

CONFIRM™ anti-CD30 (Ber-H2) Primary Antibody

Katalogové číslo 790-2926

POUŽITÍ

Toto činidlo je určeno k diagnostice *in vitro*.

Protilátka Ventana Medical Systems' CONFIRM anti-CD30 (Ber-H2) Primary Antibody obsahuje myši monoklonální protilátku (IgG1, kappa) nasměrovanou proti CD30. Protilátka je určena ke kvalitativní identifikaci CD30 pomocí světelné mikroskopie v řezech fixovaných ve formalinu, zalitých v parafínu na barvicích automatických přístrojích Ventana.

Klinická interpretace jakéhokoli zbarvení nebo jeho nepřítomnosti musí být doplněna morfoloickými studii a hodnocením řádných kontrol. Hodnocení musí v kontextu klinické anamnézy pacienta a jiných diagnostických testů provádět kvalifikovaný patolog.

SOUHRN A VYSVĚTLENÍ

CONFIRM anti-CD30 (Ber-H2) rozpoznává glykoprotein navázaný na membráně, s molekulovou hmotností 105 - 120 kD. CD30 je členem nadrodiny faktorů nádorových nekroz, který, pokud je aktivován, má za následek signalizaci antiapoptotických drah umožňujících proliferaci buněk. Antigen CD30 je exprimován v mononukleárních Hodgkinových buňkách

a multinukleárních buňkách Reed Sternberg Hodgkinova lymfomu a také v anaplastických velkobuněčných lymfomech. Protilátka způsobuje membránové, cytoplazmatické zbarvení různé intenzity a Golgiho zbarvení obou druhů buněk lymfomu a zbarvení rozptýlených, aktivovaných velkých B a T buněk v lymfatické uzlině, slezině, mandlích a brzlíku. Protilátka může barvit i malou část buněk plazmy.^{1,2,3}

PRINCIPIY METODY

CONFIRM anti-CD30 (Ber-H2) lze použít jako primární protilátku pro imunohistochemické barvení parafinových tkáňových řezů. Obecně lze říci, že imunohistochemické barvení umožňuje vizualizaci antigenů pomocí sekvenční aplikace specifické protilátky (primární protilátky), která se váže na antigen, sekundární protilátky (vazebné protilátky), která se váže na primární protilátku, komplexu enzymů a chromogenního substrátu a je proložena promývacími kroky. Enzymatická aktivace chromogenu způsobuje vznik viditelného produktu reakce v místě antigenu. Vzorek pak lze obarvit kontrastním barvivem a zakrýt krycím skličkem. Výsledky se interpretují pomocí světelného mikroskopu a pomáhají

k usnadnění diferenciální diagnózy patofyziologických procesů, které mohou, ale nemusí být spojeny s určitým antigenem.

CONFIRM anti-CD30 (Ber-H2) je optimálně naředěna pro použití s detekční soupravou MIEW™ DAB detection kit, výrobce Ventana a barvicími automaty. CONFIRM anti-CD30 (Ber-H2) je kompatibilní s detekčními soupravami *ultraView™* Universal DAB, AEC a Enhanced Alkaline Phosphatase Red detection kits. Každý krok barvicího protokolu zahrnuje inkubaci se stanovením její přesné doby a specifické teploty. Na konci každého inkubačního kroku jsou řezy v barvicím automatu Ventana opláchnuty za účelem ukončení probíhající reakce a k odstranění nevezebného materiálu, který by mohl bránit požadované reakci v následujících krocích. Aby odpařování vodných činidel ze vzorků na podložních sklech bylo co nejmenší, aplikuje barvicí automat na sklička krycí roztok. Barvení je ukončeno po inkubaci substrát-chromogenem a volitelně barvením kontrastním barvivem. Více informací o operacích přístroje naleznete v Návodu k obsluze k příslušnému barvicímu automatu Ventana.

MATERIÁLY

Dodávaná činidla

CONFIRM anti-CD30 (Ber-H2) obsahuje dostatek činidla pro 50 testů.

1 – 5 mL dávkovač CONFIRM anti-CD30 (Ber-H2) obsahuje přibližně 0,5 µg myši monoklonální protilátky nasměrované proti CD30 přítomnému ve tkáni. Protilátka je naředěna v pufru s obsahem proteinového nosiče a konzervační látky.

Celková proteinová koncentrace činidla je asi 10 mg/mL. Koncentrace specifické protilátky je asi 0,1 µg/mL. CONFIRM anti-30 (Ber-H2) je myši IgG. V tomto produktu není známa žádná irelevantní reaktivita protilátky.

Rekonstituce, smísení, ředění, titrace

Protilátka je optimalizována pro použití v barvicím automatu Ventana ve spojení s detekční soupravou MIEW DAB detection kit. Není vyžadována rekonstituce, smísení, ředění nebo titrace.

Další ředění může způsobit ztrátu zbarvení antigenu. Uživatel musí případné změny ověřit. Rozdíly ve zpracování tkáně a technických postupech v laboratoři mohou způsobit výraznou variabilitu výsledků a vyžadují pravidelné provádění kontrol (viz část Postupů kontroly kvality).

Skladování a manipulace

Skladujte při 2 – 8 °C. Nezmrazujte. Pokud se činidla skladují za jakýchkoli jiných než v příbalovém letáku uvedených podmínek, musí je uživatel ověřit.

Aby byl zajištěn správný výkon a správná stabilita protilátky po každém cyklu, musí být dávkovač uzavřen víčkem a okamžitě umístěn ve vertikální poloze do lednice.

Každý dávkovač s protilátkou má stanovenou dobu expirace. Je-li řádně skladováno, je činidlo stabilní do data uvedeného na štítku. Nepoužívejte činidla po skončení expirační doby pro předepsanou metodu skladování.

Tento produkt nejeví žádné zjevné známky nestability, a proto by se pozitivní a negativní kontroly měly provádět současně s neznámými vzorky. Kontaktujte místní zastoupení společnosti Ventana, objeví-li se příznaky nestability činidla.

Potřebné materiály a činidla, které se nedodávají

Následující činidla a materiály mohou být potřebné pro barvení, ale nejsou dodávány s primární protilátkou:

1. Ventana Negative Control Mouse Ig
2. Mikroskopická sklička, pozitivně nabitá
3. Tkáň pro pozitivní a negativní kontrolu
4. Sušička, schopná udržovat teplotu 70 °C ± 5 °C
5. Štítky s čárovým kódem (odpovídající testované negativní kontrole a primární protilátce)
6. 10 % neutrální pufovaný formalin
7. Nádoby nebo lázně na barvení
8. Stopky
9. Xylen
10. Etanol nebo reagenční alkohol
11. Deionizovaná nebo destilovaná voda
12. Barvicí nádoby
13. Barvicí automaty NexES® IHC, BenchMark®
14. Detekční soupravy Ventana *ultraView™* Universal DAB nebo MIEW™ DAB nebo AEC nebo Enhanced Alkaline Phosphatase Red detection kits
15. Ventana Amplification Kit*
16. Ventana Endogenous Biotin Blocking Kit*
17. Ventana APK Wash (10X) (Barvicí automaty NexES IHC)
18. Ventana Liquid Coverslip™ (Low Temperature) (barvicí automaty NexES IHC)
19. Ventana EZ Prep™ (10X) (barvicí automaty BenchMark Series)
20. Ventana Reaction Buffer (10X) (barvicí automaty BenchMark Series)
21. Ventana Liquid Coverslip (High Temperature) (barvicí automaty BenchMark Series)
22. Ventana Cell Conditioning 1 (Pre-dilute) (barvicí automaty BenchMark Series)
23. 1 mM pufr EDTA (pH 8,0)
24. Kontrastní barvivo Ventana Hematoxylin nebo Hematoxylin II
25. Ventana Bluing Reagent
26. Montovací médium
27. Krycí sklo
28. Světelný mikroskop (20 – 80X)

* Volitelné

UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ PŘEDPISY

1. K diagnostice *in vitro*.
2. Při manipulaci s činidly dodržujte příslušná bezpečnostní opatření. Používejte rukavice na jedno použití, manipulujete-li s nebezpečnými karcinogeny nebo toxickými materiály (jako je například: xylen nebo formaldehyd).
3. Zabraňte kontaktu činidel s očima a sliznicí. Jestliže se činidla dostanou do kontaktu s citlivými oblastmi, omyjte je vydatným množstvím vody.
4. Vzorky pacientů a všechny materiály, které s nimi přijdou do kontaktu, musí být považovány za biologicky nebezpečné látky a jejich likvidace musí probíhat podle příslušných bezpečnostních předpisů. Nikdy nepipetujte ústy.
5. Zabraňte mikrobiologickému znečištění činidel, neboť toto by způsobilo nesprávné výsledky.
6. Doporučené metody likvidace jsou uvedeny v celostátních a místních předpisech.
7. Konzervační látka v činidlu je ProClin 300. Zasažení látkou ProClin 300 může způsobit poškození kůže a očí a poškození sliznic a horních cest dýchacích. Koncentrace ProClin 300 ve výrobku je 0,10 % a nenaplnuje tak kritéria OSHA pro

nebezpečnou látku. U citlivých jedinců se mohou vyskytnout systémové alergické reakce.

Sběr vzorků a příprava pro analýzu

Pro použití s primární protilátkou, která je použita s detekčními soupravami Ventana na barvicích automatech Ventana jsou vhodné tkáně, zpracované běžným způsobem, fixované ve formalínu a zalité v parafínu (viz část Potřebné materiály a činidla, které nejsou součástí dodávky). Doporučený fixační prostředek pro tkáň je 10 % neutrální pufovaný formalín.² Mohou se vyskytnout rozdílné výsledky jako důsledek prodloužené fixace nebo speciálních procesů, například odvápnování preparátů kostní dřevě.

Každý řez je třeba nařezat na správnou tloušťku a umístit na pozitivně nabitě podložní sklíčko. Sklíčka obsahující řezy tkáni je třeba sušit v troubě po dobu nejméně 2 hodin (avšak ne déle než 24 hodin) při teplotě 70 °C ± 5 °C. V zájmu zachování antigenosti nařezaných tkáňových řezů se musí řezy tkáni barvit okamžitě.

NÁVOD K POUŽITÍ

Jednotlivé kroky postupu

Postup ruční deparafinace

Je vyžadováno, pokud je použit barvicí automat NexES IHC automated slide stainer nebo pokud není navolena funkce deparafinace na sériovém barvicím automatu BenchMark Series :

Podrobnější pokyny, kdy je potřeba opatřit sklíčka štítkem s čárovým kódem naleznete v části Návod k použití ke konkrétnímu barvicímu automatu.

1. Ponořit sklíčka postupně do 3 xylenových lázní vždy na 5 ± 1 minut.
2. Přenést sklíčka do 100 % etanolu a ponořit je postupně do 2 lázní vždy na 3 ± 1 minuty.
3. Přenést sklíčka do 95 % etanolu a ponořit je do lázně s tímto roztokem na 3 ± 1 minut.
4. Přenést sklíčka do 80 % etanolu a ponořit je do lázně s tímto roztokem na 3 ± 1 minut.
5. Přenést sklíčka do lázně s deionizovanou nebo destilovanou vodou a ponořit je minimálně 10krát.
6. Přenést sklíčka podle postupu do roztoku APK Wash (1X) nebo do pufového roztoku. V případě použití roztoku APK Wash, musí sklíčka zůstat v roztoku až do provedení barvicího cyklu. V případě použití pufového roztoku, musí sklíčka zůstat v roztoku, až do doby provedení postupu odmaskování antigenu. Nenechat sklíčka vysušit.

Sklíčka barvená na sériových barvicích automatech BenchMark Series mohou být deparafinována v přístroji. Zvolíte-li tuto možnost, opatříte sklíčka čárovým kódem a umístíte je do přístroje. Jestliže tuto možnost ne zvolíte, pokračujte podle Postupu ruční deparafinace výše

Doporučené barvicí protokoly

Primární protilátky Ventana byly vyvinuty za účelem použití v barvicích automatech Ventana ve spojení s detekčními soupravami a příslušenstvím výrobce Ventana. Doporučené barvicí protokoly pro barvicí automaty jsou uvedeny v tabulce 1. Parametry automatických postupů lze zobrazit, vytisknout a upravovat podle postupů uvedených v Návodu k obsluze. Některé parametry obsluhy barvicího automatu sklíček jsou předem nastaveny výrobcem.

Tabulka 1. Doporučené barvicí protokoly pro CONFIRM anti-CD30 (Ber-H2)

Typ postupu	Platforma nebo metoda	
	NexES IHC	BenchMark Series
Odstraňování parafínu	V systému offline	Zvolený
Úprava buněk (odmaskování antigenu)	1 mM EDTA (pH 8,0), 2 minuty, Decloaking Chamber, 120 °C	Cell Conditioning 1, standardní
Enzym (proteáza)	Není vyžadováno	Není vyžadováno
Protilátka (primární)	Asi 16 minut, 37 °C	Asi 16 minut, 37 °C
A/B Blok (Blokování biotinu)	Volitelné	Volitelné
Zesílit (amplifikace)	Volitelné	Volitelné
Kontrastní barvivo (Hematoxylin)	Hematoxylin nebo Hematoxylin II, 2 až 4 minuty	Hematoxylin nebo Hematoxylin II, 2 až 4 minuty
Po kontrastním barvení	Bluing, 2 až 4 minuty	Bluing, 2 až 4 minuty

Postupy barvení na barvicích automatech Ventana jsou následující. Další podrobné instrukce a další vlastnosti protokolu naleznete v Návodu k obsluze.

Ruční postup odmaskování antigenu

Ruční odmaskování antigenu je potřebné, používáte-li barvicí automat NexES IHC .

Postup zhodnocení antigenu (úprava buněk), (pro sklíčka s tkáněmi barvenými na automatu NexES IHC nebo pro ruční metody):

1. Připravit Decloaking Chamber k použití.
2. Umístit mísu do komory. Poznámka: Před umístěním misky do komory zkontrolujte, zda je její vnější povrch suchý. Pokud by byl vnější povrch misky vlhký, Decloaking Chamber bude vydávat rachotivý zvuk a voda v komoře bude mít za následek nesprávnou funkčnost komory.
3. Slícovat držadla nádoby s držadly komory.
4. Naplnit mísu 500 mL deionizované vody a umístit tepelný kryt (kruhový kryt) doprostřed misky. Poznámka: Tepelný kryt chrání plastové nádoby před zkroucením.
5. Umístíte každou barvicí nádobu, naplněnou 250 mL 10 mM citrátu sodného (pH 6,0) nebo puřem EDTA buffer (pH 8,0) v souladu s tabulkou 1 Doporučené barvicí protokoly v příbalovém letáku pro každou primární protilátku a příslušná sklíčka na tepelný kryt, který je umístěn uprostřed mísy. Je-li to potřeba, lze nahradit Cell Conditioning 1 (pH 8,5) puřem EDTA Buffer a Cell Conditioning 2 (pH 6,0) lze nahradit 10 mM citrátu sodného. Do komory lze umístit až 2 nádoby a je třeba se ujistit, že se obě dotýkají tepelného krytu.
6. Přiklopit Decloaking Chamber víkem a zajistit (Slícujte šipku otevřeno s bílou tečkou na rukojeti mísy. Uchopit rukojeť víka a otočit ve směru hodinových ručiček do místa uzavření; jakmile je víko uzavřeno, odvětrávací ventil sníží tlak na odvětrávací trysce).
7. Otočit reostat na 10 a zajistit v poloze (asi 120 °C).
8. Zapnout Decloaking Chamber a sledovat, až tlak dosáhne 1,16 - 1,7 atm a až je teplota 120 - 125 °C. Jakmile teplota Decloaking Chamber dosáhne potřebné hodnoty, odměřit kalibračními ručními stopkami dobu 2 minut, dokud časovač Decloaking Chamber nedosáhne hodnot „reálného času“. Jakmile se ruční stopky vypnou, vypnout časovač Decloaker Chamber. Ohřev se vypne a kontrolka se přepne z pozice „ohřev“ na „udržování tepla“. Poznámka: Technici musí sledovat teplotní a tlakové podmínky, aby byly dodrženy potřebné specifikace.
9. Jakmile je procedura zhodnocení antigenu dokončena, vypnout komoru Decloaking Chamber.
10. Technici mohou sledovat klesající tlak pravidelnou kontrolou tlakoměru. Jakmile tlak klesne na 0 atm, komoru Decloaking Chamber lze nyní bezpečně otevřít. Otočte víko proti směru hodinových ručiček a pomalu odkryjte, abyste si neopařili ruce. Poznámka: Při odklopování víka buďte velmi opatrní, neboť povrch i kapalina jsou stále velmi horké.
11. Vyjmout nádobu se sklíčky z mísy a umístit stojany se zpracovanými sklíčky do nádoby s deionizovanou vodou pokojové teploty.
12. Jakmile dokončíte oplachování, umístíte sklíčka do stojanu na sklíčka naplněného deionizovanou vodou k provedení hydratace, než jsou sklíčka opatřena čárovým kódem. Jedno po druhém sklíčka vyjmout ze stojanu; vysušit matné konce a zkontrolovat, zda se tkáňové řezy během procesu nevysušily. Opatřit sklíčka

příslušným štítkem s čárovým kódem a vrátit je do nádoby na sklíčka. Opakovat tento postup se všemi sklíčky.

13. Jakmile jsou všechna sklíčka opatřena štítky, vylít deionizovanou vodu z nádoby se sklíčky a naplnit roztokem APK Wash (1X). Sklíčka musí zůstat v roztoku až do provedení barvicího cyklu.

Sériové barvicí automaty sklíček BenchMark

1. Opatřit sklíčka štítkem s čárovým kódem odpovídajícím protokolu protilátky, která má být zpracována.
2. Založit primární protilátku a dávkovače příslušné detekční soupravy a potřebná přídavná činidla do přihrádky pro činidla a umístit je do barvicího automatu. Zkontrolovat nádoby na tekutiny a odpad.
3. Vložit sklíčka do barvicího automatu.

Pro všechny přístroje

1. Spustit barvicí cyklus.
2. Po dokončení cyklu vyjmout sklíčka z barvicího automatu.
3. Používáte-li chromogeny DAB a Alkaline Phosphatase Red, umyjte jemným čistícím prostředkem nebo v alkoholu, aby se odstranil krycí roztok; dehydrujte, projasněte a pokryjte obvyklým způsobem permanentním montovacím médiem.
4. Použije-li se AEC chromogen, nedehydratovat a neprojasňovat. Pro AEC použít vodné montovací médium. Obarvená sklíčka by měla být odečtena během 2 až 3 dnů od barvení a jsou stabilní po dobu nejméně 2 let, jsou-li správně skladována při pokojové teplotě (15 °C – 25 °C).

POSTUPY KONTROLY KVALITY

Tkáň pro pozitivní kontrolu

S každým provedeným barvicím postupem je třeba provést kontrolu pozitivních tkání. Příklady tkáně pro pozitivní kontrolu s CONFIRM anti-CD30 (Ber-H2) jsou velké buňky anaplastického lymfomu nebo Hodgkinova lymfomu. Komponenty tkání pro pozitivní kontrolu (velkobuněčné anaplastické lymfomy, mononukleární nebo multinukleární Reed-Sternbergovy buňky) se používají k potvrzení, že protilátka byla aplikována a že přístroj pracuje správně.

Tkáň může obsahovat pozitivně i negativně zbarvené buňky nebo komponenty tkáně a slouží jako tkáň pro pozitivní i negativní kontrolu. Kontrolní vzorky by měly být čerstvě fixované vzorky z pitvy, biopsie nebo operace zpracované co nejdříve a zalité stejným způsobem jako testované fezy. Takové tkáně mohou monitorovat všechny kroky postupu, od přípravy tkáně až po barvení. Použití tkáňového řezu fixovaného nebo zpracovaného jiným způsobem než testovaný vzorek zajistí kontrolu pro všechna činidla a kroky metody kromě fixace a zpracování tkáně.

Tkáň se slabým pozitivním zbarvením je vhodnější pro optimální kontrolu kvality a zjištění nižších úrovní degradace činidla.

Znamé pozitivní kontroly tkání by měly být používány pouze ke sledování správné účinnosti zpracovaných tkání a testovacích činidel, nikoliv jako pomůcka ke stanovení specifické diagnózy vzorků pacientů. Pokud se u pozitivních kontrolních tkání neprojeví pozitivní zbarvení, je nutno považovat výsledky testovacích vzorků za neplatné.

Tkáň pro negativní kontrolu

Pro negativní kontrolu lze použít stejnou tkáň, která se používá pro pozitivní kontrolu. Rozmanitost různých typů buněk, které se nacházejí ve většině řezů tkání, nabízí vnitřní oblasti pro negativní kontrolu, ale to by měl ověřit uživatel. Části, které se nebarví, by měly prokázat nepřítomnost specifického zbarvení a zajistit indikaci nespecifického zbarvení pozadí. Pokud se projeví specifické zbarvení v částech tkáně pro negativní kontrolu, je nutno považovat výsledky vzorků pacienta za neplatné.

Nevysvětlitelné rozpory

Nevysvětlitelné rozpory v kontrolách by měly být ihned ohlášeny místnímu zastoupení společnosti Ventana. Pokud se výsledky kontrol neshodují se specifikacemi, výsledky tkáně pacienta jsou neplatné. Objevili-li se rozpory, prostudujte část Řešení problémů tohoto letáku. Identifikovat a opravit problém a potom opakovat vzorek pacienta.

Činidlo pro negativní kontrolu

K usnadnění interpretace výsledků je třeba provést pro každý vzorek cyklus s činidlem pro negativní kontrolu. Kontrola negativního činidla je použita místo primární protilátky, aby se dalo vyhodnotit nespecifické zbarvení. Sklíčko je třeba správným způsobem obarvit použitím CONFIRM Negative Control Mouse Ig nebo CONFIRM Negative Control Rabbit Ig výrobce Ventana. Je-li pro negativní kontrolu použito jiné činidlo, naředte ho ve stejném poměru jako antisérum primární protilátky ředícím roztokem Ventana Antibody Diluent. Jako méně vhodnou alternativu uvedených činidel pro negativní kontrolu lze použít samotný ředící roztok. Inkubační doba činidla pro negativní kontrolu by měla odpovídat inkubační době primární protilátky.

Pokud se panely řady protilátek používají se sériovými fezy, může činidlo pro negativní kontrolu na jednom podložním skle sloužit jako negativní kontrola nebo kontrola nespecifické vazby pozadí pro jiné protilátky.

Ověření testu

Před prvním použitím protilátky nebo barvicího systému v diagnostické proceduře by měla být ověřena specifická protilátky testováním na řadě dostupných tkáních se známou imunohistochemickou účinností, které představují známé pozitivní a negativní tkáně (seznamte se s Postupy kontroly kvality popsané v této části příbalového letáku a s požadavky pro kontrolu kvality akreditačního programu College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist,⁵ a schválenou směrnicí NCCLS⁶ nebo oběma dokumenty). Tyto postupy kontroly kvality musí být provedeny vždy, když se změní šarže protilátky nebo když se změní parametry testu. K ověření testu jsou vhodné tkáně uvedené v seznamu v části Souhrn očekávaných výsledků.

INTERPRETACE výsledků

Imunologický postup barvení na automatech Ventana způsobuje barevnou reakci produktu, vedoucí k sražení oblastí antigenu lokalizovaných primární protilátkou. Očekávané barevné reakce nalezete v příbalovém letáku k příslušné detekční soupravě. Dříve než budou výsledky interpretovány, musí kvalifikovaný patolog mající zkušenosti s imunohistochemickými postupy vyhodnotit pozitivní a negativní kontroly.

Tkáň pro pozitivní kontrolu

Nejprve je nutné provést test zbarvené tkáně pro pozitivní kontrolu a ověřit tak správnost funkce všech činidel. Přítomnost správně zbarveného reakčního produktu uvnitř cílových buněk indikuje pozitivní reaktivitu. Očekávané barevné reakce nalezete v příbalovém letáku k příslušné detekční soupravě. V závislosti na délce inkubační doby a potenci použitého hematoxylinu způsobí kontrastní barvení ledněmodré až tmavomodré zbarvení buněčných jader. Přílišné nebo neúplné kontrastní zbarvení může ohrozit správnou interpretaci výsledků.

Pokud se u pozitivních kontrolních tkání neprojeví pozitivní zbarvení, je nutno považovat výsledky testovaných vzorků za neplatné.

Tkáň pro negativní kontrolu

Tkáň pro negativní kontrolu je nutno testovat po tkáni pro pozitivní kontrolu, abychom ověřili specifickou značení cílového antigenu primární protilátkou. Nepřítomnost specifického zbarvení v tkáni pro negativní kontrolu potvrzuje nepřítomnost zkřížené reaktivity s buňkami nebo částmi buněk. Pokud se projeví specifické zbarvení ve tkáni pro negativní kontrolu, je nutno považovat výsledky vzorků pacienta za neplatné.

Pokud se vyskytuje nespecifické zbarvení, je většinou difúzní. Sporadické slabé zbarvení pojivové tkáně lze také pozorovat v řezech z tkání příliš fixovaných formalínem. K interpretaci výsledků použijte intaktní buňky, protože nekrotické a degenerované buňky se často zbarvují nespecificky.

Tkáň pacienta

Vzorky pacienta je nutno testovat jako poslední. Intenzitu pozitivního zbarvení je nutno posuzovat v kontextu jakéhokoli nespecifického zbarvení pozadí činidla pro negativní kontrolu. Jako u každého imunohistochemického testu, negativní výsledek znamená, že antigen nebyl detekován, nikoli, že antigen není v testovaných buňkách nebo tkáni přítomen. V případě potřeby použijte k identifikaci falešně negativních reakcí panel protilátek (viz část Souhrn očekávaných výsledků). Ke správné interpretaci každého imunohistochemického výsledku by měla být testována rovněž morfologie každého vzorku tkáně s využitím řezů barvených hematoxylinem a eozinem. Morfologické nálezy pacientů a klinické údaje týkající se pacientů by měly být interpretovány kvalifikovaným patologem.

OMEZENÍ

Všeobecná omezení

1. Imunohistochemie je diagnostický proces obsahující více kroků, který vyžaduje specializované vyškolení ve výběru vhodných činidel, výběru tkání, fixaci, přípravě a zpracování imunohistochemického podložního skla a interpretaci výsledků zbarvení.
2. Zbarvení tkáně závisí na manipulaci s tkání a na jejím zpracování před barvením. Nesprávná fixace, zmrazení, rozmrazení, umývání, sušení, zahřívání, řezání nebo kontaminace jinými tkáněmi nebo tekutinami může vést ke vzniku artefaktů, zachycení protilátky nebo falešně negativním výsledkům. Výsledky mohou být nekonzistentní v důsledku použití různých metod fixace a zalití nebo v důsledku vnitřních nepravidlostí v tkáni.
3. Přílišné nebo neúplné kontrastní zbarvení může ohrozit správnou interpretaci výsledků.

- Klinická interpretace jakéhokoli pozitivního zbarvení nebo jeho nepřítomnosti musí být vyhodnocena v kontextu klinického projevu, morfologie a jiných histopatologických kritérií. Klinická interpretace jakéhokoli zbarvení nebo jeho nepřítomnosti musí být doplněna morfologickými studii a řádnými kontrolami a také dalšími diagnostickými testy. Protílátka je určena k použití v panelu protilátek. Za interpretaci barveného preparátu zodpovídá kvalifikovaný patolog, který zná použité protílátka, činidla a použité metody. Barvení se musí provádět v certifikované laboratoři s příslušným oprávněním a pod dohledem patologa zodpovědného za hodnocení barvených podložních skel a zaručení adekvátnosti pozitivních a negativních kontrol.
- Ventana dodává protílátka a činidla pro použití optimálně naředěná, pokud jsou dodrženy instrukce, které jsou součástí produktu. Další ředění může způsobit ztrátu zbarvení antigenu; uživatel musí tyto případné změny ověřit. Jakákoli odchylka od doporučených testovacích postupů může způsobit neočekávané výsledky. Je nutno provést a zdokumentovat příslušné kontroly. Uživatelé, kteří nedodrží doporučené postupy, musejí za těchto okolností přijmout zodpovědnost za interpretaci výsledků pacienta.
- Tento výrobek není určen k použití v průtokové cytometrii, neboť charakteristiky účinnosti nebyly stanoveny.
- Činidla mohou vykazovat neočekávané reakce v dřívě netestovaných tkáních. V důsledku biologické variability exprese antigenu v neoplazmách nebo jiných patologických tkáních nelze zcela vyloučit možnost neočekávaných reakcí i v testovaných skupinách tkání.⁷ Se zdokumentovanými neočekávanými reakcemi se obraťte na místní zastoupení společnosti Ventana.
- Tkáně osob infikovaných virem hepatitidy B, které obsahují povrchový antigen (HBsAg) hepatitidy B, mohou s křenuvou peroxidázou vykazovat nespecifické zbarvení.⁸
- Normální séra ze stejného živočišného zdroje jako sekundární antiséra použitá v blokovacích krocích mohou v důsledku přítomnosti autoprotilátek nebo přirozených protilátek způsobovat falešně negativní nebo falešně pozitivní výsledky.
- Falešně negativní výsledky se mohou vyskytovat v důsledku neimunologické vazby proteinů nebo produktů reakce se substrátem. Mohou být také způsobeny aktivitou pseudoperoxidázy (erythrocyty) a endogenní aktivitou peroxidázy (cytochrom C), alkalickou fosfatázou nebo endogenním biotinem (příklad: játra, mozek, prs, ledvina) v závislosti na typu imunologického barvení.⁹
- Jako u každého imunohistochemického testu, negativní výsledek znamená, že antigen nebyl detekován, nikoli, že antigen není v testovaných buňkách nebo tkáni přítomen.

Specifická omezení

- Protílátka byla optimalizována pro inkubační dobu v délce 16 minut (s tkání zhodnocenou antigenem) ve spojení s detekčními soupravami Ventana a barvicími automaty Ventana. Nedodržení příslušných inkubačních dob a teplot může vést k chybným výsledkům. Jakoukoliv změnu tohoto druhu musí uživatel ověřit. Vzhledem k různým způsobům fixace a zpracování tkání může být potřeba zvýšit nebo snížit inkubační doby primární protilátky na jednotlivých vzorcích. Další informace o různých fixacích naleznete v příručce „Immunohistochemistry Principles and Advances“.¹⁰
- Protílátka ve spojení s detekčními soupravami a příslušenstvím Ventana detekuje antigen, který přežívá běžně provedenou fixaci ve formalínu, zpracování tkáně a její nařezání. Uživatelé, kteří nedodrží doporučené postupy, musejí za těchto okolností přijmout zodpovědnost za interpretaci výsledků pacienta.

CHARAKTERISTIKY ÚČINNOSTI

- Specifita CONFIRM anti-CD30 (Ber-H2) byla stanovena barvením panel normálních tkání, fixovaných ve formalínu a zalitých v parafínu. Následující typy tkání byly pomocí protilátky CONFIRM anti-CD30 (Ber-H2) zbarveny pozitivně: kostní dřeň, zbarvil se 1 ze 3 případů; mandle, zbarvil se 3 ze 3 případů; děloha uterus, zbarvil se 2 ze 3 případů (lymfocyty). Následující normální tkáně nevykázaly s protílátkou CONFIRM CD30 (Ber-H2) pozitivní zbarvení: mozková dřeň, zbarvil se 0 ze 3 případů; malý mozek, nezabarvil se žádný ze 3 případů; nadledvina, nezabarvil se žádný ze 3 případů; vaječník, nezabarvil se žádný ze 3 případů; slinivka břišní, nezabarvil se žádný ze 3 případů; štítná žláza, nezabarvil se žádný ze 3 případů; prs, nezabarvil se žádný ze 3 případů; slezina, nezabarvil se žádný ze 3 tkání; brzlík, nezabarvil se žádný ze 3 případů; plíce, nezabarvil se žádný ze 3 případů; srdce, nezabarvil se žádný ze 3 případů; jícen, nezabarvil se žádný ze 3 případů; žaludek, nezabarvil se žádný ze 3 případů; tenké střevo, nezabarvil se žádný ze 3 případů; tračník, nezabarvil se žádný ze 3 případů; játra, nezabarvil se žádný ze 3 případů; slinná žláza, nezabarvil se žádný ze 3 případů; ledvina, nezabarvil se žádný ze 3 případů; prostata, nezabarvil se žádný ze 3 případů; děložní hrdlo,

nezabarvil se žádný ze 3 případů; přičně pruhovaný sval, nezabarvil se žádný ze 3 případů; kůže, nezabarvil se žádný ze 3 případů; nerv nezabarvil se žádný ze 3 případů; mezotel, nezabarvil se žádný ze 3 případů.

- Senzitivita je závislá na konzervaci antigenu. Jakákoli nesprávná manipulace s tkání během fixace, řezání, zalévání nebo uchovávání, která mění antigenost, zeslabuje detekci CD30 při použití CONFIRM anti-CD30 (Ber-H2) a může mít za následek falešně negativní výsledky. Citlivost byla stanovena barvením řady neoplastických tkání, fixovaných ve formalínu a zalitých v parafínu. Následující tkáně / rakoviny vykázaly s protílátkou CONFIRM anti-CD30 (Ber-H2) pozitivní zbarvení: embryonální karcinom varlat, Hodgkinův lymfom a anaplastický velkobuněčný lymfom. Následující neoplastické tkáně nevykázaly s protílátkou CONFIRM anti-CD30 (Ber-H2) pozitivní zbarvení: glioblastom, atypický meningiom, ependyom a oligodendrogliom v mozku; serózní a mucinózní papilární adenokarcinom; karcinom ostrůvkových buněk, adenokarcinom slinivky břišní, seminom, medulární a papilární karcinom štítné žlázy; intra ductální karcinom, fibrózní tuková tkáň nespecifický infiltrující karcinom prsu; B-buněčný lymfom sleziny difúzního typu, nediferencovaný malobuněčný karcinom, karcinom skvamózních buněk a adenokarcinom plic a jícnu; mucinózní adenokarcinom žaludku, adenokarcinom a mesenchymom tenkého a tlustého střeva; maligní melanom, adenokarcinom amesenchymom rektu; hepatocelulární karcinom a hepatoblastom; karcinom jasných buněk, adenokarcinom a karcinom tranzičních buněk prostaty; leiomyom, endometriální adenokarcinom se skvamózní metaplazií a karcinom jasných buněk dělohy; adenokarcinom ak skvamózních buněk děložního hrdla; embryonální rhabdomyosarkom, karcinom bazálních buněk, neurofibrom, neuroblastom retroperitonea, epitelální maligní mezoteliom peritonea, maligní lymfom difúzního typu, B-buněčný lymfom difúzního typu a ne-Hodgkinův lymfom lymfatické uzliny difúzního typu; karcinom tranzičních buněk a leiomyosarkom měchýře; osteosarkom, rhabdomyosarkom vrtenovitých buněk retroperitonea a leiomyosarkom.
- Reprodukovatelnost barvení uvnitř cyklu (intra run) byla stanovena na základě barvení devíti (9) sklíček obsahujících stejnou tkáň na jednom přístroji. Cílem testování na reprodukovatelnost v rámci cyklu je ujistit se, že všechna sklíčka barvená na jednom automatu mají podobnou účinnost. Testování prováděné na barvicím automatu NexES IHC poskytlo sklíčka podobně zbarvená. Testování prováděné na barvicím automatu Benchmark poskytlo sklíčka podobně zbarvená. Testování prováděné na barvicím automatu Benchmark XT/LT poskytlo sklíčka podobně zbarvená. Uživatel musí ověřit reprodukovatelnost výsledků v rámci jednoho cyklu barvením různých setů sériových řezů s nízkou, střední a vysokou hustotou antigenu v jednom cyklu.
- Reprodukovatelnost mezi cykly (inter run) byla stanovena na základě barvení tří (3) sklíček obsahujících stejnou tkáň po dobu tří dnů (jedno sklíčko, jeden cyklus za jeden den) na stejném barvicím automatu pro každou platformu barvení. Cílem testování na reprodukovatelnost mezi cykly je ujistit se, že obarvení sklíčka je konzistentní, pokud je cyklus opakován na stejném barvicím automatu. Všechna sklíčka měla na barvicím automatu NexES IHC podobnou intenzitu zbarvení. Všechna sklíčka měla na barvicím automatu Benchmark podobnou intenzitu zbarvení. Všechna sklíčka měla na barvicím automatu Benchmark XT/LT podobnou intenzitu zbarvení. Uživatel musí ověřit reprodukovatelnost výsledků mezi cykly barvením různých setů sériových řezů s nízkou, střední a vysokou hustotou antigenu v různých dnech.
- Reprodukovatelnost mezi platformami byla stanovena barvením jednoho (1) sklíčka obsahujícího stejnou tkáň na stejném barvicím automatu pro každou platformu barvení. Cílem reprodukovatelnosti mezi platformami je ujistit se, že obarvení sklíčka je konzistentní mezi platformami barvení (NexES IHC, Benchmark a Benchmark XT/LT). Sklíčka barvená tímto produktem vykázala srovnatelné zbarvení napříč všemi platformami barvení výrobce Ventana.
- Reprodukovatelnost mezi šaržemi byla stanovena barvením jednoho (1) sklíčka obsahujícího různé tkáňové vzorky se třemi (3) různými šaržemi produktu CONFIRM anti-CD30 (Ber-H2). Cílem reprodukovatelnosti mezi šaržemi je ujistit se, že každá šarže vykazuje podobnou citlivost a specifitu, pokud je aplikovaná na stejné tkáňové vzorky. Při testování na osmi (8) tkáních měly všechny tři (3) šarže podobnou účinnost.

ŘEŠENÍ PROBLÉMU

- Jestliže vykazují pozitivní kontroly slabší zbarvení než je očekáváno, je třeba během stejného cyklu na automatu zkontrolovat další cykly s pozitivní kontrolou, aby se dalo stanovit, zda je to způsobeno primární protílátkou nebo některým z běžných sekundárních činidel.
- Je-li pozitivní kontrola negativní, je třeba zkontrolovat, zda má sklíčko štítek se správným čárovým kódem. Jestliže je sklíčko opatřeno správným štítkem, je třeba během stejného cyklu na automatu zkontrolovat další cykly s pozitivní kontrolou, aby se dalo stanovit, zda je to způsobeno primární protílátkou nebo některým z

běžných sekundárních činidel. Sběr, fixace nebo odstraňování parafinů z tkání mohlo být provedeno nesprávným způsobem. Sběr tkáně, její fixace a skladování musí probíhat ve správném postupu.

3. Vyskytne-li se přílišné zabarvení pozadí, pravděpodobně jsou přítomny vysoké úrovně endogenního biotinu. Je třeba zahrnout krok blokování biotinu.
4. Jestliže se nepodařilo odstranit všechny parafin, je třeba opakovat postup odstranění parafinu z tkání.
5. Je-li zabarvení specifickou protilátkou příliš intenzivní, opakujte cyklus s kratší inkubační dobou vždy o 4 minuty až do doby dosažení požadované intenzity barvení.
6. Jestliže dochází ke smývání řezů tkání ze sklíčka, zkontrolujte, zda jsou podložní skla pozitivně nabita.
7. Při nápravě odkazujeme na část Jednotlivé kroky postupu a Návod k obsluze barvicího automatu nebo se obraťte na místní zastoupení společnosti Ventana.

REFERENCE

1. Froese P, Lemke H, Gerdes J, Havsteen B, Schwarting R, Hansen H, Stein H. Biochemical characterization and biosynthesis of the Ki-1 antigen in Hodgkin derived and virus transformed human B and T lymphoid cell lines. *The Journal of Immunology* 139(6): 2081-2087, 1987.
2. Stein H, Mason DY, Gerdes J, O'Connor N, Wainscoat J, Pallesen G, Gaher K, Falini B, Delsol G, Lemke H. The Expression of the Hodgkin's Disease Associated Antigen K1-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: Evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. *Blood* 66: 848-858, 1985.
3. Stein H, Gerdes HL, Schwab U, Lemke H, Mason DY, Ziegler A, Schienle W, Diehl V. Identification of Hodgkin and Sternberg-Reed cells as a unique cell type derived from a newly-detected small-cell population. *Int J Cancer* 30(4): 445-459, 1982.
4. Sheehan DC, Hrapchak BB. *Theory and practice of histotechnology*, 2nd Edition. The C.V. Mosby Company, St. Louis, 1980.
5. College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, *Anatomic Pathology Checklist*, 2001.
6. 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.
7. Herman GE, Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. *Biotech Histochem* 66(4): 194-199, 1991.
8. 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.
9. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase: part 1. The technique and its pitfalls. *Lab Med* 14: 767, 1983.
10. Roche PC, Hsi ED. *Immunohistochemistry-Principles and Advances*. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. (NR Rose Ed.) ASM Press, 2002.

Duševní vlastnictví

CONFIRM™, EZ Prep™, MIEW™, *ultraView*™ a Liquid Coverslip™ jsou ochranné známky společnosti Ventana Medical Systems, Inc.; BenchMark®, NexES® a Ventana® jsou registrované ochranné známky společnosti Ventana Medical Systems, Inc.

Ventana poskytuje kupujícímu jednorázovou licenci v souladu s následujícími patenty: Patent USA, č. 6045 759, 6192 945, 6416 713, 6945 128 a zahraniční stejnopisy.

KONTAKTNÍ INFORMACE

Ventana Medical Systems, Inc.
1910 E. Innovation Park Drive
Tucson, Arizona 85755
USA

+1 520 887 2155
+1 800 227 2155 (USA)



www.ventanamed.com

EC REP

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany