

CONFIRM™ anti-CD20 (L26) Primary Antibody

Katalogové číslo 760-2531

POUŽITÍ

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

Ventana Medical Systems' (Ventana) CONFIRM anti-CD20 (L26) Primary Antibody je myší monoklonální protilátka (IgG2a) nasměrovaná proti epitopu, který je přítomný na lidských B lymfocytech. Protilátka je určena ke kvalitativní identifikaci buněčných B lymfocytických linií¹ pomocí světelné mikroskopie v řezech fixovaných ve formalínu, zalitých v parafínu na barvicích automatech Ventana.

Klinická interpretace jakéhokoliv zbarvení 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.

SOUHRN A VYSVĚTLENÍ

CONFIRM anti-CD20 (L26) se specificky váže na antigeny umístěné na membráně plazmy a cytoplazmatické oblasti normálních B lymfocytů a může být rovněž exprimována Reed-Sternbergovými buňkami.² Tento fosfoprotein lze nalézt na povrchu normálních a maligních B buněk a působí jako receptor během aktivace a diferenciaci B buněk. Plazmatické buňky jsou na CD20 negativní. CONFIRM anti-CD20 (L26) lze použít k detekci B buněk

z periferní krve, lymfatické uzliny, sleziny, tonzily a kostní dřeně. Používá se také při klasifikaci většiny B buněčných malignit, včetně mnoha akutních leukémií a chronických lymfocytických leukémií.

PRINCIPY METODY

CONFIRM anti-CD20 (L26) lze použít jako primární protilátku pro imunohistochemické barvení parafinových tkáňových řezů. Obecně lze říci, že imunohistochemické barvení umožňuje vizualizaci antigenů pomocí sekvencí aplikací 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. Enzymatické 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 diferencíální diagnózy patofyziologických procesů, které mohou, ale nemusí být spojeny s určitým antigenem.

CONFIRM anti-CD20 (L26) je optimálně naředěna pro použití s detekční soupravou MIEW™ DAB, výrobce Ventana a barvicími automaty. CONFIRM anti-CD20 (L26) je kompatibilní s detekčními soupravami *ultraView™* Universal DAB, AEC a Enhanced Alkaline Phosphatase 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 nevazebného materiálu, který by mohl bránit požadované reakci v následujících krocích. Aby odpařování vodných reagentů ze vzorků na podložních sklech bylo co nejmenší, aplikuje barvicí automat na sklíčka 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

Dodávané reagenty

CONFIRM anti-CD20 (L26) obsahuje dostatek reagenty pro 50 testů.

1 – 5 mL dávkovač CONFIRM anti-CD20 (L26) obsahuje přibližně 1,5 µg (0,3 µg/mL) myší monoklonální protilátky nasměrované proti epitopu přítomnému zejména na lidských B lymfocytech v tkáni. Protilátka je naředěna v pufru s obsahem proteinového nosiče a konzervační látky.

Rekonstituce, smísení, ředění, titrace

Protilátka je optimalizována pro použití v barvicím automatu Ventana ve spojení s detekční soupravou MIEW DAB. Nemí 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 Postupy kontroly kvality).

Skladování a manipulace

Skladujte při 2– 8°C. Nezmrazujte. Pokud se reagenty 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 reagens stabilní do data uvedeného na štítku. Nepoužívejte reagenty 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 reagenty.

Potřebné materiály a reagenty, které se nedodávají

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

1. Ventana Negative Control Mouse Ig
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, BenchMark®
14. Detekční soupravy Ventana *ultraView™* Universal DAB nebo MIEW™ DAB nebo AEC nebo 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) (Sériové barvicí automaty BenchMark)
20. Ventana Reaction Buffer (10X) (Sériové barvicí automaty BenchMark)
21. Ventana Liquid Coverslip (High Temperature) (Sériové barvicí automaty BenchMark)
22. Kontrastní barvivo Ventana Hematoxylin nebo Hematoxylin II
23. Ventana Bluing Reagent
24. Montovací médium
25. Krycí sklo
26. Světelný mikroskop (20-80x)

* Volitelné

UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ PŘEDPISY

1. K diagnostice *in vitro*.
2. Při manipulaci s reagenty dodržte 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 reagentů s očima a sliznicí. Jestliže se reagenty 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 reagentů, neboť toto by způsobilo nesprávné výsledky.
6. Doporučené metody likvidace jsou uvedeny v celostátních a místních předpisech.
7. Konzervační látka v reagentech 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 0,05 % 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 reagentie, které nejsou součástí dodávky). Doporučený fixační prostředek pro tkáň je 10 % neutrální pufovaný formalin.³ 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. Skličko 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 použití ke konkrétnímu barvicímu automatu.

