



## Reakcijos buferio koncentratas (10X)

Katalogo numeris 950-300

### INDIKACIJOS IR NAUDOJIMAS

#### Numatomas naudojimas

Šis reagentas skirtas naudoti *in vitro* diagnostikai (IVD).  
Ventana® Medical Systems (Ventana) Reakcijos buferio koncentratas (10X) yra buferinis tirpalas Tris pagrindu (pH 7,6 ± 0,2), kuris naudojamas plauti objektinius stiklius tarp dažymo žingsnių ir suteikia stabilią vandeninę aplinką imunohistocheminėms (IHC) ar *in situ* hibridizacijos (ISH) reakcijoms, atliekamoms BenchMark® ir BenchMark® XT automatinėse objektinių stiklių dažymo sistemose.

#### Apžvalga ir paaiškinimas

Reakcijos buferio koncentratas (10X) yra Tris pagrindo buferinis tirpalas, kuris turi būti praskiestas prieš naudojimą. Praskiestas Reakcijos buferio (1X) tirpalas supilamas į Reakcijos buferio butelį automatinio fluidų modulyje automatinėje objektinių stiklių dažytuve. Prietaisas pateikia Reakcijos buferio (1X) tirpalą automatiškai, kai to reikalauja vykdomas dažymo protokolas. Papildoma informacija pateikiama atitinkamo automatinio objekcinio stiklių dažytuvo vartotojo vadove.

#### Principai ir procedūros

Ventana Reakcijos buferis automatinėje objektinių stiklių dažytuve naudojamas kaip pagrindinis komponentas palaikant tinkamą vandeninę aplinką daugeliui reakcijų, vykstančių IHC ir ISH metu, tokių kaip pagrindinis plovimas, inkubavimas su antikūnu ir inkubavimas su fermentais bei kitais priedais.  
Apskritai ISH dažymais galima vizualizuoti taikines DNR ar RNR sekas nuosekliai prisijungiant žymėtam DNR ar RNR zondui, žymėto zondo pirminiam antikūnui, pirminio antikūno antriniams antikūnui, fermento kompleksui ir chromogeniniam substratui su tarpiniais plovimo žingsniais. Fermentinės chromogeno aktyvacijos metu taikinio srityje gaunamas matomas reakcijos produktas.  
IHC reakcija apima specifinį antikūną, kuris lokalizuojamas su biotinu sujungtu antriniu antikūnu, atpažįstančiu triušio ir pelės imunoglobulinus. Po šio žingsnio pridama avidino/streptavidino ir fermento konjugato, kuris susijungia su biotinu, esančiu ant antrinio antikūno. Specifinio antikūno, antrinio antikūno, streptavidino ir fermento kompleksas vizualizuojamas fermentinės reakcijos produkto nuosėdomis. Kiekvienas žingsnis inkubuojamas tikslų laiką ir tiksloje temperatūroje. Po kiekvieno inkubavimo žingsnio Ventana automatinis objektinių stiklių dažytuvas nuplauna seką Reakcijos buferiu, kad sustabdytų reakciją ir pašalintų nesurištą medžiagą, kuri galėtų trukdyti norimai reakcijai tolimesniuose žingsniuose.

#### MEDŽIAGOS IR METODAI

##### Pateikiami reagentai

1 – 2 L butelis Reakcijos buferio koncentrato (10X): jame yra buferis Tris pagrindu ir konservantas.

##### Atkūrimas, maišymas, skiedimas ir titravimas

Reakcijos buferio koncentratas (10X) turi būti praskiestas devyniomis dalimis distiliuoto ar dejonizuoto vandens prieš naudojimą automatinėje objektinių stiklių dažytuvuose. Žr. skyrelį „Naudojimo nurodymai“.

##### Reikalingos, bet nepateikiamos medžiagos ir reagentai

Toliau išvardinti reagentai ir medžiagos gali būti reikalingi dažymui, bet nėra pateikiami:

1. Ventana neigiamos kontrolės reagentas arba triušio neigiama kontrolė\*.
2. Ventana kontroliniai zondai\*.
3. Mikroskopiniai objekciniai stikliai, teigiamai įkrauti.
4. Teigiamos ir neigiamos audinių kontrolės.
5. Džiovinimo krosnis, galinti palaikyti 70 °C ± 5 °C temperatūrą.
6. Juostinių kodų etiketės (tinkamos tiriamai neigiamai kontrolei ar pirminiams antikūnams ar zondui).
7. 10 % neutralus (su buferiu) formalinas.
8. Dažymo indai ar vonelės.
9. Laikrodis.
10. Ksilenas.
11. Etanolis ar reagentinis alkoholis.
12. Dejonizuotas ar distiliuotas vanduo.
13. BenchMark arba BenchMark XT automatiniai objektinių stiklių dažytuvai.
14. Ventana ISH MIEW Blue™ rinkinys\*.
15. Ventana ISH signalo nuskaitymo įrenginys\*.
16. Zondas\*.
17. Ventana ISH Proteazė 1, 2 ar 3\*.
18. Ventana ISH Raudonasis foninis dažas\*.
19. Ventana iVIEW™ DAB (pagėdaujamas), AEC, V Red (ALK PHOS) arba Enhanced V Red detekcijos rinkiniai\*.
20. Ventana endogeninio biotino blokavimo rinkinys\*.
21. Pirminis antikūnas\*.
22. Ventana EZ Prep tirpalas.

23. Ventana LSC, dengiamasis tirpalas.
24. Ventana Ląstelių kondicionierius 1 (CC1) arba Ląstelių kondicionierius 2 (CC2)\*.
25. Ventana Proteazė I, II ar III\*.
26. Ventana Hematokslino foninis dažas\*.
27. Ventana Melsvinimo reagentas\*.
28. Dengimo skystis.
29. Dengiamasis stiklis.
30. Šviesinis mikroskopas (20-80X).
31. 20 L didbutelis.

\*Jei reikia specifiniam taikymui.

#### Laikymas ir naudojimas

Laikyti kambario temperatūroje (nuo 20 °C iki 28 °C) nepasiekiamoje saulės spindulių vietoje. Neužšaldyti. Paskiestas (1X) reagentas gali būti laikomas kambario temperatūroje (nuo 20 °C iki 28 °C) nepasiekiamoje saulės spindulių vietoje iki bus pasirošta jį naudoti prietaise. Vartotojas turi validuoti bet kokią laikymo sąlygą, kitokias nei nurodyta ant informacinio lapelio, esančio pakuotėje.  
Šis reagentas turi ribotą galiojimo laiką. Kai laikomas tinkamai, reagentas yra stabilus iki datos, nurodytos ant etiketės. Nenaudokite reagento, pasibaigus jo galiojimo laikui nurodytam laikymo metodui.

#### Bandinių ėmimas ir paruošimas analizei

Rutiniškai apdoroti, formalinu fiksuoti, parafine įtvirtinti audiniai yra tinkami naudoti su šiuo reagentu, kai jis naudojamas kartu su Ventana pirminiais antikūnais, detekcijos rinkiniais, papildomais reagentais ir automatiniais objektinių stiklių dažytuvais (žr. skyrelį „Reikalingos, bet nepateikiamos medžiagos ir reagentai“). Rekomenduojamas audinio fiksatyvas yra 10 % neutralus (su buferiu) formalinas. Nepastovūs rezultatai gali būti lemiami per ilgo fiksavimo ar specialių procedūrų, tokių kaip kaulų čiulpų ruošinių dekalifikavimas.  
Kiekviena sekcija turėtų būti atpjauta tinkamo storio ir padėta ant teigiamai įkrauto objekcinio stiklio. Objekciniai stikliai su audinio sekcija gali būti kaitinami mažesniais 2 valandas (bet ne ilgiau kaip 24 valandas) 70 °C ± 5 °C temperatūros krosnyje.

#### PERSPĖJIMAI IR ATSARGUMO PRIEMONĖS

1. Naudodamiesi reagentais, imkitės tinkamų atsargumo priemonių. Naudokite vienkartinę pirštines, kai naudojate medžiagas, kurios gali būti karcinogeninės ar toksinės (pavyzdžiui, ksilenas ar formaldehidai).
2. Venkite akių ir gleivinių membranų kontakto su reagentais. Jeigu reagentai patenka ant jautrių sričių, gausiai nuplaukite vandeniu.
3. Nerūkykite, nevalgykite ir negerkite zonose, kuriose dirbama su bandiniais ir reagentais.
4. Pacientų bandiniai ir visos medžiagos, susiduriančios su jais, turėtų būti laikomi biologinio pavojaus medžiagomis ir išmetami su atitinkamomis atsargumo priemonėmis. Niekomet nesiurbkite medžiagų į pipetę burna.
5. Venkite reagentų mikrobiologinio užkrėtimo, kadangi dėl to gali būti gaunami netikslūs rezultatai.
6. Šis reagentas optimizuotas 1:10 skiedimui. Tolimesni skiedimai gali lemti prastą prietaiso veikimą ir dažymo praradimą. Vartotojas turi validuoti bet kokius tokius pakeitimus.
7. Vartojamas pagal nurodymus, produktas nėra klasifikuojamas kaip pavojinga medžiaga. Reagento konservantas yra ProClin 300. Per ilgo kontakto su ProClin 300 simptomai apima odos ir akių sudirginimą bei gleivinių membranų ir viršutinių kvėpavimo takų dirginimą. ProClin 300 koncentracija šiame produkte yra 0,05 % ir neatitinka OSHA kriterijų pavojingoms medžiagoms. Jautriems asmenims galimos sisteminės alerginės reakcijos.
8. Dėl rekomenduojamų išmetimo metodų kreipkitės į vietines ar regionines tarnybas.

#### NAUDOJIMO NURODYMAI

Detalesni nurodymai pateikti automatinio objektinių stiklių dažytuvo vartotojo vadove.

Kad pagamintumėte praskiestą tirpalą iš 2 L Reakcijos buferio koncentrato (10X):

1. Prieš pildydami įsitikinkite, kad 20 L graduoto didbutelio (pateikiamo su automatiniais objektinių stiklių dažytuvais) čiapas yra UŽDARYTAS.
2. Užpildykite maždaug 75 % tuščio 20 L didbutelio distiliuotu ar dejonizuotu vandeniu.
3. Supilkite visą 2 L Reakcijos buferio koncentrato (10x) butelio turinį į vandenį didbutelyje. Pasukite, kad susimaišytų.
4. Pripilkite distiliuoto ar dejonizuoto vandens, kad užpildytumėte didbutelį iki 20 litrų žymės. Pildami vandenį, sukite butelį, kad užtikrintumėte visišką koncentrato susimaišymą. Jeigu užpildant susidaro daug burbuliukų, leiskite plovimo tirpalui nusistovėti. Kai burbuliukai išsisklaido, pripilkite likusį reikalingą kiekį vandens, kad gautumėte 20 L plovimo tirpalo.
5. Lengvai užsukite didbutelio dangtelį. Jei dangtelis bus prisuktas per stipriai, tirpalas nebėgs per čiapą. Dabar plovimo tirpalas paruoštas naudoti Ventana automatinėje objektinių stiklių dažytuve.

Praskiestas Reakcijos buferio (1X) tirpalas supilamas į atitinkamoje pozicijoje (Reakcijos buferio) esantį butelį automatinėje fluidų modulyje Ventana automatinėje objektinių stiklių dažytuve. Reakcijos buferio (1X) tirpalas

automatiškai pateikiamas, kai to reikalauja Ventana automatiniam objektinių stikelių dažytuve vykdomas protokolas, kad būtų nuplauti objektiniai stikliai tarp dažymo žingsnių ir būtų palaikoma stabili vandeninė aplinka ant objekcinio stiklelio.

Prieš pirmąjį Reakcijos buferio (1X) tipalo naudojimą vartotojo laboratorijoje, tinkamas dažymasis turėtų būti patvirtintas nudažant keletą teigiamų ir neigiamų kontrolių. Ventana rekomenduoja teigiamas kontroles dėti ant to paties objekcinio stiklelio kaip ir paciento audinio bandinys.

Nepastovūs rezultatai gali būti gaunami dėl audinio fiksacijos. Bet kokių dažymų ar dažymo nebuvimo klinikinė interpretacija turi būti papildyta morfologiniais tyrimais ir tinkamų kontrolių įvertinimu. Vertinimas turi būti atliekamas kvalifikuoto patologo, atsižvelgiant į paciento klinikinę istoriją ir kitus diagnostinius testus.

### Procedūra žingsnis po žingsnio

Ventana reagentai buvo sukurti naudojimui Ventana automatinuose objektinių stikelių dažytuvuose kartu su Ventana detekcijos rinkiniais, pirminiais antikūnais, zondais ir priedais. Rekomenduojami dažymo protokoliai automatiniam objektinių stikelių dažytuvams pateikiami atitinkamų pirminių antikūnų ar zondu informaciniuose lapeliuose. Automatinių procedūrų parametrai gali būti pateikiami, atspausdinami ir redaguojami priklausomai nuo procedūrų, pateiktų vartotojo vadove. Kiti automatiniai objektinių stikelių dažytuvų veikimo parametrai nustatomi gamykloje. Detalūs nurodymai ir papildomos protokolų pasirinktos pateikiami prietaiso vartotojo vadove.

BenchMark ir BenchMark XT automatiniams objektinių stikelių dažytuvams

1. Užklijuokite objekcinio stiklelio juostinio kodo etiketę, atitinkančią atliekamą zondo protokolą.
2. Uždėkite pirminį antikūną ar zoną, tinkamą detekcijos rinkinį ir reikalingus papildomus reagentus ant reagentų padėklo ir įdėkite jį į automatinį objektinių stikelių dažytuvą. Patikrinkite tirinius fluidus ir atliekas.
3. Sudėkite objekcinis stiklius į automatinį objektinių stikelių dažytuvą.
4. Paleiskite dažymo procesą.
5. Pasibaigus procesui, išimkite objekcinis stiklius iš automatinio objektinių stikelių dažytuvo.
6. MIEW DAB ir Ventana Red kit protokolams nuplaukite švelniame indų plovimo detergente ar alkoholyje, kad pašalintumėte dengiamąjį tirpalą; pašalinkite vandenį, nuvalykite ir įprastu būdu padenkite pastoviu dengimo skysčiu.
7. AES chromogenui nepašalinkite vandens ir nevalykite. Uždėkite AEC su vandeniniu dengiamuoju skysčiu. Nudažyti objektiniai stikliai turėtų būti nuskaityti per dvi – tris dienas po dažymo ir yra stabilūs mažiausiai dvejus metus, jeigu tinkamai laikomi kambario temperatūroje (nuo 20 °C iki 28 °C).
8. ISH MIEW Blue detekcijos rinkiniui nuplaukite švelniame indų plovimo detergente ar alkoholyje, kad pašalintumėte dengiamąjį tirpalą.
9. Perkelkite objekcinis stiklius į vonelę su distiliuotu vandeniu maždaug 1 – 3 minutėms. Nukratykite vandens perteklių.
10. Patikrinkite šios ir visų kitų vonelių lygius. Įsitinkinkite, kad visi tirpalai visiškai padengs objekcinis stiklius, sudėlus padėkle. Pridėkite pakankamą kiekį naujo reagento į kiekvieną konteinerį, kad objekciniai stikliai visuomet būtų padengti. Įsitinkinkite, kad pašalinate fluido perteklių po kiekvieno žingsnio. Perkelkite objekcinis stiklius į 90 % etanolį maždaug 1 – 3 minutėms.
11. Perkelkite objekcinis stiklius į 100 % etanolį maždaug 1 – 3 minutėms.
12. Perkelkite objekcinis stiklius į antrąją 100 % etanolio vonelę maždaug 1 – 3 minutėms.
13. Perkelkite objekcinis stiklius į pirmąją ksileno vonelę maždaug 1 – 3 minutėms.
14. Perkelkite objekcinis stiklius į antrąją ksileno vonelę maždaug 1 – 3 minutėms. Objektiniai stikliai gali būti palikti šioje ksileno vonelėje kol bus padengiami dengiamaisiais stikliais.
16. Uždėkite visus indus ir išjunkite traukos spintą.

### Kokybės kontrolės procedūros

#### Teigiama audinio kontrolė

Teigiama audinio kontrolė turi būti apdorojama kiekvienos atliekamos dažymo procedūros metu. Teigiamos kontrolės medžiagos pavyzdžiai pateikiami atitinkamuose Ventana pirminių antikūnų pakuotėse esančiuose informaciniuose lapeliuose.

Teigiamos kontrolės naudojamos patvirtinti, kad antikūnas buvo uždėtas ir kad prietaisas tinkamai veikia. Šis audinys gali turėti tiek teigiamai, tiek neigiamai besidažančių ląstelių ar audinių komponentų ir tikti tiek kaip teigiamos, tiek kaip neigiamos kontrolės audinys. Kontroliniai audiniai turėtų būti švieži autopsiniai, biopsiniai ar chirurginiai bandiniai, paruošti ar fiksuoti kaip galima greičiau nuo pačiu būdu kaip ir testinės sekcijos. Tokie audiniai gali būti naudojami stebėti visus procedūros žingsnius nuo audinio paruošimo iki dažymo. Naudojant audinio sekcijas, kurios fiksuotos ar apdorotos skirtingai nei testinis bandinys, bus gaunama kontrolė visiems reagentų ir metodų žingsniams, išskyrus fiksavimą ir audinio apdorojimą. Audinys su silpnu teigiamu dažymu yra tinkamesnis optimaliai kokybės kontrolei ir nustatant nedidelės reagentų degradacijos lygius.

Žinomos teigiamos audinių kontrolės turėtų būti naudojamos tik stebėti tinkamam apdorotų audinių dažymo atlikimui ir reagentų tikrinimui, o ne kaip pagalba nustatant specifinę paciento pavyzdžių diagnozę. Jeigu teigiamoms audinių kontrolėms negaunamas teigiamas dažymas, rezultatai su testiniu bandiniu turėtų būti laikomi negaliojančiais.

#### Neigiama audinio kontrolė

Tas pats audinys, naudotas teigiamai audinio kontrolei, gali būti naudojamas kaip neigiama audinio kontrolė. Ląstelių tipų įvairovė, esanti daugelyje audinių sekcijų, pateikia vidines neigiamos kontrolės sritis, tačiau jos turi būti patvirtintos vartotojo. Nesidažantys komponentai turėtų būti be specifinio dažymo ir pateikti nespecifinio foninio dažymo požymius. Jeigu specifinis dažymas atsiranda neigiamos audinio kontrolės srityse, rezultatai su paciento bandiniais turėtų būti laikomi negaliojančiais.

#### Nepaaiškinami neatitikimai

Dėl nepaaiškinamų neatitikimų kontrolėse turėtų būti nedelsiant konsultuojamasi su vietiniu Ventana atstovu. Jeigu kokybės kontrolės rezultatai neatitinka specifikacijų, paciento rezultatai yra negaliojantys. Žr. šio informacinio lapelio skyrelį „Problemų sprendimas“. Identifikuokite ir pašalinkite problemą, tuomet pakartokite paciento pavyzdžių dažymą.

#### Neigiama reagento kontrolė

Neigiama reagento kontrolė turėtų būti atliekama kiekvienam bandiniui siekiant palengvinti rezultatų interpretavimą. Neigiama reagento kontrolė naudojama vietoj pirminio antikūno siekiant įvertinti nespecifinį dažymą. Objektinis stiklis turėtų būti dažomas su Neigiamos kontrolės reagentu (pelės) arba Triušio neigiama kontrole, priklausomai nuo to, kaip reikia. Jeigu naudojama alternatyvi neigiama reagento kontrolė, praskieskite ją Ventana Antikūnų skiedikliu iki tos pačios koncentracijos kaip ir pirminio antikūno antiseras. Vienas skiediklis gali būti naudojamas kaip alternatyva prieš tai aprašytoms neigiamoms reagento kontrolėms. Inkubavimo trukmės neigiamai reagento kontrolei turėtų būti tokios pačios kaip ir pirminiam antikūnui.

Kai serijinėms sekcijoms naudojamas keletas antikūnų panelis, neigiama reagento kontrolė ant vieno objekcinio stiklelio gali būti neigiama ar nespecifinio susiršimo fono kontrolė kitiems antikūnams.

