



ultraVIEW™ Universal DAB detekcijos rinkinys

Katalogo numeris 760-500

INDIKACIJOS IR NAUDOJIMAS

Numatomas naudojimas

Šis detekcijos rinkinys skirtas naudoti *in vitro* diagnostikai (IVD).
Ventana Medical Systems (Ventana®) ultraVIEW™ Universal DAB detekcijos rinkinys yra netiesioginė biotino – streptavidino neturinti sistema, nustatanti pelės IgG, pelės IgM ir triušio pirminius antikūnus. Rinkinys skirtas naudoti imunohistochemijoje (IHC) identifikuoti taikinius sekcijose iš formaline fiksuotų, parafine įtvirtintų audinių, užšaldytų audinių nudažytų Ventana NexES® ir BenchMark® serijos automatiniais objektyvų stiklelių dažytuvais. 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

Imunohistochemija (IHC) yra technika naudojama diagnostiniams tikslais laboratorijose. Pagrindinė IHC koncepcija yra antigeno lokalizacija audinyje, naudojant specifinius pirminius antikūnus. Kai tik antikūno-antigeno surišimas įvyksta, jis turi būti vizualizuojamas spalvine reakcija, kuri matoma šviesiniu mikroskopu ar naudojant fluorescencijos mikroskopą. Specifinis pirminis antikūnas gali nešti signalą generuojančią molekulę, kuri tiesiogiai vizualizuoja surišimą. Arba naudojant netiesioginį metodą vizualizacijai, tada reikia papildomo žingsnio nustatantio specifinio antikūno vietai ir sukuriama signalą. Netiesioginių metodų dažniausiai pasitaikančios technikos naudoja antrinius antikūnus tiesiogiai sąveikaujančius su specifiniais pirminiais antikūnais ir fermentus su atitinkama substrato chromogenine sistema. Šios kombinacijos rezultatas – spalvotos nuosėdos specifinių antikūnų surišimo vietoje.
ultraVIEW Universal DAB detekcijos rinkinyje naudojamas netiesioginis metodas vizualizuojantis specifinį antikūno ir antigeno susirišimą, paliekant rudos spalvos nuosėdas.

Principai ir procedūros

ultraVIEW Universal DAB detekcijos rinkiniu nustatomi specifiniai pelės ir triušio pirminiai antikūnai, susirišę su antigenu parafine įtvirtintose arba užšaldytų audinių sekcijose. Specifinio antikūno vieta nustatoma antriniu antikūnu, pažymėtu fermento. Komplexas vizualizuojamas naudojant nusodinamą reakcijos produktą.
ultraVIEW Universal DAB detekcijos rinkinys panaudojamas panaudodamas kokeitilį antrinių antikūnų pažymėtų fermentais, kurie susiriša su pirminiais antikūnais. Tuomet šis kompleksas vizualizuojamas naudojant vandenilio peroksido bei 3,3'-diaminobenzidino tetrachlorido (DAB) chromogeną, kuris pagamina lengvai šviesiniu mikroskopu matomas tamsiai rudas nuosėdas.
Kiekvienas žingsnis atliekamas inkubuojant tiksloje temperatūroje ir tikslų laiką. Kiekvieno inkubacijos etapo pabaigoje automatinis Ventana objektyvų stiklelių dažytuvus nuplauna sekcijas, kad sustabdytų reakciją ir pašalintų nesurištą medžiagą, bei užlašina skysto dengiamojo tirpalo, kuris neleidžia garuoti vandeniniams reagentams ant objektyvų stiklelio su bandiniu paviršiaus¹. Rezultatai interpretuojami naudojantis šviesiniu mikroskopu ir padeda diferencinei patofiziologinių procesų diagnozei, kuri gali būti arba gali nebūti siejama su tam tikru antigenu.
Detalesnė informacija apie prietaiso veikimą pateikiama atitinkamame Ventana automatinio objektyvų stiklelių dažytuvo vartotojo vadove.

MEDŽIAGOS IR METODAI

Pateikiami reagentai

ultraVIEW Universal DAB detekcijos rinkinyje (250 testų) yra:

1 – 25 ml dozatorius inhibitoriaus; 3 % vandenilio peroksido tirpalas.

1 – 25 ml dozatorius universalus HRP multimeras, sudarytas iš HRP pažymėtų antikūnų kokeitilio (ožkos anti-pelės IgG, ožkos anti-pelės IgM ir ožkos anti-triušio) (<50 µg/ml buferyje su baltymu ProClin® 300 konservantu.

1 – 25 ml dozatorius DAB chromogenas; turintis 3,3' – diaminobenzidino tetrachlorido patentuotu stabilizuojančiu tirpalu su patentuotu konservantu.

1 – 25 ml dozatorius H₂O₂; 0,04 % vandenilio peroksido fosfatiniame buferyje.

1 – 25 ml dozatorius vario; vario sulfatas (5 g/l) acetatiniame buferyje su patentuotu konservantu.

Atkūrimas, maišymas, skiedimas ir titravimas

Detekcijos rinkinys optimizuotas naudojimui su Ventana automatiniais objektyvų stiklelių dažytuvais. Nereikalingas joks atkūrimas, maišymas, skiedimas ar titravimas. Toliau neskiidimai gali lemti antigeno dažymo praradimą. Vartotojas turi patvirtinti bet kokius tokius pakaitimus. Skirtumai laboratorijoje apdorojant audinius ir atliekant technines procedūras gali lemti reikšmingą rezultatų kintamumą, todėl reikalingas reguliarus kontrolių naudojimas (žr. skyrelį „Kokybės kontrolės procedūros“).

Reikalingos, bet nepateikiamos medžiagos ir reagentai

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

1. Neigiamos kontrolės reagentas (Ventana neigiamos kontrolės pelės Ig (Katalogo Nr 760-2014), CONFIRM™ neigiamą kontrolę triušio Ig (Katalogo Nr 760-1029).
2. Superfrost™ Plus (VWR katalogo Nr 48311-703 ar atitinkamo) mikroskopo stikleliai.
3. Teigiamos ir neigiamos audinių kontrolės (atsižvelgiant į rekomenduojamus tipus).
4. Džiovinimo krosnis, galinti palaikyti 60 °C ± 5 °C temperatūrą.
5. Juostinių kodų etiketės (tinkamos tiriamai neigiamai kontrolei ar pirminiams antikūnams).
6. Dažymo indai ar vonelės.
7. Laikrodis (galimi nustatymai 2-10 minučių intervalu).
8. Ksilenas (tinkantis histologijai).
9. Etanolis ar reagentinis alkoholis (tinkantis histologijai)
 - 100% tirpalas: neskiestas etanolis ar reaktyvus alkoholis
 - 95% tirpalas: sumaišyta 95 dalys etanolio ar reaktyvaus alkoholio su 5 dalimis dejonizuoto vandens
 - 80% tirpalas: sumaišyta 80 dalių etanolio ar reaktyvaus alkoholio su 20 dalių dejonizuoto vandens.
- 10.
11. Dejonizuotas ar distiliuotas vanduo.
12. Biocare Medical's Decloacking Chamber (katalogo Nr.DC2002) (NexES IHC automatiniams objektyvų stiklelių dažytuvams).
13. Audinių-Tek® dažymo indai.
14. NexES IHC, BenchMark serijos automatiniai objektyvų stiklelių dažytuvai.
15. Pirminiai antikūnai.
16. Ventanos antikūnų skiediklis (Kat. Nr. 251-018)
17. Ventana APK plovimo tirpalas (10X) (Kat. Nr. 250-042) (NexES IHC automatiniams objektyvų stiklelių dažytuvams).
18. Ventana Liquid Coverslip™ tirpalas (žemos temperatūros) (Kat. Nr. 250-009) (NexES IHC automatiniams objektyvų stiklelių dažytuvams).
19. Ventana EZ Prep™ (10X) tirpalas (Kat. Nr. 950-102) (BenchMark serijos automatiniams objektyvų stiklelių dažytuvams).
20. Ventana Reakcijos buferis (10X) (Kat. Nr. 950-300) (BenchMark serijos automatiniams objektyvų stiklelių dažytuvams).
21. Ventana Liquid Coverslip™ (aukštos temperatūros) (Kat. Nr. 650-010) (BenchMark serijos automatiniams objektyvų stiklelių dažytuvams).
22. Ventana Ląstelių kondicionierius 1 (praskiedžiamas) (Kat. Nr. 950-124) ar ląstelių kondicionierius 2 (praskiedžiamas) (Kat. Nr. 950-123) (BenchMark serijos automatiniams objektyvų stiklelių dažytuvams).
23. Ventana Proteazė 1 (Kat. Nr. 760-2018), Proteazė 2 (Kat. Nr. 760-2019), ar Proteazė 3 (Kat. Nr. 760-2020).
24. Ventana Hematoksilino foninis dažas (Kat. Nr. 760-2021) .
25. Ventana Hematoksilino II foninis dažas (Kat. Nr. 790-2208).
26. Ventana Melsvinimo reagentas (Kat. Nr. 760-2037).
27. Permanentinis dengimo skystis (PermMount®, Fisher Kat. Nr. SP15-500 ar ekvivalentus).
28. Dengiamasis stiklis.
29. Šviesinis mikroskopas (20-80X).
30. Sugieriančios servetėlės.
31. Automatinis dangčio stabdis (toks kaip Audinių-Tek® SCA automatinis dangčio stabdis).

Laikymas ir naudojimas

Laikyti 2-8 °C temperatūroje. Neužšaldyti. Vartotojas turi validuoti bet kokias laikymo sąlygas, kitokias nei nurodyta ant informacinio lapelio, esančio pakuotėje. Detekcijos rinkinys gali būti naudojamas iškart išėmus iš šaldytuvo.

Kad būtų užtikrintas tinkamas kiekvieno reagento pateikimas ir stabilumas, po kiekvieno dažymo proceso dozatorius turi būti uždengtas ir nedelsiant statmenai padėtas į šaldytuvą.

Ant kiekvieno detektavimo rinkinio nurodyta galiojimo laiko pabaigos data. Kai laikomas tinkamai, reagentas yra stabilus iki datos, nurodytos ant etiketės.

Nenaudokite detektavimo rinkinio, pasibaigus jo galiojimo laikui.

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

Formalinu fiksuoti, parafine įtvirtinti audiniai ir užšaldyti audiniai yra tinkami naudoti su ultraVIEW DAB Detekcijos rinkiniu ir Ventana automatinio objektyvų stiklelių dažytuvu (žr. skyrelį „Reikalingos, bet nepateikiamos medžiagos ir reagentai“).

Rekomenduojamas audinio fiksavimas yra 10 % neutralus (su buferiu) formalinas².

Nepastovūs rezultatai gali būti lemiami per ilgo fiksavimo ar specialių procedūrų, tokių kaip kaulų čiulpų ruošinių dekalifikavimas.

Kiekviena sekcija turėtų būti atpjauta tinkamo storio (2-5µ), kad būtų galima naudoti pirminius antikūnus, ir padėta ant objektyvų stiklelio. Objektiniai stikliai su audinio sekcija gali būti kaitinami mažiausiai 2 valandas (bet ne ilgiau kaip 24 valandas) 60 °C ± 5 °C temperatūros krosnyje. Stiklelių kaitinimas naudojamas audinių sausinimui ir

padidinti audinio prilipimui prie stiklėlio. Prailgintas audinio kaitinimas gali sumažinti antigeno buvimą. Kaitinimo apribojimai apsprendžiami pirminių antikūnų paketo. Tinkamai fiksuotų ir įtvirtintų audinių ekspresuojami antigenai gali išlikti stabilūs mažiausiai 2 metus laikant šaltoje vietoje (15° C - 25° C). Pagal Klinikinių laboratorijų pagerinimo aktą (CLIA) 1988, 42CFR493. 1259 (b) reikia, kad „laboratorija turi išlaikyti stiklėlius mažiausiai dešimt metų nuo ištyrimo ir bandinių bloką išsaugoti mažiausiai du metus nuo ištyrimo“.

Užšaldyti audiniai turėtų būti supjaustyti tinkamo storio sekcijomis (4-5µ), kad naudoti pirminius antikūnus, uždėti ant mikroskopo objektyvio stiklėlio ir tuoj pat įdėti į šaltą acetoną (4-8 °C) 10 minučių. Tuomet sekcijos džiovinamos ore mažiausiai trisdešimt minučių, o geriausia per naktį. Ant sausų objektyvių stiklėlių užklijuojamos atitinkamos juostinių kodų etiketės.

Rankinė deparafinizavimo procedūra

Reikalinga naudojant NexES IHC automatinis objektyvių stiklėlių dažytuvus arba jeigu nepasirenkama deparafinizavimo procedūra BenchMark serijos automatinuose objektyvių stiklėlių dažytuvuose.

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

Objektyviai stiklėliai, dažomi BenchMark serijos automatinuose objektyvių stiklėlių dažytuvuose, gali būti automatiškai deparafinizuojami prietaise. Jeigu pasirinktis nepasirenkama, sekite rankinę deparafinizavimo procedūrą, pateiktą aukščiau.

PERSPĖJIMAI IR ATSARGUMO PRIEMONĖS

Naudojant in vitro diagnostikai:

1. Naudodamiesi reagentais, imkitės tinkamų atsargumo priemonių. Naudokite vienkartinės pirštines, kai naudojate medžiagas, kurios gali būti karcinogeninės ar toksinės (pavyzdžiui, ksilenas ar formaldehidai). Nenaudoti šalia atviros liepsnos.
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 nesurinkite 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. Nemaikykite reagentų dispenserių įvairiems produktams.
7. 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. Firminės apsauginės priemonės ir stabilizavimo priemonės netaikomos pagal OSHA kriterijus pavojingomis medžiagomis.
8. Galimas karcinogenas. Nacionalinė toksikologijos programa įtraukė benzidiną, artimą junginį 3,3'-diaminobenzidino tetrahidrochloridui (DAB), kaip žinomą žmogaus karcinogeną.
9. Koncentruotos propileno glikolio formos buvo susietos su teratogeniniais efektais laboratoriniams gyvūnams. Naudokite vienkartinės neopreno pirštines ir imkitės tinkamų atsargumo priemonių, naudodami šias medžiagas.
10. Atsižvelgiant į vietą ir būklę autorizuoti rekomenduojamus apšalymo metodus.

NAUDOJIMO NURODYMAI

Procedūra žingsnis po žingsnio

Ventana *ultraVIEW* Universal DAB rinkinys sukurtas naudoti automatinuose Ventana objektyvių stiklėlių dažytuvuose kartu su Ventana pirminiais antikūnais ir papildomais reagentais.

Automatinių procedūrų parametrai gali būti pateikiami, atspausdinami ir redaguojami priklausomai nuo procedūrų, pateiktų vartotojo vadove. Kiti automatinis objektyvių stiklėlių dažytuvų veikimo parametrai nustatomi gamykloje.

Dažymo procedūros Ventana automatinuose objektyvių stiklėlių dažytuvuose yra išvardintos toliau. Detalus nurodymai ir papildomos protokolų pasirinktys pateikiami prietaiso vartotojo vadove. Ar bandiniui reikalingas antigeno atidengimas, priklauso nuo antikūno. Patikrinkite su antikūnu pakuojamose taisyklėse.

NexES IHC automatinis objektyvių stiklėlių dažytuvams

Jeigu antigeno atidengimas reikalingas:

1. Deparafinizuokite objektyvius stiklėlius juos paeiliui veikdami ksilenu, skirtingos koncentracijos alkoholiu ir nuplaudami vandeniu ar tinkamu buferiu (nurodytu antikūno pakavimo lape). Atlikite antigeno atidengimo procedūrą (kaip nurodyta antikūno pakavimo lape) ir perkeltite objektyvius stiklėlius į APK Plovimo tirpalą (1X).
2. Uždėkite pirminio antikūno ir tinkamo detekcijos rinkinio dozatoriumis ir reikalingus papildomus reagentus ant reagentų padėklo ir įdėkite jį į automatinį objektyvių stiklėlių dažytuvą. Patikrinkite turinius fluidus ir atliekas.
3. Nudžiovinkite nudažytą objektyvio stiklėlio galą ir tuomet užklijuokite objektyvio stiklėlio juostinio kodo etiketę, atitinkančią atliekamą antikūnų protokolą.
4. Sudėkite deparafinizuotus, su atidengtu antigenu, etiketėmis sužymėtus objektyvius stiklėlius iš APK Plovimo tirpalo (1X) į NexES IHC automatinį objektyvių stiklėlių dažytuvą. Stiklėliai turi likti tirpale iki kol bus paruoštas dažytuvus paleidimui.

NexES IHC automatinis objektyvių stiklėlių dažytuvams

Jeigu antigeno atidengimas nereikalingas:

1. Užklijuokite juostinių kodų etiketes ant objektyvių stiklėlių. Tuomet deparafinizuokite objektyvius 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 dozatoriumis ir reikalingus papildomus reagentus ant reagentų padėklo ir įdėkite jį į automatinį objektyvių stiklėlių dažytuvą. Patikrinkite turinius fluidus ir atliekas.
3. Sudėkite deparafinizuotus, etiketėmis sužymėtus objektyvius stiklėlius iš APK Plovimo tirpalo (1X) į NexES IHC automatinį objektyvių stiklėlių dažytuvą. Stiklėliai turi likti tirpale iki kol bus paruoštas dažytuvus paleidimui.

BenchMark serijos automatinis objektyvių stiklėlių dažytuvams

1. Užklijuokite objektyvio stiklėlio juostinio kodo etiketę, atitinkančią atliekamą pirminio antikūnų protokolą.
2. Uždėkite pirminio antikūno ir tinkamo detekcijos rinkinio dozatoriumis ir reikalingus papildomus reagentus ant reagentų padėklo ir įdėkite jį į automatinį objektyvių stiklėlių dažytuvą. Patikrinkite turinius fluidus ir atliekas.
3. Sudėkite objektyvius stiklėlius į automatinį objektyvių stiklėlių dažytuvą.

Visiems prietaisams

1. Paleiskite dažymo procesą.
2. Pasibaigus procesui, išimkite objektyvius stiklėlius iš automatinio objektyvių stiklėlių dažytuvo.
3. Nuplaukite švelniu indų plovimo detergentu ar atskiestu alkoholiu, kad pašalintumėte dengiamąjį tirpalą; pašalinkite vandenį, nuvalykite ir įprastu būdu padenkite nuolatinio dengiamuoju skysčiu.
4. Stiklėliai gali būti žiūrėti tuoj pat po jų išėmimo iš dažymo platformos. Nudažyti stiklėliai yra stabilūs mažiausiai du metus, jei jie saugomi 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 tiki 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 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 neigiama pelės Ig kontrole, CONFIRM neigiama triušio Ig kontrole, ar neigiama triušio 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 keleto antikūnų panelis, neigiama reagento kontrolė ant vieno objektinio stiklio gali būti neigiama ar nespecifinio susirišimo fono kontrolė kitiems antikūnams.

Bandymo patvirtinimas

Prieš diagnostinei procedūrai pirmą kartą naudojant pirminį antikūną ar dažymo sistemą, turėtų būti patvirtintas pirminio 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 sąrašo³ ir CLSI patvirtintų direktyvų kokybės kontrolės rekomendacijos⁴). Šios kokybės kontrolės procedūros turėtų būti kartojamos kiekvienai naujai antikūnų partijai ar kada tik pakeičiami bandymo parametrai.

Rezultatų interpretavimas

Ventana *ultraVIEW* Universal DAB detekcijos rinkiniu gaunamas tamsiai rudos spalvos reakcijos produktas, kuris nusėda ant antigeno srities, lokalizuotos pirminių antikūnų. Kvalifikuotas patologas, patyręs imunohistocheminės procedūros, turi įvertinti kontrolės ir nudažytą medžiagą prieš interpretuodamas rezultatus. Neigiamų kontrolių dažymasis turėtų būti vertinamas pirmasis ir šie rezultatai palyginti su nudažyta medžiaga, kad būtų patvirtinta, jog susidaręs signalas nėra nespecifinės sąveikos pasekmė.

Teigiama audinio kontrolė

Nudažytas teigiamas audinys turėtų būti tiriamas pirmas, kad išsiaiškintumėte, ar visi reagentai veiks tinkamai. Tinkamos spalvos reakcijos produkto buvimas taikininėse ląstelėse nurodo, kad reaktingumas yra tinkamas. 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 ląstelinių 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 pemelyg 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 nespecifinį 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 hematoksiliną ir eoziną nudažytas sekcijas. Paciento morfologiniai rezultatai ir susiję klinikiniai duomenys turi būti interpretuojami kvalifikuoto patologo.

APRIBOJIMAI

Bendri 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. Kvalifikuotas patologas yra atsakingas už susipažinimą su antikūnais, reagentais ir metodais, naudojamais interpretuojant gautą 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.
5. Ventana tiekia 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 prisiminti atsakomybę už paciento rezultatų interpretavimą.
6. Anksčiau nelikrintuose 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 audiniuose⁵. Jei gaunate ir dokumentuojate netikėtą reakciją, susisiekite su vietiniu Ventana atstovu.
7. Hepatito B virusu infekuotų asmenų audiniai ir audiniai, turintys hepatito B paviršiaus antigeną (HbsAg) gali nespecifiškai dažytis su krienų peroksidazė⁶.
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)⁷.
10. Kaip bet kokiame imunohistocheminiame teste, neigiamas rezultatas reiškia, kad dominantis antigenas nebuvo aptiktas, o ne kad antigeno nėra tirtose ląstelėse ar audinyje.

Specifiniai apribojimai

1. Kiekvienas žingsnis detekcijos rinkinio procedūroje buvo optimizuotas Ventana automatiniais objektnių stiklių dažytuvams ir yra iš anksto nustatytas. Dėl audinio fiksavimo ir apdorojimo nepastovumo individualiems bandiniams gali reikėti padidinti arba sumažinti inkubavimo su pirminiais antikūnais trukmę. Daugiau informacijos apie fiksavimo nepastovumą pateikiama leidinyje „Imunohistochemistry Principles and Advances“⁸ ar „Immunomicroscopy: A Diagnostic Tool for the Surgical Pathologist“⁹.
2. Detekcijos rinkiniu kartu su Ventana pirminiais antikūnais ir priedais nustatomas antigenas, kuris išlieka po formalino rutinos, audinio apdorojimo ir sekcijų pjaustymo. Vartotojai, kurie nukrypsta nuo rekomenduojamos testo procedūros, tokiomis aplinkybėmis yra atsakingi už paciento rezultatų interpretavimą.

LAUKIAMŲ REZULTATŲ APŽVALGA

Atsikartojimo studijos

ultraView Universal DAB detektavimo rinkinio atsikartojamumas testuotas dažant seriją objektnių stiklių iš 3 neurtaliame formalino buferyje fiksuotų, parafine įtvirtintų audinių, naudojant 3 pirminius antikūnus, pelės IgG (anti-Ki67) dažyta krūties karcinoma, pelės IgM (anti-CD 15) dažyta Hodgkin's Lymphoma xenografit ir triušio IgG (anti-S 100) melanoma naudojant BenchMark, BenchMark XT ir NexES IHC automatinius stiklių dažytuvus. Visi pirminiai antikūnai inkubuoti 16 minučių ir stikliai buvo dažyti foniniu dažu Hematoksilinu II einančiu po melsvinimo reagento. Visi nudažyti stikliai su pirminiais antikūnais palyginti tarpusavyje kvalifikuoto objektnių stiklių vertintojo pagal dažymo atitikimą ir intensyvumą.

1. Atsikartojamumas tarp objektnių stiklių dažymo procesu (kai kurie pirminiai antikūnai palyginti platformoje) atliktas vieną kartą per dieną tris skirtingas dienas, naudojant 3 skirtingus dažytuvus: BenchMark, BenchMark XT, & NaxES IHC iš viso 9 dažymai. Atsikartojamumas tarp dažymų su BenchMark XT buvo 100 % (30 iš 30 objektnių stiklių iš dažymo pirminių antikūnų, iš viso 90 objektnių stiklių antikūnų nudažyti per 3 procesus) ir 100 % (20 iš 20 objektnių stiklių iš dažymo pirminių antikūnų, iš viso 60 objektnių stiklių antikūnų nudažyti per 3 procesus ant kiekvienos platformos: BenchMark ir NexES IHC).

- Atsikartojamumas tarp procesų paskaičiuotas remiantis nudažytų objektyvių stiklėlių skaičiumi 3 procesuose su skirtingais dažytuvais. Dažymo procesas atliktas vieną kartą per dieną 3 skirtingas dienas, naudojant 3 skirtingus dažytuvus: BenchMark, BenchMark XT, & NexES IHC. Atsikartojamumas tarp dažymo procesų su BenchMark XT buvo 100 % (90 iš 90 objektyvių stiklėlių, po 30 stiklėlių kiekvienam pirminiam antikūnui 3 atskirus dažymo procesus) ir 100 % (60 iš 60 objektyvių stiklėlių, po 20 stiklėlių kiekvienam pirminiam antikūnui 3 atskirus dažymo procesus su kiekviena dažymo platforma) su BenchMark ir NexES IHC.
- Atsikartojamumas tarp prietaisų apskaičiuotas pagal nudažytų objektyvių stiklėlių skaičių per 9 dažymo procesus su visais dažytuvų tipais. Dažymo procesas darytas 1 kartą per dieną 3 skirtingas dienas, naudojant 3 skirtingus dažytuvus: BenchMark, BenchMark XT, & NexES IHC. Atsikartojamumas *ultraView* Universal DAB detektavimo rinkinio tarp skirtingų prietaisų yra 100 % (210 iš 210 nudažytų objektyvių stiklėlių, įvertinant stiklėlius su visais 3 pirminiais antikūnais).

Atitikimo procesas *ultraView* Universal DAB detektavimo rinkinio atliktas nudažius 53 normalius ir ligos audinio pavyzdžius, fiksuotus neutraliame formalino tirpale, naudojant 20 pirminių antikūnų. Pasirinkti antikūnai parodantys rūšį ir izotipą, paprastai naudojami IHC. 100 % testuotų pavyzdžių (53 iš 53 nudažytų pavyzdžių) su *ultraView* Universal DAB detektavimo rinkiniu atpažinti pirminiai antikūnai ir klinikinis panaudojimas įvertinti kvalifikuoto objektyvių stiklėlių vertintojo.

PROBLEMŲ SPRENDIMAS

- Jeigu teigiamai kontrolei gautas silpnas dažymas nei tikėtasi, turėtų būti patikrintos kitos teigiamos kontrolės, kad nustatytumėte, ar tai dėl pirminio antikūno, ar dėl vieno iš bendrų antrinių reagentų.
- Jeigu teigiama kontrolė nenusidažė, reikėtų patikrinti, ar ant jos objektyvio stiklelio užklijuota tinkama juostinio kodo etiketė. Jeigu objektyvinis stiklis pažymėtas tinkamai, turėtų būti patikrintos kitos teigiamos kontrolės, 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 buvo pašalintas ne visas parafinas, negalima dažyti. Deparafinizacijos procedūra turėtų būti pakartota.
- Jeigu specifinis antikūnų dažymas yra per intensyvus, objektyvių stiklėlių apdorojimas su pirminiu antikūnu turėtų būti kartojamas trumpinant inkubacijos trukmę 4 minutėmis, kol bus gautas norimas dažymo intensyvumas.
- Jei audinių sekcijos nusiplauna nuo objektyvių stiklėlių, reikia patikrinti, ar jie teigiamai įkrauti.
- Sprendami problemas remkitės skyreliu „Procedūra žingsnis po žingsnio“, automatinio objektyvių stiklėlių dažytuvo vartotojo vadovu arba susisiekiote su vietiniu Ventana atstovu.

LITERATŪRA

- Elias JM, Gown AM, Nakamura RM, Wilbur DC, Herman GE, Jaffe ES, Battifora H, Brigati DJ. Quality control in immunohistochemistry. Report of a workshop sponsored by the Biological Stain Commission. Am J Clin Pathol 92 (6): 836-843, 1989.
- 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.
- CLSI. Quality Assurance for Immunocytochemistry: Approved Guideline. CLSI 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, Ashcava 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.
- Roche PC, Hsi ED. Immunohistochemistry-Principles and Advances. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. (NR Rose Ed.) ASM Press, 2002.
- Taylor C, Cote RJ. Immunomicroscopy: A Diagnostic Tool for the Surgical Pathologist, 2nd Edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia. 1986.

INTELEKTINĖ NUOSAVYBĖ

CONFIRM™, EZ Prep™, *ultraVIEW*™ ir Liquid Coverslip™ yra Ventana Medical Systems, Inc. prekiniai ženklai; BenchMark®, NexES® and Ventana® registruoti Ventana Medical Systems, Inc. prekiniai ženklai.

ProClin® yra registruotas prekinis ženklas Rohm & Haas Company.

Permout® yra registruotas prekinis ženklas Fisher Scientific Company.

Tissue-Tek® yra registruotas prekinis ženklas Pakura Finetek.

Superfrost™ Plus yra registruotas prekinis ženklas Erie Scientific Company.

Ventana suteikia Pirkėjui vienintelį naudojimo licenziją pagal šiuos patentus: U.S. Pat. Nos. 6045 759, 6192 945, 6416 713, 6945128 ir kitų šalių analogų.

ultraView Universal DAB detektavimo rinkinys saugomas per patentus.