

ultraView Universal DAB Detection Kit

REF

760-500

05269806001

IVD
 250

PRZEZNACZENIE

Zestaw *ultraView* Universal DAB Detection Kit to wolny od biotyny system przeznaczony do pośredniej detekcji przeciwciał pierwszorzędowych: mysich przeciwciał IgG, mysich przeciwciał IgM i przeciwciał króliczych. Zestaw jest przeznaczony do identyfikacji metodą immunohistochemiczną cząsteczek wykrywanych w skrawkach tkanek utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie oraz w zamrożonych skrawkach tkankowych, wybarwionych w aparacie BenchMark IHC/ISH.

Wynik powinien zostać zinterpretowany 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

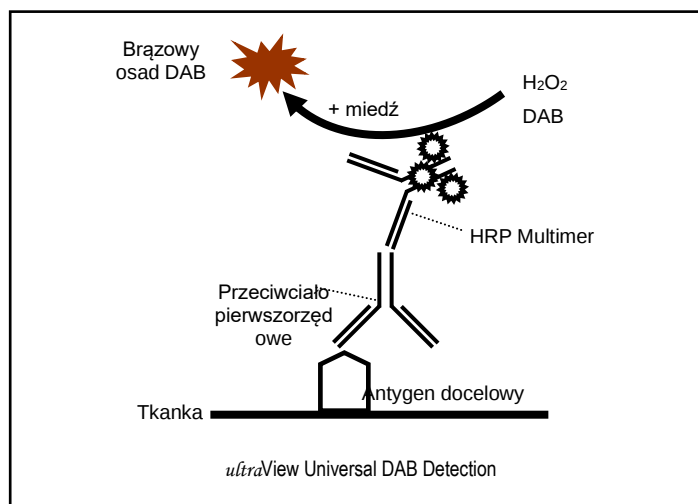
Immunohistochemia (IHC) to technika stosowana w laboratoriach do celów diagnostycznych. Działanie techniki IHC opiera się na wykorzystaniu swoistych przeciwciał pierwszorzędowych do zlokalizowania antygenów w utrwalonych lub zamrożonych skrawkach tkankowych, do których te przeciwciała zostają przyłączone. Przyłączenie się przeciwciała do antygenu jest wizualizowane pośrednią metodą detekcji. W najczęściej stosowanych technikach metod pośrednich wykorzystywane jest przeciwciało drugorzędowe skierowane przeciwko przeciwciału pierwszorzędowemu danego gatunku oraz enzym z odpowiednim układem substrat-chromogen. Taka kombinacja powoduje wytrącenie barwnego osadu w miejscu wiązania swoistych przeciwciał. Wykorzystywana w zestawie *ultraView* Universal DAB Detection Kit metoda pośrednia umożliwia uwidocznienie swoistych przeciwciał przyłączonych do antygenów poprzez wytrącenie brązowego osadu.

ZASADA DZIAŁANIA

Zestaw *ultraView* Universal DAB Detection Kit umożliwia detekcję swoistych przeciwciał pierwszorzędowych mysich i króliczych przyłączonych do antygenu w skrawkach tkanek utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie (FFPE) lub zamrożonych skrawkach tkankowych. Swoiste przeciwciało jest lokalizowane przez koktajl przeciwciał drugorzędowych znakowanych enzymem. Następnie kompleks jest uwidaczniany za pomocą substratu nadtlenu wodoru i chromogenu DAB (tetrachlorowodorek 3,3'-diaminobenzyny), które powodują wytrącenie brązowego osadu łatwego do obserwacji pod mikroskopem świetlnym.

Protokół barwienia obejmuje wiele kroków inkubacji odczynników przez określony czas w określonej temperaturze. Pod koniec każdego kroku inkubacji aparat BenchMark IHC/ISH przepłukuje skrawki w celu usunięcia niezwiązanego materiału i nanosi płynne szkło nakrywkowe, które minimalizuje parowanie odczynników wodnych z preparatu.¹ Interpretacji wyników dokonuje się przy użyciu mikroskopu świetlnego. Wyniki mogą wspomagać rozpoznanie różnicowe procesów patofizjologicznych, które mogą (ale nie muszą) być powiązane z poddawaniem ocenie antygenem.

Szczegółowe informacje dotyczące obsługi aparatu zawiera odpowiedni przewodnik użytkownika. Na Rysunku 1 przedstawiono zasadę działania pośredniej metody detekcji.



Rys. 1. Działanie zestawu *ultraView* Universal DAB Detection Kit

MATERIAŁY I METODY

Dostarczone materiały

Zestaw *ultraView* Universal DAB Detection Kit zawiera odczynniki w ilości wystarczającej do przeprowadzenia 250 testów.