*In situ* hibridizacijai turi būti atliekama neigiama kontrolė. Ventana rekomenduoja sekti kokybės kontrolės rekomendacijas, pateiktas Amerikos patologų laboratorijų akreditavimo programos kolegijos, Anatomijos patologijos kontrolinio sąrašo.

#### Bandymo patvirtinimas

Prieš diagnostinei procedūrai pirmą kartą naudojant antikūną ar dažymo sistemą, turėtų būti patvirtintas antikūno specifiskumas, patikrinant jį su serija audinių su žinomomis imunohistocheminėmis savybėmis, atitinkančių žinomus teigiamus ir neigiamus audinius (remkitės atitinkamų Ventana pirminių antikūnų informaciniame lapelyje esančiu skyreliu „Kokybės kontrolės procedūros“, kuriame pateikiamos Amerikos patologų laboratorijų akreditavimo programos kolegijos, Anatomijos patologijos kontrolinio sąrašo ir NCCLS patvirtintų direktyvų kokybės kontrolės rekomendacijos. Šios kokybės kontrolės procedūros turėtų būti karojamos kiekvienai naujai antikūnų partijai ar kada tik pakeičiami bandymo parametrai.

#### Rezultatų interpretavimas

Ventana automatinė imunodažymo procedūra lemia spalvoto reakcijos produkto susidarymą. Remkitės atitinkamo detekcijos rinkinio pakuotėje esančiu informaciniu lapeliu, kuriame aprašomos laukiamos spalvinės reakcijos. Kvalifikuotas patologas, patyręs imunohistocheminėse procedūrose, turi įvertinti teigiamas ir neigiamas kontroles prieš interpretuodamas rezultatus.

#### Teigiama audinio kontrolė

Nudažytas teigiamas audinys turėtų būti tiriamas pirmas, kad išsiaiškintumėte, ar visi reagentai veikia tinkamai. Tinkamos spalvos reakcijos produkto buvimas taikininėse ląstelėse nurodo, kad reakingumas yra tinkamas. Laukiama spalvinė reakcija aprašyta informaciniame lapelyje, esančiame detekcijos rinkinio pakuotėje. Foninio dažymo intensyvumas priklausys nuo inkubavimo trukmės.

Priklausomai nuo inkubacijos trukmės ir naudojamo hematoksilino stiprumo, foninio dažymo metu ląstelių branduoliai bus gauti nuo blyškų iki tamsiai mėlynų.

*In situ* hibridizacijai priklausomai nuo foninio dažymo inkubacijos trukmės ir naudojamo ISH Red stiprumo ląstelių branduolių spalva varijuos nuo blyškiai iki tamsiai rožinės.

Perteklinis arba nepakankamas foninis dažymas gali trukdyti tinkamai interpretuoti rezultatus. Jeigu teigiamoje audinio kontrolėje negaunamas teigiamas dažymas, bet kokie rezultatai testiniuose bandiniuose turėtų būti laikomi negaliojančiais.

#### Neigiama audinio kontrolė

Neigiama audinio kontrolė turėtų būti tiriama po teigiamos audinio kontrolės, kad patvirtintumėte reakcijos specifiskumą. Neigiamoje kontrolėje turėtų nebūti specifinio dažymo. Jeigu dažymas atsiranda, jis gali rodyti nespecifinę kryžminę reakciją su ląstelėmis ar ląsteliniais komponentais. Dažymo rezultatų vertinimui turėtų būti naudojamos intaklinės ląstelės. Nekrotinės ar degeneravusios ląstelės dažnai dažosi nespecifiškai.

#### Paciento audinys

Paciento bandiniai turėtų būti tiriami paskutiniai. Teigiamo dažymo intensyvumas turėtų būti įvertintas pagal neigiamos reagento kontrolės foninį dažymą.

Kaip bet kokiame imunohistocheminiame teste, neigiamas rezultatas reiškia, kad dominantis antigenas nebuvo aptiktas, o ne kad antigeno nėra tirtose ląstelėse ar audinyje. Jeigu reikia, naudokite antikūnų panelę, kad lengviau nustatytumėte klaidingus neigiamus rezultatus (žr. skyrelį „Laukiamų rezultatų apžvalga“).

*In situ* hibridizacijos testuose neigiamas rezultatas reiškia, kad taikininė RNR ar DNR seka buvo arba nenustatyta, arba kopijų skaičius buvo žemiau rinkinio detekcijos lygio, o ne tai, kad sekos nebuvo tirtose ląstelėse. Interpretuojant bet kokius imunohistocheminius rezultatus, taip pat turėtų būti ištirta kiekvieno audinio bandinio morfologija naudojant hematoksilinu ir eozinu nudažytas sekcijas. Paciento morfologiniai rezultatai ir susiję klinikiniai duomenys turi būti interpretuojami kvalifikuoto patologo.

## APRIBOJIMAI

### Bendri apribojimai

1. Šis produktas skirtas *in vitro* diagnostikai.
2. Imunohistochemija ir *in situ* hibridizacijos tyrimai yra daugiapakopis diagnostinis procesas, kuriam būtinas specializuotas paruošimas pasirenkant tinkamus reagentus, audinius, fiksuojant, apdorojant, paruošiant imunohistocheminius objektinius stiklelius ir interpretuojant dažymo rezultatus.
3. Imunohistocheminiuose tyrimuose klaidingi teigiami rezultatai gali būti matomi dėl neimunitinio baltymų ar substrato reakcijos produktų susirišimo. Priklausomai nuo naudojamo imunodažymo tipo jie taip pat gali būti lemiami pseudoperoksidazės aktyvumo (eritrocituose), endogeninio peroksidazės aktyvumo (citolochromas C), šarminės fosfatazės aktyvumo ar endogeninio biotino (pavyzdžiui, kepenyse, smegenyse, krūtyse, inkstuose).
4. Audinio dažymasis priklauso nuo audinio paruošimo ir apdorojimo prieš dažymą. Netinkamas fiksavimas, užšaldymas, atšildymas, džiovinimas, kaitinimas, sekcijų pjaustymas ar užteršimas kitais audiniais ar fluidais gali lemti artefaktų susidarymą, nespecifinį antikūnų sugavimą ar klaidingus neigiamus rezultatus. Nenuoseklūs rezultatai gali būti gaunami dėl fiksavimo ir įvairtinių metodų variacijų ar dėl būdingų nereguliarumų audinyje.
5. Perteklinis ar nepakankamas foninis dažymas gali trukdyti tinkamai interpretuoti rezultatus.
6. Klinikinė bet kokio teigiamo dažymo ar jo nebuvimo interpretacija turi būti įvertinta klinikinės istorijos, morfologijos ar kitų histopatologinių kriterijų kontekste. Klinikinė bet kokio teigiamo dažymo ar jo nebuvimo interpretacija turi būti papildyta morfologiniais tyrimais ir tinkamomis kontrolėmis bei kitais diagnostiniais testais. Kvalifikuotas patologas yra atsakingas už susipažinimą su antikūnais, reagentais ir metodais, naudojamais gauti dažytą bandinį. Dažymas turi būti atliekamas sertifikuotoje licencijuotoje laboratorijoje prižiūrint patologui, kuris yra atsakingas už nudažytų objektinių stiklelių peržiūrą ir teigiamų bei neigiamų kontrolių tinkamumo užtikrinimą.
7. Ventana tiekia antikūnus, zondus ir reagentus, kurių skiedimai, darbo metu sekant pateikiamus nurodymus, yra optimalūs. Bet kokie nuokrypiai nuo rekomenduojamos testo procedūros gali anuliuoti laukiamus rezultatus. Tinkamos kontrolės turi būti naudojamos ir dokumentuojamos. Vartotojai, kurie nukrypsta nuo rekomenduojamų testo procedūrų, turi prisiimti atsakomybę už paciento rezultatų interpretavimą.
8. Anksčiau netikrintuose audiniuose reagentų reakcijos gali būti netikėtos. Netikėtų reakcijų galimybė net ir patikrintų audinių grupėse negali būti visiškai eliminuota dėl antigeno raiškos biologinio nepastovumo neoplazmose ar kituose patologiniuose audiniuose. Jei gaunate ir dokumentuojate netikėtą reakciją, susisiekitė su vietiniu Ventana atstovu.

### Specifiniai apribojimai

1. Prieš naudojimą reikia patikrinti, ar Reakcijos buferio koncentratas (10X) neturi mikrobino užkrėtimo požymių. Požymiai rodantys užkrėtimą ar šio produkto nestabilumą, yra tirpalo drumstumas, kvapo atsiradimas, tirpale matomos nuosėdos. Pasirodžius galimo reagento užkrėtimo ar nestabilumo požymiams iškart kreipkitės į vietinį Ventana atstovą.
2. Šis reagentas optimizuotas 1:10 skiedimui. Tolimesni skiedimai gali lemti prastą prietaiso veikimą ir dažymo praradimą. Vartotojas turi validuoti bet kokius tokius pakeitimus.

## LAUKIAMŲ REZULTATŲ APŽVALGA

1. Laukiami rezultatai yra kiekybiniai tik tikriniant kiekvieno specifinio antigeno ar taikininės nukleorūgšties sekos jautrumą ir specifiškumą. Kaip atskiro reagento šio produkto specifiškumas ar jautrumas negali būti tiriamas.
2. Buvo patikrintas atsikartojamumas viename dažymo procese ir tarp skirtingų procesų 5 partijoms Reakcijos buferio koncentrato (10X). Buvo nustatyta, kad visi bandiniai atliko visų tirtų reagento savybių specifikacijos ribas.

## PROBLEMŲ SPRENDIMAS

1. Jeigu teigiamai kontrolei gautas silpnas dažymas nei tikėtasi, turėtų būti patikrintos kitos teigiamos kontrolės, apdorotos tame pačiame prietaise, kad nustatytumėte, ar tai dėl pirminio antikūno, ar dėl vieno iš bendrų antrinių reagentų.
2. Jeigu teigiama kontrolė nenusidažė, reikėtų patikrinti, ar ant jos objektinio stiklio užklijuota tinkama juostinio kodo etiketė. Jeigu objekcinis stiklis pažymėtas tinkamai, turėtų būti patikrintos kitos teigiamos kontrolės, apdorotos tame pačiame prietaise, kad nustatytumėte, ar tai dėl pirminio antikūno, ar dėl vieno iš bendrų antrinių reagentų. Audiniai gali būti neteisingai paimti, užfiksuoti ar deparafinuoti. Imant audinius, juos laikant ir fiksuojant turėtų būti laikomasi tinkamos procedūros.

3. Jeigu gaunamas perteklinis fono dažymasis, gali būti, kad endogeninis biotino lygis yra aukštas. Turėtų būti įtrauktas biotino blokavimo žingsnis.
4. Jeigu buvo pašalintas ne visas parafinas, deparafinizacijos procedūra turėtų būti pakartota.
5. Jeigu specifinis antikūnų dažymas yra per intensyvus, objektyvinių stiklelių apdorojimas turėtų būti kartojamas trumpinant inkubacijos trukmę 4 minutėmis, kol bus gautas norimas dažymo intensyvumas.
6. Jei audinių sekcijos nusiplauna nuo objektyvinių stiklelių, reikia patikrinti, ar jie teigiamai įkrauti.
7. Spręsdami problemas remkitės skyreliu „Procedūra žingsnis po žingsnio“, automatinio objektyvinių stiklelių dažytuvo vartotojo vadovu arba susisiekitė su vietiniu Ventana atstovu.

## LITERATŪRA

1. Sheehan DC, Hrapchak BB. Theory and practice of histotechnology, 2nd Edition. The C.V. Mosby Company, St. Louis, 1980.
2. College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2001.
3. NCCLS. Quality Assurance for Immunocytochemistry: Approved Guideline. NCCLS document MM4-A- (ISBN 1-56238-396-5). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA, 1999.
4. Herman GE, Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech Histochem 66(4): 194-199, 1991.

## INTELEKTINĖ NUOSAVYBĖ

CONFIRM™, EZ Prep™, VIEW™ ir Liquid Coverslip™ yra Ventana Medical Systems, Inc. prekiniai ženklai; BenchMark®, ES®, Gen II®, NexES® and Ventana® registruoti Ventana Medical Systems, Inc. prekiniai ženklai.

Saugoma šių patentų: U.S. Pat. Nos. 6045 759, 6192 945 B1, 6416 713 B1 ir kitų šalių analogų.