*ultra*View Universal DAB Detection Kit

REF 760-500

05269806001

IVD Σ 250

VERWENDUNGSZWECK

*ultra*View Universal DAB Detection Kit ist ein indirektes, biotinfreies System zum Nachweis von primären Maus-IgG-, Maus-IgM- und Kaninchen-Antikörpern. Das Kit ist zur Identifizierung von Zielen mittels Immunhistochemie in Schnitten von formalinfixiertem, paraffineingebettetem oder gefrorenem Gewebe bestimmt, die auf einem BenchMark IHC/ISH Gerät gefärbt wurden.

Dieses Produkt muss von einem qualifizierten Pathologen in Verbindung mit histologischen Untersuchungen, klinisch relevanten Informationen und geeigneten Kontrollen interpretiert werden.

Dieses Produkt ist für die Verwendung in der In-vitro-Diagnostik (IVD) bestimmt.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Die Immunhistochemie (IHC) ist eine Technik, die im Labor zu diagnostischen Zwecken eingesetzt wird. Bei der IHC werden spezifische primäre Antikörper verwendet, um Antigene in fixierten oder gefrorenen Gewebeschnitten zu lokalisieren und an diese zu binden. Die Bindung des Antikörpers an das Antigen wird mit einer indirekten Nachweismethode sichtbar gemacht. Bei den gängigsten Techniken für indirekte Methoden werden sekundäre Antikörper gegen die Spezies des primären Antikörpers sowie ein Enzym mit einem entsprechenden Substrat-Chromogen-System verwendet. Diese Kombination führt zu einem farbigen Niederschlag an der Stelle der spezifischen Antikörperbindung. *ultra*View Universal DAB Detection Kit verwendet eine indirekte Methode, um spezifische, an Antigene gebundene Antikörper durch Ablagerung eines braunen Niederschlags sichtbar zu machen.

VERFAHRENSPRINZIP

*ultra*View Universal DAB Detection Kit erkennt spezifische primäre Maus- und Kaninchen-Antikörper, die an ein Antigen gebunden sind, in Schnitten von formalinfixiertem, paraffineingebettetem (FFPE) Gewebe oder gefrorenem Gewebe. Der spezifische Antikörper wird mithilfe eines Cocktails von enzymmarkierten sekundären Antikörpern lokalisiert. Daraufhin wird der Komplex mit Wasserstoffperoxidsubstrat und 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) als Chromogen sichtbar gemacht, wodurch ein brauner Niederschlag entsteht, der im Lichtmikroskop gut erkennbar ist.

Das Färbeprotokoll besteht aus zahlreichen Schritten, in denen Reagenzien bei bestimmten Temperaturen für eine bestimmte Dauer inkubiert werden. Am Ende jedes Inkubationsschritts werden die Schnitte in dem BenchMark IHC/ISH Gerät gewaschen, um ungebundenes Material zu entfernen, und es wird eine flüssige Deckglaslösung (Liquid Coverslip) aufgetragen, um die Verdunstung der wässrigen Reagenzien vom Objektträger zu minimieren.[1] Die Ergebnisse werden mithilfe eines Lichtmikroskops interpretiert und dienen zur Unterstützung bei der Differentialdiagnose pathophysiologischer Prozesse, die möglicherweise mit einem bestimmten Antigen assoziiert sind bzw. nicht assoziiert sind.

Weiterführende Hinweise zur Verwendung der Geräte sind dem jeweiligen Benutzerhandbuch zu entnehmen. Abbildung 1 veranschaulicht die indirekte Nachweismethode.

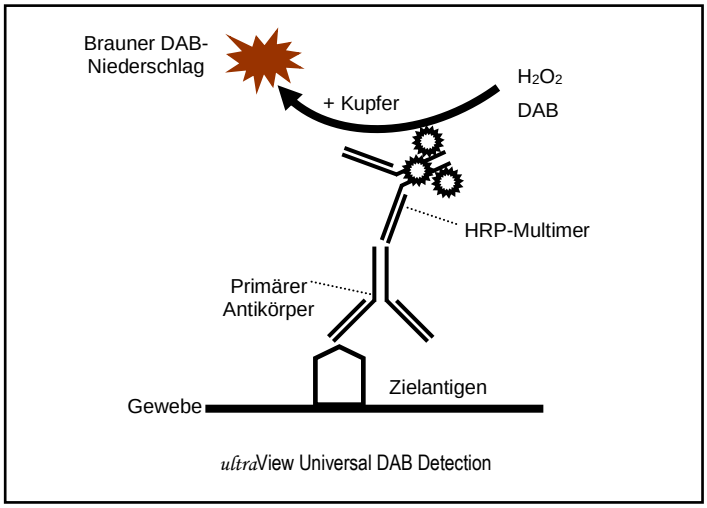

Abb. 1. Reaktion bei Verwendung des *ultra*View Universal DAB Detection Kit

MATERIALIEN UND METHODEN

Im Lieferumfang enthaltenes Material

*ultra*View Universal DAB Detection Kit enthält ausreichendes Reagenzmaterial für 250 Tests.

