



## Melsvinimo reagentas

Katalogo numeris 760-2037

### INDIKACIJOS IR NAUDOJIMAS

#### Numatomas naudojimas

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

Ventana® Medical Systems Melsvinimo reagentas yra vandeninis buferinis ličio karbonato tirpalas. Šis reagentas skirtas naudoti Ventana automatinuose objektinių stiklelių dažytuose hematoksilinu nudažytų sekcijų ant objektinių stiklelių blukiniui. 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.

#### Apžvalga ir paaiškinimas

Melsvinimo reagentas veikia per bendrą ličio jonų ir augančio plovimo buferio pH efektą ir išblukina hematoksilinu nudažytas sekcijas<sup>1</sup>. Melsvinimo reagentas pateikiamas po hematoksilino ir pakeičia hematoksilino spalvą į mėlyną.

#### Principai ir procedūros

Po foninio dažymo su hematoksilinu, melsvinimo reagentas pateikiamas ant objektinių stiklelių ir sumaišomas visame bandinio plote. Reagentas išblukina hematoksilinu nudažytas sekcijas, o inkubavimo etapo pabaigoje automatinis objektinių stiklelių dažytuvas nuplauna objektinius stiklelius, kad sustabdytų reakciją ir pašalintų nesurištą medžiagą. Daugiau informacijos pateikiama atitinkamo Ventana automatinio objektinių stiklelių dažytuvo vartotojo vadove.

### MEDŽIAGOS IR METODAI

#### Pateikiami reagentai

Viename Melsvinimo reagento dozatoriuje yra 25 ml tinkamos koncentracijos reagento. Dozatoriuje yra 0,1 M ličio karbonato ir 0,5 M natrio karbonato tirpalas.

#### Atkūrimas, maišymas, skiedimas ir titravimas

Nereikalingas joks atkūrimas, maišymas, skiedimas ar titravimas. Šis reagentas optimizuotas naudoti automatinuose Ventana objektinių stiklelių dažytuose kartu su Ventana detekcijos rinkiniais, antikūnais ir pagalbiniais reagentais.

#### 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. Pirminis antikūnas.
3. Antikūnų skiediklis.
4. Mikroskopiniai objektiniai stiklėliai, teigiamai įkrauti.
5. Teigiamos ir neigiamos audinių kontrolės.
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 Decloacking Chamber\* (ES ir NexES IHC automatiniams objektinių stiklelių dažytuvams).
15. ES NexES IHC, BenchMark ir BenchMark XT automatiniai objektinių stiklelių dažytuvai.
16. MIEW™ DAB, AEC, V Red (ALK PHOS) ar Enhanced V Red detekcijos rinkiniai.
17. Ventana endogeninio biotino blokavimo rinkinys\*.
18. Ventana amplifikavimo rinkinys\*.
19. Detekcijos rinkiniui skirta programinė įranga (tik automatiniam ES objektinių stiklelių dažytuvui).
20. Ventana APK plovimo tirpalas (ES ir NexES IHC automatiniams objektinių stiklelių dažytuvams).
21. Ventana Liquid Coverslip™ tirpalas (ES ir NexES IHC automatiniams objektinių stiklelių dažytuvams).
22. Ventana EZ Prep™ tirpalas\* (BenchMark ir BenchMark XT automatiniams objektinių stiklelių dažytuvams).
23. Ventana Reakcijos buferis (BenchMark ir BenchMark XT automatiniams objektinių stiklelių dažytuvams).
24. Ventana LCS (BenchMark ir BenchMark XT automatiniams objektinių stiklelių dažytuvams).
25. Ventana Ląstelių kondicionierius 1 (CC1), Ląstelių kondicionierius 2 (CC2) (BenchMark ir BenchMark XT automatiniams objektinių stiklelių dažytuvams)\*.
26. Ventana Proteazė I, II arba III\*.

27. Ventana Hematoksilino foninis dažas.
  28. Dengimo skystis.
  29. Dengiamasis stiklis.
  30. 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. Pasirodžius galimo reagento nestabilumo požymiams iškart kreipkitės į vietinį Ventana atstovą.

#### Bandinių ėmimas ir paruošimas analizei

Rutiniškai apdoroti, formalinu fiksuoti<sup>1</sup>, parafine įtvirtinti audiniai yra tinkami naudoti su šiuo reagentu, kai jis naudojamas kartu su Ventana pirminiais antikūnais, detekcijos rinkiniais, papildomais reagentais ir automatiniais objektinių stiklelių dažytuvais (žr. skyrelį „Reikalingos, bet nepateikiamos medžiagos ir reagentai“). Rekomenduojamas audinio fiksatyvas yra 10 % neutralus (su buferiu) formalinas<sup>2</sup>. 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 objekto stiklėlio. Objektiniai 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 automatinis objektinių stiklelių dažytuvus arba jeigu nepasirenkama deparafinizavimo procedūra BenchMark arba BenchMark XT automatinuose objektinių stiklelių dažytuvuose.

1. Nurodymai, kada pažymėti objektinius stiklėlius juostinių kodų etiketėmis pateikiami kiekvienam specifiniam automatiniam objektinių stiklelių dažytuvui skyrelyje „Naudojimo nurodymai“.
2. Paeiliui tris kartus 5 ± 1 minutėms panardinkite objektinius stiklėlius į ksileno vonelę.
3. Perkelkite objektinius stiklėlius į 100 % etanolį ir panardinkite paeiliui du kartus 3 ± 1 minutėms.
4. Perkelkite objektinius stiklėlius į 95 % etanolį ir panardinkite šiame tirpale 3 ± 1 minutėms.
5. Perkelkite objektinius stiklėlius į 80 % etanolį ir panardinkite šiame tirpale 3 ± 1 minutėms.
6. Perkelkite objektinius stiklėlius į dejonizuoto ar distiliuoto vandens vonelę ir panardinkite mažiausiai 10 kartų.
7. Perkelkite objektinius stiklėlius į APK Plovimo tirpalą (1X) ar buferinį tirpalą, priklausomai nuo to, kaip reikia. APK plovimo tirpale objektiniai stiklėliai turėtų likti iki būsite pasiruošę atlikti dažymo procesą. Buferiniame tirpale objektiniai stiklėliai turėtų išlikti iki būsite pasiruošę atlikti antigeno atidengimo procedūrą. Neleiskite objektiniams stiklėliams išdžiūti.

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

#### 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 formaldehidą).
2. Venkite akių ir gleivinių membranų kontakto su reagentais. Jeigu reagentai patenka ant jautrių sričių, gausiai nuplaukite vandeniu.
3. 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.
4. Venkite reagentų mikrobiologinio užkrėtimo, kadangi dėl to gali būti gaunami netikslūs rezultatai.
5. Kitokios nei nurodyta inkubavimo trukmės ir temperatūros gali lemti klaidingus rezultatus. Vartotojas turi validuoti bet kokius tokius pakeitimus.
6. Reagentai yra optimaliai praskiesti, tolimesni skiedimai gali lemti antigeninio dažymo praradimą. Vartotojas turi validuoti bet kokius tokius pakeitimus.
7. Melsvinimo reagentas yra stipriai šarminis reagentas. Venkite kontakto su akimis, oda ir gleivinės membranomis. Jeigu reagentas patenka ant jautrių sričių, nedelsdami paveiktą sritį gausiai nuplaukite vandeniu.
8. Per ilgo kontakto su reagentu simptomai gali apimti odos ir akių sudirginimus bei gleivinių membranų ir viršutinių kvėpavimo takų dirginimą. Kiti ūmūs efektai apima kvėpavimo blokavimą, diarėją, pykinimą ir vėmimą. ACGIH (TLV): N/A; OSHA (PEL): N/A; IARC: neįtraukta; NTP: neįtraukta.

## NAUDOJIMO NURODYMAI

### Procedūra žingsnis po žingsnio

Melsvinimo reagentas buvo optimizuotas pakeisti hematoksilinu dažytų sekcijų spalvą į mėlyną, kai inkubuojamas keturias minutes ir naudojamas kartu su Ventana Hematoksilinu. Automatinio objektnių stiklėlių dažytuvo atliekamos operacijos priklauso nuo pasirinktų pasirinktųjų kiekvienai taikomai procedūrai. Tikslų operacijų seką pateikiama prietaiso vartotojo vadove. Automatinio procedūrų parametrai gali būti pateikiami, atspausdinami ir redaguojami priklausomai nuo procedūrų, pateiktų vartotojo vadove. Kiti automatinio objektnių stiklėlių dažytuvų veikimo parametrai nustatomi gamykloje.

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

#### ES ir NexES IHC automatiniams objektnių stiklėlių dažytuvams

Jei antigeno atidengimas reikalingas:

1. Deparafinizuokite objektnius stiklėlius juos paeiliui veikdami ksilenu, skirtingos koncentracijos alkoholiu ir nuplaudami vandeniu ar tinkamu buferiu. Atlikite antigeno atidengimo procedūrą ir perkelkite objektnius stiklėlius į APK Plovimo tirpalą (1X).
2. Uždėkite pirminio antikūno ir tinkamo detekcijos rinkinio dozatorių ir reikalingus papildomus reagentus ant reagentų padėklą ir įdėkite jį į automatinį objektnių stiklėlių dažytuvą. Patikrinkite turinius fluidus ir atliekas.
3. Nudžiovinkite nudažytą objektnio stiklėlio galą ir tuomet užklijuokite objektnio stiklėlio juostinio kodo etiketę, atitinkančią atliekamą antikūnų protokolą.
4. Sudėkite deparafinizuotus, su atidengtu antigenu, etiketėmis sužymėtus objektnius stiklėlius iš APK Plovimo tirpalo (1X). Neleiskite audiniui išdžiūti.

Jei antigeno atidengimas nereikalingas:

1. Užklijuokite juostinių kodų etiketes ant objektnių stiklėlių. Tuomet deparafinizuokite objektnius stiklėlius juos veikdami ksilenu, skirtingos koncentracijos alkoholiu ir nuplaudami vandeniu bei po to APK Plovimo tirpalu (1X).
2. Uždėkite pirminio antikūno ir tinkamo detekcijos rinkinio dozatorių ir reikalingus papildomus reagentus ant reagentų padėklą ir įdėkite jį į automatinį objektnių stiklėlių dažytuvą. Patikrinkite turinius fluidus ir atliekas.
3. Sudėkite deparafinizuotus, etiketėmis sužymėtus objektnius stiklėlius iš APK Plovimo tirpalo (1X). Neleiskite audiniui išdžiūti.

#### BenchMark ir BenchMark XT automatiniams objektnių stiklėlių dažytuvams

1. Užklijuokite objektnio stiklėlio juostinio kodo etiketę, atitinkančią atliekamą antikūnų protokolą.
2. Uždėkite pirminio antikūno ir tinkamo detekcijos rinkinio dozatorių ir reikalingus papildomus reagentus ant reagentų padėklą ir įdėkite jį į automatinį objektnių stiklėlių dažytuvą. Patikrinkite turinius fluidus ir atliekas.
3. Sudėkite objektnius stiklėlius į automatinį objektnių stiklėlių dažytuvą.

#### Visiems prietaisams

1. Paleiskite dažymo procesą.
2. Pasibaigus procesui, išimkite objektnius stiklėlius iš automatinio objektnių stiklėlių dažytuvo.
3. MIEW DAB ir Ventana Red kit protokolams nuplaukite švelniau indų plovimo detergente ar alkoholyje, kad pašalintumėte dengiamąjį tirpalą; pašalinkite vandenį, nuvalykite ir įprastu būdu padenkite pastoviu dengimo skysčiu.
4. AES chromogenui nepašalinkite vandens ir nevalykite. Uždėkite AEC su vandeniniu dengiamuoju skysčiu. Nudažyti objektniai stikliai turėtų būti nuskaityti per dvi – tris dienas po dažymo ir yra stabilūs mažiausiai dvejis metus, jeigu tinkamai laikomi kambario temperatūroje (nuo 20 °C iki 28 °C).

### 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 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 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. Objektnis 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 serijinėms sekcijoms naudojamas keletas antikūnų panelis, neigiama reagento kontrolė ant vieno objektnio stiklėlio 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 (remkites atitinkamų Ventana pirminių antikūnų informaciniame lapelyje esančių skyrelių „Kokybės kontrolės procedūros“, kuriame pateikiamos Amerikos patologų laboratorijų akreditavimo programos kolegijos, Anatomijos patologijos kontrolinio sąrašo<sup>3</sup> ir NCCLS patvirtintų direktyvų kokybės kontrolės rekomendacijos<sup>4</sup>. Šios kokybės kontrolės procedūros turėtų būti kartojamos kiekvienai naujai antikūnų partijai ar kada tik pakeičiami bandymo parametrai.

### Rezultatų interpretavimas

Melsvinimo reagentas išblukina hematoksilinu nudažytas sekcijas ant objektnių stiklėlių.

#### 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. 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 kokie rezultatai testiniuose bandiniuose turėtų būti laikomi negaliojančiais.

#### Neigiama audinio kontrolė

Neigiama audinio kontrolė turėtų būti tirama po teigiamos audinio kontrolės, kad patvirtintumėte specifinį taikininio 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 atsitiktinis šviesus jungiamojo audinio dažymas sekcijose iš pernelyg formalinu fiksuotų audinių. 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 apliktas, 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

1. Imunohistochemija yra daugiapakopis diagnostinis procesas, kuriam būtinas specializuotas paruošimas pasirenkant tinkamus reagentus, audinius, fiksuojant, apdorojant, paruošiant imunohistocheminius objektinius stiklius ir interpretuojant dažymo rezultatus.
2. 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.
3. Perteklinis ar nepakankamas foninis dažymas gali trukdyti tinkamai interpretuoti rezultatus.
4. 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. 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.
5. Ventana tiekia antikūnus ir reagentus, kurių skiedimai, darbo metu sekant pateikiamus nurodymus, yra optimalūs. Bet kokie nuokrypiai nuo rekomenduojamos testo procedūros gali anuluoti laukiamus rezultatus. Tinkamos kontrolės turi būti naudojamos ir dokumentuojamos. Vartotojai, kurie nukrypsta nuo rekomenduojamų testo procedūrų, turi prisiimti atsakomybę už paciento rezultatų interpretavimą.
6. 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<sup>5</sup>. Jei gaunate ir dokumentuojate netikėtą reakciją, susisiekite su vietiniu Ventana atstovu.
7. Hepatito B viruso infekuotų asmenų audiniai ir audiniai, turintys hepatito B paviršiaus antigeną (HbsAg) gali nespecifiškai dažytis su krienų peroksidaze<sup>6</sup>.
8. 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.
9. 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 pseudoperoksidazės aktyvumo (eritrocituose), endogeninio peroksidazės aktyvumo (citochromas C), šarminės fosfatazės aktyvumo ar endogeninio biotino (pavyzdžiui, kepenyse, smegenyse, krūtyse, inkstuose)<sup>7</sup>.
10. Kaip bet kokiame imunohistocheminiame teste, neigiamas rezultatas reiškia, kad dominantis antigenas nebuvo aptiktas, o ne kad antigeno nėra tirtoje ląstelėje ar audinyje.

## LAUKIAMŲ REZULTATŲ APŽVALGA

1. Ventana automatiname objektinių stiklių dažytuve po hematoksilino dažymo ant sekcijų pateikus Melsvinimo reagento, spalva pakinta iš mėlynai violetinės į mėlyną. Laukiami paciento bandinio rezultatai aprašyti atitinkamame Ventana pirminių antikūnų informaciniame lapelyje. Tinkami bandinio kontrolės rezultatai patvirtina, kad reagentas ir sistema veikia tinkamai.
2. 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.
3. Atsikartojamumo tame pačiame dažymo procese tyrimuose buvo gautas spalvos pokytis iš mėlynai violetinės į mėlyną 100 % tirtų atvejų.
4. Atsikartojamumo tarp skirtingų dažymo procesų tyrimuose buvo gautas spalvos pokytis iš mėlynai violetinės į mėlyną 100 % tirtų atvejų.

## 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 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 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, objektinių stiklių apdorojimas turėtų būti kartojamas trumpinant inkubacijos trukmę 4 minutėmis, kol bus gautas norimas dažymo intensyvumas.
6. Jei audinių sekcijos nusiplauna nuo objektinių stiklių, reikia patikrinti, ar jie teigiamai įkrauti.
7. Spręsdami problemas remkitės skyreliu „Procedūra žingsnis po žingsnio“, automatinio objekcinio stiklių dažytuvo vartotojo vadovu arba susisiekite su vietiniu Ventana atstovu.
8. Jeigu Melsvinimo reagentu paveikti objekciniai stikliai neišbluko, patikrinkite, ar užklijuotos teisingos juostinio kodo etiketės. Jeigu objekciniai stikliai sužymėti tinkamai, patikrinkite kitus objektinis stiklius, veiktus Melsvinimo reagentu tame pačiame prietaiso dažymo procese, kad nustatytumėte, ar problema išliko dėl Melsvinimo reagento dozatoriaus. Susisiekite su vietiniu Ventana atstovu.

## LITERATŪRA

1. Luna, L.G. Histopathologic methods and color atlas of special stains and tissue artifacts. Johnson Printers, Downers Grove, Illinois. 78-79, 1992.
2. Sheehan DC, Hrapchak BB. Theory and practice of histotechnology, 2nd Edition. The C.V. Mosby Company, St. Louis, 1980.
3. College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2001.
4. 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.
5. Herman GE, Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech Histochem 66(4): 194-199, 1991.
6. 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 73(5): 626-32, 1980.
7. Nadjji M, Morales AR. Immunoperoxidase: part 1. The technique and its pitfalls. Lab Med 14: 767, 1983.

## 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.