Jeden dozownik 25 mL	Odczynnik <i>ultraView</i> Universal DAB Inhibitor zawiera roztwór nadtlenu wodoru w stężeniu 3%.
Jeden dozownik 25 mL	Odczynnik <i>ultraView</i> Universal HRP Multimer zawiera koktajl przeciwciał znakowanych HRP (kozie przeciwciała skierowane przeciwko mysim przeciwciałom IgG, kozie przeciwciała skierowane przeciwko mysim przeciwciałom IgM i kozie przeciwciała skierowane przeciwko przeciwciałom króliczym) (około 55 µg/mL) w buforze z dodatkiem białka i środka ProClin 300, będącego konserwantem.
Jeden dozownik 25 mL	Odczynnik <i>ultraView</i> Universal DAB Chromogen zawiera zastrzeżony roztwór stabilizatora z dodatkiem tetrachlorowodorku 3,3'-diaminobenzyny w stężeniu 0.2% (w/v) i zastrzeżonego środka konserwującego.
Jeden dozownik 25 mL	Odczynnik <i>ultraView</i> Universal DAB H ₂ O ₂ zawiera roztwór buforu fosforanowego z dodatkiem nadtlenu wodoru w stężeniu 0.04%.
Jeden dozownik 25 mL	Odczynnik <i>ultraView</i> Universal DAB Copper zawiera bufor octanowy z dodatkiem siarczanu miedzi (5 g/L) i zastrzeżonego konserwantu.

Odtwarzanie, mieszanie, rozcieńczanie, miareczkowanie

Zestaw detekcyjny został zoptymalizowany do użytku w aparatach BenchMark IHC/ISH. Odtwarzanie, mieszanie, rozcieńczanie lub miareczkowanie odczynników wchodzących w skład zestawu nie jest konieczne. Dalsze rozcieńczanie może doprowadzić do utraty barwienia.

Materiały wymagane, ale niedostarczane

W skład dostarczonego zestawu nie wchodzi odczynniki do barwienia, takie jak przeciwciała pierwszorzędowe firmy VENTANA, ani elementy pomocnicze, takie jak ujemne i dodatnie kontrolne preparaty tkankowe.

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 z zestawem detekcyjnym:

1. Przeciwciało pierwszorzędowe
2. Odczynnik do kontroli ujemnej

3. Tkanki do kontroli dodatniej i ujemnej (zalecane typy tkanek wymieniono w arkuszu metody przeciwciała)
4. Amplification Kit (nr kat. 760-080 / 05266114001)
5. Protease 1 (nr kat. 760-2018 / 05266688001)
6. Protease 2 (nr kat. 760-2019 / 05266696001)
7. Protease 3 (nr kat. 760-2020 / 05266718001)
8. Hematoxylin (nr kat. 760-2021 / 05266726001)
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. Cell Conditioning Solution 1 (CC1) (nr kat. 950-124 / 05279801001)
13. Cell Conditioning Solution 2 (CC2) (nr kat. 950-123 / 05279798001)
14. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (nr kat. 950-224 / 05424569001)
15. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC2) (nr kat. 950-223 / 05424542001)
16. Antibody Diluent (nr kat. 251-018 / 05261899001)
17. EZ Prep Concentrate (10X) (nr kat. 950-102 / 05279771001)
18. LCS (Predilute) (nr kat. 650-010 / 05264839001)
19. ULTRA LCS (Predilute) (nr kat. 650-210 / 05424534001)
20. Aparat BenchMark IHC/ISH
21. Szkiełka mikroskopowe, naładowane dodatnio
22. Szkiełka nakrywkowe i metoda nakładania szkiełek nakrywkowych odpowiednia do przykrycia całej tkanki
23. 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. Użytkownik jest zobowiązany do walidacji warunków przechowywania różniących się od tych określonych w arkuszu metody. Zestawu detekcyjnego można użyć bezpośrednio po wyjęciu go z lodówki.

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

Każdy zestaw detekcyjny jest oznaczony datą ważności. Prawidłowo przechowywany produkt zachowuje stabilność do daty podanej na etykiecie. Nie używać produktu po upływie daty ważności dla zalecanej metody przechowywania. Nie stwierdzono jednoznacznych oznak, które mogłyby wskazywać na niestabilność tego produktu; dlatego podczas badania nieznanymi preparatami należy jednocześnie wykonać badanie kontroli dodatniej i ujemnej. W razie wystąpienia oznak wskazujących na niestabilność odczynnika należy niezwłocznie skontaktować się z lokalnym przedstawicielem działu pomocy technicznej.

Pobieranie próbek i przygotowanie ich do analizy

Do stosowania z zestawem *ultraView Universal DAB Detection Kit* i aparatami BenchMark IHC/ISH nadają się rutynowo przygotowane tkanki FFPE (patrz część „Materiały wymagane, ale niedostarczane”). Zalecanym środkiem do utrwalania tkanek jest obojętna zbuforowana formalina (NBF) w stężeniu 10%.² Grubość skrawków tkanek, metoda utrwalania, niepełne/długotrwałe utrwalenie lub procesy specjalne, np. odwapnienie preparatów ze szpiku kostnego, mogą być przyczyną zmienności wyników.

Tkanki należy pociąć na skrawki o grubości odpowiedniej dla używanego przeciwciała pierwszorzędowego (patrz arkusz metody odpowiedniego przeciwciała) i umieścić na dodatnio naładowanych szkiełkach mikroskopowych. Przed rozpoczęciem wypiekania szkiełka ze skrawkami tkanek należy pozostawić w pozycji pionowej w temperaturze pokojowej na co najmniej 15 minut w celu odsączenia nadmiaru wody spod skrawka. Preparaty można suszyć/podgrzewać w piecu przez 1 godzinę w temperaturze 60°C ± 5°C lub suszyć na powietrzu w temperaturze 37°C przez maksymalnie 24 godziny. Suszenie i podgrzewanie preparatów ma na celu osuszenie tkanki po zatopieniu preparatu i wzmocnienie adhezji tkanki do szkiełka. Ograniczenia dotyczące podgrzewania przedstawiono w arkuszu metody przeciwciała pierwszorzędowego. Zbyt długie podgrzewanie tkanek może doprowadzić do obniżenia dostępności antygenu.

Prawidłowo utrwalone i zatopione tkanki, w których zachodzi ekspresja antygenu, pozostają stabilne, jeśli będą przechowywane w chłodnym miejscu (15–25°C). W wytycznej 42CFR493.1259 (b) normy Clinical Laboratory Improvement Act (CLIA) z 1988 r. określono wymóg nakazujący laboratorium przechowywanie preparatów przez co najmniej dziesięć lat od daty badania oraz przechowywanie blozków próbek przez co najmniej dwa lata od daty badania. Każde laboratorium powinno walidować

stabilność preparatów ciętych skrawków tkanek zgodnie z wewnętrznymi procedurami i środowiskowymi warunkami przechowywania preparatów.

Do stosowania z zestawem *ultraView Universal DAB Detection Kit* i aparatami BenchMark IHC/ISH nadają się również rutynowo przygotowane, zamrożone tkanki. Zalecane jest utrwalanie tkanek przez 10 minut w zimnym acetonie. Długotrwałe utrwalanie lub procesy specjalne, np. odwapnienie preparatów ze szpiku kostnego, mogą być przyczyną zmienności wyników.

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 lekarzowi lub na zlecenie lekarza. (Rx Only)
4. **Ostrzeżenie: Możliwy czynnik rakotwórczy.** Benzydyna, związek ściśle powiązany z tetrachlorowodorokiem 3,3'-diaminobenzydyny (DAB), widnieje na listach stworzonych przez Międzynarodową Agencję Badań nad Rakiem (International Agency for Research on Cancer, IARC) oraz w ramach amerykańskiego programu National Toxicology Program (NTP) jako substancja o znanym działaniu rakotwórczym na ludzi.
5. Nie wykonywać większej liczby testów niż liczba określona na etykiecie.
6. W tym roztworze jako środek konserwujący zastosowano roztwór ProClin 300. Uznano go za środek drażniący, a jego kontakt ze skórą może powodować uczulenie. Podczas pracy z produktem należy stosować uzasadnione środki ostrożności. Unikać kontaktu odczynników z oczami, skórą i błonami śluzowymi. Stosować odpowiednią odzież i rękawice ochronne.
7. Materiały pochodzenia ludzkiego lub zwierzęcego należy traktować jako materiały stanowiące potencjalne zagrożenie biologiczne i usuwać je z zachowaniem właściwych środków ostrożności. W przypadku narażenia należy przestrzegać wytycznych określonych w dyrektywach wydanych przez właściwe organy.^{3,4}
8. 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.
9. W przypadku kontaktu odczynników z wrażliwymi miejscami splukiwać obficie dużą ilością wody. Unikać wdychania odczynników.
10. 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.
11. Unikać skażenia mikrobiologicznego odczynników ze względu na możliwość otrzymania nieprawidłowych wyników.
12. 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.
13. W celu uzyskania informacji na temat zalecanej metody utylizacji produktu należy skontaktować się z władzami lokalnymi i/lub krajowymi.
14. Oznakowanie dotyczące bezpieczeństwa produktu jest przede wszystkim zgodne z wytycznymi GHS UE. Karta charakterystyki jest dostępna na życzenie profesjonalnego użytkownika.
15. 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	H317	Może powodować reakcję alergiczną skóry.
	H319	Działa drażniąco na oczy.
	H350	Może powodować raka.
	H412	Działa szkodliwie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki.

Zagrożenie	Kod	Zwrot
	P201	Przed użyciem zapoznać się ze specjalnymi środkami ostrożności.
	P261	Unikać wdychania mgły lub par.
	P273	Unikać uwolnienia do środowiska.
	P280	Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy/ochronę słuchu.
	P308 + P313	W przypadku narażenia lub stycznosci: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.
	P333 + P313	W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry lub wysypki: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.

PROCEDURA

Zestaw *ultraView* Universal DAB Detection Kit opracowano do stosowania w aparatach BenchMark IHC/ISH razem z przeciwciałami pierwszorzędowymi i elementami pomocniczymi firmy VENTANA. Parametry procedur zautomatyzowanych mogą być wyświetlane, drukowane i edytowane zgodnie z procedurą opisaną w przewodniku użytkownika aparatu. Pozostałe parametry pracy aparatu zostały ustawione fabrycznie.

Poniżej opisano procedury barwienia w aparatach BenchMark IHC/ISH. Szczegółowe instrukcje i dodatkowe opcje protokołów zawiera przewodnik użytkownika. Konieczność wykonania etapu Cell Conditioning podczas przygotowania próbki zależy od używanego przeciwciała. Informacje na ten temat można znaleźć w arkuszu metody przeciwciała.

Aparaty BenchMark IHC/ISH

1. Na preparat nakleić etykietę z kodem kreskowym odpowiadającą protokołowi, który ma zostać wykonany.
2. Przeciwciało pierwszorzędowe, odpowiednie dozowniki zestawu detekcyjnego oraz wymagany odczynnik dodatkowy umieścić na tacy na odczynniki, a następnie umieścić załadowaną tacę w aparacie.
3. Sprawdzić płyny i wyrzucić odpady.
4. Umieścić preparaty w aparacie.
5. Rozpocząć cykl barwienia.
6. Po zakończeniu cyklu barwienia wyjąć preparaty z aparatu.
7. Przejść do części Zalecane procedury postępowania po obróbce w urzędzeniu.

Zalecane procedury postępowania po obróbce w urzędzeniu

1. Przeplukać preparaty w łagodnym płynie do mycia naczyń, aby usunąć roztwór szkiełka nakrywkowego.
2. Dokładnie wypłukać preparaty w wodzie destylowanej, aby usunąć cały płyn do mycia.
3. Odwodnić, oczyścić i nalożyć szkiełko nakrywkowe ze środkiem do ostatecznego zatapiania.

PROCEDURA KONTROLI JAKOŚCI

Tkanka do kontroli dodatniej

W każdym cyklu procedury barwienia należy uwzględnić tkankę do kontroli dodatniej. Zgodnie z optymalną praktyką laboratoryjną na szkiełko, na którym jest tkanka pacjenta, należy dodać skrawek tkanki będący kontrolą dodatnią. Stosowanie tej praktyki wspomaga wykrycie wszelkich nieprawidłowości związanych z nałożeniem przeciwciała pierwszorzędowego lub innych istotnych odczynników na badany preparat z tkanką pacjenta. Dla optymalnej kontroli jakości bardziej odpowiednia jest tkanka ze słabym barwieniem dodatnim. Składników tkankowych dających odczyn dodatni używa się w celu potwierdzenia naniesienia przeciwciała na preparat oraz prawidłowego działania aparatu. Tkanka ta może zawierać komórki lub składniki tkankowe dające zarówno odczyn dodatni, jak i ujemny, a zatem może być stosowana jednocześnie jako dodatnia i ujemna tkanka kontrolna. Tkanki kontrolne powinny być próbkami świeżo pobranymi z autopsji, biopsji lub chirurgicznie i powinny zostać przygotowane lub utracone jak najszybciej, w identyczny sposób jak skrawki badane. Takie tkanki mogą być wykorzystywane do monitorowania wszystkich kroków procedury, od przygotowania tkanki po jej barwienie. Użycie skrawka

tkanki utraconego lub poddanego obróbce w sposób inny niż próbka badana umożliwia kontrolę wszystkich odczynników oraz kroków metody z wyjątkiem utraconia i obróbki tkanki.

Znane dodatnie kontrole tkankowe powinny być stosowane wyłącznie w celu monitorowania prawidłowego przebiegu barwienia poddanych obróbce tkanek i działania odczynników testowych, a nie pomocniczo do określania rozpoznania dla próbek pacjentów. Jeśli nie udaje się potwierdzić dodatniego barwienia w preparatach tkanki do kontroli dodatniej, należy uznać, że wyniki próbek badanych są nieważne.

Tkanka do kontroli ujemnej

Ta sama tkanka, która służy do kontroli dodatniej, może być również używana do kontroli ujemnej. Zróżnicowanie typów komórek obecnych w większości skrawków tkanek przekłada się na obecność na preparacie obszarów, które mogą posłużyć jako wewnętrzna kontrola ujemna, jednak za weryfikację takich obszarów odpowiada użytkownik. Składniki komórkowe nieulegające wybarwieniu nie powinny wykazywać swego barwienia, powinny natomiast wskazywać barwienie tła. Jeśli w ujemnych obszarach tkanki kontrolnej zachodzi swoiste barwienie, wyniki uzyskane dla próbek pacjentów należy uznać za nieważne.

Niewyjaśnione rozbieżności

Niewyjaśnione rozbieżności w tkankach kontrolnych należy niezwłocznie zgłosić lokalnemu przedstawicielowi działu pomocy technicznej. Jeśli kontrola jakości nie spełnia wymogów, wyniki pacjenta są nieważne. Patrz część „Rozwiązywanie problemów” tego arkusza metody. Zidentyfikować i rozwiązać problem, a następnie powtórzyć test dla próbek pacjenta.

Odczynnik do kontroli ujemnej

Z każdą próbą należy stosować odczynnik do kontroli ujemnej, aby wspomóc interpretację wyników. W celu oceny barwienia nieswoistego zamiast przeciwciała pierwszorzędowego używany jest odczynnik do kontroli ujemnej. Preparat należy wybarwić przeciwciałem Negative Control Mouse lub przeciwciałem Negative Control Rabbit, odpowiednio do potrzeb. Zamiast opisanego powyżej odczynnika do kontroli ujemnej można użyć samego rozpuszczalnika. Okres inkubacji z odczynnikiem do kontroli ujemnej powinien być taki sam jak okres inkubacji z przeciwciałem pierwszorzędowym.

Jeśli do badania skrawków seryjnych wykorzystywane są panele z wieloma przeciwciałami, odczynnik do kontroli ujemnej zastosowany na jednym preparacie może służyć jako kontrola ujemna lub kontrola nieswoistego wiązania tła dla innych przeciwciał.

Weryfikacja badania

Przed pierwszym użyciem przeciwciała pierwszorzędowego lub systemu do barwienia w procedurze diagnostycznej należy zweryfikować swoistość przeciwciała pierwszorzędowego poprzez wybarwienie serii tkanek dodatnich i ujemnych, dla których znana jest charakterystyka wyników badań immunohistochemicznych (patrz część „Tkanka do kontroli dodatniej” w arkuszu metody przeciwciała pierwszorzędowego oraz zalecenia dotyczące kontroli jakości opracowane w ramach programu College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program i zawarte w dokumencie Anatomic Pathology Checklist⁵ i/lub z wytyczne CLSI Approved Guideline⁶). Te procedury kontroli jakości należy powtarzać dla każdej nowej partii przeciwciała oraz każdorazowo w przypadku zmiany parametrów testu. Tkanki wymienione w części „Charakterystyka wyników” ulotki przeciwciała pierwszorzędowego nadają się do weryfikacji badania.

Interpretacja wyników

Barwienie przy użyciu zestawu *ultraView* Universal DAB Detection Kit prowadzi do wytrącenia brązowego produktu reakcji w miejscach występowania antygenów zlokalizowanych przez przeciwciało pierwszorzędowe. Przed przystąpieniem do interpretacji wyników wykwalifikowany patomorfolog z doświadczeniem w procedurach immunohistochemicznych musi dokonać oceny odczynów kontroli tkankowych i zakwalifikować produkt barwienia do badania. Najpierw należy ocenić wybarwienie tkanek do kontroli ujemnej, a następnie wyniki tego barwienia porównać z wybarwionym materiałem w celu określenia, czy otrzymany sygnał nie powstał w wyniku nieswoistych reakcji.

Tkanka do kontroli dodatniej

Wybarwioną tkankę do kontroli dodatniej należy ocenić jako pierwszą, aby upewnić się, że wszystkie odczynniki działają prawidłowo. Obecność produktu reakcji o odpowiedniej barwie w komórkach docelowych wskazuje dodatnią reaktywność tkanki. W zależności od czasu inkubacji i mocy stosowanej hematoxyliny, w wyniku barwienia kontrastowego jądra komórek przybiorą barwę od błononiebieskiej do ciemnoniebieskiej. Nadmierne lub niepełne wybarwienie kontrastowe może uniemożliwić właściwą interpretację wyników.

Jeśli nie udaje się potwierdzić dodatniego barwienia w preparacie tkanki do kontroli dodatniej, należy uznać, że wyniki próbek badanych są nieważne.

Tkanka do kontroli ujemnej

Po ocenie tkanki do kontroli dodatniej należy ocenić tkankę do kontroli ujemnej w celu weryfikacji swoistego wyznakowania docelowego antygenu przez przeciwciała pierwszorzędowe. Brak swoistego barwienia w tkance do kontroli ujemnej świadczy o braku reaktywności krzyżowej przeciwciała z komórkami lub składnikami komórkowymi. Jeśli w tkance do kontroli ujemnej zachodzi swoiste barwienie, wyniki uzyskane dla próbek pacjentów należy uznać za nieważne.

Nieswoiste barwienie, jeśli występuje, będzie mieć wygląd rozlany. W skrawkach tkanek, które zostały nadmiernie utwalone w formalinie, może być również obserwowane sporadyczne, lekkie wybarwienie tkanki łącznej. W celu interpretacji wyników barwienia należy się posłużyć nienaruszonymi komórkami. Komórki nekrotyczne lub zdegenerowane często barwią się nieswoiście.

Tkanka pobrana od pacjenta

Próbki pacjentów należy oceniać jako ostatnie. Intensywność wybarwienia dodatniego należy oceniać względem nieswoistego barwienia tła odczynnikami do kontroli ujemnej. Jak w przypadku każdego testu immunohistochemicznego, wynik ujemny oznacza, że docelowy antygen nie został wykryty — nie można jednak wykluczyć obecności antygenu w badanych komórkach lub tkankach. W razie konieczności należy użyć panelu przeciwciał, aby ułatwić identyfikację fałszywie ujemnych reakcji. Przy interpretacji wyników badań immunohistochemicznych należy również ocenić cechy morfologiczne każdej próbki tkanki na podstawie skrawka wybarwionego hematoxyliną i eozyną. Cechy morfologiczne próbki pacjenta i odpowiednie dane kliniczne muszą zostać zinterpretowane przez wykwalifikowanego patomorfologa.

OGRA NICZENIA METODY

Ograniczenia ogólne

1. Metoda immunohistochemiczna (IHC) to wieloetapowy proces diagnostyczny, który wymaga odbycia specjalistycznego szkolenia w zakresie doboru odpowiednich odczynników, doboru tkanek, utwalania, obróbki, przygotowania preparatu do badania immunohistochemicznego oraz interpretacji wyników barwienia.
2. Wybarwienie tkanki zależy od sposobu postępowania z tkanką i obróbki tkanki przed barwieniem. Nieprawidłowe utwalanie, zamrażanie, rozmrażanie, przemywanie, suszenie, podgrzewanie, wykonywanie skrawków lub zanieczyszczenie próbki innymi tkankami lub płynami może prowadzić do powstania artefaktów, wychwytywania przeciwciał lub uzyskania fałszywie ujemnych wyników. Niespójne wyniki mogą być skutkiem różnic w metodach utwalania i zatapiania lub naturalnych nieregularności w obrębie tkanki.
3. Nadmierne lub niepełne wybarwienie kontrastowe może uniemożliwić właściwą interpretację wyników.
4. Interpretacja kliniczna każdego dodatniego wybarwienia lub jego braku musi być dokonywana w kontekście danych z wywiadu klinicznego, cech morfologicznych tkanki oraz innych kryteriów histopatologicznych. Interpretacja kliniczna każdego wybarwienia lub jego braku musi być uzupełniona badaniami morfologicznymi i właściwymi kontrolami, jak również innymi testami diagnostycznymi. Wykwalifikowany patomorfolog ma obowiązek zapoznać się z działaniem przeciwciał i odczynników oraz metodami interpretacji wzoru barwienia w wybarwionych preparatach. Barwienie musi być wykonywane w certyfikowanym, licencjonowanym laboratorium pod nadzorem patomorfologa odpowiedzialnego za ocenę wybarwionych preparatów i zapewnienie adekwatności kontroli dodatnich i ujemnych.
5. Przeciwciała i 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.
6. 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 ekspresji antygenu w nowotworach lub innych tkankach patologicznych.⁷ W przypadku wystąpienia nieoczekiwanych reakcji należy udokumentować ten fakt i skontaktować się z lokalnym przedstawicielem działu pomocy technicznej.

7. Tkanki pochodzące od osób zakażonych wirusem zapalenia wątroby typu B i zawierające antygen powierzchniowy wirusa zapalenia wątroby typu B (hepatitis B surface antigen, HBsAg) mogą wykazywać nieswoiste barwienie peroksydazą chrzanową.⁸
8. Stosowane w krokach blokowania prawidłowe surowice pochodzące z tego samego źródła zwierzęcego co surowice odpornościowe wtórne mogą powodować otrzymanie fałszywie ujemnych lub fałszywie dodatnich wyników z powodu obecności autoprzeciwciał lub przeciwciał naturalnych.
9. Jak w przypadku każdego testu immunohistochemicznego, wynik ujemny oznacza, że antygen nie został wykryty — nie można jednak wykluczyć obecności antygenu w badanych komórkach lub tkankach.

Szczegółowe ograniczenia

1. Każdy etap procedury użycia zestawu detekcyjnego został zoptymalizowany i ustawiony fabrycznie w aparatach BenchMark IHC/ISH. Ze względu na zmienność utwalania i obróbki tkanek konieczne może być wydłużenie lub skrócenie czasu inkubacji z przeciwciałem pierwszorzędowym dla poszczególnych próbek. Czas inkubacji z przeciwciałem pierwszorzędowym jest zależny od stopnia utwalenia tkanki i może wynosić od 8 do 32 minut. Więcej informacji na temat zmiennych związanych z utwalaniem można znaleźć w dokumencie „Immunohistochemistry Principles and Advances”⁹ lub dokumencie „Immunomicroscopy: A Diagnostic Tool for the Surgical Pathologist”.¹⁰
2. Zestaw detekcyjny, w połączeniu z przeciwciałami pierwszorzędowymi i dodatkowymi odczynnikami firmy VENTANA, umożliwia detekcję antygenu, który przetrwał rutynowe procesy utwalania w formalinie, obróbki tkanek i wykonywania skrawków.
3. Ten zestaw detekcyjny został zoptymalizowany do użytku z roztworem płuczącym Reaction Buffer, przeciwciałami pierwszorzędowymi, dodatkowymi odczynnikami oraz aparatami BenchMark IHC/ISH. Aby zapewnić prawidłowe działanie zestawu detekcyjnego, należy używać roztworu płuczącego Reaction Buffer. Użytkownicy, którzy odstępują od zalecanych procedur badawczych, są odpowiedzialni za interpretację otrzymanych w ten sposób wyników badań pacjenta.
4. Ten zestaw detekcyjny został zoptymalizowany do użytku z odczynnikami LCS (Predilute) lub ULTRA LCS (Predilute). Odczynnik LCS to wstępnie rozcieńczony roztwór płynnego szkiełka nakrywkowego, używany zarówno jako bariera między odczynnikami wodnymi a powietrzem, jak i odczynnik do usuwania parafiny z próbek tkanki podczas odparafinowania. Bariera stworzona przez odczynnik LCS ogranicza parowanie i zapewnia stabilne środowisko wodne podczas reakcji IHC lub hybrydyzacji in situ (ISH) przeprowadzanych w aparatach firmy VENTANA.
5. Stosowanie czasów inkubacji i temperatur innych niż podane może prowadzić do uzyskania błędnych wyników. Użytkownik jest odpowiedzialny za walidację działania odczynnika w przypadku wprowadzenia jakichkolwiek modyfikacji.
6. Niektóre zestawy detekcyjne mogą nie być zarejestrowane na każdym aparacie. Aby uzyskać więcej informacji, należy skontaktować się z lokalnym przedstawicielem firmy Roche.

CHARAKTERYSTYKA WYNIKÓW

SKUTECZNOŚĆ ANALITYCZNA

Skuteczność zestawu *ultraView* Universal DAB Detection Kit oceniono na podstawie wyników badań precyzji i innych odpowiednich badań. Wszystkie cykle barwienia wykonywano zgodnie z protokołem opisanym w arkuszu metody przeciwciała, w aparatach BenchMark IHC/ISH, o ile nie określono inaczej.

Badania precyzji

Precyzję zestawu *ultraView* Universal DAB Detection Kit przetestowano poprzez barwienie seryjnych skrawków wykonanych z 3 tkanek utwalonych w obojętnej zbuforowanej formalinie i zatopionych w parafinie (FFPE) przy użyciu 3 przeciwciał pierwszorzędowych. Mysim przeciwciałem IgG (anty-Ki67) wybarwiono tkankę raka sutka, mysim przeciwciałem IgM (anty-CD15) wybarwiono próbkę ksenograftową z tkanką chłoniaka Hodgkina, a króliczym przeciwciałem IgG (anty-S100) wybarwiono tkankę czerniaka. Barwienie wykonywano w aparatach BenchMark i BenchMark XT. Wszystkie przeciwciała pierwszorzędowe inkubowano przez 16 minut, a preparaty wybarwiono kontrastowo przy użyciu odczynnika Hematoxylin II, a następnie odczynnika Bluing Reagent. Wszystkie preparaty wybarwione przy użyciu przeciwciała pierwszorzędowego porównano ze sobą pod kątem odpowiedniego wybarwienia i jego intensywności:

1. Badanie precyzji w ramach cyklu (jedno przeciwciało pierwszorzędowe wykorzystywane do barwienia na jednej platformie) polegało na przeprowadzaniu

jednego cyklu barwienia dziennie w 3 różnych dniach przy użyciu 2 różnych aparatów: BenchMark i BenchMark XT, w których przeprowadzono łącznie 6 cykli barwienia. Precyzja w ramach cyklu w aparacie BenchMark XT wynosiła 100% (30 na 30 preparatów wybarwiono przeciwciałem pierwszorzędowym w jednym cyklu; łącznie wybarwiono 90 preparatów dla każdego przeciwciała w 3 cyklach barwienia) i 100% (20 na 20 preparatów wybarwiono przeciwciałem pierwszorzędowym w jednym cyklu; łącznie wybarwiono 60 preparatów dla każdego przeciwciała w 3 cyklach barwienia) dla aparatu BenchMark.

2. Precyzję między cyklami barwienia obliczono na podstawie liczby preparatów wybarwionych w 3 cyklach barwienia przypadających na jeden typ aparatu. Przeprowadzono jeden cykl barwienia dziennie w 3 różnych dniach przy użyciu 2 różnych aparatów: BenchMark i BenchMark XT. Precyzja między cyklami barwienia dla aparatu BenchMark XT wynosiła 100% (90 na 90 preparatów; 30 preparatów dla każdego przeciwciała pierwszorzędowego w 3 odrębnych cyklach barwienia) i 100% (60 na 60 preparatów; 20 preparatów dla każdego przeciwciała pierwszorzędowego w 3 odrębnych cyklach barwienia dla każdej platformy) dla aparatu BenchMark.
3. Precyzję między aparatami obliczono na podstawie liczby preparatów wybarwionych w 6 cyklach barwienia we wszystkich typach aparatów. Przeprowadzono 1 cykl barwienia dziennie w 3 różnych dniach, używając 2 różnych aparatów: BenchMark i BenchMark XT. Precyzja między aparatami z użyciem zestawu *ultraView* Universal DAB Detection Kit wynosiła 100% (150 na 150 wybarwionych preparatów; oceniane preparaty wybarwiono, używając wszystkich 3 przeciwciał pierwszorzędowych).

Z zestawem *ultraView* Universal DAB Detection Kit opracowano wiele przeciwciał pierwszorzędowych firmy VENTANA. W ramach badań tych testów określono następujące parametry charakterystyki wyników dla zestawu *ultraView* Universal DAB Detection Kit;

1. Precyzja w ramach cyklu, pomiędzy dniami, pomiędzy aparatami i między platformami w aparatach BenchMark GX, BenchMark XT i BenchMark ULTRA.
2. Czułość i swoistość barwienia w przypadku różnych typów tkanek prawidłowych i nowotworowych oraz tkanek, do których badania przeznaczony jest test.
3. Precyzja aparatu BenchMark ULTRA PLUS została wykazana przy użyciu reprezentatywnych testów. Badania obejmowały testy precyzji w ramach testu, między dniami oraz między aparatami. Wyniki wszystkich badań spełniły kryteria akceptacji

ROZWIĄZYWANIE PROBLEMÓW

1. Jeśli kontrola dodatnia wykazuje słabsze wybarwienie niż oczekiwano, należy sprawdzić barwienie w innych kontrolach dodatnich wybarwionych podczas tego samego cyklu barwienia, aby określić, czy problem jest spowodowany przeciwciałem pierwszorzędowym, czy jednym z powszechnie stosowanych odczynników drugorzędowych.
2. Jeśli dla kontroli dodatniej otrzymano wynik ujemny, należy upewnić się, że preparat jest oznaczony odpowiednią etykietą z kodem kreskowym. Jeśli preparat jest oznaczony prawidłową etykietą, należy sprawdzić barwienie w innych kontrolach dodatnich wybarwionych podczas tego samego cyklu barwienia, aby określić, czy problem jest spowodowany przeciwciałem pierwszorzędowym, czy jednym z powszechnie stosowanych odczynników drugorzędowych. Tkanki mogły zostać niewłaściwie pobrane, utwalone lub odparafinowane. Przestrzegać odpowiednich procedur pobierania, przechowywania i utwalania.
3. Niekompletne usunięcie parafiny może prowadzić do wystąpienia artefaktów podczas barwienia lub uniemożliwić wybarwienie preparatu.
 - Jeśli z preparatu nie usunięto całej parafiny, należy powtórzyć cykl barwienia z wybraną opcją przedłużonego odparafinowania, jeżeli jest ona dostępna.
 - Alternatywnie można przeprowadzić ręczne odparafinowanie bez użycia aparatu. Jeśli wybrano odparafinowanie ręczne, przed umieszczeniem preparatów w aparacie należy cofnąć zaznaczenie opcji odparafinowania na pokładzie aparatu w protokole barwienia. Należy szczególnie uważać, aby preparaty nie wyschły przed rozpoczęciem cyklu barwienia.
4. Jeśli swoiste barwienie za pomocą przeciwciała jest zbyt intensywne, powtórzyć cykl, skracając czas inkubacji w krokach co 4 minuty, aż do osiągnięcia żądanej intensywności barwienia.
5. Jeśli skrawki tkanek są wypłukiwane ze szkiełek, należy sprawdzić, czy szkiełka są naładowane dodatnio.
6. Aby uzyskać informacje o środkach zaradczych, należy zapoznać się z częścią dotyczącą procedury postępowania, przewodnikiem użytkownika aparatu lub skontaktować się z lokalnym przedstawicielem działu pomocy technicznej.

7. Jeśli dozowanie płynu przy użyciu dozownika do odczynników jest niemożliwe, sprawdzić, czy w komorze napełniania wstępnego lub na menisku nie ma ciał obcych lub cząstek stałych, takich jak włókna lub osady. Jeśli dozownik jest zatkany, należy go nie używać i skontaktować się z lokalnym przedstawicielem działu pomocy technicznej. Można również ponownie napełnić dozownik — w tym celu należy skierować wylot dozownika w stronę pojemnika na zlewki, zdjąć nasadkę dyszy i nacisnąć górną część dozownika. Informacje dotyczące prawidłowego użytkowania tego wyrobu można znaleźć w arkuszu metody dozownika wbudowanego powiązanego z P/N 760-500.

BIBLIOGRAFIA

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.

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

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 na stronie elabdoc.roche.com/symbols).



Globalny Numer Jednostki Handlowej



Unikalny identyfikator wyrobu



Wskazuje podmiot odpowiedzialny za import wyrobu medycznego do Unii Europejskiej

HISTORIA ZMIAN

Ver.	Aktualizacje
K	Zaktualizowano informacje zawarte w części Ostrzeżenia i środki ostrożności oraz Instrukcja stosowania, a także łączy do odniesień do symboli w częściach Ostrzeżenia i środki ostrożności oraz Symbole. Zaktualizowano bibliografię

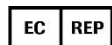
WŁASNOŚĆ INTELEKTUALNA

VENTANA, BENCHMARK, *ultraView* oraz logo VENTANA są znakami towarowymi firmy Roche. Wszystkie pozostałe znaki towarowe stanowią własność odpowiednich właścicieli.
© 2023 Ventana Medical Systems, Inc.

DANE KONTAKTOWE

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

www.ventanamedical.com



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

