

VENTANA ISH /VIEWBlue Detection Kit

REF

800-092

05278511001

IVD
 200

PRZEZNACZENIE

Zestaw VENTANA ISH /VIEW Blue Detection Kit to system oparty o układ biotyna-streptawidyna przeznaczony do pośredniej detekcji sond znakowanych fluoresceiną. Zestaw jest przeznaczony do identyfikacji sekwencji docelowych metodą hybrydyzacji in situ w skrawkach tkanek utwardzonych w formalinie i zatopionych w parafinie, wybarwionych w aparatach 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

W hybrydyzacji in situ (ISH) znakowane sondy są wykorzystywane do detekcji swoistych sekwencji docelowych DNA lub RNA w próbkach utwardzonych skrawków tkankowych. Sekwencje docelowe są odsłanianie poprzez podgrzewanie tkanki z roztworem zawierającym sondy w celu denaturacji kwasów nukleinowych. Następnie temperatura reakcji jest obniżana, co umożliwia hybrydyzację znakowanej sondy będącej fragmentem kwasu nukleinowego z komplementarną sekwencją kwasu nukleinowego w tkance.

Hybrydyzacja sondy do sekwencji kwasu nukleinowego jest wizualizowana pośrednią metodą detekcji. Powszechnie stosowana technika pośrednia wykorzystuje biotynylowane przeciwciało drugorzędowe skierowane przeciwko danemu gatunkowi przeciwciała pierwszorzędowego skierowanego przeciwko haptenu, oraz enzym powiązany z odpowiednim układem substrat-chromogen. Taka kombinacja powoduje wytrącenie barwnego osadu w miejscu wiązania swoistych przeciwciał. Wykorzystywana w zestawie VENTANA ISH /VIEW Blue Detection Kit metoda pośrednia umożliwia uwidocznienie komplementarnych sekwencji kwasu nukleinowego poprzez wytrącenie niebieskiego osadu.

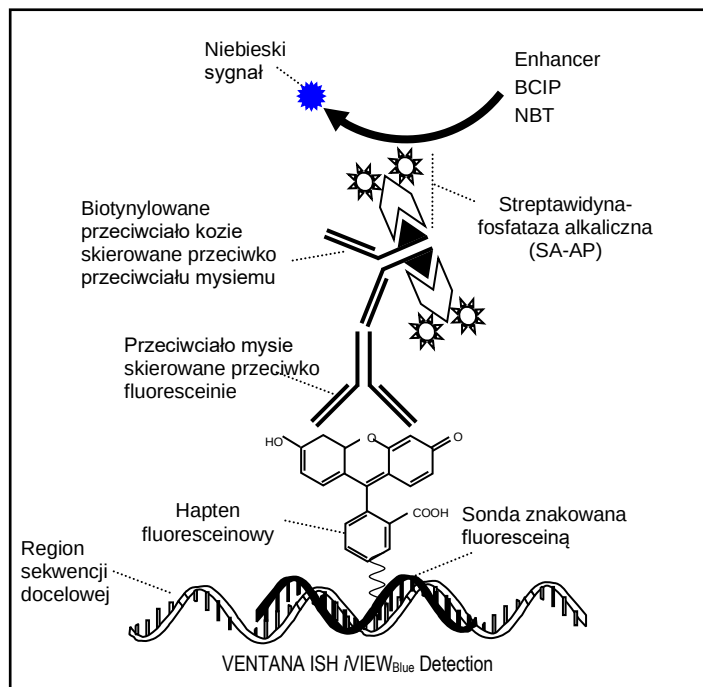
ZASADA DZIAŁANIA

Zestaw VENTANA ISH /VIEW Blue Detection Kit wykrywa swoiste sondy znakowane fluoresceiną przyłączone do swoistych sekwencji docelowych w skrawkach tkanek utwardzonych w formalinie i zatopionych w parafinie (FFPE). Zestaw VENTANA ISH /VIEW Blue Detection Kit zawiera mysie przeciwciało pierwszorzędowe skierowane przeciwko fluoresceinie, które wykrywa sondy znakowane fluoresceiną przyłączone do sekwencji docelowej. Następnie do przeciwciała skierowanego przeciwko fluoresceinie przyłącza się biotynylowane przeciwciało drugorzędowe w postaci koziej immunoglobuliny IgG skierowanej przeciwko przeciwciałom mysim. Po tym kroku dodawany jest koniugat enzymatyczny streptawidyna-AP (fosfataza alkaliczna), który przyłącza się do biotyny obecnej na przeciwciele drugorzędowym. Komplex jest następnie uwidaczniany za pomocą fosforanu 5-bromo-4-chloro-3-indolilu (BCIP) oraz błękitu nitrotetrazolowego (NBT) będącego chromogenem, które powodują wytrącenie niebieskiego osadu do wykrycia przy użyciu mikroskopu świetlnego.

Aktywność endogennej peroksydazy nie ma wpływu na fosfatazę alkaliczną (w przeciwieństwie do peroksydazy chłazanowej), dlatego jej użycie umożliwia skuteczniejsze znakowanie próbek o wysokich stężeniach neutrofilii i eozynofili. Błękit nitrotetrazolowy barwi tkankę na niebieski kolor, a jego zaletą jest wyższy współczynnik absorpcji, dzięki czemu uzyskuje się wyższą intensywność reakcji barwnej w miejscu interakcji między sondą a sekwencją docelową.

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 roztwór płynnego szkła nakrywkowego, który minimalizuje parowanie odczynników wodnych z preparatu. Interpretacji wyników dokonuje się przy użyciu mikroskopu świetlnego. Wyniki wspomagają rozpoznanie różnicowe procesów patofizjologicznych, które mogą (ale nie muszą) być powiązane z dodatnim barwieniem charakterystycznym dla sondy.

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



Rys. 1. Reakcja zachodząca podczas stosowania zestawu VENTANA ISH /VIEW Blue Detection

MATERIAŁY I METODY

Dostarczone materiały

Zestaw VENTANA ISH /VIEW Blue Detection Kit zawiera odczynniki w ilości wystarczającej do przeprowadzenia 200 testów.

Jeden dozownik 20 mL

Zestaw VENTANA ISH /VIEW Blue Detection Kit zawiera około 0.5 µg/mL mysiego przeciwciała monoklonalnego skierowanego przeciwko fluoresceinie w roztworze buforowanej fosforanem soli fizjologicznej z dodatkiem białka stabilizującego i środka ProClin 300 w stężeniu 0.10%, będącego konserwantem.

Jeden dozownik 20 mL

Zestaw VENTANA ISH /VIEW Blue Detection Kit Biotinylated Ig zawiera około 10 µg/mL oczyszczonej metodą powinowactwa koziej immunoglobuliny IgG skierowanej przeciwko przeciwciałom mysim w roztworze buforowanej fosforanem soli fizjologicznej z dodatkiem białka stabilizującego i środka ProClin 300 w stężeniu 0.10%, będącego konserwantem.

Jeden dozownik 20 mL

Odczynnik VENTANA ISH /VIEW Blue Detection Kit Streptavidin Alkaline Phosphatase w stężeniu około 1%, w buforze Tris z dodatkiem MgCl₂ i ZnCl₂ oraz środka ProClin 300 w stężeniu 0.10%, będącego konserwantem.

Jeden dozownik 20 mL

Odczynnik VENTANA ISH /VIEW Blue Detection Kit Enhancer zawiera roztwór MgCl₂ w stężeniu około 11% (v/v) z dodatkiem środka ProClin 300 w stężeniu 0.10%, będącego konserwantem.

Jeden dozownik 20 mL

Odczynnik VENTANA ISH /VIEW Blue Detection Kit NBT zawiera błękit nitrotetrazolowy (0.5 g/L) w roztworze dimetyloformamidu o stężeniu około 1% (v/v).

Jeden dozownik 20 mL

Zestaw VENTANA ISH /VIEW Blue Detection Kit BCIP zawiera fosforan 5-bromo-4-chloro-3-indolilu (0.5 g/L) w buforze Tris.

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 zestawy detekcyjne firmy VENTANA, ani elementy pomocnicze, takie jak dodatnie i ujemne 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. Sonda ISH
2. Tkanki do kontroli dodatniej i ujemnej (zalecane typy tkanek wymieniono w arkuszu metody sondy)
3. ISH Protease 1 (nr kat. 780-4147 / 05273315001)
4. ISH Protease 2 (nr kat. 780-4148 / 05273323001)
5. ISH Protease 3 (nr kat. 780-4149 / 05273331001)
6. Red Counterstain II (nr kat. 780-2218 / 05272017001)
7. Reaction Buffer Concentrate (10X) (nr kat. 950-300 / 05353955001)
8. Negative Control Probe (nr kat. 800-2847 / 05278716001)
9. SSC (10X) (nr kat. 950-110 / 05353947001)
10. EZ Prep Concentrate (10X) (nr kat. 950-102 / 05279771001)
11. Cell Conditioning Solution (CC1) (nr kat. 950-124 / 05279801001)
12. Cell Conditioning Solution (CC2) (nr kat. 950-123 / 05279798001)
13. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (nr kat. 950-224 / 05424569001)
14. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC2) (nr kat. 950-223 / 05424542001)
15. LCS (Predilute) (nr kat. 650-010 / 05264839001)
16. ULTRA LCS (Predilute) (nr kat. 650-210 / 05424534001)
17. Aparat BenchMark IHC/ISH
18. Środek do ostatecznego zatapiania
19. Szkiełko nakrywkowe odpowiednie do przykrycia całej tkanki
20. Zautomatyzowany aparat do naklejania szkiełek nakrywkowych
21. Szkiełka mikroskopowe, naładowane dodatnio
22. 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. Zestawu detekcyjnego można użyć bezpośrednio po wyjęciu go z lodówki.

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

Każdy zestaw detekcyjny jest oznaczony datą ważności. Prawdopodobnie przechowywane odczynniki zachowują stabilność do daty podanej na etykiecie. Nie należy używać produktu po upływie daty ważności. 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 zaobserwowania nieoczekiwanych wyników należy niezwłocznie skontaktować się z lokalnym przedstawicielem działu pomocy technicznej.

Pobieranie próbek i przygotowanie ich do analizy

Do stosowania z zestawem VENTANA ISH /VIEW Blue 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%.¹ Grubość skrawków tkanek,

metoda utrwalania, niepełne lub długotrwałe utrwalanie lub procesy specjalne, np. odpawianie preparatów ze szpiku kostnego, mogą być przyczyną zmienności wyników. Tkanki należy pociąć na skrawki o grubości odpowiedniej dla używanej sondy (2–5 µm) i umieścić na dodatnio naładowanych szkiełkach mikroskopowych. Preparaty należy odsączyć lub osuszyć w celu usunięcia nadmiaru wody z obszaru pomiędzy szkiełkiem a tkanką. W celu wzmocnienia adhezji tkanki do szkiełka można wykorzystać podgrzewanie preparatów. Ograniczenia dotyczące podgrzewania przedstawiono w arkuszu metody sondy.

W przypadku skrawków tkankowych o grubości powyżej 4 µm może być wymagane zastosowanie silniejszej niż zalecana w protokole obróbki proteazą, a ze względu na nadmiar parafiny w tkance może być w nich obserwowanych więcej jądrowych artefaktów „bąbelkowych” niż w cieńszych skrawkach. Jądrowe artefakty „bąbelkowe” przejawiają się występowaniem w jądrze komórkowym dużych lub małych pęcherzyków lub wakuol. Zazwyczaj artefakt ten nie prowadzi do „zepchnięcia” sygnałów Blue ISH na obrzeża jądra komórkowego ani nie zniekształca ich w inny sposób, a więc nie zakłada on zliczania sygnałów. Silne jądrowe artefakty „bąbelkowe” mogą jednak zniekształcić jądro komórkowe lub sygnały Blue ISH, uniemożliwiając tym samym zliczenie sygnałów. W przypadku próbek tego typu przed powtórным przeprowadzeniem barwienia w aparacie może być konieczne ich odparafinowanie w kąpieli ksylenowej i alkoholowej albo włączenie przez użytkownika do procedury barwienia opcji przedłużonego odparafinowania (patrz Rozwiązywanie problemów). Jądrowe artefakty „bąbelkowe” mogą być również wywołane niedostatecznym utrwalaniem (1–3 godz. przy użyciu formaliny); w tym przypadku jądrowe artefakty „bąbelkowe” są zwykle bardziej rozlane. Jeśli tkanki utrwalano przez trzy godziny, problem ten można rozwiązać, modyfikując proces kondycjonowania komórek/obróbki proteazą, jednak jeśli tkanki utrwalano przez jedną godzinę, najprawdopodobniej nie uda się rozwiązać tego problemu.

Prawidłowo utrwalone i zatopione tkanki, wykazujące ekspresję RNA i DNA, pozostaną 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.

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: produkt zawiera formamid.** Formamid jest toksyczny przy wdychaniu i umiarkowanie toksyczny w przypadku spożycia. Działa drażniąco na skórę, oczy i błony śluzowe. Jest wchłaniany przez skórę. Jego działanie może prowadzić do uszkodzeń płodu. Podczas pracy z odczynnikami należy stosować środki ostrożności. Podczas pracy z materiałami o domniemanym działaniu rakotwórczym lub materiałami toksycznymi należy nosić rękawiczki jednorazowe i odpowiednią odzież ochronną. Nie wykonywać większej liczby testów niż liczba określona na etykiecie.
5. Nie wykonywać większej liczby testów niż liczba określona na etykiecie.
6. W tym odczynniku jako środek konserwujący zastosowano preparat 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.^{2,3}
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.
6. Po zakończeniu cyklu barwienia wyjąć preparaty z aparatu.
7. Przejść do części Zalecane procedury 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 etanolu w stężeniu 100%.

1. Aby usunąć roztwór Liquid Coverslip, preparaty kolejno przepłukać w dwóch roztworach łagodnego płynu do mycia naczyń (nie używać płynu przeznaczanego do użycia w zmywarkach automatycznych).
2. Dokładnie płukać preparaty wodą destylowaną przez około 1 minutę. Strząsając nadmiar wody.
3. Przenieść preparaty do kąpeli w 80-procentowym etanolu na około 1 minutę.
4. Przenieść preparaty do kąpeli w 90-procentowym etanolu na około 1 minutę.
5. Przenieść preparaty do kąpeli w 100-procentowym etanolu na około 1 minutę.
6. Przenieść preparaty do drugiej kąpeli w 100-procentowym etanolu na około 1 minutę.
7. Zanurzyć preparaty 10 razy w 100-procentowym acetonie (acetonu należy używać jednokrotnie i wymieniać go po każdym cyklu barwienia). Preparatów nie zostawiać w acetonie.
8. Przenieść preparaty do pierwszej kąpeli w ksylenie na około 30 sekund.
9. Przenieść preparaty do drugiej kąpeli w ksylenie na około 30 sekund.
10. Na preparat nałożyć szkiełko nakrywkowe.

Tab. 1. Informacje o zagrożeniach.

Zagrożenie	Kod	Zwrot
 	H317	Może powodować reakcję alergiczną skóry.
	H360D	Może działać szkodliwie na dziecko w łonie matki
	H412	Działa szkodliwie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki.
	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 styczości: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.
	P333 + P313	W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry lub wysypki: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.

Ten produkt zawiera substancję o numerze CAS 55965-84-9, masę reakcyjną 5-chloro-2-metylo-2H-izotiazol-3-onu i 2-metylo-2H-izotiazol-3-onu (3:1).

PROCEDURA

Zestaw VENTANA ISH /VIEW Blue Detection Kit opracowano do stosowania w aparatach BenchMark IHC/ISH razem z odczynnikami pomocniczymi firmy VENTANA. Protokoły barwienia 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 oraz dodatkowe opcje protokołów można znaleźć w arkuszu metody odpowiedniej sondy lub przewodniku użytkownika.

Aparaty BenchMark IHC/ISH

1. Na preparat nakleić etykietę z kodem kreskowym odpowiadającą protokołowi, który ma zostać wykonany.
2. Dozownik sondy, odpowiednie dozowniki zestawu detekcyjnego oraz wymagane dozowniki odczynników pomocniczych umieścić w 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.

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. Składników tkankowych dających odczyn dodatni używa się w celu potwierdzenia naniesienia odczynników 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. Wewnętrznych kontroli tkankowych należy używać według uznania głównego badacza i patomorfologa. Tkanki kontrolne powinny być próbkami pobranymi z autopsji, biopsji lub chirurgicznie i powinny zostać przygotowane lub utrwalone w identyczny sposób jak skrawki badane. Skrawki tkanek utrwalone lub poddane obróbce w sposób inny niż próbka badana umożliwiają kontrolę porównawczą wszystkich odczynników oraz kroków metody, na które wpływ mają utwalanie i obróbka 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.

Konkretne zalecenia dotyczące tkanek do kontroli dodatniej można znaleźć w ulotce dołączonej do opakowania odpowiedniej sondy.

Tkanka do kontroli ujemnej

W każdym cyklu procedury barwienia należy uwzględnić próbkę do kontroli ujemnej. Celem jest monitorowanie niepożądanego reaktywności krzyżowej sondy ze składnikami komórkowymi. Ta sama próbka, która służy do kontroli dodatniej, może być również używana do kontroli ujemnej. Zróżnicowanie typów komórek obecnych w większości próbek 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 swobodnego barwienia, powinny natomiast wskazywać barwienie tła. Jeśli w ujemnych obszarach próbki kontrolnej zachodzi niedopuszczalne barwienie, wyniki uzyskane dla próbek pacjentów należy uznać za nieważne.

W stosownych przypadkach informacje na ten temat można znaleźć w arkuszu metody odpowiedniej sondy.

Odczynnik do kontroli dodatniej

Podczas weryfikacji badania oraz czynności związanych z rozwiązywaniem problemów, w cyklu należy uwzględnić odczynnik do kontroli dodatniej, ponieważ dostępność materiału DNA i RNA może się różnić w zależności od zastosowanych metod utwalania oraz obróbki wstępnej próbki.

W stosownych przypadkach informacje na ten temat można znaleźć w arkuszu metody odpowiedniej sondy.

Odczynnik do kontroli ujemnej

W celu ułatwienia interpretacji wyników każdego pacjenta podczas barwienia każdej próbki sondę ISH należy zastąpić odczynnikiem do kontroli ujemnej. Umożliwia on wskazanie nieswoistego barwienia tła na każdym preparacie. Podczas barwienia preparatu zamiast sondy ISH należy użyć sondy Negative Control Probe. Czas inkubacji kontroli powinien odpowiadać czasowi inkubacji sondy.

Zastosowanie kontroli ujemnej jest szczególnie istotne ze względu na to, że forma jelitowa fosfatazy alkalicznej może występować nie tylko w rąbku szczoteczki komórek nabłonkowych jelita, lecz również w innych komórkach.⁴ Ponadto podczas utrwalania tkanki może dojść do zachowania enzymów zdolnych do redukcji błękitu nitrotetrazolowego.^{5,6}

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. Zidentyfikować i rozwiązać problem, a następnie powtórzyć test dla próbek pacjenta.

Weryfikacja badania

Przed pierwszym użyciem sondy lub systemu do barwienia w procedurze diagnostycznej należy zweryfikować swoistość sondy poprzez wybarwienie serii tkanek, dla których znana jest charakterystyka wyników badań ISH (więcej informacji na ten temat można znaleźć w arkuszu metody sondy, zaleceniach dotyczących kontroli jakości opracowanych w ramach programu College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, zaleceniach zawartych w dokumencie Anatomic Pathology Checklist⁷ i/lub wytycznych CLSI Approved Guideline⁸). Te procedury kontroli jakości należy powtarzać dla każdej nowej partii lub nowego odczynnika oraz każdorazowo w przypadku zmiany parametrów testu.

Interpretacja wyników

Barwienie przy użyciu zestawu VENTANA ISH /VIEW Blue Detection Kit prowadzi do wytrącania niebieskiego produktu reakcji w formie osadu w miejscach hybrydyzacji sondy do sekwencji kwasu nukleinowego. Przed przystąpieniem do interpretacji wyników wykwalifikowany patomorfolog z doświadczeniem w procedurach ISH musi dokonać oceny 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.

OGRANICZENIA METODY

Ograniczenia ogólne

1. Metoda ISH to wieloetapowy proces, który wymaga odbycia 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. Niespójne wyniki mogą być skutkiem różnic w metodach utrwalania 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. 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.
5. Odczynniki firmy VENTANA są dostarczane w rozcieńczeniu optymalnym do użytku, gdy przestrzegane są dostarczone instrukcje. Dalsze rozcieńczanie może doprowadzić do utraty odpowiedniego wybarwienia. 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 tkanek. W przypadku wystąpienia nieoczekiwanych reakcji należy udokumentować ten fakt i skontaktować się z lokalnym przedstawicielem działu pomocy technicznej.

Szczegółowe ograniczenia

1. Każdy etap procedury użycia zestawu detekcyjnego został zoptymalizowany i ustawiony fabrycznie w aparatach BenchMark IHC/ISH. Ze względu na zmienność utrwalania i obróbki tkanek konieczne może być wydłużenie lub skrócenie czasu hybrydyzacji dla poszczególnych próbek. Więcej informacji na temat zmiennych związanych z utrwalaniem można znaleźć w dokumencie „Immunohistochemistry Principles and Advances”⁶ lub dokumencie „Immunomicroscopy: A Diagnostic Tool for the Surgical Pathologist”⁹.
2. Zestaw detekcyjny, w połączeniu z sondami i akcesoriami firmy VENTANA, umożliwia detekcję sekwencji kwasu nukleinowego, które przetwarzają rutynowe procesy utrwalania w formalinie, obróbki tkanek i wykonywania skrawków.
3. Jak w przypadku każdego testu, wynik ujemny oznacza, że swoista sekwencja kwasu nukleinowego nie została wykryta — nie można jednak wykluczyć obecności swoistej sekwencji kwasu nukleinowego w badanych komórkach lub tkankach.
4. Ten zestaw detekcyjny został zoptymalizowany do użytku z roztworem płuczącym Reaction Buffer, sondami, akcesoriami 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.
5. Ten zestaw detekcyjny został zoptymalizowany do użytku z odczynnikami LCS (Predilute) lub ULTRA LCS (Predilute). Odczynnik LCS to wstępnie rozcieńczony roztwór płynnego szkła 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 ISH przeprowadzanych w aparatach BenchMark IHC/ISH.
6. Podczas używania sond znakowanych fluoresceiną oraz zestawu VENTANA ISH /VIEW Blue Detection Kit może wystąpić barwienie cytoplazmatyczne i/lub jądrowe komórek nabłonkowych tkanki przewodu pokarmowego. W celu wykrycia barwienia tego typu wymagane jest użycie sondy Negative Control Probe.
7. Niektóre zestawy detekcyjne mogą nie być zarejestrowane na każdym aparacie. Aby uzyskać więcej informacji, należy skontaktować się z lokalnym przedstawicielem firmy Roche.

CHARAKTERYSTYKA WYNIKÓW

Działanie zestawu VENTANA ISH /VIEW Blue Detection Kit oceniono na podstawie wyników badań odtwarzalności i innych istotnych badań.

Z zestawem VENTANA ISH /VIEW Blue Detection Kit opracowano wiele sond firmy VENTANA. W ramach badań tych testów określono następujące parametry charakterystyki wyników dla zestawu VENTANA ISH /VIEW Blue Detection Kit:

1. Precyzja w cyklu barwienia, pomiędzy dniami, pomiędzy aparatami i pomiędzy platformami w aparatach BenchMark IHC/ISH.
2. Czulość i swoistość barwienia w przypadku różnych typów tkanek prawidłowych i nowotworowych oraz tkanek, do których badania przeznaczony jest test.

Wyniki wszystkich badań spełniły kryteria akceptacji.

ROZWIĄZYWANIE PROBLEMÓW

1. Należy zapoznać się z częścią „Rozwiązywanie problemów” arkusza metody odpowiedniej sondy.
2. 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.

3. Jeśli skrawki tkanek są wyplukiwane ze szkiełek, należy sprawdzić, czy szkiełka są naładowane dodatnio. Należy zapoznać się z częścią Pobieranie próbek i przygotowanie ich do analizy.
4. Jeśli w skrawkach tkanki o grubości powyżej 4 µm wskutek nadmiaru parafiny pojawiają się jądrowe artefakty „bąbelkowe”, w procedurze barwienia należy wybrać opcję „przedłużone odparafinowanie”.
5. Aby uzyskać informacje o środkach zaradczych, należy zapoznać się z przewodnikiem użytkownika aparatu lub skontaktować się z lokalnym przedstawicielem działu pomocy technicznej.
6. 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 zatłoczony, należy zaprzestać używania dozownika 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, zdjęć nasadkę dyszy i nacisnąć górną część dozownika. Informacje dotyczące prawidłowego użytkowania dozownika można znaleźć w arkuszu metody powiązanego dozownika wbudowanego.

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.

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. Doria M, Lloyd D, Thistlethwaite JR, Franklin WA. Immunohistochemical detection of antibody in tissue sections of non-perfused and ex vivo-perfused organs using a tetrazolium alkaline phosphatase substrate. Histochemistry. 1988;89(5):443-446.
5. True LD. Atlas of Diagnostic Immunohistopathology. J.B. Lippincott Co., Philadelphia, PA, 1990.
6. Roche PC, Hsi ED. Immunohistochemistry-Principles and Advances. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. In: NR Rose, ed. ASM Press; 2002.
7. College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2001.
8. 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.
9. 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 cyfry 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: dalsze informacje 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

HISTORIA ZMIAN

Wer.	Aktualizacje
G	Zaktualizowano informacje zawarte w części Materiały wymagane, ale niedostarczane.

WŁASNOŚĆ INTELEKTUALNA

VENTANA, BENCHMARK 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.roche.com



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

