



Amplifikacijos rinkinys

Katalogo numeris 760-080

INDIKACIJOS IR NAUDOJIMAS

Numatomas naudojimas

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

Ventana® Medical Systems Amplifikacijos rinkinys gali būti naudojamas kartu su Ventana detekcijos rinkiniais, siekiant padidinti silpno dažymo pelės ar triušio pirminiais antikūnais signalo intensyvumą. Rinkinys skirtas naudoti kokybiniais formaline fiksuotų, parafine įtvirtintų audinių, užšaldytų audinių ar citologinių bandinių dažymui automatiniais Ventana objektinių stiklėlių dažytuvais su Ventana pirminiais antikūnais, detekcijos rinkiniais ir pagalbiniiais reagentais.

Rinkinyje yra du dozatoriai: 1 dozatorius su triušio anti-pelės IgG sunkiosiomis ir lengvosiomis grandinėmis (Amplifikatorius A) ir 1 dozatorius su pelės anti-triušio IgG sunkiosiomis grandinėmis (Amplifikatorius B). Amplifikatorius A specifiskai susiriša su pelės imunoglobulinais, esančiais audinio sekcijoje, o Amplifikatorius B specifiskai susiriša su triušio imunoglobulinais. Gali atsirasti netikėta antigeno raiška arba raiška gali būti prarasta, ypač neoplazmose. Atsitiktiniai strominiai elementai, supantys stipriai nudažytas struktūras ir ląsteles, pasižymės imunoreaktingumu. 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

Amplifikacijos rinkinyje naudojami anti-pelės ir anti-triušio antikūnai, susirišantys su prieš tai prisijungusiais pelės ir triušio antikūnais, esančiais audinio sekcijoje. Ventana detekcijos rinkiniuose naudojami biotilinti antikūnai, kuriais nustatoma susirišusių amplifikacijos antikūnų vieta. Po to seka streptavidino-fermento prijungimas prie biotino. Specifinis antikūno, antrinio antikūno, avidino arba streptavidino-fermento kompleksas tuomet vizualizuojamas naudojant nusėdantį reakcijos produktą, kuris lengvai nustatomas šviesine mikroskopija.

Principai ir procedūros

Ventana Amplifikacijos rinkinyje naudojamas triušio anti-pelės IgG sunkiosios ir lengvosios grandinės ir pelės anti-triušio IgG sunkiosios grandinės, kurios susiriša su pirminiais antikūnais ir padidina antikūnų, prisijungusių prie antigeno srities, skaičių. Ventana detekcijos rinkiniuose naudojami biotilinti antriniai antikūnai, kurie suriša triušio ir pelės antikūnų kompleksus, sudarytus iš pirminio antikūno ir amplifikacijos antikūnų. Po šio žingsnio pridama streptavidino-fermento konjugato, kuris prisijungia prie biotino, esančio ant antrinio antikūno. Specifinis antikūno, antrinio antikūno, streptavidino-fermento kompleksas tuomet vizualizuojamas naudojant nusėdantį reakcijos produktą. Kiekvienas žingsnis atliekamas inkubuojant tikslioje temperatūroje ir tiksliu laiku. Kiekvieno inkubacijos etapo pabaigoje automatinis Ventana objektinių stiklėlių dažytuvas nuplauna sekcijas, kad sustabdytų reakciją ir pašalintų nesurištą medžiagą, bei užlašina skysto dengiamojo tirpalo, kuris neleidžia garuoti vandeniniams reagentams ant objekcinio stiklėlio su bandiniu paviršium.

MEDŽIAGOS IR METODAI

Pateikiami reagentai

Ventana Amplifikacijos rinkinyje (100 testų) yra:

1 – 10 ml dozatorius su Amplifikatoriumi A, susidedančiu iš praskiestų triušio anti-pelės IgG sunkiųjų ir lengvųjų grandinių antikūno fiziologinio tirpalo fosfatiniame buferyje su konservantu.

1 – 10 ml dozatorius su Amplifikatoriumi B, susidedančiu iš praskiestų pelės anti-triušio IgG sunkiųjų grandinių antikūno fiziologinio tirpalo fosfatiniame buferyje su konservantu.

Atkūrimas, maišymas, skiedimas ir titravimas

Nereikalingas joks atkūrimas, maišymas, skiedimas ar titravimas.

Tolimesni skiedimai gali lemti antigeno dažymo praradimą. Vartotojas turi patvirtinti bet kokius tokius pakeltimus. Skirtumai laboratorijoje apdorojant audinius ir atliekant technines procedūras gali lemti reikšmingą rezultatų kintamumą, todėl reikalingas reguliarius kontrolių naudojimas.

Reikalingos, bet nepateikiamos medžiagos ir reagentai

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

1. Ventana neigiamos kontrolės reagentas arba Ventana triušio neigiama kontrolė.
2. Mikroskopiniai objekciniai stiklėliai, teigiamai įkrauti.
3. Teigiamos ir neigiamos audinių kontrolės.
4. Džiovinimo krosnis, galinti palaikyti $70^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ temperatūrą.
5. Juostinių kodų etiketės (tinkamos tiriami neigiamai kontrolei ar pirminiams antikūnams).
6. 10 % neutralus (su buferiu) formalinas.
7. Dažymo indai ar vonelės.
8. Laikrodis.

9. Ksilenas.
 10. Etanolis ar reagentinis alkoholis.
 11. Dejonizuotas ar distiliuotas vanduo.
 12. Biocare Medical's Decloacking Chamber (ES ir NexES IHC automatiniams objektinių stiklėlių dažytuvams).
 13. ES NexES IHC, BenchMark ir BenchMark XT automatiniai objektinių stiklėlių dažytuvai.
 14. VUEW™ DAB, AEC, V Red (ALK PHOS) ar Enhanced V Red detekcijos rinkiniai.
 15. Ventana Antikūnų skiediklis*.
 16. Ventana endogeninio biotino blokavimo rinkinys*.
 17. Detekcijos rinkiniui skirta programinė įranga (tik automatiniam ES objektinių stiklėlių dažytuvui).
 18. Ventana APK plovimo tirpalas (ES ir NexES IHC automatiniams objektinių stiklėlių dažytuvams).
 19. Ventana Liquid Coverslip™ tirpalas (ES ir NexES IHC automatiniams objektinių stiklėlių dažytuvams).
 20. Ventana EZ Prep™ tirpalas (BenchMark ir BenchMark XT automatiniams objektinių stiklėlių dažytuvams).
 21. Ventana Reakcijos buferis* (BenchMark ir BenchMark XT automatiniams objektinių stiklėlių dažytuvams).
 22. Ventana LCS (BenchMark ir BenchMark XT automatiniams objektinių stiklėlių dažytuvams).
 23. Ventana Ląstelių kondicionierius 1 (CC1)* (BenchMark ir BenchMark XT automatiniams objektinių stiklėlių dažytuvams).
 24. Ventana Ląstelių kondicionierius 2 (CC2)* (BenchMark ir BenchMark XT automatiniams objektinių stiklėlių dažytuvams).
 25. Ventana Proteazė I, II arba III*.
 26. Ventana Hematoksilino foninis dažas.
 27. Ventana Melsvinimo reagentas.
 28. Dengimo skystis.
 29. Dengiamasis stiklėlis.
 30. Šviesinis mikroskopas (20-80X).
- *Jei reikia specifiniam taikymui.

Laikymas ir naudojimas

Laikyti $2-8^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Neužšaldyti. Vartotojas turi validuoti bet kokias laikymo sąlygas, kitokias nei nurodyta ant informacinio lapelio, esančio pakuotėje.

Kad būtų užtikrintas tinkamas reagento pateikimas ir antikūnų 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 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 įjaustymo užšaldytas audinys turėtų būti laikomas -80°C temperatūroje. Biopsijos supjaustomos nuo 4 iki 6 µm storio sekcijomis, uždedamos ant švaraus objekcinio stiklėlio ir tuoj pat įdedamos į šaltą acetoną ($0-8^{\circ}\text{C}$) 10 – 30 minučių. Išėmus iš acetono objekciniai stiklėliai 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 objektinius stiklėlius ore 30 minučių.
2. Užfiksuokite šaltame acetone ($0-8^{\circ}\text{C}$) 10 – 30 minučių.
3. Išimkite iš acetono ir palikite džiūti 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 fiksavimas yra 10 % neutralus (su buferiu) formalinas¹. 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 stiklėlio. Objekciniai 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 objektnių stiklėlių dažytuvus arba jeigu nepasirenkama deparafinizavimo procedūra BenchMark arba BenchMark XT automatiniuose objektnių stiklėlių dažytuvuose.

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

Objekciniai stiklėliai, dažomi BenchMark ar BenchMark XT automatiniuose objektnių stiklėlių dažytuvuose, gali būti automatiškai deparafinizuojami prietaise. Jeigu pasirinktas nepasirenkama, sekite rankinę deparafinizavimo procedūrą, pateiktą aukščiau.

PERSPĖJIMAI IR ATSARGUMO PRIEMONĖS

1. Naudodamiesi reagentais, imkitės tinkamų atsargumo priemonių. Naudokite vienkartinės 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. Niekuomet 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. Naudojant pagal nurodymus, šis produktas neklasifikuojamas kaip pavojinga medžiaga. Reagento konservantas yra ProClin 300. Per ilgo kontakto su ProClin 300 simptomai apima odos ir akių sudirginimus 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. Per ilgo kontakto su reagentu simptomai gali apimti odos ir akių sudirginimus. Gali dirginti gleivinių membranų ir viršutinių kvėpavimo takus. Toksiškas į organizmą patekęs prarijus, per poodį, per veną ir galbūt kitais keliais. Labai toksiškas prarijus. ACGIH (TLV): jokie; OSHA (PEL): jokie; IARC: neįtraukta; NTP: neįtraukta.

NAUDOJIMO NURODYMAI

Procedūra žingsnis po žingsnio

Amplifikacijos rinkinys sukurtas naudoti automatiniuose Ventana objektnių stiklėlių dažytuvuose kartu su Ventana pirminiais antikūnais, detekcijos rinkiniais ir papildomais reagentais. Rekomenduojamas dažymo protokolas automatiniams objektnių stiklėlių dažytuvams aprašytas konkrečių antikūnų informaciniame lapelyje. Automatinų procedūrų parametrai gali būti pateikiami, atspausdinami ir redaguojami priklausomai nuo procedūrų, pateiktų vartotojo vadove. Kiti automatinų objektnių stiklėlių dažytuvų veikimo parametrai nustatomi gamykloje. Dažymo procedūros Ventana automatiniuose objektnių stiklėlių dažytuvuose yra išvardintos toliau. Detalus nurodymai ir papildomos protokolų pasirinktos pateikiami prietaiso vartotojo vadove.

ES ir NexES IHC automatiniams objektnių stiklėlių dažytuvams

Je antigeno atidengimas reikalingas:

1. Deparafinizuokite objektnius stiklėlius juos paeilui 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 dozatoriumi ir reikalingus papildomus reagentus ant reagentų padėklo ir įdėkite jį į automatinį objektnių stiklėlių dažytuvą. Patikrinkite tūrinius 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.

Je 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 dozatoriumi ir reikalingus papildomus reagentus ant reagentų padėklo ir įdėkite jį į automatinį objektnių stiklėlių dažytuvą. Patikrinkite tūrinius 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 dozatoriumi ir reikalingus papildomus reagentus ant reagentų padėklo ir įdėkite jį į automatinį objektnių stiklėlių dažytuvą. Patikrinkite tūrinius 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 švelniame indų plovimo detergente ar alkoholyje, kad pašalintumėte dengiamąjį tirpalą; pašalinkite vandenį, nuvalykite ir įprastu būdu padenkite pastoviu dengimo skysčiu.
4. AES chromogenai nepašalinkite vandens ir nevalykite. Uždėkite AEC su vandeniniu dengiamuoju skysčiu. Nudažyti objekciniai stiklėliai turėtų būti nuskaityti per dvi – tris dienas po dažymo ir yra stabilūs mažiausiai dvejus metus, jeigu tinkamai laikomi kambario temperatūroje (nuo 15 °C iki 25 °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 veiks. 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. Objektinis stiklėlis 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 objekcinio 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 (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. 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 veikė 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 blyškų 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 kryžiniškai 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 sviesus jungiamojo audinio dažymas sekcijose iš pernelių 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 kokių imunohistocheminių rezultatų, 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

Bendri apribojimai

- Imunohistochemija yra daugiapakopis diagnostinis procesas, kuriam būtinas specializuotas paruošimas pasirenkant tinkamus reagentus, audinius, fiksuojant, apdorojant, paruošiant imunohistocheminius objektnius stiklėlius ir interpretuojant dažymo rezultatus.
- Audinio dažymasis priklauso nuo audinio paruošimo ir apdorojimo prieš dažymą. Nelinkamas fiksavimas, užšaldymas, atšildymas, džiovinimas, kaltinimas, sekcijų pjaušymas 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 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, naudojamiems gauti dažytą bandinį. Dažymas turi būti atliekamas sertifikuotoje licencijuotoje laboratorijoje prižiūrint patologui, kuris yra atsakingas už nudažytų objektnių stiklėlių 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 nepastovumo neoplazmose ar kituose patologiniuose audiniuose⁴. Jei gaunate ir dokumentuojate netikėtą reakciją, susisiekite su vietiniu Ventana atstovu.
- Hepatito B virusu infekuotų asmenų audiniai ir audiniai, turintys hepatito B paviršiaus antigeną (HbsAg) gali nespecifiškai dažytis su krienų peroksidazės⁵.
- 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)⁶.
- Kaip bet kokiame imunohistocheminiame teste, neigiamas rezultatas reiškia, kad dominantis antigenas nebuvo aptiktas, o ne kad antigeno nėra tirtose ląstelėse ar audinyje.

Specifiniai apribojimai

Amplifikavimo rinkinys turi ribotą galiojimo laiką. Jeigu laikomas tinkamai, reagentas turėtų būti stabilus iki nurodytos datos. Nėra jokių akivaizdžių požymių, rodančių, kad šis produktas nestabilus. Todėl kartu su nežinomais bandiniais turėtų būti atliekami teigiamų ir neigiamų kontrolių dažymai. Teigiamos kontrolės užtikrina, kad bandinio dažymas buvo atliktas tinkamai. Neigiamos kontrolės naudojamos įvertinti nespecifinį dažymą, į kurį būtina atsižvelgti interpretuojant rezultatus. Kai teigiamos kontrolės medžiagoje gaunamas suprastėjęs dažymasis, tai gali rodyti reagento nestabilitumą; turėtumėte iškart kreiptis į vietinį Ventana atstovą.

LAUKIAMŲ REZULTATŲ APŽVALGA

- Naudojant imunodažymą su Ventana Amplifikacijos rinkiniu kartu su Ventana automatiniais objektnių stiklėlių dažytuvais, pirminiais antikūnais, detekcijos rinkiniais ir papildomais reagentais, gaunamos didesnio intensyvumo spalvotos nuosėdos antigeno vietoje, lokalizuotoje pirminio antikūno. Iš pradžių turėtų būti įvertintas neigiamos kontrolės dažymasis ir šie rezultatai palyginti su nudažyta medžiaga vertinant signalą. Taip pat kvalifikuoto patologo turėtų būti atlikta kiekvieno audinio bandinio morfologinė analizė.
- Antigeno nustatymo specifiskumas ir jautrumas priklauso nuo naudojamų specifinių pirminių antikūnų. Kiekvienas specifinis antikūnas turi būti optimizuotas siekiant gauti norimą dažymą. Optimizacija atliekama prietaise keičiant inkubacijos trukmę ir/arba specifinių antikūnų koncentraciją. Neoptimizavus specifinio antikūno antigenas gali būti nustatomas neoptimaliai.
- Amplifikacijos rinkinio specifiskumas buvo nustatytas klinikiniais tyrimais, kuriuose gautas tinkamas ląstelių dažymas naudojant triušio anti-pelės IgG sunkiausias ir lengvasias grandines ir pelės anti-triušio IgG sunkiausias grandines. Ventana patikrina įvairius normalius audinius. Formalinu fiksuoti, parafine įtvirtinti audiniai buvo nudažyti su V-Blue, V-Red, AEC ir Ventana DAB detekcijos rinkiniais (naudojant tris skirtingus antikūnus kiekvienai detekcijai). Amplifikacijos rinkinys buvo patikrintas 33 blokuose audinių iš 11 skirtingų audinių tipų. Buvo nudažyti tokie audiniai: inkstų, stuburo smegenų, stemplės, žarnų, odos, krūties, tonzilių, kepenų, skydlaukės, raumenų ir kasos. Neigiamos kontrolės buvo pasirinkti kaip pirminiai antikūnai, siekiant patikrinti, ar naudojant amplifikavimo reagentus gaunamas nespecifinis dažymas. Atsitiktinis nespecifinis foninis dažymas buvo stebimas epitelio, jungiamojo audinio, neuroblastų, lygiųjų raumenų, hepatocitų, koloidinėse ir salelių ląstelėse; tačiau šiuose tyrimuose negauta netikėtų dažymų ar rezultatų, kurie trukdytų numatytam šio produkto naudojimui.
- Atsikartojamumo tarp tame pačiame dažymo procese ir tarp skirtingų procesų tyrimais nustatyta, kad visi objektniai stiklėliai buvo dažomi tokiu pačiu intensyvumu.

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 stiklėlio užklijuota tinkama juostinio kodo etiketė. Jeigu objektinis stiklėlis 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.
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, objektyvių stiklelių apdorojimas turėtų būti kartojamas trumpinant inkubacijos trukmę 4 minutėmis, kol bus gautas norimas dažymo intensyvumas.
6. Jei audinių sekcijos nusiplauna nuo objektyvių stiklelių, reikia patikrinti, ar jie teigiamai įkrauti.
7. Spręsdami problemas remkitės skyreliu „Procedūra žingsnis po žingsnio“, automatinio objektyvių stiklelių dažytuvo vartotojo vadovu arba susisiekiate 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.
5. 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.
6. 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.