

CONFIRM™ anti-Kappa Rabbit Polyclonal Primary Antibody

Katalogové číslo 760-2514

POUŽITÍ

Tato protilátka je určena k diagnostice in vitro (IVD).

Ventana Medical Systems (Ventana) CONFIRM anti-Kappa Rabbit Polyclonal Primary Antibody je nasměrována proti lehkým řetězcům kapa imunoglobulinu. Barvení lehkých řetězců kapa je možné použít jako pomůcku při identifikaci buněk normálních a abnormálních B buněčných linií. Protilátka je určena ke kvalitativnímu barvení B buněk a buněk plazmy exprimujících lehké řetězce kapa imunoglobulinu v tkáňových řezech fixovaných ve formalínu, zalitých v parafínu na barvicích automatech Ventana. CONFIRM anti-Kappa Rabbit Polyclonal specificky váže antigeny umístěné na buněčné membráně a cytoplazmatické oblasti normálních B buněk a buněk plazmy.

Klinická interpretace jakéhokoliv zabarvení nebo jeho nepřítomnosti musí být doplněna morfologickými studii a hodnocením řádných kontrol. Hodnocení musí v kontextu klinické anamnézy pacienta a jiných diagnostických testů provádět kvalifikovaný patolog. Pouze na lékařský předpis.

SOUHRN A VYSVĚTLENÍ

Lehké řetězce kapa jsou polypeptidové řetězce, které v kombinaci s těžkými řetězci, tvoří imunoglobulinové molekuly. V imunoglobulinech se nacházejí dvě třídy lehkých řetězců, kapa a lambda. Produkce lehkých řetězců lymfoidními buňkami je geneticky omezena, takže imunoglobulinové molekuly produkované jednotlivou buňkou obsahují pouze jednu třídu lehkých řetězců. Klonální restrikce je možné využít k označení polyklonální nebo monoklonální povahy populací B buněk a buněk plazmy.^{1,2,3}

Jelikož klonalita je z klinického hlediska důležitá vlastnost, která pomáhá při klasifikaci lymfomů (nádory lymfoidního původu¹) do podtříd, má identifikace třídy lehkých řetězců stále větší důležitost v imunopatologii. Přehled použití barvení anti-kapa lehkých řetězců při klasifikaci nádorů byl představen Taylor, CR (1978).⁴

CONFIRM anti-Kappa obsahuje králičí polyklonální protilátku nasměrovanou na lidský kapa Fab fragment, specifická byla dosažena absorpcí pevné fáze.

PRINCIPY METODY

CONFIRM anti-Kappa Rabbit Polyclonal lze použít jako primární protilátku pro imunohistochemické barvení parafinových tkáňových řezů. Obecně lze říci, že imunohistochemické barvení umožňuje vizualizaci antigenů pomocí sekvencí aplikace specifické protilátky (primární protilátky), která se váže na antigen, sekundární protilátka (vazební protilátka), která se váže na primární protilátku, komplexu enzymů a chromogenního substrátu a je proložena promyvacími kroky. Enzymatická aktivace chromogenu způsobuje vznik viditelného produktu reakce v místě antigenu. Vzorek pak lze obarvit kontrastním barvivem a zakrýt krycím sklíčkem. Výsledky se interpretují pomocí světelného mikroskopu a pomáhají k usnadnění diferenční diagnózy patofyziologických procesů, které mohou, ale nemusí být spojeny s určitým antigenem.

CONFIRM anti-Kappa Rabbit Polyclonal je optimálně naředěna pro použití s detekčními soupravami MIEW DAB nebo *ultraView* Universal DAB na barvicích automatech Ventana. CONFIRM anti-Kappa Rabbit Polyclonal je kompatibilní s detekčními soupravami Enhanced Alkaline Phosphatase Red, AEC a *ultraView* Universal Red. 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 vodních číidel ze vzorků na podložních sklech bylo co nejmenší, aplikuje barvicí automat na sklíčka krycí roztok. Barvení je ukončeno po inkubaci substrát-chromogemem a volitelně barvením kontrastním barvivem. Více informací o operacích přístroje naleznete v příslušném Návodu k použití barvicího automatu Ventana I.

MATERIÁLY

Dodávaná činidla

CONFIRM anti-Kappa Rabbit Polyclonal obsahuje dostatek činidla pro 50 testů.

1 – 5 mL dávkovač CONFIRM anti-Kappa Rabbit Polyclonal obsahuje asi 33,5 µg králičí polyklonální protilátky nasměrované proti epitopu přítomnému na lidských lehkých řetězcích kapa, které se nacházejí v tkáních.

