



Hematoksilinas

Katalogo numeris 760-2021

INDIKACIJOS IR NAUDOJIMAS

Numatomas naudojimas

Šis reagentas skirtas naudoti *in vitro* diagnostikai (IVD).

Tech. spec. 1.12

Ventana® Medical Systems (Ventana) Hematoksilino foninio dažo reagentas yra modifikuotas Gillo hematoksilinas ir skirtas dažyti ląstelių branduoliams ant objektyvinių stiklėlių su ląstelėmis iš užšaldytų audinių, formalinu fiksuotų ir parafine įtvirtintų audinių arba citologinių ruošinių.

Bet kokių dažymų ar dažymo nebuvimo klinikinė interpretacija turi būti papildyta morfologiniais tyrimais ir tinkamų kontrolinių įvertinimų. Vertinimas turi būti atliekamas kvalifikuoto patologo, atsižvelgiant į paciento klinikinę istoriją ir kitus diagnostinius testus.

Apžvalga ir paaiškinimas

Hematoksilinas dažo įvairius audinių komponentus, įskaitant branduolį, mitochondrijas, gleives, hemoglobiną, elastines skaidulas ir kolageną. Dažo komponentas, hemateinas, susijungia su audiniu netiesiogiai per kandią, aliuminio sulfatą.

Principai ir procedūros

Apskritai imunohistocheminiai dažymai suteikia galimybę vizualizuoti antigenus per nuoseklų specifinio antikūno pateikimą (pirminio antikūno) antigenui, antrinio antikūno pateikimą pirminiam antikūnui, fermento komplekso ir chromogeninio substrato pateikimą su tarpiniais plovimo žingsniais. Fermentinės chromogeno aktyvacijos metu susidaro matomas reakcijos produktas antigeno srityje. Tuomet bandinys gali būti nudažytas foniniu dažu – Hematoksilino tirpalu, kuris pateikiamas ant objektyvinio stiklėlio ir sumaišomas visame bandinio plote. Hematoksilinas dažo branduolius mėlynai, kandi – dažo komplekso forma susijungdamas su nukleorūgštimis ir heterochromalino histonais baltymais. Pasibaigus inkubavimo etapui Ventana automatinis objektyvinių stiklėlių dažytuvas nuplauna objektyvinius stiklėlius, kad sustabdytų reakciją ir pašalintų nesurištą medžiagą. Bandinys gali būti apdorojamas dažymu po foninio dažymo ir padengiamas dengiamuoju stikleliu. Rezultatai interpretuojami naudojantis šviesiniu mikroskopu ir padeda diferencinei patofiziologinių procesų diagnozei, kuri gali būti arba gali nebūti siejama su tam tikru antigenu.

MEDŽIAGOS IR METODAI

Pateikiami reagentai

1 – 25 ml buteliukas Hematoksilino; turi gliukolio ir acto rūgšties, stabilizuojančių tirpalą.

Atkūrimas, maišymas, skiedimas ir titravimas

Nereikalingas joks atkūrimas, maišymas, skiedimas ar titravimas. Šis reagentas optimizuotas naudoti automatinuose Ventana objektyvinių stiklėlių dažytuvuose kartu su Ventana pirminiais antikūnais, detekcijos rinkiniais ir pagalbiniais reagentais.

Reikalingos, bet nepateikiamos medžiagos ir reagentai

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

1. Teigiamos ir neigiamos audinių kontrolės.
2. Ventana neigiamos kontrolės reagentas*.
3. Ventana triušio neigiamą kontrolę*.
4. Pirminis antikūnas.
5. Mikroskopiniai objektyvinių stiklėlių, teigiamai įkrauti.
6. Džiovinimo krosnis, galinti palaikyti 70 °C ± 5 °C temperatūrą.
7. Juostinių kodų etiketės (tinkamos tiriami neigiamai kontrolei ar pirminiams antikūnams).
8. 10 % neutralus (su buferiu) formalinas.
9. Dažymo indai ar vonelės.
10. Laikrodis.
11. Ksilenas.
12. Etanolis ar reagentinis alkoholis.
13. Dejonizuotas ar distiliuotas vanduo.
14. Biocare Medical's Decloaking Chamber* (ES ir NexES IHC automatiniams objektyvinių stiklėlių dažytuvams).
15. ES NexES IHC, BenchMark ir BenchMark XT automatiniai objektyvinių stiklėlių dažytuvai.
16. MEW™ DAB, AEC, V Red (ALK PHOS) ar Enhanced V Red detekcijos rinkiniai.
17. Ventana endogeninio biotino blokavimo rinkinys*.
18. Detekcijos rinkiniui skirta programinė įranga (tik automatiniam ES objektyvinių stiklėlių dažytuvui).
19. Ventana APK plovimo tirpalas* (ES ir NexES IHC automatiniams objektyvinių stiklėlių dažytuvams).
20. Ventana Liquid Coverslip™ tirpalas (ES ir NexES IHC automatiniams objektyvinių stiklėlių dažytuvams).

21. Ventana EZ Prep™ tirpalas* (BenchMark ir BenchMark XT automatiniams objektyvinių stiklėlių dažytuvams).
 22. Ventana Reakcijos buferis* (BenchMark ir BenchMark XT automatiniams objektyvinių stiklėlių dažytuvams).
 23. Ventana LCS (BenchMark ir BenchMark XT automatiniams objektyvinių stiklėlių dažytuvams).
 24. Ventana Ląstelių kondicionierius 1 (CC1), Ląstelių kondicionierius 2 (CC2) arba Ląstelių kondicionierius 3 (CC3) (BenchMark ir BenchMark XT automatiniams objektyvinių stiklėlių dažytuvams)*.
 25. Ventana Proteazė I, II arba III*.
 26. Ventana Melsvinimo reagentas*.
 27. Dengimo skystis.
 28. Dengiamasis stiklėlis.
 29. Šviesinis mikroskopas (20-80X).
- *Jei reikia specifiniam taikymui.

Laikymas ir naudojimas

Laikyti 2-8 °C temperatūroje. Neužšaldyti. Vartotojas turi validuoti bet kokias laikymo sąlygas, kitokias nei nurodyta ant informacinio lapelio, esančio pakuotėje. Kad būtų užtikrintas tinkamas reagento pateikimas ir stabilumas, po kiekvieno dažymo proceso dozatorius turi būti uždengtas ir nedelsiant statmenai padėtas į šaldytuvą. Ant kiekvieno reagento konteinerio nurodyta galiojimo laiko pabaigos data. Kai laikomas tinkamai, reagentas yra stabilus iki datos, nurodytos ant etiketės. Nenaudokite reagento, pasibaigus jo galiojimo laikui nurodytam laikymo metodui. Požymiai, rodantys užkrėtimą ar šio produkto nestabilumą, yra reagento nuosėdų susidarymas ir tirpalo nuskaidėjimas. Pasirodžius galimo reagento nestabilumo požymiams iškart kreipkitės į vietinį Ventana atstovą.

Bandinių ėmimas ir paruošimas analizei

Užšaldytos sekcijos

Rekomenduojama procedūra yra įdėti šviežią audinį į OCT įtvirtinančią terpę ir greitai užšaldyti skystame azote ar sausu ledu atšaldytame izopentane. Iki sekcijų pjauستymo užšaldytas audinys turėtų būti laikomas -80 °C temperatūroje. Biopsijos supjaustomos nuo 4 iki 6 μm storio sekcijomis, uždedamos ant švaraus objektyvinio stiklėlio ir tuoj pat įdedamos į šaltą acetoną (0-8 °C) 10 – 30 minučių. Išėmus iš acetono objektyvinius stiklėlius paliekami džiūti ore nuo 10 minučių iki 1 valandos.

Citologiniai bandiniai

Citologiniai ruošiniai ir kraujo tepinėliai turėtų būti ruošiami pagal standartinės laboratorinės procedūras:

1. Džiovinkite objektyvinius stiklėlius ore 30 minučių.
2. Užfiksuokite šaltame acetone (0-8 °C) 10 – 30 minučių.
3. Išimkite iš acetono ir palikite džiūti ore nuo 10 minučių iki 1 valandos.
4. Įdėkite į eksikatorius su džiovinčiu daugiausiai 10 dienų. Jeigu sekcijos turi būti saugomos ilgiau nei 10 dienų, sandariai suvyniokite į aliuminio foliją ir laikykite -80 °C temperatūroje.
5. Išėmę iš -80 °C temperatūros, leiskite objektyviniams stiklėliams atšilti iki kambario temperatūros (į aliuminio foliją įvyniotus objektyvinius stiklėlius atšildykite prieš nuimdami aliuminio foliją, kad išvengtumėte kondensacijos ant bandinio).
6. Užklijuokite juostinių kodų etiketes ant objektyvinių stiklėlių ir sudėkite į automatinį objektyvinių stiklėlių dažytuvą.

Formaline fiksuoti, parafine įtvirtinti bandiniai

Rutiniškai apdoroti formaline fiksuoti, parafine įtvirtinti audiniai tinkami naudoti su šiuo reagentu, kai naudojami su Ventana pirminiais antikūnais, detekcijos rinkiniais, papildomais reagentais ir automatiniais objektyvinių stiklėlių dažytuvais (žr. skyrelį „Reikalingos, bet nepateikiamos medžiagos ir reagentai“). Rekomenduojamas audinio fiksavimas 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 objektyvinio stiklėlio. Objektyviniai stiklėliai su audinio sekcija gali būti kaitinami mažiausiai 2 valandas (bet ne ilgiau kaip 24 valandas) 70 °C ± 5 °C temperatūros krosnyje.

Rankinė deparafinizavimo procedūra

Reikalinga naudojant ES arba NexES IHC automatinius objektyvinių stiklėlių dažytuvus arba jeigu nepasirenkama deparafinizavimo procedūra BenchMark arba BenchMark XT automatinuose objektyvinių stiklėlių dažytuvuose.

1. Nurodymai, kada pažymėti objektyvinius stiklėlius juostinių kodų etiketėmis pateikiami kiekvienam specifiniam automatiniam objektyvinių stiklėlių dažytuvui skyrelyje „Naudojimo nurodymai“.
2. Paeiliui tris kartus 5 ± 1 minutėms panardinkite objektyvinius stiklėlius į ksileno vonelę.
3. Perkelkite objektyvinius stiklėlius į 100 % etanolį ir panardinkite paeiliui du kartus 3 ± 1 minutėms.
4. Perkelkite objektyvinius stiklėlius į 95 % etanolį ir panardinkite šiame tirpale 3 ± 1 minutėms.
5. Perkelkite objektyvinius stiklėlius į 80 % etanolį ir panardinkite šiame tirpale 3 ± 1 minutėms.

- Perkelkite objektinius stikelius į dejonizuoto ar distiliuoto vandens vonelę ir panardinkite mažiausiai 10 kartų.
- Perkelkite objektinius stikelius į APK Plovimo tirpalą (1X) ar buferinį tirpalą, priklausomai nuo to, kaip reikia. APK plovimo tirpale objektiniai stikliai turėtų likti iki būsimo pasiruosę atlikti dažymo procesą. Buferiniame tirpale objektiniai stikliai turėtų išlikti iki būsimo pasiruosę atlikti antigeno atidengimo procedūrą. Neleiskite objektiniams stikliams išdžiūti.

Objektiniai stikliai, dažomi BenchMark ar BenchMark XT automatinuose objektinių stiklių dažytuvuose, gali būti automatiškai deparafinizuojami prietaise. Jeigu pasirinktis nepasirenkama, sekite rankinę deparafinizavimo procedūrą, pateiktą aukščiau.

