

## Proteazė 1

Katalogo numeris 760-2018

### INDIKACIJOS IR NAUDOJIMAS

#### Numatomas naudojimas

Šis detekcijos rinkinys skirtas naudoti *in vitro* diagnostikai (IVD). Ventana® Medical Systems (Ventana) yra endopeptidazė (šarminė proteazė) iš serino proteazių šeimos, ji skaldo antigenus (baltymus) audinio sekcijoje ir sudaro sąlygas pirminiams antikūnams atpažinti ir susiriši su epitopu(-ais). Reagentas skirtas fermentiniam sekcijų iš formaline fiksuotų, parafine įtvirtintų audinių skaidymui, naudojant automatinis Ventana objektinių stiklėlių dažytuvus. 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

Fermentinis skaidymas naudojant Ventana Proteazę 1 prieš uždedant pirminį antikūną, dažnai padidina imunoreaktingumą, kaip pranešė Brozman 1978<sup>1</sup>. Po skaidymo ir po to sekančio inkubavimo su pirminiu antikūnu, naudojant Ventana detekcijos rinkinius, biotilintais antriniams antikūnais nustatoma surišto pirminio antikūno vieta. Tuomet prie biotino prijungiamas avidino – fermento konjugatas. Komplexas vizualizuojamas naudojant nusėdantį fermentinės reakcijos produktą.

#### Principai ir procedūros

Proteazė 1 skelia antigenus (baltymus) audinių sekcijoje ir sudaro sąlygas pirminiams antikūnams atpažinti ir susiriši su epitopu(-ais). Apskritai imunohistocheminis dažymas suteikia galimybę vizualizuoti antigenus per nuoseklų specifinio antikūno (pirminio antikūno) pateikimą 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 ir padengtas dengiamuoju stikliu. 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

Proteazės 1 pateikiamas kiekis yra pakankamas 250 testų. 1 –25 ml dozatorius Proteazės 1: susideda iš maždaug 12,5 fermentinio aktyvumo vienetų šarminės proteazės fermentą stabilizuojančiame tirpale su 0,01 % natrio azido.

#### Atkūrimas, maišymas, skiedimas ir titravimas

Nereikalingas joks atkūrimas, maišymas, skiedimas ar titravimas. Šis reagentas optimizuotas naudoti automatinuose Ventana objektinių 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. Teigiami ir neigiami audinio kontrolės.
2. Ventana neigiamos kontrolės reagentas\*.
3. Ventana triušio neigiamą kontrolę\*.
4. Pirminis antikūnas.
5. Mikroskopiniai objektiniai stiklėliai, teigiamai įkrauti.
6. Džiovinimo krosnis, galinti palaikyti 70 °C ± 5 °C temperatūrą.
7. Juostinių kodų etiketės (tinkamos tiriamai 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 objektinių stiklėlių dažytuvams).
15. ES NexES IHC, BenchMark ir BenchMark XT automatiniai objektinių stiklėlių dažytuvai.
16. MIEV™ 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 objektinių stiklėlių dažytuvui).
19. Ventana APK plovimo tirpalas\* (ES ir NexES IHC automatiniams objektinių stiklėlių dažytuvams).

20. Ventana Liquid Coverslip™ tirpalas (ES ir NexES IHC automatiniams objektinių stiklėlių dažytuvams).
  21. Ventana EZ Prep™ tirpalas\* (BenchMark ir BenchMark XT automatiniams objektinių stiklėlių dažytuvams).
  22. Ventana Reakcijos buferis\* (BenchMark ir BenchMark XT automatiniams objektinių stiklėlių dažytuvams).
  23. Ventana LCS (BenchMark ir BenchMark XT automatiniams objektinių stiklėlių dažytuvams).
  24. Ventana Ląstelių kondicionierius 1 (CC1), Ląstelių kondicionierius 2 (CC2) (BenchMark ir BenchMark XT automatiniams objektinių stiklėlių dažytuvams)\*.
  25. Ventana Hematoksinilinis foninis dažas\*.
  26. Ventana Melsvinimo reagentas\*.
  27. Dengimo skystis.
  28. Dengiamasis stiklis.
  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 dozatoriaus 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. Nėra jokių pavyzdinių požymių, rodančių, kad šis produktas nestabilus; todėl kartu su nežinomais bandiniais turėtų būti atliekami teigiamų ir neigiamų kontrolių dažymai. Pasirodžius galimo reagento nestabilumo požymiams iškart kreiptis 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 pjaustymo užšaldytas audinys turėtų būti laikomas -80 °C temperatūroje. Biopsijos supjaustomos nuo 4 iki 6 µm storio sekcijomis, uždedamos ant švaraus objekcinio stiklelio ir tuoj pat įdedamos į šaltą acetoną (0-8 °C) 10 – 30 minučių. Išėmus iš acetono objekciniai stiklėliai paliekami džūti ore nuo 10 minučių iki 1 valandos.

##### Citologiniai bandiniai

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

1. Džiovininkite objektinius stiklėlius ore 30 minučių.
2. Užfiksukite šaltame acetone (0-8 °C) 10 – 30 minučių.
3. Išimkite iš acetono ir palikite džūti ore nuo 10 minučių iki 1 valandos.
4. Įdėkite į eksikatorius su džiovikliu 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 objektiniams stiklėliams atšilti iki kambario temperatūros (į aliuminio foliją įvyniotus objektinius stiklėlius atšildykite prieš nuimdami aliuminio foliją, kad išvengtumėte kondensacijos ant bandinio).
6. Užklijuokite juostinių kodų etiketes ant objektinių stiklėlių ir sudėkite į automatinį objektinių 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 objektinių stiklėlių 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 stiklelio. 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 stiklėlių dažytuvus arba jeigu nepasirenkama deparafinizavimo procedūra BenchMark arba BenchMark XT automatinuose objektinių stiklėlių dažytuvuose.

1. Nurodymai, kada pažymėti objektinius stiklėlius juostinių kodų etiketėmis pateikiami kiekvienam specifiniam automatiniam objektinių stiklėlių 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.

- Perkelkite objektinius stikelius į 80 % etanolį ir panardinkite šiame tirpale 3 ± 1 minutėms.
- Perkelkite objektinius stiklius į dejonizuoto ar distiliuoto vandens vonelę ir panardinkite mažiausiai 10 kartų.
- Perkelkite objektinius stiklius į APK Plovimo tirpalą (1X) ar buferinį tirpalą, priklausomai nuo to, kaip reikia. APK plovimo tirpale objektiniai stikliai turėtų likti iki būsite pasiruošę atlikti dažymo procesą. Buferiniame tirpale objektiniai stikliai turėtų išlikti iki būsite pasiruošę 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 vienkartinės 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.
- Nerūkykite, nevalykite ir negerkite zonose, kuriose dirbama su bandiniais ir reagentais.
- Pacientų bandiniai ir visos medžiagos, susiduriančios su jais, turėtų būti laikomi biologinio pavojaus medžiagomis ir išmetami su atitinkamomis atsargumo priemonėmis. Niekuomet nesiurbkite 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 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. Toksiškas patekęs į organizmą prarijus, per poodį, per veną ir galbūt kitais keliais. Labai toksiškas prarijus. ACGIH (TLV): jokių; OSHA (PEL): jokių; IARC: neįtraukta; NTP: neįtraukta.
- Dėl rekomenduojamų išmetimo metodų kreipkitės į vietines ar regionines tarnybas.

#### NAUDOJIMO NURODYMAI

##### Procedūra žingsnis po žingsnio

Proteazė 1 buvo optimizuota suteikti pastovų rutiniškai fiksuotų formalinu, įtvirtintų parafinų audinių fermentinį skaidymą. Ji turėtų būti naudojama kartu su Ventana pirminiais antikūnais, detekcijos rinkiniais ir papildomais reagentais naudojant Ventana automatinis objektinių stiklių dažytuvus. Automatinio objektinių stiklių dažytuvo atliekamos operacijos priklauso nuo pasirinktų pasirinkčių kiekvienai taikomai procedūrai. Tiksliai operacijų seka pateikiama prietaiso vartotojo vadove. Automatinis procedūrų parametrai gali būti pateikiami, atspausdinami ir redaguojami priklausomai nuo procedūrų, pateiktų vartotojo vadove. Kiti automatinis objektinių stiklių dažytuvų veikimo parametrai nustatomi gamykloje. Dažymo procedūros Ventana automatinuose objektinių stiklių dažytuvuose yra išvardintos toliau (detaliai 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 ksilenų, 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 dozatorių ir reikalingus papildomus reagentus ant reagentų padėklą ir įdėkite jį į automatinį objektinių stiklių dažytuvą. Patikrinkite turinius 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 ksilenų, skirtingos koncentracijos alkoholiu ir nuplaudami vandeniu bei po to APK Plovimo tirpalu (1X).
- Uždėkite pirminio antikūno ir tinkamo detekcijos rinkinio dozatorių ir reikalingus papildomus reagentus ant reagentų padėklą ir įdėkite jį į automatinį objektinių stiklių dažytuvą. Patikrinkite turinius 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 dozatorių ir reikalingus papildomus reagentus ant reagentų padėklą ir įdėkite jį į automatinį objektinių stiklių dažytuvą. Patikrinkite turinius 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 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).

#### 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 audinis 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 sekijos. Tokie audiniai gali būti naudojami stebėti visus procedūros žingsnius nuo audinio paruošimo iki dažymo. Naudojant audinio sekijas, 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 sekijų, 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 serijinėms sekijoms naudojamas keleto antikūnų panelis, neigiama reagento kontrolė ant vieno objekto stiklio gali būti neigiama ar nespecifinio susirūšimo 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 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

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. Kvalifikuotas patologas, patyręs imunohistocheminės procedūros, 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 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 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 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 (žr. skyrelį „Laukiamų rezultatų apžvalga“). Interpretuojant bet kokius imunohistocheminius rezultatus, taip pat turėtų būti ištirta kiekvieno audinio bandinio morfologija naudojant hematoksilino ir eozino 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 objektnius stiklius ir interpretuojant dažymo rezultatus.
- Audinio dažymasis priklauso nuo audinio paruošimo ir apdoravimo prieš dažymą. Netinkamas fiksavimas, užšaldymas, atšildymas, džiovinimas, kaitinimas, sekcijų pjautumas 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 kokie teigiamo dažymo ar jo nebuvimo interpretacija turi būti įvertinta klinikinės istorijos, morfologijos ar kitų histopatologinių kriterijų kontekste. Klinikinė bet kokie 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 objektnių 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 prisimti 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 nepastovumo neoplazmose ar kituose patologiniuose audiniuose<sup>5</sup>. 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 peroksidazė<sup>6</sup>.
- 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 pseudoperoksidazės aktyvumo (eritrocituose), endogeninio peroksidazės aktyvumo (citochromas C), šarminės fosfatazės aktyvumo ar endogeninio biotino (pavyzdžiui, kepenyse, smegenyse, krūtyse, inkstuose)<sup>7</sup>.
- Kaip bet kokiame imunohistocheminiame teste, neigiamas rezultatas reiškia, kad dominantis antigenas nebuvo aptiktas, o ne kad antigeno nėra tirtose ląstelėse ar audinyje.
- Proteazė 1 buvo optimizuota naudoti kartu su Ventana detekcijos rinkiniais ir Ventana automatiniais objektnių stiklių dažytuvais. Dėl audinių apdoravimo nepastovumo individualiems bandiniams gali reikėti padidinti arba sumažinti inkubavimo su Proteaze 1 trukmę.

### LAUKIAMŲ REZULTATŲ APŽVALGA

- Proteazė 1 yra didelio fermentinio aktyvumo reagentas. Jis buvo optimizuotas gerai fiksuotų audinių skaidymui. Nustatyta, kad naudojant šį preparatą gauti pastovūs rezultatai antigenams, kuriems reikia stipraus fermentinio skaidymo, kad būtų gaunamas optimalus dažymas. Laukiami rezultatai yra kiekybiniai tik tada, kai tiriamas kiekvieno specifinio antigeno jautrumas ir specifiskumas. Kaip atskiram reagentui šiam produktui negali būti atliekami specifiskumo ir jautrumo tyrimai. Laukiami paciento bandinio rezultatai aprašyti atitinkamame Ventana pirminių antikūnų informaciniame lapelyje. Tinkami bandinio kontrolės rezultatai patvirtina, kad reagentas ir sistema veikia tinkamai.
- Atsikartojamumas toje pačioje partijoje ir tarp skirtingų partijų buvo patikrintas 2 Proteazės 1 partijoms. Buvo nustatyta, kad visi bandiniai atitiko specifikacijų ribas visoms patikrintos reagento savybėms.

### 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 objektnio stiklio užklijuota tinkama juostinio kodo etiketė. Jeigu objektnis 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 paraftinas, deparafinizacijos procedūra turėtų būti pakartota.
- Jeigu specifinis antikūnų dažymas yra per intensyvus, objektnių stiklių apdorojimas turėtų būti kartojamas trumpinant inkubacijos trukmę 4 minutėmis, kol bus gautas norimas dažymo intensyvumas.
- Jei audinių sekcijos nusiplauna nuo objektnių stiklių, reikia patikrinti, ar jie teigiamai įkrauti.
- Spręsdami problemas remkitės skyreliu „Procedūra žingsnis po žingsnio“, automatinio objektnių stiklių dažytuvo vartotojo vadovu arba susisieki su vietiniu Ventana atstovu.

### LITERATŪRA

- Brozman, M. Immunohistochemical analyses of formaldehyde and trypsin- or pepsin-treated material. Acta Histochem 63(2): 251-560, 1978.
- 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.

**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.