Protilátka je naředěna v 0,05 M Tris-HCl s 2 % proteinovým nosičem a 0,10 % ProClin 300,

konzervační látky obsahující aktivní látky 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one a 2-methyl-4-isothiazolin-3-one.

Celková proteinová koncentrace činidla je asi 16,25 µg/mL. Koncentrace specifické protilátky je asi 6,7 µg/mL. 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 detekčními soupravami MIEW DAB nebo *ultraView* Universal DAB. Není vyžadována rekonstituce, smísení, ředění nebo titrace.

Další ředění může způsobit ztrátu zabarvení 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 Postupy kontroly kvality).

Skladování a manipulace

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

Aby byl zajištěn správný výkon činidla a 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 CONFIRMTM Negative Control Rabbit Ig nebo Rabbit Negative Control
2. Mikroskopická sklíčka, 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 nebo BenchMark® Series
14. Detekční soupravy Ventana *ultraView*™ Universal DAB, *ultraView*™ Universal Red, *VIEW*™ DAB, AEC, Enhanced Alkaline Phosphatase Red
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 Protease 1
23. Ventana Protease 2*
24. Ventana Protease 3*
25. Kontrastní barvivo Ventana Hematoxylin* nebo Hematoxylin II
26. Ventana Bluing Reagent
27. Montovací médium
28. Krycí sklo
29. Světelný mikroskop (20-80x)

* Volitelné

UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ PŘEDPISY

1. K diagnostice in vitro.

- 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).
- Zabraňte kontaktu činidel s očima a sliznicí. Jestliže se činidla dostanou do kontaktu s citlivými oblastmi, omyjte je vydatným množstvím vody.
- 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.
- Zabraňte mikrobiologickému znečištění činidel, neboť toto by způsobilo nesprávné výsledky.
- Doporučené metody likvidace jsou uvedeny v celostátních a místních předpisech.
- Konzervačním prostředkem v činidle je ProClin 300. Příznaky nadměrné expozice ProClin 300 zahrnují podráždění kůže a očí a podráždění sliznic a horních dýchacích cest. Koncentrace ProClin 300 ve výrobku je 0,1% 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, která nejsou součástí dodávky). Doporučený fixační prostředek pro tkáně je 10 % neutrální pufrováný formalin.⁵ 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 skličko. Sklička obsahující řezy tkání 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 tkání barvit okamžitě.

NÁVOD K POUŽITÍ

Jednotlivé kroky postupu

Postup ruční deparafinace

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

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

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

Sklička barvená na sériových barvicích automatech BenchMark Series mohou být deparafinována v přístroji. Zvolíte-li tuto možnost, opatříte sklička čárovým kódem a umístíte je do přístroje. Jestliže tuto vlastnost nezvolíte, 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 protokoly 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 skliček jsou předem nastaveny výrobcem.

Tabulka 1. Doporučené barvicí protokoly pro CONFIRM anti-Kappa Rabbit Polyclonal Primary Antibody pomocí detekčních souprav MIEW DAB a ultraView Universal DAB

Typ postupu	Platforma nebo metoda	
	NexES IHC	BenchMark Series
Odstraňování parafínu	V systému offline	Zvoleno
Úprava buněk (odmaskování antigenu)	Není vyžadováno	Není vyžadováno
Enzym (proteáza)*	Protease 1, 4 minuty	Protease 1, 4 minuty
Protílátka (primární)*	Asi 32 minut, 37 °C	Asi 16 minut, 37 °C
A/B Blok (Blokování biotinu)	Volitelné	Volitelné
Zesílit (amplifikace)	Volitelné	Volitelné
Kontrastní barvivo (hematoxylin)	Hematoxylin II, 2 až 4 minuty	Hematoxylin II, 2 až 4 minuty
Po kontrastním barvení	Bluing, 2 až 4 minuty	Bluing, 2 až 4 minuty

*Doby inkubace protilátky a proteázy a typy proteázy je možné podle potřeb optimálního barvení měnit.

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

Odmaskování antigenu není vyžadováno:

- Sklička opatřit štítkem s čárovým kódem. Parafín se ze skliček odstraňuje pomocí sérii xylenů a odstupňovaných alkoholů až po vodu a potom v lázni APK Wash (1X).
- 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.
- Vymout sklička zbarvená parafínem, opatřená štítky z roztoku APK Wash (1X). Zamezit vysychání tkání.

Sériové barvicí automaty BenchMark Series

- Opatřit sklička štítkem s čárovým kódem odpovídajícím protokolu protilátky, která má být zpracována.
- 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.
- Vložit sklička do barvicího automatu.

Pro všechny přístroje

- Spustit barvicí cyklus.
- Po dokončení cyklu vymout sklička z barvicího automatu.
- Používáte-li detekční soupravy 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.
- Použije-li se AEC chromogen, nedehydratovat a neprojasňovat. Pro AEC použít vodné montovací médium. Obarvená sklička 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. Příkladem pozitivní kontroly pro protilátku CONFIRM anti-Kappa Rabbit Polyclonal je tonzila, lymfatická uzlina a slezina. Komponenty tkání pro pozitivní kontrolu (B buňky a buňky plazmy) 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 řezy. 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 nižší úrovně degradace činidla.

Známe 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 pacienta jsou neplatné. Objeví-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. Sklička je třeba barvit přiměřeně kontrolním Negative Control Mouse Ig, CONFIRM Negative Control Rabbit Ig nebo Rabbit Negative Control. Je-li pro negativní kontrolu použito jiné činidlo, naředte ho ve stejném poměru jako primární protilátku 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 řezy, 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 specifita protilátky testováním na řadě dostupných tkáních se známou imunohistochemickou charakteristikou 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,⁶ a schválenou směrnici CLSI Approved Guideline⁷ 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 bleďomodré 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 specifitu 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 formalinem. 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 činidel 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 školení 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.
4. 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. Protilátka je určena k použití v panelu protilátek. Za interpretaci barveného preparátu zodpovídá kvalifikovaný patolog, který zná použité protilátky, činidla a použité metody. Barvení se musí provádět v certifikované laboratoři s příslušným oprávněním a pod dohledem patologa zodpovědného za hodnocení barvených podložních skl a zaručení adekvátnosti pozitivních a negativních kontrol.
5. Ventana dodává protilátky a činidla pro použití optimálně naředěné, 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.
6. Tento výrobek není určen k použití v průtokové cytometrii, neboť charakteristiky účinnosti nebyly stanoveny.
7. Činidla mohou vykazovat neočekávané reakce v dříve netestovaných tkáních. V důsledku biologické variability exprese antigenu v neoplazmě nebo jiných patologických tkáních nelze zcela vyloučit možnost neočekávaných reakcí i v testovaných skupinách tkání.⁸ Se zdokumentovanými neočekávanými reakcemi se obraťte na místní zastoupení společnosti Ventana.
8. Tkáně osob infikovaných virem hepatitidy B, které obsahují povrchový antigen (HBsAg) hepatitidy B, mohou s křenovou peroxidázou vykazovat nespecifické zbarvení.⁹
9. 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.
10. Falešně negativní výsledky se mohou vyskytovat v důsledku neimunologické vazby proteinů nebo produktů reakce se substrátem. Mohou být také způsobeny aktivitou pseudoperoxidázy (erytrocyty) a endogenní aktivitou peroxidázy (cytochrom C), alkalickou fosfatázou nebo endogenním biotinem (příklad: játra, mozek, prs, ledvina) v závislosti na typu imunologického barvení.¹⁰
11. Jako u každého imunohistochemického testu, negativní výsledek znamená, že antigen nebyl detekován, nikoli, že antigen není v testovaných buňkách nebo tkáni přítomen.
12. Vzhledem k převaze Ig rozpoznávanému tímto polyklonálním činidlem, je třeba očekávat intersticiální a sérové zbarvení tkáně.

Specifická omezení

1. Protílátka byla optimalizována pro inkubační dobu v délce 16 až 32 minut 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 protílátky na jednotlivých vzorcích. Další informace o různých fixacích naleznete v příručce „Immunohistochemistry Principles and Advances“ (Principy a postupy imunohistochemie).⁷
2. 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 nedodrželi doporučené postupy, musejí za těchto okolností přjmout zodpovědnost za interpretaci výsledků pacienta.
3. Při použití fixativa Prefer může dojít k zhoršení morfologie.