PERSPĖJIMAI IR ATSARGUMO PRIEMONĖS

- Naudodamiesi reagentais, imkitės tinkamų atsargumo priemonių. Naudokite vienkartines pirštines, kai naudojate medžiagas, kurios gali būti karcinogeninės ar toksinės (pavyzdžiui, ksilenas ar formaldehidus).
- Venkite akių ir gleivinių membranų kontakto su reagentais. Jeigu reagentai patenka ant jautrių sričių, gausiai nuplaukite vandeniu.
- Pacientų bandiniai ir visos medžiagos, susiduriančios su jais, turėtų būti laikomi biologinio pavojaus medžiagomis ir išmetami su atitinkamomis atsargumo priemonėmis. Niekuomet nesiraukite medžiagų į pipetę burna.
- Venkite reagentų mikrobiologinio užkrėtimo, kadangi dėl to gali būti gaunami netikslūs rezultatai.
- Kitokios nei nurodyta inkubavimo trukmės ir temperatūros gali lemti klaidingus rezultatus. Vartotojas turi validuoti bet kokius tokius pakeitimus.
- Reagentai yra optimaliai praskiesti, tolimesni skiedimai gali gali lemti antigeninio dažymo praradimą. Vartotojas turi validuoti bet kokius tokius pakeitimus.
- Per ilgo kontakto su reagentais simptomai gali apimti odos ir akių sudirginimus bei gleivinių membranų ir viršutinių kvėpavimo takų dirginimą. ACGIH (TLV): jokio: OSHA (PEL): N/A; IARC: neįtraukta; NTP: neįtraukta.

NAUDOJIMO NURODYMAI

Procedūra žingsnis po žingsnio

Hematoksilinas buvo optimizuotas, kad suteiktų pastovų branduolių dažymą, kai inkubuojamas keturias minutes ir naudojamas kartu su Ventana pirminiais antikūnais, detekcijos rinkiniais ir papildomais reagentais Ventana automatinuose objektinių stiklių dažytuvuose. Automatinio objektinių stiklių dažytuvo atliekamos operacijos priklauso nuo pasirinktų pasirinkčių kiekvienai taikomai procedūrai. Tikslų operacijų seką pateikiama prietaiso vartotojo vadove. Automatinę procedūrą parametrai gali būti pateikiami, atspausdinami ir redaguojami priklausomai nuo procedūrų, pateiktų vartotojo vadove. Kiti automatinų objektinių stiklių dažytuvų veikimo parametrai nustatomi gamykloje.

Dažymo procedūros Ventana automatinuose objektinių stiklių dažytuvuose yra išvardintos toliau (detalūs nurodymai ir papildomos protokolų pasirinktys pateikiami prietaiso vartotojo vadove).

ES ir NexES IHC automatiniams objektinių stiklių dažytuvams

Jei antigeno atidengimas reikalingas:

- Deparafinizuokite objektinius stiklius juos paeiliui veikdami ksilenu, skirtingos koncentracijos alkoholiu ir nuplaudami vandeniu ar tinkamu buferiu. Atlikite antigeno atidengimo procedūrą ir perkelkite objektinius stiklius į APK Plovimo tirpalą (1X).
- Uždėkite pirminio antikūno ir tinkamo detekcijos rinkinio dozatorius ir reikalingus papildomus reagentus ant reagentų padėklo ir įdėkite jį į automatinį objektinių stiklių dažytuvą. Patikrinkite tūrinis fluidus ir atliekas.
- Nudžiovinkite nudažytą objektinio stiklio galą ir tuomet užklijuokite objektinio stiklio juostinio kodo etiketę, atitinkančią atliekamą antikūnų protokolą.
- Sudėkite deparafinizuotus, su atidengtu antigenu, etiketėmis sužymėtus objektinius stiklius iš APK Plovimo tirpalo (1X). Neleiskite audiniui išdžiūti.

Jei antigeno atidengimas nereikalingas:

- Užklijuokite juostinių kodų etiketes ant objektinių stiklių. Tuomet deparafinizuokite objektinius stiklius juos veikdami ksilenu, skirtingos koncentracijos alkoholiu ir nuplaudami vandeniu bei po to APK Plovimo tirpalu (1X).
- Uždėkite pirminio antikūno ir tinkamo detekcijos rinkinio dozatorius ir reikalingus papildomus reagentus ant reagentų padėklo ir įdėkite jį į automatinį objektinių stiklių dažytuvą. Patikrinkite tūrinis fluidus ir atliekas.
- Sudėkite deparafinizuotus, etiketėmis sužymėtus objektinius stiklius iš APK Plovimo tirpalo (1X). Neleiskite audiniui išdžiūti.

BenchMark ir BenchMark XT automatiniams objektinių stiklių dažytuvams

- Užklijuokite objektinio stiklio juostinio kodo etiketę, atitinkančią atliekamą antikūnų protokolą.
- Uždėkite pirminio antikūno ir tinkamo detekcijos rinkinio dozatorius ir reikalingus papildomus reagentus ant reagentų padėklo ir įdėkite jį į automatinį objektinių stiklių dažytuvą. Patikrinkite tūrinis fluidus ir atliekas.
- Sudėkite objektinius stiklius į automatinį objektinių stiklių dažytuvą.

Visiems prietaisams

- Paleiskite dažymo procesą.

- Pasibaigus procesui, išimkite objektinius stiklius iš automatinio objektinių stiklių dažytuvo.
- VIEW 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.
- AES chromogenu 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 dvi savaites, jeigu tinkamai laikomi kambario temperatūroje (nuo 20 °C iki 28 °C).

Kokybės kontrolės procedūros

Teigiama audinio kontrolė

Teigiama audinio kontrolė turi būti atdorojama kiekvienos atliekamos dažymo procedūros metu. Teigiamos kontrolės medžiagos pavyzdžiai pateikiami atitinkamose 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 tiktai tiek kaip teigiamos, tiek kaip neigiamos kontrolės audinys. Kontroliniai audiniai turėtų būti švieži autopsiniai, biopsiniai ar chirurginiai bandiniai, paruošti ar fiksuoti kaip galima greičiau tuo 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 testinės 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 antiserumas. Vienas skiediklis gali būti naudojamas kaip alternatyva prieš tai aprašytoms neigiamoms reagento kontrolėms. Inkubavimo trukmė neigiamai reagento kontrolei turėtų būti tokios pačios kaip ir pirminiam antikūnui. Kai serijinės sekcijos naudojamas keleto antikūnų panelis, neigiama reagento kontrolė ant vieno objekto stiklio gali būti neigiama ar nespecifinio susirišimo fono kontrolė kitiems antikūnams.

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 sąrašo² ir NCCLS patvirtintų direktyvų kokybės kontrolės rekomendacijos³. Šios kokybės kontrolės procedūros turėtų būti kartojamos kiekvienai naujai antikūnų partijai ar kada tik pakeičiami bandymo parametrai.

Rezultatų interpretavimas

Ventana automatinė imunodažymo procedūra lemia spalvoto reakcijos produkto nusodinimą ant antigeno sričių, lokalizuotų pirminio antikūno. Remkitės atitinkamo detekcijos rinkinio pakuotėje esančiu informaciniu lapeliu, kuriame aprašomos laukiamos spalvinės reakcijos. Užlašinus hematoksilino kaip foninio dažo bus gaunamas mėlynas ląstelių branduolio heterochromatino dažymas. Kvalifikuotas patologas, patyręs imunohistocheminę procedūrą, 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 taikiniuose ląstelėse nurodo, kad reaktingumas yra tinkamas. Laukiama spalvinė reakcija aprašyta informaciniame lapelyje, esančiame detekcijos rinkinio pakuotėje. Priklausomai nuo inkubacijos trukmės ir naudojamo hematoksilino stiprumo, foninio dažymo metu ląstelių branduoliai bus gauti nuo blyškių iki tamsiai mėlynų. Perteklinis arba nepakankamas foninis dažymas gali trukdyti tinkamai interpretuoti rezultatus. Jeigu teigiamoje audinio kontrolėje negaunamas teigiamas dažymas, bet kokiu rezultatai testiniuose bandiniuose turėtų būti laikomi negaliojančiais.

Neigiama audinio kontrolė

Neigiama audinio kontrolė turėtų būti tirama po teigiamos audinio kontrolės, kad patvirtintumėte specifinį taikinio antigeno žymėjimą pirminiais antikūnais. Specifinio dažymo nebuvimas neigiamoje audinio kontrolėje patvirtina, kad antikūnai kryžmiškai nereagavo su ląstelėmis ar ląsteliniais komponentais. Jeigu neigiamoje audinio kontrolėje atsiranda specifinis dažymas, paciento bandinio rezultatai turėtų būti laikomi negaliojančiais.

Jeigu bus, nespecifinis dažymas atrodys išsisklaidęs. Taip pat gali būti stebimas atsiliktinis šviesus jungiamojo audinio dažymas sekcijose iš pernelyg formalinu fiksuotų audinių. Dažymo rezultatų vertinimui turėtų būti naudojamos intaktinės 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. Interpretuojant bet kokius imunohistocheminius rezultatus, taip pat turėtų būti iširta kiekvieno audinio bandinio morfologija naudojant hematoksilinu ir eozinu nudažytas sekcijas. Paciento morfologiniai rezultatai ir susiję klinikiniai duomenys turi būti interpretuojami kvalifikuoto patologo.

APRIBOJIMAI

- Imunohistochemija yra daugiapakopis diagnostinis procesas, kuriam būtinas specializuotas paruošimas pasirenkant tinkamus reagentus, audinius, fiksuojant, apdorojant, paruošiant imunohistocheminius objektinius stiklius ir interpretuojant dažymo rezultatus.
- 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 įtvirtinimo metodų variacijų ar dėl būdingų nereguliarumų audinyje.
- Perteklinis ar nepakankamas foninis dažymas gali trukdyti tinkamai interpretuoti rezultatus.
- Klinikinė bet koks teigiamo dažymo ar jo nebuvimo interpretacija turi būti įvertinta klinikinės istorijos, morfologijos ar kitų histopatologinių kriterijų kontekste. Klinikinė bet koks teigiamo dažymo ar jo nebuvimo interpretacija turi būti papildyta morfologiniais tyrimais ir tinkamomis kontrolėmis bei kitais diagnostiniais testais. Šis antikūnas yra skirtas būti naudojamas su antikūnų panelėmis. 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 stiklių peržiūrą ir teigiamų bei neigiamų kontrolių tinkamumo užtikrinimą.
- Ventana tiekia antikūnus 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.
- Anksčiau netikrintuose audiniuose reagentų reakcijos gali būti netikėtos. Netikėtų reakcijų galimybė net ir patikrintų audinių grupėse negali būti visiškai eliminuota dėl antigeno raiškos biologinio nestovumo neoplazmose ar kituose patologiniuose audiniuose⁴. Jei gaunate ir dokumentuojate netikėtą reakciją, susisieki su vietiniu Ventana atstovu.
- Hepatito B virusu infekuotų asmenų audiniai ir audiniai, turintys hepatito B paviršiaus antigeną (HbsAg) gali nespecifiškai dažytis su krienų peroksidaze⁵.
- Blokavimo etapuose naudojamas normalus serumas iš to paties gyvūninio šaltinio kaip ir antrinis antiserumas gali lemti klaidingus neigiamus ar klaidingus teigiamus rezultatus dėl autoantikūnų ar natūralių antikūnų.
- Klaidingi teigiami rezultatai gali būti matomi dėl neimuninio baltymų ar substrato reakcijos produktų susirišimo. Priklausomai nuo naudojamo imunodažymo tipo jie taip pat gali būti lemiami pseudoperoxidazės aktyvumo (eritrocituose), endogeninio peroksidazės aktyvumo (citochromas C), šarminės fosfatazės aktyvumo ar endogeninio biotino (pavyzdžiui, kepenyse, smegenyse, krūtyse, inkstuose)⁶.

- Kaip bet kokiame imunohistocheminiame teste, neigiamas rezultatas reiškia, kad dominantis antigenas nebuvo aptiktas, o ne kad antigeno nėra tirtose ląstelėse ar audinyje.

LAUKIAMŲ REZULTATŲ APŽVALGA

- Hematoksilino pateikimas Ventana automatiniam objektinių stiklių dažyvuve lems mėlyną ląstelės branduolio heterochromatino dažymą. Laukiami paciento bandinio rezultatai aprašyti atitinkamame Ventana pirminių antikūnų informaciniame lapelyje. Tinkami bandinio kontrolės rezultatai patvirtina, kad reagentas ir sistema veikia tinkamai.
- Jautrumas priklauso nuo antikūno išlaikymo. Netinkamas audinio apdorojimas fiksavimo, sekcijų pjaustymo, įtvirtinimo ar laikymo metu, pakeičiantis antigeniškumą, susilpnina pirminių antikūnų detekciją ir gali lemti klaidingus neigiamus rezultatus.
- Atsikartojamumo tame pačiame dažymo procese tyrimuose buvo gautas mėlynas ląstelių branduolių heterochromatino dažymas 100 % tirtų atvejų.
- Atsikartojamumo tarp skirtingų dažymo procesų tyrimuose buvo gautas mėlynas ląstelių branduolių heterochromatino dažymas 100 % tirtų atvejų.

PROBLEMŲ SPRENDIMAS

- 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.
- Jeigu teigiama kontrolė nenusidazė, reikėtų patikrinti, ar ant jos objekcinio 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 deparafinizuoti. Imant audinius, juos laikant ir fiksuojant turėtų būti laikomasi tinkamos procedūros.
- Jeigu gaunamas perteklinis fono dažymasis, gali būti, kad endogeninis biotino lygis yra aukštas. Turėtų būti įtrauktas biotino blokavimo žingsnis.
- Jeigu buvo pašalintas ne visas parafinas, deparafinizacijos procedūra turėtų būti pakartota.
- Jeigu specifinis antikūnų dažymas yra per intensyvus, objekcinį stiklį apdorojimas turėtų būti kartojamas trumpinant inkubacijos trukmę 4 minutėmis, kol bus gautas norimas dažymo intensyvumas.
- Jei audinių sekcijos nusiplauna nuo objekcinį stiklį, reikia patikrinti, ar jie teigiamai įkrauti.
- Sprendami problemos remkitės skyreliu „Procedūra žingsnis po žingsnio“, automatinio objekcinį stiklį dažyvuvo vartotojo vadovu arba susisieki su vietiniu Ventana atstovu.

LITERATŪRA

- Sheehan DC, Hrapchak BB. Theory and practice of histotechnology, 2nd Edition. The C.V. Mosby Company, St. Louis, 1980.
- College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2001.
- 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.
- Herman GE, Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech Histochem 66(4): 194-199, 1991.
- Omata M, Liew CT, Ashcavi M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen. A possible source of error in immunohistochemistry. Am J Clin Pathol 73(5): 626-32, 1980.
- Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase: part 1. The technique and its pitfalls. Lab Med 14: 767, 1983.
- Gill GW, Frost JK, Miller KA. A new formula for a half-oxidized hematoxylin that neither overstains nor requires differentiation. Acta Cytol 18(4): 300-311, 1974.

INTELEKTINĖ NUOSAVYBĖ

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