniem standardowej obróbki wstępnej może spowodować uzyskanie ciemniejszego sygnału. 3. Wybarwić preparat przygotowany z próbki pacjenta przy użyciu sondy VENTANA U6 BF Probe, aby ocenić integralność mRNA. W przypadku zaobserwowania utraty mRNA może być wymagana nowa próbka pacjenta. 4. Brak naruszenia integralności mRNA może wskazywać na brak ekspresji mRNA łańcuchów Kappa i/lub Lambda lub poziom ekspresji utrzymujący się poniżej wartości progowej detekcji testu.

Problem	Rozwiązanie
Nieodpowiednie tło w próbce pacjenta przy odpowiednim barwieniu we wstępnie zakwalifikowanej tkance migdalka służącej jako kontrola na szkiełku	1. Upewnić się, że używany skrawek ma 4 µm grubości oraz, że do obróbki próbki zastosowano zgodny środek do utrwalania i/lub odpowiednią metodę odwapniania. 2. Jeśli preparat został wybarwiony przy użyciu zalecanego protokołu, ponowne wybarwienie z zastosowaniem krótkiej obróbki wstępnej może zredukować sygnał tła. 3. Wybarwić preparat przygotowany z próbki pochodzącej od pacjenta przy użyciu odczynnika ISH Negative Control, aby ocenić tło uzyskane przy użyciu zestawu detekcyjnego. Pomiąć tło uzyskane podczas detekcji na preparacie wybarwionym przy użyciu testu VENTANA K/L Probe Cocktail w celu zinterpretowania statusu restrykcji. 4. Jeśli tło nadal utrudnia określenie statusu restrykcji, może być wymagany nowy preparat.
Sygnał IGLL5 zakłóca ocenę sygnału Kappa/Lambda	1. Jeśli preparat został wybarwiony przy użyciu zalecanego protokołu, ponowne wybarwienie z zastosowaniem krótkiej obróbki wstępnej może zredukować sygnał IGLL5. 2. Jeśli sygnał IGLL5 nadal utrudnia interpretację sygnału kappa/lambda, w celu oceny statusu restrykcji może być wymagane przeprowadzenie testu opartego o detekcję białka.
Tkanki są wypłukiwane ze szkiełek.	Upewnić się, że zastosowano szkiełka Superfrost™ Plus.

BIBLIOGRAFIA

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

UWAGA: W tym dokumencie jako separator dziesiętny do zaznaczenia granicy między częścią całkowitą a ułamkową cyfry dziesiętnej zawsze używana jest kropka. Nie jest używany separator tysięcy.

Podsumowanie dotyczące bezpieczeństwa i skuteczności można znaleźć pod adresem: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>

Symbole

Firma Ventana stosuje określone poniżej symbole i oznaczenia dodatkowo do symboli wymienionych w normie ISO 15223-1 (dotyczy Stanów Zjednoczonych: więcej informacji można znaleźć pod adresem elabdoc.roche.com/symbols):



Globalny Numer Jednostki Handlowej



Niepowtarzalny kod identyfikacyjny wyrobu



Wskazuje podmiot odpowiedzialny za import wyrobu medycznego do Unii Europejskiej

WŁASNOŚĆ INTELEKTUALNA

VENTANA, BENCHMARK, HYBREADY, ULTRAVIEW oraz logo VENTANA są znakami towarowymi firmy Roche. Wszystkie pozostałe nazwy produktów i znaki towarowe stanowią własność odpowiednich właścicieli.

© 2024 Ventana Medical Systems, Inc.

DANE KONTAKTOWE



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

www.roche.com