CHARAKTERISTIKY ÚČINNOSTI

1. Testování, jehož výsledky jsou uváděné v této části, bylo prováděno za použití doporučeného protokolu pro detekční soupravu MIEW DAB Detection Kit.
2. Specifická CONFIRM anti-Kappa Rabbit Polyclonal byla stanovena testováním následujících typů tkání: vždy 3 vzorky, mozek, malý mozek, žláza nadledviny, vaječník, slinivka břišní, příštítná žláza, hypofýza, varlata, štítná žláza, prs, slezina, žláza brzlíku, plíce, srdce, jícen, žaludek, tenké střevo, tračník, játra, slinná žláza, ledvina a prostata. Dále bylo barveno 11 vzorků kostní dřeně, 18 lymfatických uzlin a 9 vzorků mandlí. Barvení protílátkou CONFIRM anti-Kappa Rabbit Polyclonal mělo za následek vznik intersticiálního a sérového zbarvení a zbarvení následujících specifických buněčných komponent: imunoglobulin (B buňky), dendritické retikulum, imunoblasty a buňky plazmy.
3. Senzitivita je závislá na konzervaci antigenu. Jakákoli nesprávná manipulace s tkání během fixace, řezání, zalévání nebo uchovávání, která mění antigenost, zeslabuje detekci kapa při použití CONFIRM anti-Kappa Rabbit Polyclonal a může mít za následek falešně negativní výsledky. CONFIRM anti-Kappa Rabbit Polyclonal zbarvila 2 ze 4 tkání lymfomu.
4. Reprodukovatelnost barvení uvnitř cyklu (intra run) byla stanovena na základě barvení 3 sklíček obsahujících stejnou tkáň na 1 přístroji. Cílem testování na reprodukovatelnost v rámci cyklu je ujistit se, že všechna sklíčka zbarvená 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.
5. Reprodukovatelnost mezi cykly (inter run) byla stanovena na základě barvení 27 sklíček obsahujících stejnou tkáň po dobu 3 dnů (jedno sklíčko na 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 opakovan na 1 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.
6. Reprodukovatelnost mezi platformami byla stanovena barvením 9 sklíček obsahujících stejnou tkáň na 1 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 napříč všemi platformami Ventana vykazovala srovnatelné zbarvení.
7. Reprodukovatelnost mezi šaržemi byla stanovena barvením 3 sklíček obsahujících 1 tkáňový vzorek, který obsahoval 5 specifických buněčných komponent se 3 různými šaržemi protílátky CONFIRM anti-Kappa Rabbit Polyclonal. Cílem reprodukovatelnosti mezi šaržemi je ujistit se, že každá šarže vykazuje podobnou citlivost a specifitu, pokud je aplikovaná na stejné tkáňové vzorky. Všechny 3 šarže vykazovaly podobnou účinnost, když byly testovány na 1 tkání, která obsahovala 5 specifických buněčných komponent: T buňky, imunoglobulin (B buňky), dendritické retikulum, imunoblasty a buňky plazmy.

ŘEŠENÍ PROBLÉMU

1. 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.

2. 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 zbarvení pozadí, pravděpodobně jsou přítomny vysoké úrovně endogenního biotinu, při použití detekčních souprav na bázi biotinu. Je třeba zahrnout krok blokování biotinu.
4. Jestliže se nepodařilo odstranit všechn parafín, je třeba opakovat postup odstranění parafínu z tkání.
5. Je-li zbarvení specifickou protílátkou 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 nabitá.
7. Při nápravě odkazujeme na oddíl Jednotlivé kroky postupu a Návod k obsluze barvicího automatu nebo se obraťte na místní zastoupení společnosti Ventana.

REFERENCE

1. Landaas TO, Godal T, Marton PF, Kvaloy S, Langholm R, Lindmo T, Jorgensen OG, Host H. Cell-associated immunoglobulin in human non-Hodgkin lymphomas. A comparative study of surface immunoglobulin on cells in suspension and cytoplasmic immunoglobulin by immunohistochemistry. *Acta Path Microbiol Scand* 89(2): 91-101, 1981.
2. Pangalis GA, Nathwani BN, Rappaport H. Detection of cytoplasmic immunoglobulin in well-differentiated lymphoproliferative diseases by the immunoperoxidase method. *Cancer* 45(6): 1334-1339, 1980.
3. Woda BA, Knowles DM. Nodular lymphocytic lymphoma eventuating into diffuse histiocytic lymphoma – Immunoperoxidase demonstration of monoclonality. *Cancer* 43(1): 303-307, 1979.
4. Taylor CR. Immunocytochemical methods in the study of lymphoma and related conditions. *J Histochem Cytochem* 26(7): 496-512, 1978.
5. Sheehan DC, Hrapchak BB. Theory and practice of histotechnology, 2nd Edition. The C.V. Mosby Company, St. Louis, 1980.
6. College of American Pathologists Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2001.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. 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.
8. Herman GE, Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. *Biotech Histochem* 66(4): 194-199, 1991.
9. 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.
10. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase: part 1. The technique and its pitfalls. *Lab Med* 14: 767, 1983.
11. Roche PC, Hsi ED. Immunohistochemistry-Principles and Advances. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. (NR Rose Ed.) ASM Press, 2002.

Důležité 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



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany