

Anti-Pan Keratin (AE1/AE3/PCK26) Primary Antibody

Katalogové číslo 760-2595 (50 testů)

760-2135 (250 testů)

INDIKACE A POUŽITÍ

Účel použití

Tato protilátka je určena pro diagnostické použití in vitro.

Anti-Pan Keratin (AE1/AE3/PCK26) Primary Antibody společnosti Ventana Medical Systems (Ventana®) může být použita jako pomůcka při identifikaci normálních a abnormálních epitelálních buněk a ke stanovení rodokmenu špatně diferenciováných maligních tumorů. Keratiny jsou skupinou intermediárních vláknových proteinů, které se objevují v normálních a neoplastických buňkách epitelálního původu. Je známo devatenáct humánních cytokeratinů, které se dělí do kyselých a bazických podskupin. V epitelových tkáních se vyskytují v párech, složení párů se mění podle typu epitelálních buněk, stádia diferenciace, prostředí buněčného růstu a stavu onemocnění. Tento pan-keratinový koktejl rozpoznává většinu kyselých a všechny bazické cytokeratiny, což z něho vytváří užitečné barvivo pro téměř všechny epitelové tkáně a jejich tumory. Anti-Pan Keratin (AE1/AE3/PCK26) se specificky váže na antigeny nacházející se v cytoplasmě jednoduchých a složitých epitelových buněk. Tato protilátka je určena k laboratornímu použití pro kvalitativní barvení cytokeratinů v řezech fixovaných ve formaldehydu a zalitých do parafínu na automatu pro barvení sklíček Ventana. Anti-Pan Keratin (AE1/AE3/PCK26) obsahuje koktejl myších monoklonálních protilátek směřovaných proti epitopu, který se nachází na humánních epidermálních keratinech, jak to uvádí Woodcock-Mitchell, et al.¹ Tento koktejl protilátek reaguje s cytokeratiny 56,5 kD, 50 kD, 50' kD, 48 kD a 40 kD kyselých podskupin a cytokeratiny 65-67 kD, 64 kD, 59 kD, 58 kD, 56 kD a 52 kD bazických podskupin.^{1,2,3,4,5} Může nastat neočekávaná exprese antigenu nebo ztráta exprese, zvláště v neoplazmatech. Příležitostně budou stromální prvky, obklopující silně zbarvenou tkáň a/nebo buňky, vykazovat imunoreaktivitu.

Klinickou interpretaci jakéhokoliv zbarvení nebo jeho nepřítomnosti musí doplňovat morfologické studie a hodnocení vhodných kontrol. Hodnocení musí provádět kvalifikovaný patolog v kontextu anamnézy pacienta a jiných diagnostických testů. Upozornění: Federální zákony USA omezují prodej tohoto zařízení lékaři nebo na základě jeho objednávky.

Souhrn a vysvětlení

Cytokeratiny jsou polypeptidové řetězce, které vytváří strukturální proteiny nazývané intermediární vlákna, které obsahují epitelální buněčný cytoskeleton. Jak v normálních, tak maligních epitelových buněčných liniích^{6,7,8} bylo charakterizováno devatenáct různých forem cytokeratinu podle molekulové hmotnosti a izoelektrického pH. Cytokeratiny o nízké molekulové hmotnosti (40-54 kD) jsou často exprimovány v nestratifikovaném cylindrickém epitelu zatímco vysokomolekulární cytokeratiny (48-67 kD) jsou často exprimovány ve stratifikovaném epitelu.⁹ Monoklonální protilátky proti různým cytokeratinům mohou být užitečné při stanovování původu špatně diferenciováných tumorů.¹⁰ Protože jsou cytokeratinové peptidy asociovány s epitelovými buňkami, tyto peptidy jsou klinicky důležitými markery, které pomáhají odlišit karcinomy od maligních tumorů neepitelového původu, jako jsou lymfomy, melanomy a sarkomy.^{11,12} Identifikace cytokeratinu získává v imunopatologii stále větší důležitost. V Imunomikroskopii je prezentován diagnostický algoritmus pro použití cytokeratinu při klasifikaci tumorů: Diagnostický nástroj pro chirurgického patologa, kapitola 14.6 Jestliže reaktivita keratinu chybí a existuje vysoký index podezření na karcinom, měly by se provést další imunohistochemické studie.¹⁰ Zdá se, že anti-keratinové primární protilátky rozeznávají pouze epitelová neoplazmata s principiální výjimkou epitelosarkomu, synoviálního sarkomu a mezotheliomu.

Protilátka je lokalizována biotin konjugovaným sekundárním přípravkem protilátky, který rozeznává králíčí a myší imunoglobuliny. Po tomto kroku následuje vázání avidinového nebo streptavidinového enzymového konjugátu, který se váže na biotin přítomný v sekundární protilátce. Avidinový nebo streptavidinový enzymatický komplex sekundární protilátky a specifické protilátky je poté vizualizován produktem srážecí enzymové reakce, který se snadno detekuje světelnou mikroskopií.