Ein 25-mL-Spender	*ultra*View Universal DAB Inhibitor enthält 3 % Wasserstoffperoxidlösung.
Ein 25-mL-Spender	*ultra*View Universal HRP Multimer enthält einen Cocktail aus HRP-markierten Antikörpern (Ziege-Anti-Maus-IgG, Ziege-Anti-Maus-IgM und Ziege-Anti-Kaninchen) (etwa 55 µg/mL) in einem Puffer, der Protein mit ProClin 300, einem Konservierungsmittel, enthält.
Ein 25-mL-Spender	*ultra*View Universal DAB Chromogen 0.2 % w/v 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid in einer proprietären Stabilisatorlösung mit einem proprietären Konservierungsmittel.
Ein 25-mL-Spender	*ultra*View Universal DAB H_2O_2 enthält 0.04 % Wasserstoffperoxid in einer phosphatgepufferten Lösung.
Ein 25-mL-Spender	*ultra*View Universal DAB Copper enthält Kupfersulfat (5 g/L) in einem Acetatpuffer mit einem proprietären Konservierungsmittel.

Rekonstitution, Mischen, Verdünnung, Titration

Das Nachweiskit ist für den Einsatz auf BenchMark IHC/ISH Geräten optimiert. Rekonstitution, Mischen, Verdünnung und Titration von Kitreagenzien sind nicht erforderlich. Eine weitere Verdünnung könnte zum Verlust der Färbung führen.

Nicht im Lieferumfang enthaltene, aber erforderliche Materialien

Färbereagenzien wie VENTANA Primärantikörper und Hilfskomponenten, einschließlich der Objektträger mit negativen und positiven Gewebekontrollen, sind nicht im Lieferumfang enthalten.

Möglicherweise sind nicht alle in dem Methodenblatt aufgeführten Produkte in allen Regionen verfügbar. Wenden Sie sich an den zuständigen Kundendienst.

Die folgenden möglicherweise für die Färbung benötigten Reagenzien und Materialien sind nicht im Lieferumfang des Nachweiskits enthalten:

1. Primärer Antikörper
2. Negatives Kontrollreagenz
3. Positive und negative Gewebekontrollen (welche Gewebetypen jeweils empfohlen werden, ist der Packungsbeilage des Antikörpers zu entnehmen)
4. Amplification Kit (Art.-Nr. 760-080 / 05266114001)
5. Protease 1 (Art.-Nr. 760-2018 / 05266688001)
6. Protease 2 (Art.-Nr. 760-2019 / 05266696001)

7. Protease 3 (Art.-Nr. 760-2020 / 05266718001)
8. Hematoxylin (Art.-Nr. 760-2021 / 05266726001)
9. Hematoxylin II (Art.-Nr. 790-2208 / 05277965001)
10. Bluing Reagent (Art.-Nr. 760-2037 / 05266769001)
11. Reaction Buffer Concentrate (10X) (Art.-Nr. 950-300 / 05353955001)
12. Cell Conditioning Solution 1 (CC1) (Art.-.Nr. 950-124 / 05279801001)
13. Cell Conditioning Solution 2 (CC2) (Art.-.Nr. 950-123 / 05279798001)
14. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (Art.-Nr. 950-224 / 05424569001)
15. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC2) (Art.-Nr. 950-223 / 05424542001)
16. Antibody Diluent (Art.-Nr. 251-018 / 05261899001)
17. EZ Prep Concentrate (10X) (Art.-Nr. 950-102 / 05279771001)
18. LCS (Predilute) (Art.-Nr. 650-010 / 05264839001)
19. ULTRA LCS (Predilute) (Art.-Nr. 650-210 / 05424534001)
20. BenchMark IHC/ISH Gerät
21. Objektträger, positiv geladen
22. Deckglas und Deckglasmethode zum Bedecken des Gewebes
23. Allgemeine Laborgeräte

Lagerung und Haltbarkeit

Bei Annahme, und wenn nicht verwendet, bei 2-8 °C lagern. Nicht einfrieren. Der Benutzer muss alle Lagerbedingungen, die von den im Methodenblatt angegebenen abweichen, überprüfen. Dieses Nachweiskit kann sofort nach dem Herausnehmen aus dem Kühlschrank verwendet werden.

Um die ordnungsgemäße Abgabe der Reagenzien und die Stabilität jedes Reagenzes zu gewährleisten, die Spender-Verschlusskappe nach jedem Gebrauch wieder aufgesetzt und den Spender sofort in aufrechter Position zurück in den Kühlschrank stellen.

Jedes Nachweiskit ist mit einem Verfallsdatum versehen. Bei korrekter Lagerung ist das Produkt bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil. Das Produkt darf nach Ablauf des Verfallsdatums unter den angegebenen Lagerbedingungen nicht mehr verwendet werden. Es gibt keine sicheren Anzeichen für eine Instabilität dieses Produkts. Daher sollten bei der Testung unbekannter Proben stets positive und negative Kontrollen mitgeführt werden. Wenn Anzeichen für eine Reagenzinstabilität vorliegen, umgehend den zuständigen Kundendienst benachrichtigen.

Probensammlung und -vorbereitung zur Analyse

Für die Verwendung mit *ultra*View Universal DAB Detection Kit und BenchMark IHC/ISH Geräten eignet sich routinemäßig verarbeitetes FFPE-Gewebe (siehe Abschnitt „Nicht im Lieferumfang enthaltene, aber erforderliche Materialien“). Als Gewebefixierungsmittel wird 10 %iges neutral gepuffertes Formalin (NBF) empfohlen.[2] In Abhängigkeit vom Gewebeschnitt, der Art der Fixierung, einer unvollständigen längeren Fixierung oder besonderen Bearbeitungen, z. B. der Entkalkung von Knochenmarkpräparaten, können unterschiedliche Ergebnisse auftreten.

Jeder Schnitt sollte in der für den verwendeten primären Antikörper geeigneten Dicke (es ist das Methodenblatt des jeweiligen Antikörpers zu beachten) erstellt und auf einen positiv geladen Glasobjektträger aufgebracht werden. Objektträger mit dem Gewebeschnitt sollten mindestens 15 Minuten lang bei Raumtemperatur in aufrechter Position trocknen, damit überschüssiges Wasser unter dem Schnitt vor dem Anbacken ablaufen kann. Die Objektträger können 1 Stunde in einem Ofen bei 60 °C ±5 °C angebacken/erhitzt oder bis zu 24 Stunden bei 37 °C luftgetrocknet werden. Das Trocknen und Erhitzen der Objektträger dient dazu, das Gewebe nach dem Platzieren auf dem Objektträger zu trocknen und die Gewebehaftung an dem Glas zu verbessern. Etwaige Einschränkungen in Bezug auf das Erhitzen sind dem Methodenblatt des primären Antikörpers zu entnehmen. Zu starkes Erhitzen des Gewebes kann zu einer verringerten Antigenverfügbarkeit führen.

Korrekt fixierte und eingebettete Gewebe, die das Antigen exprimieren, bleiben stabil, wenn sie kühl (bei 15-25 °C) gelagert werden. Der Clinical Laboratory Improvement Act (CLIA) aus dem Jahr 1988, 42CFR493.1259 (b), enthält die folgende Vorschrift: „Das Labor muss Objektträger mindestens zehn Jahre ab dem Datum der Untersuchung und Probenblöcke mindestens zwei Jahre ab dem Datum der Untersuchung aufbewahren.“ Jedes Labor sollte die Stabilität von Schnitten auf Objektträgern für die eigenen Verfahren und vorhandenen Lagerbedingungen selbst validieren.

Für die Verwendung mit *ultra*View Universal DAB Detection Kit und BenchMark IHC/ISH Geräten eignet sich auch routinemäßig verarbeitetes gefrorenes Gewebe. Die empfohlene Gewebefixierung beträgt 10 Minuten in kaltem Aceton. In Abhängigkeit von einer längeren Fixierung oder besonderen Bearbeitungen, z. B. der Entkalkung von Knochenmarkpräparaten, können unterschiedliche Ergebnisse auftreten.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

1. Zur Verwendung in der In-vitro-Diagnostik (IVD).
2. Nur zur professionellen Verwendung.
3. **WICHTIGER HINWEIS:** In den USA ist der Verkauf dieses Produkts laut Bundesgesetz nur durch einen Arzt oder auf Anordnung eines Arztes zulässig. (Rx Only (verschreibungspflichtig))
4. **Warnung: Möglicherweise krebserregend.** Bei der International Agency for Research on Cancer (IARC) und im US National Toxicology Program (NTP) wird Benzidin, eine eng mit 3, 3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) verwandte Substanz, als bekanntes Karzinogen für den Menschen geführt.
5. Nur für die angegebene Testanzahl verwenden.
6. ProClin 300 wird in dieser Lösung als Konservierungsmittel verwendet. Es ist als Reizstoff eingestuft und kann eine Sensibilisierung durch Hautkontakt hervorrufen. Beim Umgang mit diesem Mittel angemessene Vorsichtsmaßnahmen zu treffen. Kontakt mit Augen, Haut und Schleimhäuten vermeiden. Schutzhandschuhe und entsprechende Schutzkleidung tragen.
7. Materialien menschlichen oder tierischen Ursprungs müssen als mögliche biologische Gefahrstoffe behandelt und mit den erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen entsorgt werden. Im Falle einer Exposition sind die Richtlinien der zuständigen Gesundheitsbehörden zu beachten.[3,4]
8. Beim Umgang mit Reagenzien angemessene Vorsichtsmaßnahmen treffen. Kontakt mit Augen, Haut und Schleimhäuten vermeiden. Bei der Arbeit mit vermutlich krebserregenden oder giftigen Substanzen Einweghandschuhe und geeignete Schutzkleidung tragen.
9. Bei Kontakt von Reagenzien mit empfindlichen Körperteilen mit reichlich Wasser spülen. Das Einatmen von Reagenzien vermeiden.
10. Sicherstellen, dass der Abfallbehälter leer ist, bevor ein Lauf auf dem Gerät gestartet wird. Wenn diese Vorsichtsmaßnahme nicht beachtet wird, könnte der Abfallbehälter überlaufen und Benutzer ausrutschen und stürzen.
11. Mikrobielle Kontamination der Reagenzien vermeiden, da dies zu fehlerhaften Versuchsergebnissen führen kann.
12. Weiterführende Informationen zur Verwendung dieses Produkts sind dem Benutzerhandbuch des BenchMark IHC/ISH Geräts und den Methodenblättern aller benötigten Komponenten auf navifyportal.roche.com zu entnehmen.
13. Anweisungen zur vorschriftsmäßigen Entsorgung sind bei den zuständigen kommunalen und/oder staatlichen Behörden erhältlich.
14. Die Kennzeichnung der Produktsicherheit erfolgt in erster Linie nach der EU-GHS-Verordnung. Sicherheitsdatenblätter sind für professionelle Benutzer auf Anfrage erhältlich.
15. Bei Verdacht auf ein schwerwiegendes Ereignis im Zusammenhang mit diesem Produkt wenden Sie sich an den Roche-Vertreter vor Ort und melden das Ereignis bei der zuständigen Behörde des EU-Mitgliedstaats bzw. des Landes, in dem sich der Benutzer befindet.

Dieses Produkt enthält Bestandteile, die nach Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 wie folgt eingestuft sind:

Tabelle 1. Gefahrenhinweis.

Gefahr	Code	Hinweis
Gefahr	H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
	H319	Verursacht schwere Augenreizung.
	H350	Kann Krebs erregen.
	H412	Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
	P201	Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
	P261	Nebel oder Dämpfe nicht einatmen.
	P273	Freisetzung in die Umwelt vermeiden.
	P280	Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz/Gehörschutz tragen.

Gefahr	Code	Hinweis
	P308 + P313	BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
	P333 + P313	Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

PROZEDUR

*ultra*View Universal DAB Detection Kit wurde für die Verwendung auf BenchMark IHC/ISH Geräten in Kombination mit primären Antikörpern von VENTANA und Hilfsreagenzien entwickelt. Die Parameter für die automatisierten Verfahren können gemäß dem Verfahren im Benutzerhandbuch des Geräts angezeigt, gedruckt und bearbeitet werden. Andere Betriebsparameter für das Gerät sind werkseitig voreingestellt.

Für die Färbung auf BenchMark IHC/ISH Geräten die nachstehend beschriebene Vorgehensweise befolgen. Ausführliche Anweisungen und zusätzliche Protokolloptionen sind dem Benutzerhandbuch zu entnehmen. Ob bei einer Probe eine Cell Conditioning erforderlich ist, hängt vom jeweils verwendeten Antikörper ab. Angaben dazu sind dem Methodenblatt des jeweiligen Antikörpers zu entnehmen.

BenchMark IHC/ISH Geräte

1. Ein Barcode-Etikett auf dem Objektträger anbringen, das dem durchzuführenden Protokoll entspricht.
2. Den primären Antikörper, die entsprechenden Nachweiskit-Spender und das erforderliche Zubehörreagenz in den Reagenzträger laden und diesen in das Gerät stellen.
3. Die Vorratsflüssigkeiten überprüfen und den Abfall leeren.
4. Die Objektträger in das Gerät laden.
5. Den Färbelauf starten.
6. Nach Abschluss des Laufs die Objektträger aus dem Gerät nehmen.
7. Mit Empfohlene Verfahren zur Geräte-Nachbehandlung fortfahren.

Empfohlene Verfahren zur Geräte-Nachbehandlung

1. Die Objektträger in einem milden Detergens waschen, um die Deckglaslösung zu entfernen.
2. Die Objektträger gründlich mit destilliertem Wasser spülen, um das Reinigungsmittel vollständig zu entfernen.
3. Eine Dehydrierung und Klärung des Gewebes durchführen und das Gewebe mit permanentem Eindeckmedium bedecken.

QUALITÄTSKONTROLLVERFAHREN

Positive Gewebekontrolle

Bei jedem Färbeverfahren muss eine positive Gewebekontrolle mitgeführt werden. Im Rahmen der optimalen Laborpraxis wird jedem Objektträger mit Patientengewebe ein Schnitt mit positivem Kontrollgewebe hinzugefügt. Damit kann ein Fehler beim Auftragen des primären Antikörpers oder eines anderen wichtigen Reagenzes auf den Objektträger mit Patientengewebe leicht festgestellt werden. Gewebe mit schwacher positiver Färbung ist für eine optimale Qualitätskontrolle am besten geeignet. Die Gewebebestandteile mit positiver Färbung dienen zur Bestätigung, dass der Antikörper aufgetragen wurde und das Gerät korrekt funktioniert hat. Dieses Gewebe kann sowohl positiv als auch negativ färbende Zellen oder Gewebebestandteile enthalten und damit als Positiv- wie auch als Negativkontrolle verwendet werden. Das Kontrollgewebe muss eine frische Probe einer Autopsie, Biopsie oder eines chirurgischen Eingriffs sein und so schnell wie möglich auf identische Weise wie die Probenschnitte präpariert oder fixiert werden. Mit diesen Geweben können alle Verfahrensschritte von der Gewebevorbereitung bis zur Färbung kontrolliert werden. Die Verwendung eines Gewebeschnitts, der anders als die Testprobe fixiert oder aufgearbeitet wurde, ermöglicht die Kontrolle aller Reagenzien und Methodenschritte mit Ausnahme der Fixierung und Gewebeaufbereitung.

Nachweislich positive Gewebekontrollen dürfen nur zur Kontrolle der korrekten Leistung von aufbereitetem Gewebe und von Testreagenzien verwendet werden und nicht zur Unterstützung bei der Erstellung einer bestimmten Diagnose ausgehend von den Patientenproben. Wenn mit den positiven Gewebekontrollen keine positive Färbung nachgewiesen werden kann, gelten die Ergebnisse der Testproben als ungültig.

Negative Gewebekontrolle

Dasselbe Gewebe, das für die positive Gewebekontrolle verwendet wird, kann auch als negative Gewebekontrolle dienen. Die Vielfalt der Zelltypen, die in den meisten Gewebeschnitten vorhanden sind, ist häufig als negative Kontrolle geeignet, weil sie keine Antikörperbindungsstellen aufweisen, dies sollte jedoch vom Benutzer überprüft werden. Die entsprechenden Bestandteile dürfen keine spezifische Färbung aufweisen und geben Aufschluss über spezifische Hintergrundfärbung. Wenn in der negativen Gewebekontrolle eine spezifische Färbung auftritt, gelten die Ergebnisse mit den Patientenproben als ungültig.

Ungeklärte Diskrepanzen

Wenn ungeklärte Diskrepanzen in Kontrollen auftreten, umgehend den zuständigen Kundendienst benachrichtigen. Wenn die Ergebnisse der Qualitätskontrolle nicht den Spezifikationen entsprechen, sind die Patientenergebnisse ungültig. Den Abschnitt zur Fehlerbehebung in diesem Methodenblatt beachten. Das Problem muss identifiziert und behoben werden. Anschließend sind die Patientenproben erneut zu testen.

Negative Reagenzkontrolle

Für jede Probe muss eine negative Reagenzkontrolle durchgeführt werden, um die Interpretation der Ergebnisse zu unterstützen. Eine negative Reagenzkontrolle wird anstelle des primären Antikörpers zur Bewertung von unspezifischer Färbung durchgeführt. Der Objektträger sollte mit Negative Control Mouse bzw. Negative Control Rabbit gefärbt werden. Alternativ zu den zuvor beschriebenen negativen Reagenzkontrollen kann das Verdünnungsmittel verwendet werden. Die Inkubationsdauer für die negative Reagenzkontrolle sollte der für die primären Antikörper geltenden Inkubationsdauer entsprechen.

Wenn Panels mit mehreren Antikörpern auf Serienschnitten verwendet werden, kann eine negative Reagenzkontrolle auf einem Objektträger als negative Kontrolle oder als Kontrolle für unspezifische Hintergrundbindung für andere Antikörper dienen.

Assay-Verifizierung

Vor der ersten Verwendung eines primären Antikörpers oder Färbesystems in einem Diagnoseverfahren muss die Spezifität des primären Antikörpers überprüft werden. Zu diesem Zweck wird der Antikörper auf einer Reihe von Gewebeproben mit bekannten Leistungsmerkmalen in der Immunhistochemie getestet, die bekannte positive und negative Gewebe enthalten müssen (siehe hierzu den Abschnitt „Positive Gewebekontrolle“ im Methodenblatt des primären Antikörpers und die Empfehlungen zur Qualitätskontrolle in der Anatomic Pathology Checklist des College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program[5] und/oder die CLSI Approved Guideline[6]). Die Qualitätskontrollverfahren müssen für jede neue Antikörpercharge und bei jeder Änderung der Assay-Parameter wiederholt werden. Zur Assay-Verifizierung sind die im Abschnitt „Leistungsmerkmale“ für den primären Antikörper aufgeführten Gewebe geeignet.

Interpretation der Ergebnisse

*ultra*View Universal DAB Detection Kit bewirkt, dass an den Stellen, an denen das Antigen von dem primären Antikörper lokalisiert wurde, ein braunes Reaktionsprodukt ausfällt. Ein qualifizierter, mit immunhistochemischen Verfahren vertrauter Pathologe muss zunächst die Kontrollen auswerten und das gefärbte Produkt qualifizieren, bevor die Ergebnisse interpretiert werden können. Zuerst muss die Färbung der Negativkontrollen mit der Färbung des Gewebes insgesamt verglichen werden, um zu überprüfen, ob das erzeugte Signal nicht das Resultat unspezifischer Wechselwirkungen ist.

Positive Gewebekontrolle

Die gefärbte positive Gewebekontrolle sollte zuerst überprüft werden, um sicherzustellen, dass alle Reagenzien korrekt funktionieren. Positive Reaktivität ist an dem Vorhandensein eines korrekt gefärbten Reaktionsprodukts in den Zielzellen erkennbar. Abhängig von der Inkubationsdauer und der Stärke des verwendeten Hämatoxylins führt die Gegenfärbung zu einer blass- bis dunkelblauen Färbung der Zellkerne. Übermäßige oder unvollständige Gegenfärbung kann die korrekte Interpretation der Ergebnisse beeinträchtigen.

Wenn die positiven Gewebekontrollen keine positive Färbung aufweisen, gelten alle Ergebnisse der Testproben als ungültig.

Negative Gewebekontrolle

Nach der positiven Gewebekontrolle sollte die negative Gewebekontrolle untersucht werden, um die spezifische Markierung des Zielantigens durch den primären Antikörper zu verifizieren. Das Fehlen einer spezifischen Färbung in der negativen Gewebekontrolle bestätigt das Fehlen einer Antikörper-Kreuzreaktivität mit Zellen oder Zellbestandteilen.

Wenn in der negativen Gewebekontrolle eine spezifische Färbung vorhanden ist, gelten die Ergebnisse mit der Patientenprobe als ungültig.

Sofern vorhanden, hat eine unspezifische Färbung ein diffuses Muster. Auch in Schnitten von sehr stark formalinfixiertem Gewebe kann eine sporadische leichte Färbung des Bindegewebes festgestellt werden. Zur Interpretation der Färbeergebnisse sollten intakte Zellen herangezogen werden. Nekrotische oder degenerierte Zellen weisen oftmals eine unspezifische Färbung auf.

Patientengewebe

Patientenproben sollten zuletzt untersucht werden. Die Intensität der positiven Färbung sollte in Relation zu der unspezifischen Hintergrundfärbung der negativen Reagenzkontrolle beurteilt werden. Wie bei jedem immunhistochemischen Test bedeutet ein negatives Ergebnis lediglich, dass das fragliche Antigen nicht nachgewiesen wurde, nicht jedoch, dass das Antigen in den untersuchten Zellen/Geweben nicht vorhanden ist. Gegebenenfalls ein Antikörperpanel zur Identifizierung falsch negativer Reaktionen verwenden. Bei jeder Gewebeprobe sollte im Zusammenhang mit der Interpretation eines immunhistochemisches Ergebnisses auch die Morphologie unter Verwendung eines mit Hämatoxylin und Eosin gefärbten Schnitts untersucht werden. Die morphologischen Ergebnisse eines Patienten und die dazugehörigen klinischen Daten müssen von einem qualifizierten Pathologen ausgewertet werden.

EINSCHRÄNKUNGEN

Allgemeine Einschränkungen

1. IHC ist ein aus mehreren Schritten bestehendes Diagnoseverfahren, das hinsichtlich der Wahl der geeigneten Reagenzien und Gewebeproben sowie bezüglich Fixierung, Aufbereitung und Vorbereitung der IHC-Objektträger und der Interpretation der Färbeergebnisse eine besondere Schulung erfordert.
2. Die Gewebefärbung ist von sachgemäßer Behandlung und Aufbereitung des Gewebes vor dem Färben abhängig. Unsachgemäßes Fixieren, Einfrieren, Auftauen, Waschen, Trocknen, Erhitzen, Schneiden oder die Kontamination mit anderen Geweben oder mit Flüssigkeiten kann zu Artefakten, Antikörper-Trapping oder falsch-negativen Ergebnissen führen. Inkonsistente Ergebnisse können die Folge von Abweichungen bei Fixierungs- und Einbettungsmethoden oder von dem Gewebe inhärenten Unregelmäßigkeiten sein.
3. Übermäßige oder unvollständige Gegenfärbung kann die korrekte Interpretation der Ergebnisse beeinträchtigen.
4. Die klinische Interpretation einer positiven Gewebefärbung oder deren Fehlen muss im Kontext der klinischen Vorgeschichte, der Morphologie und sonstiger histopathologischer Kriterien erfolgen. Die klinische Interpretation einer eventuellen Färbung oder deren Fehlen muss durch morphologische Untersuchungen und geeignete Kontrollen sowie durch andere diagnostische Tests ergänzt werden. Der qualifizierte Pathologe muss zur Auswertung der gefärbten Präparate mit den zur Färbung verwendeten Antikörpern, Reagenzien und Methoden vertraut sein. Die Färbung muss in einem zertifizierten, lizenzierten Labor unter der Aufsicht eines Pathologen durchgeführt werden, der für die Überprüfung der gefärbten Objektträger sowie die Sicherstellung adäquater positiver und negativer Kontrollen verantwortlich ist.
5. VENTANA Antikörper und Reagenzien werden in der optimalen Konzentration zur Verwendung entsprechend der Gebrauchsanweisung geliefert. Abweichungen von den empfohlenen Testverfahren können die erwarteten Ergebnisse ungültig machen. Es müssen entsprechende Kontrollen durchgeführt und dokumentiert werden. Benutzer, die von den empfohlenen Testverfahren abweichen, tragen die Verantwortung für die Interpretation der Patientenergebnisse.
6. Bei Gewebe, das im Vorfeld nicht getestet wurde, können unerwartete Reaktionen mit den verwendeten Reagenzien auftreten. Aufgrund der biologischen Variabilität der Antigenexpression in Neoplasien oder anderen pathologischen Geweben können unerwartete Reaktionen auch bei getesteten Gewebegruppen nicht vollkommen ausgeschlossen werden.[7] Wenn unerwartete Reaktionen dokumentiert werden, ist der zuständige Kundendienst zu benachrichtigen.
7. Gewebeproben von Personen mit Hepatitis-B-Infektion und mit dem Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg) können mit Meerrettich-Peroxidase eine unspezifische Färbung aufweisen.[8]
8. Normalseren derselben tierischen Herkunft wie die sekundären Antiseren können bei Verwendung in Blockierungsschritten aufgrund von Autoantikörpern oder natürlichen Antikörpern zu falsch-negativen oder falsch-positiven Ergebnissen führen.
9. Wie bei jedem immunhistochemischen Test bedeutet ein negatives Ergebnis lediglich, dass das fragliche Antigen nicht nachgewiesen wurde, nicht jedoch, dass das Antigen in den untersuchten Zellen/Geweben nicht vorhanden ist.

Spezifische Einschränkungen

1. Jeder Schritt des Verfahrens bei Verwendung des Nachweiskits wurde auf BenchMark IHC/ISH Geräten optimiert und bereits konfiguriert. Aufgrund von Unterschieden bei der Gewebefixierung und -aufbereitung ist es eventuell erforderlich, die Inkubationsdauer für den primären Antikörper auf einzelnen Proben zu verlängern oder zu verkürzen. Die Inkubationsdauer für den primären Antikörper hängt vom Grad der Gewebefixierung ab und kann zwischen 8 und 32 Minuten liegen. Weiterführende Informationen über Fixierungsvariablen siehe „Immunohistochemistry Principles and Advances“[9] oder „Immunomicroscopy: A Diagnostic Tool for the Surgical Pathologist“.[10]
2. In Kombination mit VENTANA primären Antikörpern und Zubehör erkennt das Nachweiskit Antigen, das auch nach routinemäßiger Formalinfixierung , Gewebeaufbereitung und Schneiden noch vorhanden ist.
3. Das Nachweiskit wurde für die Verwendung mit der Reaction Buffer Waschlösung, primären Antikörpern, Zubehör und BenchMark IHC/ISH Geräten optimiert. Die Verwendung von Reaction Buffer Waschlösung ist wichtig, damit das Nachweiskit korrekte Ergebnisse liefert. Benutzer, die von den empfohlenen Testverfahren abweichen, tragen die Verantwortung für die Interpretation der Patientenergebnisse unter den jeweiligen Bedingungen.
4. Dieses Nachweiskit wurde für die Verwendung mit LCS (Predilute) oder ULTRA LCS (Predilute) optimiert. LCS ist eine vorverdünnte Deckglaslösung zur Verwendung als Barriere zwischen wässrigen Reagenzien und der Luft sowie als Reagenz zur Entfernung von Paraffin von Gewebeproben bei der Entparaffinisierung. Die LCS-Barriere reduziert Verdunstung und sorgt dadurch für ein stabiles wässriges Milieu für die Reaktion im Rahmen der IHC oder In-situ-Hybridisierung (ISH) auf VENTANA Geräten.
5. Andere als die angegebenen Inkubationsdauern und Temperaturen können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Der Benutzer muss solche Veränderungen validieren.
6. Es sind möglicherweise nicht alle Nachweiskits auf jedem Gerät registriert. Weitere Informationen erhalten Sie von Ihrem Roche-Vertreter vor Ort.

LEISTUNGSMERKMALE

ANALYTISCHE LEISTUNG

Die Leistung von *ultra*View Universal DAB Detection Kit wurde mithilfe von Präzisionsstudien und anderen relevanten Studien untersucht. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Färbungen unter Verwendung des im Methodenblatt des Antikörpers angegebenen Protokolls auf einem BenchMark IHC/ISH Gerät durchgeführt.

Studien zur Präzision

Die Präzision von *ultra*View Universal DAB Detection Kit wurde unter Verwendung von BenchMark und BenchMark XT Geräten geprüft, indem Serienschnitte von 3 neutral gepufferten FFPE-Geweben mit 3 primären Antikörpern, d. h. einem Maus-IgG (anti-Ki67) zur Färbung eines Mammakarzinoms, einem Maus-IgM (anti-CD15) zur Färbung eines Hodgkin-Lymphoms und einem Kaninchen-IgG (anti-S100) zur Färbung eines Melanoms, gefärbt wurden. Alle primären Antikörper wurden 16 Minuten inkubiert und die Objektträger wurden mit Hematoxylin II gefolgt von Bluing Reagent gegengefärbt. Alle mit einem primären Antikörper gefärbten Objektträger wurden hinsichtlich der Angemessenheit und Intensität der Färbung miteinander verglichen:

1. Zur Bestimmung der Intra-Lauf-Präzision (es wurde jeweils derselbe primäre Antikörper hinsichtlich der Färbung auf der jeweiligen Plattform verglichen) wurden insgesamt 6 Färbeläufe an 3 separaten Tagen mit 2 verschiedenen Geräten (BenchMark und BenchMark XT) mit einem Lauf pro Tag durchgeführt. Die Intra-Lauf-Präzision betrug jeweils 100 % auf dem BenchMark XT Gerät (30 von 30 Objektträgern pro primärem Antikörper pro Lauf, d. h., es wurden insgesamt 90 Objektträger pro Antikörper in den 3 Läufen gefärbt) und 100 % auf dem BenchMark Gerät (20 von 20 Objektträgern pro primärem Antikörper pro Lauf, d. h., es wurden insgesamt 60 Objektträger pro Antikörper in den 3 Läufen gefärbt).
2. Die Inter-Lauf-Präzision wurde auf der Grundlage der Anzahl der in 3 Läufen pro Gerätetyp gefärbten Objektträger berechnet. Die Färbeläufe wurden einmal pro Tag an 3 separaten Tagen unter Verwendung von 2 verschiedenen Geräten (BenchMark und BenchMark XT) durchgeführt. Die Inter-Lauf-Präzision betrug jeweils 100 % auf dem BenchMark XT Gerät (90 von 90 Objektträgern, 30 Objektträger für jeden

primären Antikörper in 3 separaten Läufen) und 100 % auf dem BenchMark Gerät (60 von 60 Objektträgern, 20 Objektträger für jeden primären Antikörper in 3 separaten Läufen auf jeder Plattform).

3. Die Inter-Geräte-Präzision wurde auf der Grundlage der Anzahl der in 6 Läufen mit allen Gerätetypen gefärbten Objektträger berechnet. Die Färbeläufe wurden einmal pro Tag an 3 separaten Tagen unter Verwendung von 2 verschiedenen Geräten (BenchMark und BenchMark XT) durchgeführt. Die Inter-Geräte-Präzision von *ultra*View Universal DAB Detection Kit beträgt 100 % (150 von 150 gefärbten Objektträgern, es wurden die mit allen 3 primären Antikörpern gefärbten Objektträger bewertet).

Es wurden mehrere primäre Antikörper von VENTANA mit *ultra*View Universal DAB Detection Kit entwickelt. Im Rahmen der Tests für diese Assays wurden die folgenden Leistungsmerkmale für *ultra*View Universal DAB Detection Kit ermittelt;

1. Intra-Lauf-, Inter-Tages-, Inter-Geräte- und Inter-Plattform-Präzision auf BenchMark GX, BenchMark XT und BenchMark ULTRA Geräten.
2. Sensitivität und Spezifität der Färbung in verschiedenen normalen und neoplastischen Gewebetypen und assayspezifischen Zielgeweben
3. Die Präzision auf dem BenchMark ULTRA PLUS Gerät wurde unter Verwendung repräsentativer Assays gezeigt. In den Studien wurden die Intra-Lauf-Präzision, die Inter-Tages-Präzision und die Inter-Geräte-Präzision untersucht. Alle Studien erfüllten die jeweiligen Akzeptanzkriterien.

FEHLERBEHEBUNG

1. Wenn die positive Kontrolle eine schwächere Färbung als erwartet aufweist, die anderen, im selben Gerätelauf verwendeten positiven Kontrollen überprüfen, um festzustellen, ob dies auf den primären Antikörper oder eines der üblichen sekundären Reagenzien zurückzuführen ist.
2. Wenn die positive Kontrolle negativ ist, überprüfen, ob der Objektträger das richtige Barcode-Etikett aufweist. Wenn der Objektträger ordnungsgemäß gekennzeichnet ist, die anderen, im selben Gerätelauf verwendeten positiven Kontrollen überprüfen, um festzustellen, ob das Ergebnis auf den primären Antikörper oder eines der üblichen sekundären Reagenzien zurückzuführen ist. Das Gewebe wurde möglicherweise nicht ordnungsgemäß gewonnen, fixiert oder entparaffinisiert. Die korrekten Verfahren zur Gewinnung, Aufbewahrung und Fixierung von Gewebe befolgen.
3. Unvollständige Entparaffinisierung kann zu Färbeartefakten oder zum Ausbleiben der Färbung führen.
   - Wurde das Paraffin nicht vollständig von dem Objektträger entfernt, den Färbelauf gegebenenfalls mit der Option zur erweiterten Entparaffinisierung wiederholen.
   - Alternativ kann eine manuelle Entparaffinisierung außerhalb des Geräts durchgeführt werden. Wenn die manuelle Option verwendet wird, die Entparaffinisierung im Gerät vor dem Laden der Objektträger in das Gerät aus dem Färbeprotokoll entfernen. Besonders darauf achten, dass das Gewebe auf dem Objektträger vor dem Färbelauf nicht austrocknet.
4. Wenn die spezifische Antikörperfärbung zu intensiv ist, sollte der Lauf mit einer um 4 Minuten kürzeren Inkubationsdauer wiederholt werden, bis die gewünschte Färbungsintensität erreicht ist.
5. Wenn Gewebeschnitte vom Objektträger gewaschen werden, die Objektträger überprüfen, um sicherzustellen, dass sie positiv geladen sind.
6. Bezüglich der Fehlerbehebung ist der Abschnitt „Verfahren“ oder das Benutzerhandbuch des Geräts zu beachten oder der zuständige Kundendienst zu kontaktieren.
7. Wenn der Reagenzspender kein Reagenz abgibt, die Aktivierungskammer oder den Meniskus auf Fremdkörper oder Partikel, wie beispielsweise Fasern oder Niederschlag, prüfen. Ist der Spender blockiert, darf er nicht verwendet werden. Stattdessen den zuständigen Kundendienst benachrichtigen. Andernfalls den Spender noch einmal aktivieren, indem er über einen Abfallbehälter gehalten, die Spenderkappe entfernt und oben auf den Spender gedrückt wird. Weitere Hinweise zur ordnungsgemäßen Verwendung sind in dem dem Produkt mit der Art.-Nr. 760-500 beiliegenden Methodenblatt für den integrierten Spender enthalten.

LITERATURANGABEN

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 2020 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.

HINWEIS: In diesem Dokument wird statt einem Komma ein Punkt als Dezimaltrennzeichen verwendet, um die Vorkomma- von den Nachkommastellen zu trennen. Es werden keine Tausendertrennzeichen verwendet.

Symbole

Ventana verwendet die folgenden Symbole und Zeichen zusätzlich zu den Symbolen und Zeichen gemäß Norm ISO 15223-1 (USA: siehe elabdoc.roche.com/symbols für weitere Informationen).

GTIN	Internationale Artikelnummer
UDI	Eindeutige Gerätekennung
	Verweist auf den Importeur des medizinischen Produkts in die Europäische Union

VERSIONSVERLAUF

Rev.	Updates
K	Aktualisierungen der Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen sowie der Gebrauchsanweisung und den Links zu den Symbolen in den Abschnitten Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen und Symbole. Aktualisierungen der geltenden Referenzen

GEISTIGES EIGENTUM

VENTANA, BENCHMARK, *ultra*View und das VENTANA Logo sind Marken von Roche. Alle sonstigen Marken sind Eigentum der jeweiligen Inhaber.

© 2023 Ventana Medical Systems, Inc.

KONTAKTDATEN

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

EC REP

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

CE