1. Ponořit sklička postupně do 3 xylenových lázni vždy na 5 ± 1 minut.
2. Přenést sklička do 100 % etanolu a ponořit je postupně do 2 lázni vždy na 3 ± 1 minuty.
3. Přenést sklička do 95 % etanolu a ponořit je do lázně s tímto roztokem na 3 ± 1 minut.
4. Přenést sklička do 80 % etanolu a ponořit je do lázně s tímto roztokem na 3 ± 1 minut.
5. Přenést sklička do lázně s deionizovanou nebo destilovanou vodou a ponořit je minimálně 10krát.
6. Přenést sklička podle postupu do roztoku APK Wash (1X) nebo do pufového roztoku. V případě použití roztoku APK Wash, musí sklička zůstat v roztoku až do provedení barvicího cyklu. V případě použití pufového 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 možnost nezvolíte, pokračujte podle Postupu ruční deparafinace výše.

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 skliček jsou předem nastaveny výrobcem.

Tabulka 1. Doporučené barvicí protokoly pro CONFIRM anti-CD20 (L26)

Typ postupu	Platforma nebo metoda	
	NexES IHC	BenchMark Series
Odstraňování parafínu	V systému offline	Zvolený
Úprava buněk (odmaskování antigenu)	Není vyžadováno	Není vyžadováno
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	Modření, 2 až 4 minuty	Modření, 2 až 4 minuty

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

Odmaskování antigenu není vyžadováno:

1. Sklička opatřit štítkem s čárovým kódem. Parafín se ze skliček odstraňuje pomocí sérií xylynu a odstupňovaných alkoholů až po vodu a potom v lázni APK Wash (1X).
2. Založit primární protilátku a dávkovače příslušné detekční soupravy a potřebné přídavné reagentie do přihrádky pro reagentie a umístit je do barvicího automatu. Zkontrolujte nádoby na tekutiny a odpad.
3. Vyjmout sklička zbarvená parafínem, opatřená štítky z roztoku APK Wash (1X). Zamezit vysychání tkání.

Sériové barvicí automaty BenchMark Series

1. Opatřit sklička štítkem s čárovým kódem odpovídajícím protokolu protilátky, která má být zpracována.
2. Založit primární protilátku a dávkovače příslušné detekční soupravy a potřebné přídavné reagentie do přihrádky pro reagentie a umístit je do barvicího automatu. Zkontrolujte nádoby na tekutiny a odpad.
3. Vložte sklička do barvicího automatu.

Pro všechny přístroje

1. Spustit barvicí cyklus.
2. Po dokončení cyklu vyjmout sklička z barvicího automatu.
3. Používáte-li detekční soupravy DAB a Alkaline Phosphatase Red, umyjte jemným čisticím 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 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 °–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-CD20 (L26) je tonzila a slezina. Komponenty tkání pro pozitivní kontrolu (B 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 čerstvé 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 zajišťují kontrolu pro všechny reagentie a kroky metody kromě fixace a zpracování tkáně.

Tkáň se slabým pozitivním zbarvením je vhodnější pro optimální kontrolu kvality a zjištění nižší úrovně degradace reagentie.

Známe pozitivní kontroly tkání by měly být používány pouze ke sledování správné účinnosti zpracovaných tkání a testovacích reagentií, 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 specifikacími, výsledky tkáně pacienta jsou neplatné. Objeví-li se rozpory, prostudujte část Řešení problémů tohoto letáku. Identifikovat a opravit problém a potom opakovat vzorek pacienta.

Reagentie pro negativní kontrolu

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

Pokud se panely řady protilátek používají se sériovými řezy, může reagentie 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,⁴ a schválenou směrnicí NCCLS⁵ 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 reagentií. 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 specifickost 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 vyskytne 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 reagentií 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 morfolgie 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

- Imunohistochemie je diagnostický proces obsahující více kroků, který vyžaduje specializované školení ve výběru vhodných reagentií, výběru tkání, fixaci, přípravě a zpracování imunohistochemického podložního skla a interpretaci výsledků zbarvení.
- 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 nepravdivostí v tkáni.

- 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, morfolgie a jiných histopatologických kritérií. Klinická interpretace jakéhokoli zbarvení nebo jeho nepřítomnosti musí být doplněna morfolgickými 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, reagentie 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.
- Ventana dodává protilátky a reagentie 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.
- Tento výrobek není určen k použití v průtokové cytometrii, neboť charakteristiky účinnosti nebyly stanoveny.
- Reagentie 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.⁶ Se zdokumentovanými neočekávanými reakcemi se obraťte na místní zastoupení společnosti Ventana.
- Tkáň osob infikovaných virem hepatitidy B, které obsahují povrchový antigen (HBsAg) hepatitidy B, mohou s křenovou peroxidázou vykazovat nespecifické zbarvení.⁷
- 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 (erytrocyty) a endogenní aktivitou peroxidázy (cytochrom C), alkalickou fosfatázou nebo endogenním biotinem (příklad: játra, mozek, prs, ledvina) v závislosti na typu imunologického barvení.⁸
- Jako u každého imunohistochemického testu, negativní výsledek znamená, že antigen nebyl detekován, nikoli, že antigen není v testovaných buňkách nebo tkáni přítomen.

Specifická omezení

- Protilátka 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".⁹
- Protilátka 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

- Specifická CONFIRM anti-CD20 (L26) byla stanovena barvením panel normálních tkání, fixovaných ve formalínu a zalitých v parafínu. Výsledky byly následující: mozková dřev, zbarvil se 0 ze 3 případů; malý mozek, nezabarvil se žádný ze 3 případů; nadledvina, zbarvilo se 0 ze 3 případů; vaječník, zbarvily se 0 ze 3 případů; slinivka břišní, zbarvilo se 0 ze 3 případů; příštítná žláza, zbarvily se 0 ze 3 případů (přítomnost rozptýlených infiltrujících B-buněk); hypofýza, zbarvily se 0 ze 3 případů; varlata, zbarvily se 0 ze 3 případů; štítná žláza, zbarvily se 0 ze 3 případů; prs, zbarvily se 0 ze 3 případů; slezina, zbarvily se 3 ze 3 tkání; mandle, zbarvily se 5 z 5 případů; brzlík, zbarvily se 0 ze 3 případů (přítomnost rozptýlených infiltrujících B-buněk); kostní dřev, nezabarvil se žádný ze 3 případů (přítomnost rozptýlených infiltrujících B-buněk); plíce, zbarvily se 0 ze 3 případů; srdce, zbarvily se 0 ze 3 případů; jícen, zbarvily se 0 ze 3 případů (přítomnost rozptýlených infiltrujících B-buněk); žaludek, zbarvily se 0 ze 3 případů (přítomnost rozptýlených infiltrujících B-buněk); tenké střevo, zbarvily se 0 ze 3 případů; tračník, zbarvily se 0 ze 3 případů; játra, zbarvily se 0 ze 3 případů; slinná žláza, zbarvily se 0 ze 3 případů; ledvina, zbarvily se 0 ze 3 případů; prostata, zbarvily

- se 0 ze 3 případů; děloha, zabarvily se 0 ze 3 případů; děložní hrdlo, zabarvily se 0 ze 3 případů; příčné pruhovaný sval, nezabarvil se žádný ze 3 případů; kůže, zabarvily se 0 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 CD20 při použití CONFIRM anti-CD20 (L26) a může mít za následek falešně negativní výsledky. Citlivost byla stanovena barvením řady neoplastických tkání, fixovaných ve formalínu a zalitých v parafínu. Následující tkáně vykázaly zabarvení na CD20: Difúzní typ maligních lymfomu, difúzní typ B-buněčných lymfomu, difúzní typ ne-Hodgkinova lymfomu, smíšené lymfomy z malých i velkých buněk, malobuněčné lymfomy, velkobuněčné lymfomy a folikulární lymfom. Následující neoplastické tkáně nevykázaly na CD20 zabarvení: glioblastom, atypický meningiom, ependymom a oligodendrogliom v mozku; karcinom ostrůvkových buněk; karcinom jater; adenokarcinom slinivky břišní, jícen, plíce (přítomnost rozptýlených infiltrujících B-buněk), žaludek, tenké střevo, tračník, rektum, prostata (přítomnost rozptýlených infiltrujících B-buněk), vaječník, děloha a děložní hrdlo; testikulární seminom a embryonální karcinom; medulární a papilární karcinom štítné žlázy; infiltrující karcinom, intraduktální karcinom a fibrofatická tkáň prsu (přítomnost rozptýlených infiltrujících B-buněk); tři karcinomy skvamózních buněk; mezenchymom v tenkém střevu; hepatocelulární karcinom a hepatoblastom; rhabdomyosarkom v retroperitoneu; neurofibrom a neuroblastom; melanom; sarkom; karcinom transitionálních buněk v měchýři; karcinom jasných buněk v ledvině; Hodgkinův lymfom (přítomnost rozptýlených infiltrujících B-buněk); leiomyosarkom v hladkém svalu a měchýři.
 - Reprodukovatelnost barvení uvnitř cyklu (Intra run) byla stanovena na základě barvení (9) sklíček obsahujících stejnou tkáň na jednom 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.
 - 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 zbarvená tímto produktem vykazovala 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-CD20 (L26). 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 deseti (10) tkáních měly všechny tři (3) šarže podobnou účinnost.

ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ

- 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 protilátkou nebo některým z běžných sekundárních reagensů.
- 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 protilátkou nebo některým z běžných sekundárních reagensů. Sběr, fixace nebo odstraňování parafínů z tkání mohlo být provedeno nesprávným způsobem. Sběr tkáně, její fixace a skladování musí probíhat ve správném postupu.
- Vyskytne-li se přílišné zbarvení pozadí, pravděpodobně jsou přítomny vysoké úrovně endogenního biotinu. Je třeba zahrnout krok blokování biotinu.

- Jestliže se nepodařilo odstranit všechny parafín, je třeba opakovat postup odstranění parafínu z tkání.
- Je-li zbarvení specifickou protilátkou příliš intenzivní, opakujte cyklus s kratší inkubační dobou vždy o 4 minuty až do doby dosažení požadované intenzity barvení.
- Jestliže dochází ke smývání řezů tkání ze sklíčka, zkontrolujte, zda jsou podložní skla pozitivně nabita.
- Při nápravě odkazujeme na část Jednotlivé kroky postupu a Návod k obsluze barvicího automatu nebo se obraťte na místní zastoupení společnosti Ventana.

REFERENCE

- Mason DY, Comans-Bitter WM, Cordell JL, Verhoeven MA, van Dongen JJ. Antibody L26 recognizes an intracellular epitope on the B-cell-associated CD20 antigen. *Am J Clin Pathol* 136(6): 1215-1222, 1990.
- Coles FB, Curtun RW, Pastuszak WT. Hodgkin's disease, lymphocyte-predominant type: immunoreactivity with B-cell antibodies. *Mod Pathol* 1(4): 274-278, 1988.
- 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.
- 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.
- Herman GE, Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. *Biotech Histochem* 66(4): 194-199, 1991.
- Omata M, Liew CT, Ashcava M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen. A possible source of error in immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol* 73(5): 626-32, 1980.
- Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase: part 1. The technique and its pitfalls. *Lab Med* 14: 767, 1983.
- Roche PC, Hsi ED. *Immunohistochemistry-Principles and Advances*. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. (NR Rose Ed.) ASM Press, 2002.

Duševní vlastnictví

CONFIRM™, EZ Prep™, MIEV™, *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