Zásady a postupy

Anti-Pan Keratin (AE1/AE3/PCK26) může být použit jako primární protilátka pro imunohistochemické barvení parafinových tkáňových řezů. Obecně imunohistochemické barvení umožňuje vizualizaci antigenů následnou aplikací specifické protilátky (primární protilátka) na antigen, sekundární protilátky (spojená protilátka) na primární protilátku, enzymového komplexu a chromogenního substrátu s vloženými promývacími kroky. Enzymatická aktivace chromogenu má za následek viditelný reakční produkt v místě

antigenu. Vzorok pak je možné kontrastně obarvit a zalít. Výsledky se interpretují světelným mikroskopem a za pomoci diferenciální diagnózy patofyziologických procesů, které mohou, ale nemusí být spojeny s konkrétním antigenem.

Anti-Pan Keratin (AE1/AE3/PCK26) se optimálně nařadí pro použití s detekčními sadami a automaty na barvení sklíček Ventana. Každý krok v protokolu barvení zahrnuje inkubaci po přesně stanovenou dobu při specifické teplotě. Na konci každého inkubačního kroku se částí opláchnou automatizovaným zařízením na barvení sklíček Ventana, aby se reakce zastavila a odstranil nevázaný materiál, který by narušoval v následných krocích požadovanou reakci. Aby se minimalizovalo odpařování vodných reagentů ze sklíčka obsahujícího vzorky, zařízení pro barvení sklíček na něj nanáší zalévací roztok. Barvení je dokončeno po inkubaci substrátovým chromogenem a doplňkovým kontrastním barvením. Podrobnější informace o provozu přístroje naleznete v návodu k obsluze příslušného automatického zařízení na barvení sklíček Ventana.

MATERIÁLY A METODY

Dodávané reagentie

Katalogové č. 760-2595: Jeden dávkovač Anti-Pan Keratin (AE1/AE3/PCK26) obsahuje 5 mL předem naředěné reagentie. Dávkovač obsahuje přibližně 5 µg (1 µg/mL) myší monoklonální protilátky směřované proti epitopu přítomnému na humánních epidermálních cytokeratinech.^{1,3}

Katalogové č. 760-2135: Jeden dávkovač Anti-Pan Keratin (AE1/AE3/PCK26) obsahuje 25 mL předem naředěné reagentie. Dávkovač obsahuje přibližně 25 µg (1 µg/mL) myší monoklonální protilátky směřované proti epitopu přítomnému na humánních epidermálních cytokeratinech.^{1,3}

Protilátky AE1 a AE3 se produkují z ascitové tekutiny frakcionované sranem sodným získané z hybridizace myších buněk myelomu P3 se splenocyty z BALB/c myší imunizovaných humánními epidermálními keratiny.¹ Protilátka PCK26 se připravuje z čištěné ascitové tekutiny získané z hybridizace myších buněk myelomu NS-1 splenocyty z BALB/c myší imunizovaných humánními epidermálními keratiny. Koktejl protilátek se rozředí ve fyziologickém roztoku pufovaném fosfátem, který obsahuje protein nosiče a konzervační látku. Celková proteinová koncentrace reagentie je přibližně 3 mg/mL. Klon AE1 je imunoglobulinová třída IgG1, kappa; klon AE3 je imunoglobulinová třída IgG1 a klon PCK26 je imunoglobulinová třída IgG1, kappa.

Rekonstituce, míchání, ředění, titrace

Tato protilátka byla optimalizována pro použití na automatu pro barvení sklíček Ventana v kombinaci s detekčními sadami Ventana. Není nutná žádná rekonstituce, míchání, ředění ani titrace.

Další ředění může způsobit ztrátu antigenu při barvení. Uživatel musí jakéhokoliv takové změny validovat. Rozdíly ve zpracování tkání a technických postupech v laboratoři mohou vést k významné variabilitě výsledků a vyžadují pravidelné používání kontrol. (Viz část Postupy kontroly kvality.)

Potřebné materiály a reagentie, které nejsou součástí dodávky

Následující reagentie a materiály mohou být vyžadovány pro barvení, nejsou součástí dodávky:

1. Kontroly pozitivních a negativních tkáňových vzorků
2. Ventana Negative Control Reagent
3. Ventana Rabbit Negative Control
4. Sklíčka mikroskopu, pozitivně nabitá
5. Sušící píčka schopná udržovat teplotu 70°C ± 5°C
6. Štítky s čárovým kódem (vhodné štítky s čárovým kódem pro negativní kontrolu a testovanou primární protilátku)
7. 10% neutrální pufovaný formaldehyd
8. Barvicí skleničky nebo lázně
9. Časový spínač
10. Xylen
11. Ethanol nebo reagenční alkohol
12. Deionizovaná nebo destilovaná voda
13. Automaty na barvení sklíček ES®, NexES IHC®, BenchMark® a BenchMark XT
14. MIEW™ DAB (upřednostňovaná), AEC, V Red (ALK PHOS) nebo Enhanced V Red detection kits
15. Ventana Endogenous Biotin Blocking Kit
16. Software specifický pro detekční sadu (pouze automat na barvení sklíček ES)
17. APK Wash Solution (automaty na barvení sklíček ES a NexES IHC)

18. Liquid Coverslip™ solution (automaty na barvení sklíček ES a NexES IHC)
19. EZ Prep™ solution (automaty na barvení sklíček BenchMark a BenchMark XT)
20. Reakční pufr (automaty na barvení sklíček BenchMark a BenchMark XT)
21. LCS (automaty na barvení sklíček BenchMark a BenchMark XT)
22. Protease I
23. Hematoxylin Counterstain
24. Bluing Reagent
25. Montážní médium
26. Krycí sklo
27. Světelný mikroskop (20-80x)

Uchovávání a nakládání s výrobkem

Uchovávejte při 2-8°C. Chraňte před mrazem. Uživatel musí validovat jakékoliv jiné podmínky uchovávání, než jsou podmínky uvedené v příbalové informaci.

Pro zajištění vhodné dodávky a stability protilátky po každém provedení testu se uzávěr musí vrátit na své místo a dávkovač se musí neprodleně uložit do ledničky ve svislé poloze.

Každý dávkovač protilátky má uvedené datum použitelnosti. Při správném uchovávání je reacie stabilní do dne vyznačeného na štítku. Reagenci nepoužívejte po uplynutí dne použitelnosti pro předepsanou metodu uchovávání.

Neexistují žádné definitivní příznaky naznačující nestabilitu tohoto přípravku, proto je souběžně s neznámými vzorky zapotřebí provádět pozitivní a negativní kontroly. Jestliže se objeví známka nestability reacie, obraťte se neprodleně na svoji místní kancelář Ventana.

Odběr vzorků a příprava k analýze

Pro použití s touto primární protilátkou jsou vhodné rutinně zpracované tkáně fixované formaldehydem a vložené do parafínu, pokud se používají detekční sady Ventana a automaty na barvení sklíček Ventana (viz část Potřebné materiály a reacie, které nejsou součástí dodávky). Doporučenou látkou pro fixaci tkáně je 10% neutrální pufovaný formaldehyd.¹⁴ Může dojít k proměnlivým výsledkům v důsledku dlouhodobé fixace nebo speciálních procesů, jako je dekalifikace preparátů kostní dřevě.

Každá část by měla být nařezána na vhodnou tloušťku a umístěna na pozitivně nabitou skleněnou destičku Superfrost Plus. Sklípka obsahující tkáňovou sekcí lze péci nejméně 2 hodiny (ale ne déle než 24 hodin) v peci při teplotě 70°C ± 5°C.

Proces ruční deparafinizace

Je nutný v případě použití automatů na barvení sklíček ES nebo NexES IHC nebo pokud nebyl vybrán automat na barvení sklíček BenchMark nebo BenchMark XT:

1. Pokyny o tom, kdy označovat sklípka štítkem s čárovým kódem naleznete v části Návod k použití konkrétního automatu na barvení sklíček.
2. Postupně sklípka ponořte do 3 xylenových lázní, do každé na 5 ± 1 minuty.
3. Sklípka převedte do 100% ethanolu a postupně ponořte do 2 xylenových lázní, do každé na 3 ± 1 minuty.
4. Sklípka převedte do 95% ethanolu a postupně ponořte do lázně s tímto roztokem na 3 ± 1 minuty.
5. Sklípka převedte do 80% ethanolu a ponořte do tohoto roztoku na 3 ± 1 minuty.
6. Převedte sklípka do lázně deionizované a destilované vody a ponořte je minimálně 10krát.
7. Převedte sklípka do roztoku APK Wash (1x) nebo roztoku pufru podle toho, jak to bude vhodné. Pokud jde o roztok APK Wash, sklípka by v něm měla zůstat, dokud nebudete připraveni k provedení barvení. Pokud jde o roztok pufru, sklípka by v něm měla zůstat, dokud nebudete připraveni na postup odmaskování antigenu. Sklípka nenechte uschnout.

Sklípka barvená automaty na barvení sklíček BenchMark nebo BenchMark XT lze na přístroji zbavit parafínu. Pokud se zvolí tato možnost, opatřete sklípka čárovým kódem a vložte je do přístroje. Pokud tato volba vybrána nebude, postupujte podle shora uvedené Postupu ruční deparafinizace.

VAROVÁNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

1. Při nakládání s reagiemi uplatněte přiměřená bezpečnostní opatření. Používejte jednorázové rukavice při manipulaci s materiály podezřelými z karcinogenních nebo toxických účinků (příklad: xylen nebo formaldehyd).
2. Chraňte oči a sliznice před kontaktem s reagiemi. Jestliže reacie přijde do styku s citlivými plochami, omyjte je velkým množstvím vody.

3. Se všemi vzorky pacienta a všemi materiály, které s nimi přijdou do styku, je zapotřebí nakládat jako s biologickými nebezpečnými materiály a likvidovat je za použití vhodných bezpečnostních opatření. Nikdy nepipetujte ústy.
4. Reacie chraňte před mikrobiální kontaminací, protože by to mohlo způsobovat nesprávné výsledky.
5. Jiné doby a teploty inkubace než ty, které jsou specifikovány, mohou vést k chybným výsledkům. Uživatel musí jakoukoliv takovou změnu validovat.
6. Reacie byly optimálně naředěny a další ředění může způsobit ztrátu zabarvení antigenu. Uživatel musí jakoukoliv takovou změnu validovat.
7. Při použití podle pokynů nebude tento přípravek klasifikován jako nebezpečná látka. Konzervační látka v reagenci je ProClin 300. Příznaky nadměrné expozice působení ProClin 300 zahrnují podráždění kůže a očí, podráždění sliznic a horních cest dýchacích. Koncentrace ProClin 300 v tomto přípravku je 0,05 % a nespĺňuje kritéria OSHA pro nebezpečnou látku. Systémové alergické reakce jsou možné u citlivých jednotlivců.

NÁVOD K POUŽITÍ

Postupný proces

Primární protilátky Ventana byly vyvinuty pro použití na automatu pro barvení sklíček Ventana v kombinaci s detekčními sadami Ventana a příslušenstvím. Doporučené protokoly o barvení pro automaty na barvení sklíček jsou uvedeny v následující tabulce 1. Parametry pro automatizované postupy lze zobrazit, vytisknout a editovat podle postupu uvedeného v návodu k obsluze. Ostatní provozní parametry pro automaty barvení sklíček byly předem nastaveny ve výrobním závodu.

Tabulka 1. Doporučené protokoly o barvení pro Anti-Pan Keratin (AE1/AE3/PCK26)

Typ postupu	Platforma/metoda	
	ES nebo NexES IHC	BenchMark nebo BenchMark XT
Deparafinizace	Off-line	Vybráno
Úprava buněk (odmaskování antigenu)	Nepožaduje se	Nepožaduje se
Enzym (proteáza)	Proteáza 1 až 4 minuty	Proteáza 1 až 4 minuty
Protílátka (primární)	Pankeratin, přibližně 16 minut	Pankeratin, přibližně 16 minut
A/B blok (blokování biotinu)	Volitelné	Volitelné
Zesílit (zesílení)	Volitelné	Volitelné
Kontrastní barvení (Hematoxylin)	Hematoxylin, 2 až 4 minuty	Hematoxylin, 2 až 4 minuty
Po kontrastním barvení	Bluing, 2 až 4 minuty	Bluing, 2 až 4 minuty

Postupy pro barvení na automatech na barvení sklíček Ventana jsou následující. Podrobnější pokyny a dodatečné možnosti protokolu naleznete v návodu k obsluze.

Automaty na barvení sklíček ES a NexES IHC

Požadované odmaskování antigenu:

1. Sklípka se deparafinizují v řadě roztoků počínaje xylenem a koncentrovanými alkoholy až po vodu a příslušný pufr. Proveďte postup odmaskování antigenu a převedte sklípka do 1x APK Wash.
2. Na misku reagií položte primární protílátku a vhodné dávkovače detekční sady a požadované reacie příslušenství a umístěte je do automatu na barvení sklíček. Zkontrolujte objemné tekutiny a odpad.
3. Osušte natřený konec sklípka a poté nalepte štítek s čárovým kódem sklípka, který odpovídá protokolu protilátky, která se má použít.
4. Vyjměte deparafinizovaná sklípka s odmaskovaným antigenem označená štítkem z 1X APK Wash. Zabraňte sušení tkáně.

Odmaskování antigenu není požadováno:

1. Dejte na sklípko štítky s čárovým kódem. Sklípka se poté deparafinizují v řadě roztoků počínaje xylenem a koncentrovanými alkoholy až po vodu a poté je vložte do APK Wash (1X).
2. Na misku reagií položte primární protílátku a vhodné dávkovače detekční sady a požadované reacie příslušenství a umístěte je do automatu na barvení sklíček.

3. Vyměte deparafinovanou sklíčka APK Wash (1X). Zabraňte sušení tkáně.

Automaty na barvení sklíček řady BenchMark nebo BenchMark XT

1. Nalepte štítek s čárovým kódem sklíčka, který odpovídá protilátce, která se má použít.
2. Na misku reagencí položte primární protilátku a vhodné dávkovače detekční sady a požadované reagencie příslušenství a umístěte je do automatu na barvení sklíček. Zkontrolujte objemné tekutiny a odpad.
3. Vložte sklíčka do automatu na barvení sklíček.

Pro všechny přístroje

1. Spustíte proces barvení.
2. Po dokončení procesu sklíčka z automatu na barvení vyměte.
3. U sad MIEW DAB a roztoků Ventana Red kit promyjte detergentem na nádobí nebo alkoholem, aby se odstranil roztok krycího sklíčka; dehydratujte, vyčistěte a opatřete krycím sklíčkem s permanentním montážním médiem obvyklým způsobem.
4. U přípravku AEC chromogen nedehydratujte a nečistěte. Proveďte montáž AEC vodným montážním médiem. Obarvená sklíčka by se měla odečíst během dvou až tří dnů barvení a jsou stabilní nejméně dva roky, pokud jsou správně uložena při pokojové teplotě (15 až 25°C).

Postupy kontroly kvality

Pozitivní tkáňová kontrola

S každým provedeným procesem barvení se musí provést kontrola pozitivního tkáňového vzorku. Příkladem pozitivní kontroly s přípravkem Anti-Pan Keratin (AE1/AE3/PCK26) je normální střeva. Pozitivní obarvené tkáňové komponenty (buňky cylindrického epitelu) se používá jako potvrzení, že byla nasazena protilátka a že nástroj správně fungoval. Tato tkáň může obsahovat jak pozitivní, tak negativní obarvené buňky nebo tkáňové komponenty a slouží jednak jako pozitivní, ale i negativní kontrolní tkáň. Kontrolní tkáň by měla být čerstvé vzorky z pitvy, biopsie nebo získané chirurgicky a připravené či fixované co nejdříve, a to způsobem shodným jako testované řezu. Takové tkáň by měla monitorovat všechny kroky výkonu, od přípravy vzorků až do konce barvení. Použití tkáňových řezů fixovaných či zpracovaných odlišně od testovacích vzorků zajistí kontrolu pro všechny reagencie a kroky metody s výjimkou fixace a zpracování tkáni.

Tkáň se slabým pozitivním zbarvením je vhodnější pro optimální kontrolu kvality a pro detekci malých úrovní degradace reagencie.

Známe pozitivní tkáňové kontroly by se měly používat pouze pro sledování správného schování zpracovaných tkání a testovacích reagentů, ne jako pomůcka pro stanovení specifické diagnózy vzorků pacienta. Jestliže pozitivní tkáňové kontroly neprokáží pozitivní zbarvení, výsledky se zkušebními vzorky je nutno považovat za neplatné.

Negativní tkáňová kontrola

Stejná tkáň použitá pro pozitivní tkáňovou kontrolu může být i použita jako negativní tkáňová kontrola. Různorodost typů buněk přítomných ve většině tkáňových sekcí nabízí místa vnitřní negativní kontroly, ale to by si měl uživatel ověřit. Komponenty, které nebarví, by měly prokázat absenci specifického zbarvení a poskytnout indikaci nespecifického zbarvení pozadí. Jestliže dojde ke specifickému zbarvení v místech negativní tkáňové kontroly, výsledky se zkušebními vzorky je nutno považovat za neplatné.

Nevysvětlené nesrovnalosti

Nevysvětlené nesrovnalosti v kontrolách ihned oznamte svému místnímu zastoupení Ventana. Jestliže výsledky kontroly kvality nesplňují technické parametry, výsledky pacienta jsou neplatné. Viz bod Odstraňování závad v této příbalové informaci. Problém identifikujte a odstraňte, poté postup opakujte se zkušebními vzorky pacienta.

Negativní kontrola reagentů

Negativní kontrola reagentů se musí provádět u každého vzorku, aby napomáhala interpretaci výsledků. Negativní kontrola reagentů se používá namísto primární protilátky k vyhodnocení nespecifického zbarvení. Sklíčko by se mělo obarvit negativní kontrolou (myší) nebo králíčí negativní kontrolou podle toho, co se hodí. Jestliže se použije alternativní negativní kontrola reagentů, naředte na stejnou koncentraci jako primární antisérum protilátky pomocí ředidla protilátky Ventana. Ředidlo samotné lze použít jako alternativu k dříve popsaným negativním kontrolám reagentů. Inkubační doba pro negativní kontrolu reagentů by měla být rovna inkubační době primární protilátky.

Když se použijí panely několika protilátek na sériových sekcích, negativní kontrola reagentů na jednom sklíčku může fungovat jako negativní nebo nespecifická kontrola pozadí vazby pro jiné protilátky.

Ověření kvantitativní analýzy

Před prvním použitím protilátky nebo systému barvení v diagnostickém postupu je zapotřebí ověřit specifitu protilátky tím, že ji otestujete na řadě vzorků tkáni se známými

charakteristikami imunohistochemického chování, které reprezentuje známé pozitivní a negativní tkáň (viz Postupy kontroly kvality uvedené shora v této části příbalové informace, Doporučení kontroly kvality College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist [Akreditační program laboratoře Koleje amerických patologů, Dotazník anatomické patologie]¹⁵ a Směrnice schválené NCCLS¹⁶). Tyto postupy kontroly kvality je zapotřebí opakovat pro každou novou šarži protilátek nebo pokaždé, kdy dojde ke změně v parametrech kvantitativní analýzy. Tkáň uvedené na seznamu v části Shrnutí očekávaných výsledků jsou vhodné pro ověření kvantitativní analýzy.

Interpretace výsledků

Automatizovaný postup imunobarvení Ventana způsobuje, že se v místech antigenu lokalizovaných primárním antigenem vysráží barevný reakční produkt. Další podrobnosti o očekávaných barevných reakcích naleznete v příslušné příbalové informaci detekční sady. Pozitivní a negativní kontroly musí před interpretací výsledků vyhodnotit kvalifikovaný patolog, který má zkušenosti s imunohistochemickými postupy.

Pozitivní tkáňová kontrola

Obarvená pozitivní tkáňová kontrola by měla být prozkoumána jako první, aby se ověřilo, zda-li všechny reagencie řádně fungují. Přítomnost vhodného produktu barevné reakce v cílových buňkách je indikátorem pozitivní reaktivity. Další podrobnosti o očekávaných barevných reakcích naleznete v příbalové informaci detekční sady. V závislosti na délce inkubace a síle použitého hematoxylinu způsobí kontrastní zbarvení bleďe až tmavě modré zbarvení buněčných jader. Nadměrné nebo neúplné kontrastní zbarvení může narušit správnou interpretaci výsledků.

Jestliže pozitivní tkáňové kontroly neprokáží pozitivní zbarvení, všechny výsledky se zkušebními vzorky je nutno považovat za neplatné.

Negativní tkáňová kontrola

Negativní tkáňová kontrola by se měla prověřit po pozitivní tkáňové kontrole, aby se ověřilo specifické označení cílového antigenu primární protilátkou. Nepřítomnost specifického zbarvení u negativní tkáňové kontroly potvrzuje nedostatek zkřížené reaktivity protilátky s buňkami nebo buněčnými komponentami. Jestliže dojde ke specifickému zbarvení u negativní tkáňové kontrole, výsledky se zkušebními vzorky je nutno považovat za neplatné.

Bude-li přítomno nespecifické zbarvení, bude mít difúzní vzhled. Může se pozorovat v řezech i sporadické lehké zbarvení pojivové tkáně od tkání nadměrně fixovaných formaldehydem. K interpretaci výsledků barvení je zapotřebí používat nedotčené buňky. Nekrotické či degenerované buňky se často barví nespecificky.

Tkáň pacienta

Vzorky pacienta by se měly vyšetřovat poslední. Intenzita pozitivní zbarvení by se měla vyhodnocovat v kontextu jakéhokoliv zbarvení pozadí negativní kontroly reagentů. Negativní test, stejně jako jakýkoliv imunohistochemický test, znamená, že dotčený antigen nebyl detekován, a nikoliv že antigen v hodnocených buňkách či tkáních není přítomen. Bude-li to nezbytné, použijte panel protilátek jako pomůcku pro identifikaci falešně negativních reakcí (viz část Souhrn očekávaných výsledků). Při interpretaci jakéhokoliv imunohistochemického výsledku by se také měla prověřit morfolgie každého tkáňového vzorku pomocí hematoxylinu a řezu obarveného eozinem. Morfologické nálezy pacienta a příslušné klinické údaje musí interpretovat kvalifikovaný patolog.

OMEZENÍ

VŠEOBECNÁ OMEZENÍ

1. Imunohistochemie je diagnostický proces o více krocích, který vyžaduje specializované školení ve výběru vhodných reagentů, přípravě vzorků, volbě tkáni, fixaci, zpracování, přípravě sklíčka na imunohistochemii a interpretaci výsledků barvení.
2. Barvení tkáně závisí na manipulaci s tkání a jejím zpracování před barvením. Nesprávná fixace, zmrazení, roztátní, omývání, sušení, ohřívání, dělení na části nebo kontaminace s ostatními tkáněmi nebo tekutinami může vytvářet artefakty, zachycení protilátek nebo falešně negativní výsledky. Nekonzistentní výsledky mohou být výsledkem odchylek v metodách fixace a zabudování nebo inherentních nepravidlostí v rámci tkáně.
3. Nadměrné nebo neúplné kontrastní zbarvení může narušit správnou interpretaci výsledků.
4. Klinická interpretace jakéhokoliv pozitivního zbarvení nebo jeho nepřítomnosti se musí vyhodnotit v kontextu klinické historie, morfolgie a dalších histopatologických kritérií. Klinickou interpretaci jakéhokoliv zbarvení nebo jeho nepřítomnosti musí doplňovat morfologické studie a hodnocení vhodných kontrol společně dalšími diagnostickými testy. Tato protilátka je určena k použití v panelu protilátek.

Kvalifikovaný patolog odpovídá za to, že se seznámí s protilátkami a metodami použitými k vytvoření obarveného přípravku. Barvení musí provádět certifikovaná laboratoř s licencí pod dohledem patologa, který odpovídá za kontrolu obarvených sklíček a zajištění adekvátnosti pozitivních a negativních kontrol.

- Ventana dodává protilátku a reagentie pro optimální ředění pro použití za předpokladu, že jsou dodrženy příložené pokyny. Jakákoliv odchylka od doporučených zkušebních postupů může zneplatnit očekávané výsledky. Musí se používat a dokumentovat vhodné kontroly. Uživatelé, kteří se odchýlí od doporučených zkušebních postupů, musí přijmout odpovědnost za interpretaci výsledků pacientů.
- Tento přípravek není určen k použití v průtokové cytometrii, jeho charakteristiky chování nebyly stanoveny.
- Reagentie mohou vykazat neočekávané reakce v dřívě nezkoušených tkáních. Možnost neočekávaných reakcí i v testovaných tkáňových skupinách nelze zcela vyloučit kvůli biologické proměnlivosti exprese antigenu v neoplazmatech nebo jiných patologických tkáních. ¹⁷ S dokumentovanými neočekávanými reakcemi se obraťte na své místní zastoupení Ventana.
- Tkáně od osob infikovaných virem hepatitidy B a obsahující povrchový antigen hepatitidy B (HBsAg) mohou vykazovat nespecifické zbarvení křenovou peroxidázou. ¹⁸
- Při použití blokačních kroků mohou normální séra ze stejného zvířecího zdroje jako sekundární antiséra způsobovat falešně negativní nebo falešně pozitivní výsledky kvůli autoprotilátkám nebo přírodním protilátkám.
- Falešně pozitivní výsledky lze pozorovat kvůli neimunologické vazbě proteinů nebo produktů substrátové reakce. Mohou být rovněž způsobeny aktivitou pseudoperoxidázy (erythrocyty), endogenní aktivitou peroxidázy (cytochrom C) nebo endogenním biotinem (příklad: játra, mozek, prsa, ledviny) závisící na typu použitého imunobarviva. ¹⁹
- Negativní test, stejně jako jakýkoliv imunohistochemický test, znamená, že antigen nebyl detekován, a nikoliv že antigen v hodnocených buňkách či tkáních nebyl přítomen.

Specifická omezení

- Protilátka byla optimalizována pro 16minutovou inkubační dobu v kombinaci s detekční sadou Ventana a automaty na barvení sklíček Ventana. Kvůli odchylce v tkáňové fixaci a zpracování může být nezbytné zvýšit nebo snížit primární inkubační dobu protilátky u individuálních vzorků. Další informace o proměnlivých parametrech fixace viz „Zásady a výhody imunohistochemie“. ²⁰
- Protilátka v kombinaci s detekčními sadami a příslušenstvím Ventana detekuje antigen, který přežije rutinní fixaci formaldehydem, zpracování tkáně a jejím rozdělení na řezy. Uživatelé, kteří se odchýlí od doporučených zkušebních postupů, musí přijmout odpovědnost za interpretaci a validaci výsledků pacientů.

SOUHRN OČEKÁVANÝCH VÝSLEDKŮ

- Specifická Anti-Pan Keratin (AE1/AE3/PCK26) byla stanovena na základě studie, která prokázala vhodné obarvení různorodé skupiny tkání fixovaných formaldehydem a zalitých parafínem pomocí Anti-Pan Keratin (AE1/AE3/PCK26) a Ventana's DAB detection kits. Výsledky barvení normální lidské tkáně jsou následující: pro prsa (glandulární a duktální epitel), tenké střevo (epitel), mícha (glíální buňky), štítná žláza (epitelové buňky), jícen (stratifikovaný skvamózní a glandulární epitel), ledviny (kanálky), pankreas (kanály), kůže (stratifikovaný skvamózní a glandulární epitel), hlasivky (skvamózní epitel) a játra (žlučové kanálky), 3 ze 3 případů mělo pozitivní obarvení a u svalů bylo 0 ze 3 případů obarveno pozitivně.
- Citlivost je závislá na uchování antigenu. Jakákoliv nesprávná manipulace s tkání během fixace, přípravy řezy, zabudování nebo ukládání, které mění antigenicitu, oslabuje detekci pomocí Anti-Pan Keratin (AE1/AE3/PCK26) a může vytvářet falešně negativní výsledky.
- Reprodukovatelnost barvení v rámci procesu byla stanovena barvením pěti sklíček obsahujících tutéž tkáň. Pět z pěti sklíček bylo pozitivně zbarveno. Všechna sklíčka byla obarvena stejnou intenzitou barvení. Uživatelé by měli ověřit reprodukovatelnost výsledků obarvením několika sad sériových řezů s nízkou, střední a vysokou hustotou antigenu v jediném běhu.
- Reprodukovatelnost barvení v rámci běhu byla stanovena barvením sklíček obsahujících tutéž tkáň na pěti různých běžích přístroje. Pět z pěti sklíček bylo pozitivně zbarveno. Všechna sklíčka byla obarvena podobnou intenzitou barvení. Uživatelé by měli ověřit reprodukovatelnost výsledků mezi běhy obarvením několika sad sériových řezů s nízkou, střední a vysokou hustotou antigenu v různých dnech.

ODSTRAŇOVÁNÍ ZÁVAD

- Jestliže pozitivní kontrola vykazuje slabší než očekávané zbarvení, je zapotřebí zkontrolovat další proběhlé pozitivní kontroly obarvené v témže běhu přístroje, aby se určilo, zdali je selhání způsobeno primární protilátkou nebo jednou ze společných sekundárních reagentií.
- Jestliže je pozitivní kontrola negativní, je jí nutno zkontrolovat a zajistit, aby sklíčko mělo štítek se správným čárovým kódem. Jestliže je sklíčko řádně označeno, je zapotřebí zkontrolovat další proběhlé pozitivní kontroly obarvené v témže běhu přístroje, aby se určilo, zdali je selhání způsobeno primární protilátkou nebo jednou ze společných sekundárních reagentií. Tkáně mohou být nesprávně odebrány, fixovány nebo deparafinizovány. Při odběru, uchování a fixaci je nutné dodržovat správný postup.
- Jestliže dochází k nadměrnému barvení pozadí, mohou být přítomny vysoké úrovně endogenního biotinu. Je nutné do procesu začlenit krok blokující biotín.
- Pokud nebyl odstraněn všechen parafín, musí se deparafinizační postup opakovat.
- Jestliže je obarvení specifickou protilátkou příliš intenzivní, běh by se měl zopakovat s inkubační dobou zkrácenou ve 4minutových intervalech, dokud není dosaženo požadované intenzity intenzity skvrm.
- Jestliže se řezy tkáně smyjí ze sklíčka, sklíčka by se měla zkontrolovat, aby se zajistilo, že mají pozitivní náboj.
- Při nápravných krocích postupujte podle bodu Postupný proces v návodu k obsluze automatu na barvení sklíček nebo se obraťte na svoji místní kancelář Ventana.

SEZNAM LITERATURY

- Woodcock-Mitchell J, Eichner R, Nelson WG, Sun TT. Immunolocalization of keratin polypeptides in human epidermis using monoclonal antibodies. *J. Cell. Biol* 95(2 pt 1): 580-588, 1982.
- Spagnolo DV, Michie SA, Crabtree GS, Warnke RA, Rouse RV. Monoclonal Anti-Keratin (AE1) reactivity in routinely processed tissue from 166 human neoplasms. *Am J Clin Pathol* 84(6):697-704, 1985.
- Lane EB, Rugg EL, Navsaria H, Leigh IM, Heagerty AHM, Ishida-Yamamoto A, Eady RA. A mutation in the conserved helix termination peptide of keratin 5 in hereditary skin blistering. *Nature* 356(6366): 244-246, 1992.
- Sun TT, Tseng SC, Huang AJ, Cooper D, Schermer A, Lynch MH, Weiss R, Eichner R., Monoclonal antibody studies of mammalian epithelial keratins: a review. *Annals New York Academy of Sciences* 455: 307-329, 1985.
- Eichner R, Bonitz P, Sun TT. Classification of epidermal keratins according to their immunoreactivity, isoelectric point and mode of expression. *Cell Biol* 98(4): 1388-1396, 1984.
- Taylor RT, Cote RJ. *Immunomicroscopy: A Diagnostic Tool For The Surgical Pathologist*, 2nd Edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1994.
- Angus B, Kiberu S, Purvis J, Wilkinson L, and Horne CH. Cytokeratins in cervical dysplasia and neoplasia: A comparative study of immunohistochemical staining using monoclonal antibodies NCL 5D3, CAM 5.2, and PCKK1. *J. Pathol* 155(1): 71-75, 1988.
- Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31(1): 11-24, 1982.
- Steinert PM, Steven AC, Roop DR. The molecular biology of intermediate filaments. *Cell* 42(2): 411-420, 1985.
- Kamel OW, Rouse RV, Warnke RA. Heterogeneity of epithelial marker expression in routinely processed, poorly differentiated carcinomas. *Arch Pathol Lab Med* 115(6): 566-570, 1991.
- Leader M, Patel J, Makin C, and Henry K. An analysis of the sensitivity and specificity of the cytokeratin marker CAM 5.2 for epithelial tumors. Results of a study of 203 sarcomas, 50 carcinomas, and 28 malignant melanomas. *Histopathol* 10(12): 1315-1324, 1986.
- Robbins SL, Cotran RS, and Kumar V. *Pathologic basis of disease*. W.B. Saunders Company. New York, 1984. p. 200.
- Lane EB, Alexander CM. Use of keratin antibodies in tumor diagnosis. *Seminars in Cancer Biology* 1(3): 165-179, 1990.
- 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.

16. 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.
17. Herman GE, Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech Histochem 66(4): 194-199, 1991.
18. 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.
19. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase: part 1. The technique and its pitfalls. Lab Med 14: 767, 1983.
20. Roche PC, Hsi ED. Immunohistochemistry-Principles and Advances. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. (NR Rose Ed.) ASM Press, 2002.

DUŠEVNÍ VLASTNICTVÍ

EZ Prep™, VIEWS™ a Liquid Coverslip™ jsou ochrannými známkami společnosti Ventana Medical Systems, Inc.; BenchMark®, ES®, Gen II®, NexES IHC® a Ventana® jsou ochrannými známkami společnosti Ventana Medical Systems, Inc.

Pokryto následujícími patenty: Patenty USA č. 6045 759, 6192 945 B1, 6416 713 B1 a jejich zahraničními protějšky.

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



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany