

## **ultraView Red ISH DIG Detection Kit**

**REF** 800-505

05907128001

### **MỤC ĐÍCH SỬ DỤNG**

*ultraView Red ISH DIG Detection Kit* của Ventana Medical Systems (Ventana) là một hệ thống gián tiếp, không có biotin dùng để phát hiện các mẫu dò được đánh dấu digoxigenin (DIG). Bộ kit được dùng để nhận biết vùng đích bằng phương pháp lai tại chỗ (ISH) gắn chất tạo màu đỏ trong các lát cắt mô cố định bằng formalin, vùi trong paraffin được nhuộm trên máy dòng BenchMark của Ventana.

Biện luận lâm sàng dựa trên sự bắt màu hoặc không bắt màu, phải được kết hợp với thử nghiệm mô học và đánh giá các mẫu chứng thích hợp. Đánh giá kết quả phải được thực hiện bởi một người đọc đủ tiêu chuẩn kết hợp với tiền sử lâm sàng của bệnh nhân và các xét nghiệm chẩn đoán khác.

Bộ kit phát hiện này được sử dụng trong chẩn đoán *in vitro* (IVD).

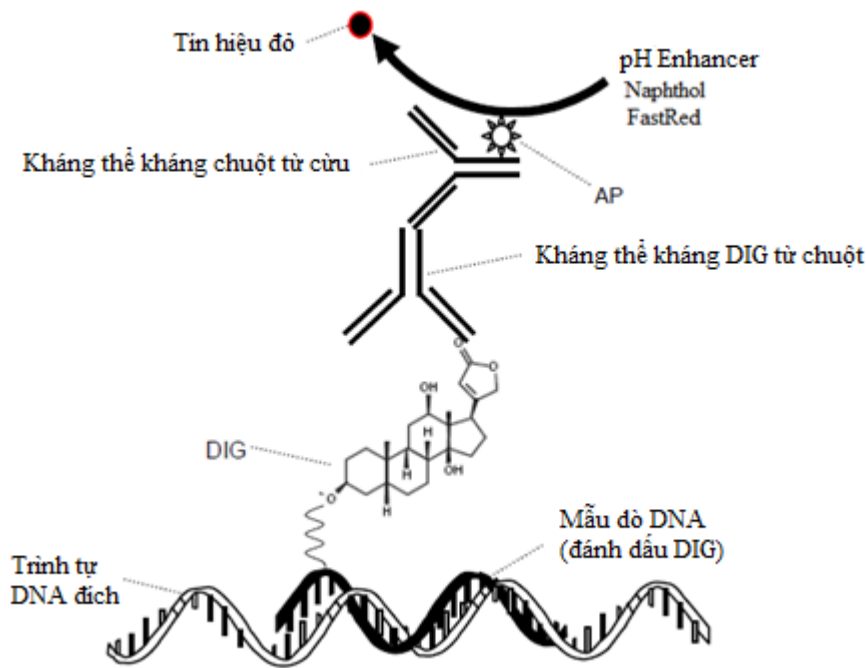
### **TÓM TẮT VÀ GIẢI THÍCH**

Phương pháp lai tại chỗ (ISH) nhìn chung sử dụng mẫu dò được đánh dấu để phát hiện các trình tự đích DNA hoặc RNA đặc hiệu trong các mô được cố định. Phương pháp này được thực hiện bằng cách gia nhiệt mô và dung dịch mẫu dò để gây biến tính acid nucleic. Sau đó phản ứng được làm nguội, cho phép mẫu dò acid nucleic được đánh dấu lai với trình tự đích bổ sung tương ứng trong mô.

Mẫu dò khi lai với trình tự đích được quan sát qua một phương pháp phát hiện gián tiếp định vị được mẫu dò gắn kết và tạo ra tín hiệu. Kỹ thuật phổ biến nhất đối với các phương pháp phát hiện gián tiếp là sử dụng một kháng thể thứ cấp kháng trực tiếp loại kháng thể sơ cấp (kháng hapten) và một enzyme với hệ thống cơ chất tạo màu tương ứng. Sự kết hợp này tạo ra kết tủa có màu tại vị trí gắn kết kháng thể đặc hiệu. *ultraView Red ISH DIG Detection Kit* sử dụng phương pháp gián tiếp để hiển thị các kháng thể đặc hiệu gắn kết với kháng nguyên bởi kết tủa có màu đỏ.

### **NGUYÊN TẮC CỦA QUY TRÌNH**

*ultraView Red ISH DIG Detection Kit* phát hiện mẫu dò được đánh dấu digoxigenin (DIG) gắn với trình tự đích sử dụng phương pháp lai tại chỗ gắn chất tạo màu đỏ (Red ISH) trên lát cắt mô được vùi trong paraffin. Đầu tiên, lát cắt mô được lai với một mẫu dò được đánh dấu DIG, sau đó là quá trình ủ với một kháng thể đơn dòng kháng DIG từ chuột, kháng thể này gắn với DIG hapten trên mẫu dò. Một dung dịch Multimer, là một kháng thể IgG kháng chuột từ dê có gắn cộng hợp một enzyme alkaline phosphatase (AP), được sử dụng để phát hiện kháng thể kháng DIG từ chuột. Lát cắt mô được ủ với dung dịch pH Enhancer (làm tăng pH), là dung dịch giúp kích hoạt enzyme AP và cung cấp thành phần/nồng độ muối và pH đệm thích hợp để tối ưu hóa hiệu năng của enzyme AP. Lát cắt mô được ủ với Naphthol, giúp cung cấp cơ chất cho enzyme AP (AP dephosphorylates Naphthol). Fast Red được bổ sung vào lát cắt mô, kết hợp với Naphthol tạo thành kết tủa màu đỏ có thể dễ dàng quan sát dưới kính hiển vi quang học. Hình 1 minh họa phản ứng Red ISH. Mẫu thử sau đó được nhuộm tương phản với Hematoxylin II để biện luận dưới kính hiển vi quang học.



Hình 1. Phản ứng Red ISH phát hiện mẫu dò đánh dấu DIG

Bộ kit phát hiện *ultraView Red ISH DIG* được tối ưu hóa để sử dụng với các mẫu dò, thuốc thử phụ trợ của Ventana và máy dòng BenchMark của Ventana. Quy trình nhuộm bao gồm nhiều bước trong đó các thuốc thử được ủ trong thời gian xác định ở nhiệt độ quy định. Ở cuối mỗi bước ủ, các máy BenchMark của Ventana rửa các lát cắt để loại bỏ các vật liệu không gắn kết và sử dụng một dung dịch phủ bảo vệ để giảm thiểu sự bay hơi của các thuốc thử tan trong nước từ tiêu bản.<sup>1</sup> Kết quả được biện luận khi đọc bằng kính hiển vi quang học và hỗ trợ chẩn đoán phân biệt về sinh lý bệnh.

Để biết thêm thông tin về vận hành máy, tham khảo Hướng dẫn vận hành máy BenchMark thích hợp của Ventana.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Thuốc thử được cung cấp

*ultraView Red ISH DIG* Detection Kit cung cấp thuốc thử đủ cho 100 xét nghiệm.

- 1 - Ống 10mL Ống thuốc thử *ultraView Red ISH DIG* Mouse anti-DIG Antibody 10 mL chứa <5 µg/mL kháng thể đơn dòng kháng DIG từ chuột trong đệm với chất bảo quản ProClin 300.\*
- 1 - Ống 10mL Ống thuốc thử *ultraView Red ISH DIG* AP chứa <50 µg/mL cộng hợp alkaline phosphatase (AP) kháng IgG kháng chuột từ dê trong đệm chứa chất bảo quản ProClin 300.\*
- 1 - Ống 20mL Ống thuốc thử *ultraView Red ISH DIG* pH Enhancer 20 mL chứa <3% MgCl<sub>2</sub> trong đệm Tris với chất bảo quản ProClin 300.\*
- 1 - Ống 10mL Ống thuốc thử *ultraView Red ISH DIG* Naphthol 10 mL chứa <8 g/L Naphthol trong đệm Tris với chất bảo quản ProClin 300.\*
- 1 - Ống 20mL Ống thuốc thử *ultraView Red ISH DIG* Fast Red 20mL chứa <3 g/L muối Fast

Red KL trong đệm acetate với chất bảo quản ProClin 300.\*

\*Để biết thông tin chất bảo quản, vui lòng tham khảo mục Cảnh báo và Thận trọng.

### **Hoàn nguyên, Trộn, Pha loãng, Chuẩn độ thuốc thử**

Không cần thực hiện hoàn nguyên, trộn, pha loãng, hay chuẩn độ thuốc thử. Người sử dụng cần phải thẩm định lại quy trình nếu có bất cứ sự thay đổi nào.

### **Vật liệu và thuốc thử cần thiết nhưng không được cung cấp**

Các thuốc thử và vật liệu sau có thể cần cho quá trình nhuộm nhưng không được cung cấp kèm:

1. Mẫu dò được đánh dấu DIG của Ventana
2. Ventana HybReady Solution [Số danh mục 780-4409]
3. Ventana *ultraView* SISH DNP Detection Kit [Số danh mục 800-098]\*
4. Ventana *ultraView* Silver Wash II [số danh mục 780-003 hay tương đương]
5. Ventana ISH Block [Số danh mục 780-4461]\*
6. Ventana ISH Protease 2 [Số danh mục 780-4148] \*
7. Ventana ISH Protease 3 [Số danh mục 780-4149] \*
8. Ventana Hematoxylin II Counterstain [Số danh mục 790-2208]\*
9. Ventana Bluing Reagent [Số danh mục 760-2037]\*
10. Ventana Reaction Buffer (Dung dịch đệm phản ứng) (10X) [Số danh mục 950-300]
11. Ventana SSC (10X) [Số danh mục 950-110]
12. Ventana EZ Prep (10X) [Số danh mục 950-102]
13. Ventana Cell Conditioning 2 (Tiền pha loãng) [Số danh mục 950-123]\*
14. Ventana ULTRA CC2 (Tiền pha loãng) [Số danh mục 950-223]\*
15. Ventana Liquid Coverslip (Nhiệt độ cao) [Số danh mục 650-010]
16. Ventana ULTRA LCS [Số danh mục 650-210]
17. Máy nhuộm Ventana dòng BenchMark
18. Nhãn mã vạch của tiêu bản [Số danh mục 1358501]
19. Lam kính hiển vi Superfrost Plus (VWR Số danh mục 48311-703 hoặc tương đương)
20. Nước khử ion hay nước cất
21. Xylene (mức độ mô học)
22. Môi trường cố định, (như CytoSeal 60) hoặc Thiết bị phủ bảo vệ tự động (như Tissue-Tek SCA automated coverslipper)
23. Lame kính (đủ để che phủ mô như VWR Số danh mục 48393-60 hoặc tương đương)
24. Bể nhuộm hay lọ nhuộm
25. Tủ sấy có khả năng duy trì ở 60°C
26. Đồng hồ bấm giờ.

## 27. Kính hiển vi quang học

\* Dành cho các ứng dụng đặc biệt khi cần.

### **Bảo quản và Xử lý**

Bảo quản ở 2-8° C. Không đông lạnh. Kit phát hiện có thể được dùng ngay sau khi lấy ra khỏi tủ lạnh.

Để đảm bảo độ ổn định và phân phối đúng và của mỗi thuốc thử, sau mỗi lần chạy mẫu thay nắp ống thuốc thử và để ống thuốc thử theo hướng thẳng đứng vào tủ lạnh ngay lập tức.

Mỗi kit phát hiện đều có hạn dùng. Nếu bảo quản đúng, các thuốc thử sẽ ổn định đến hạn dùng in trên nhãn.

Không sử dụng ống thuốc thử phát hiện đã hết hạn sử dụng. Nên liên hệ với đại diện tại địa phương ngay lập tức nếu thấy các kết quả không mong muốn.

### **Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu phân tích**

Các mẫu mô được cố định bởi formalin, vùi trong paraffin, theo quy trình thường quy thích hợp sử dụng với thuốc thử này. Mỗi lát cắt cần được cắt đến độ dày thích hợp (khoảng 4 µm) và được đặt trên một lam kính Superfrost Plus (tích điện dương). Dung dịch cố định mô được đề nghị là dung dịch formalin đậm trung hòa 10%.<sup>2</sup> Ventana đã thẩm định các mẫu thử được cố định trong kẽm formalin hoặc alcohol formalin cũng là loại mẫu phù hợp. Mẫu được cố định trong Prefer cũng cho thấy một bản sao được phát hiện với xét nghiệm này, nhưng hình thái mô có thể bị ảnh hưởng. Không sử dụng các mô cố định bởi AFA hoặc chất định hình Bouin cho xét nghiệm này. Các mẫu cố định >6 giờ với AFA hoặc chất định hình Bouin có hiệu quả nhuộm bắt màu yếu hoặc không bắt màu nhuộm.<sup>3</sup> Ngoài các xét nghiệm của Ventana, các nghiên cứu gần đây đã phát hiện phần lớn kết quả không rõ ràng của gen HER2 thu được từ FISH liên quan đến các yếu tố tiền phân tích bao gồm cố định dưới mức và quá mức,<sup>4</sup> cũng như cố định muộn.<sup>5</sup> Thực hiện chính xác quy trình cố định (như sử dụng một người/thiết bị chuyên dụng để đảm bảo thời gian cố định tối thiểu là 6 giờ) giúp giảm 64% các trường hợp không rõ ràng từ 10.8% lỗi còn 3.4%. Mẫu cố định trong formalin <6 giờ có thể bị mất tín hiệu và phân cắt nhân quá mức, như quan sát thấy khi nhuộm với hematoxylin nhạt/yếu.

Lát cắt dày hơn 4 µm có thể cần được xử lý với protease mạnh hơn điều kiện khuyến cáo và có thể cho thấy có bọt trong nhân nhiều hơn so với lát cắt mỏng hơn do lượng paraffin dư trong mô. Có thể phải khử paraffin trong alcohol và xylene trước khi nhuộm trên máy. Hiện tượng bọt trong nhân cũng có thể xảy ra trong hai bối cảnh khác: 1) cố định quá mức (ví dụ >24 giờ) có thể khắc phục được với quy trình khử paraffin ngoại tuyến đề cập ở trên, và 2) cố định dưới mức (1-3 giờ với formalin) có ít bọt rời rạc trong nhân. Điều này có thể khắc phục tại thời điểm cố định 3 giờ bằng cách thay đổi phương pháp xử lý tế bào/xử lý protease, nhưng ở thời điểm 1 giờ hầu như không thể khắc phục.

### **CẢNH BÁO VÀ THẬN TRỌNG**

1. Dùng trong chẩn đoán *in vitro* (IVD).
2. Làm sạch bình chứa chất thải trước khi bắt đầu nhuộm trên máy. Nếu biện pháp phòng ngừa này không được thực hiện, các bình chứa chất thải có thể tràn và người sử dụng có nguy cơ trượt và ngã. Trên máy BenchMark XT, một lượt chạy sẽ chỉ bắt đầu khi bình chứa chất thải được làm sạch trước khi bắt đầu chạy.

3. ProClin 300 được sử dụng làm chất bảo quản trong các sản phẩm này. Nó được phân loại là chất kích ứng và có thể gây mẫn cảm khi tiếp xúc với da. Sử dụng các biện pháp phòng ngừa hợp lý khi thao tác các thuốc thử. Tránh để thuốc thử tiếp xúc với mắt, da và niêm mạc. Sử dụng găng tay và quần áo bảo hộ.
4. Nếu thuốc thử tiếp xúc với các vùng da nhạy cảm, rửa với thật nhiều nước. Tránh hít thuốc thử.
5. Vật liệu có nguồn gốc từ người hoặc động vật nên được xử lý như chất sinh học nguy hiểm tiềm tàng và với các biện pháp đề phòng thích hợp.
6. Tránh để nhiễm vi sinh vật vào thuốc thử vì có thể làm sai lệch kết quả.
7. Tham khảo hướng dẫn sử dụng về phương pháp khuyến cáo để loại bỏ chất thải.

## HƯỚNG DẪN SỬ DỤNG

### Quy trình nhuộm đề nghị

Bộ kit phát hiện *ultraView* ISH DIG được phát triển để sử dụng trên các máy nhuộm tiêu bản tự động dòng BenchMark của Ventana kết hợp với các thuốc thử phụ của Ventana. Các thông số của quy trình tự động hóa có thể được hiển thị, in và chỉnh sửa theo quy trình ghi trong hướng dẫn vận hành của mỗi máy nhuộm tiêu bản tự động riêng biệt. Các thông số vận hành khác cho các máy BenchMark của Ventana đã được cài đặt trước tại nhà máy sản xuất.

Quy trình nhuộm trên các máy BenchMark của Ventana như sau. Để biết hướng dẫn chi tiết và các lựa chọn quy trình bổ sung, tham khảo Hướng dẫn vận hành và tờ hướng dẫn sử dụng của mẫu dò Ventana được sử dụng:

1. Dán nhãn mã vạch lên tiêu bản tương ứng với quy trình nhuộm của mẫu dò sử dụng.
2. Đặt ống đựng mẫu dò, các bộ kit phát hiện phù hợp và các thuốc thử phụ cần thiết vào khay thuốc thử và đặt khay thuốc thử lên máy nhuộm tiêu bản tự động.
3. Kiểm tra hóa chất cơ bản và dọn sạch chất thải trước khi bắt đầu chạy.
4. Đặt các tiêu bản vào máy nhuộm tiêu bản tự động.
5. Khởi động máy nhuộm.
6. Khi kết thúc quá trình, lấy các tiêu bản ra khỏi máy nhuộm tiêu bản tự động.

### Quy trình xử lý khuyến cáo sau chạy máy

Lưu ý: Chất tạo màu Fast Red tan trong cồn và acetone. Không sử dụng các bể alcohol và acetone hoặc rửa quá lâu trong xylene để khử nước và làm sạch tiêu bản.

1. Để loại bỏ dung dịch phủ bảo vệ (LCS), rửa tiêu bản lần lượt trong 2 dung dịch rửa chén nhẹ (không dùng chất tẩy thiết kế cho máy rửa chén tự động).
2. Rửa kỹ tiêu bản với nước khử ion, trong khoảng 1 phút. Loại bỏ nước dư.
3. Sấy tiêu bản tối thiểu 15 phút trong tủ sấy (45-60°C) hoặc sấy bằng không khí khô ở nhiệt độ môi trường. Đảm bảo tiêu bản khô hoàn toàn trước khi phủ lam kính.
4. Chuyển tiêu bản vào bể xylene để rửa nhanh trong khoảng 30 giây.
5. Đặt lam kính phủ lên tiêu bản.

### Quy trình Kiểm tra Chất lượng

## Các mẫu mô chứng dương

Xem tờ hướng dẫn sử dụng của mẫu dò sử dụng nếu cần.

## Mẫu mô chứng âm

Xem tờ hướng dẫn sử dụng của mẫu dò sử dụng nếu cần.

## Thuốc thử chứng dương

Xem tờ hướng dẫn sử dụng của mẫu dò sử dụng nếu cần.

## Những sai lệch không xác định

Những sai lệch không xác định trong các mẫu chứng cần được tham khảo ngay lập tức với đại diện tại địa phương. Nếu kết quả kiểm tra chất lượng không đạt các tiêu chuẩn cần thiết thì kết quả của bệnh nhân không có giá trị. Nếu sai lệch xảy ra, tham khảo phần Xử lý sự cố trong tờ hướng dẫn này. Cần tìm ra nguyên nhân và khắc phục, và chạy lại mẫu bệnh phẩm.

## Thẩm định xét nghiệm

Trước khi bắt đầu sử dụng một hệ thống nhuộm trong quy trình chẩn đoán, hiệu năng của mẫu dò cần phải được thẩm định bằng cách làm xét nghiệm trên một loạt các mẫu mô có đặc tính hiệu năng ISH đã được xác định (tham khảo tờ hướng dẫn sử dụng của mẫu dò thích hợp), và Khuyến cáo về Kiểm tra Chất lượng của Chương trình thẩm định phòng xét nghiệm của Hội Giải phẫu bệnh Hoa Kỳ, phần Danh mục.6 Giải phẫu bệnh tế bào và/hoặc Hướng dẫn.7 đã được phê duyệt của CLSI. Các quy trình kiểm tra chất lượng này cần được lặp lại với mỗi lô hoặc thuốc thử mới, hay bất cứ khi nào có sự thay đổi các thông số xét nghiệm.

## Biện luận kết quả

*ultraView Red ISH DIG Detection Kit* của Ventana tạo ra sản phẩm phản ứng có màu đỏ kết tủa tại các vị trí được định vị bởi mẫu dò và kháng thể sơ cấp. Một người đọc đủ tiêu chuẩn có kinh nghiệm về quy trình lai tại chỗ (ISH) phải đánh giá các mẫu chứng và đánh giá sản phẩm nhuộm trước khi biện luận kết quả. Xem mô tả chi tiết về thẩm định mô chứng trong tờ hướng dẫn sử dụng của mẫu dò tương ứng thích hợp.

## HẠN CHẾ

### Các hạn chế chung

1. ISH là một quy trình chẩn đoán gồm nhiều bước đòi hỏi phải được đào tạo chuyên môn trong việc lựa chọn thuốc thử và mô thích hợp, cố định, xử lý, chuẩn bị tiêu bản ISH, và biện luận kết quả nhuộm.
2. Sự nhuộm mô phụ thuộc vào quy trình thao tác và xử lý mô trước khi nhuộm. Cố định, đông lạnh, rã đông, rửa, sấy khô, gia nhiệt, cắt lát không đúng, hay để nhiễm với các mẫu mô hay mẫu dịch khác có thể gây sai lệch, hoặc bị nhiễm kháng thể, kết quả dương tính hoặc âm tính giả. Các kết quả không nhất quán có thể là hậu quả của sự thay đổi phương pháp cố định và vùi, hay tính bất thường vốn có của mô.
3. Nhuộm tương phản quá mức hay không hoàn toàn có thể làm giảm tính chính xác của việc biện luận kết quả.
4. Biện luận lâm sàng bất kỳ mẫu bệnh dương tính, hay âm tính, cần phải được đánh giá cùng với tiền sử lâm sàng, hình thái học và các tiêu chuẩn mô bệnh học khác. Trách nhiệm của người đọc

kết quả đủ tiêu chuẩn là phải quen thuộc với các loại mẫu dò, kháng thể, thuốc thử và các phương pháp sử dụng để tạo ra sản phẩm nhuộm. Quá trình nhuộm phải được thực hiện ở một phòng thí nghiệm được chứng nhận, cấp phép dưới sự giám sát của một bác sĩ giải phẫu bệnh chịu trách nhiệm xem lại các tiêu bản đã nhuộm và đảm bảo tính chính xác của các mẫu chứng.

- Ventana cung cấp các thuốc thử với độ pha loãng tối ưu để sử dụng theo hướng dẫn kèm theo. Pha loãng nhiều hơn có thể làm mất sự nhuộm màu thích hợp; người sử dụng cần phải thẩm định lại quy trình nếu có bất cứ sự thay đổi nào.
- Các mẫu chứng thích hợp phải được sử dụng và ghi nhận lại.
- Các thuốc thử có thể cho các phản ứng không mong muốn trên các mô chưa được xét nghiệm trước đó. Không thể loại bỏ hoàn toàn khả năng phản ứng không mong muốn xảy ra trên các nhóm mô đã được xét nghiệm do sự đa dạng sinh học trên các tế bào ung thư, hay các mô bệnh khác.<sup>8</sup> Liên hệ với văn phòng đại diện tại địa phương để được chỉ dẫn về các phản ứng không mong muốn.
- Kết quả dương tính giả có thể xảy ra do sự gắn protein không theo cơ chế miễn dịch hay do sản phẩm phản ứng của cơ chất.

### **Giới hạn đặc hiệu**

- Mỗi bước của quy trình kit phát hiện đã được tối ưu hóa trên máy BenchMark Series của Ventana và được cài đặt trước. Vì có sự biến thiên trong quy trình cố định và xử lý mô, cần điều chỉnh một số biến số cho từng mẫu thử. Để có thêm thông tin về sự biến thiên trong cố định mẫu, tham khảo mục Xử lý sự cố và tài liệu “Immunohistochemistry Principles and Advances” (“Các nguyên tắc Hóa mô miễn dịch và các tiến bộ”)<sup>9</sup> hoặc “Immunomicroscopy: A Diagnostic Tool for the Surgical Pathologist” (“Hiển vi miễn dịch: Công cụ chẩn đoán cho Bác sĩ giải phẫu bệnh”).<sup>10</sup>
- Không sử dụng các mô cố định với AFA hoặc chất định hình Bouin cho xét nghiệm này (Xem mục Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu phân tích).
- Bộ kit phát hiện, kết hợp với mẫu dò của Ventana, phát hiện các trình tự acid nucleic đặc hiệu còn tồn tại sau các bước cố định thường quy bằng formalin, xử lý và cắt lát mô. Người sử dụng nếu thay đổi quy trình xét nghiệm, nhiệt độ, hoặc thời gian ủ được đề nghị phải chịu trách nhiệm biện luận và thẩm định kết quả của bệnh nhân.
- Việc không tuân thủ quy trình xử lý khuyến cáo sau chạy máy có thể làm mất tín hiệu hoặc thay đổi tín hiệu ngoài dự kiến.

### **ĐẶC TÍNH HIỆU NĂNG**

- Độ tái lập của bộ kit phát hiện *ultraView* Red ISH DIG được kiểm tra qua năm trường hợp ung thư biểu mô vú ở người khác nhau (đại diện cho khoảng động học của trạng thái gen HER2) và các tiêu bản HER2 Dual ISH 3-in-1 Xenograft trong năm ngày không liên tục trên sáu máy (2 BenchMark, 2 BenchMark XT, 2 BenchMark ULTRA). Số bản sao trung bình của HER2 và Nhiễm sắc thể số 17 thu được từ mỗi máy (qua 3 hệ thống) trong mỗi lần của năm lượt chạy. Trên 95% tất cả các tiêu bản được nhuộm và thẩm định trong nghiên cứu này (tổng cộng 506) đạt yêu cầu tương thích của tiêu bản và tạo ra số lượng bản sao tái lập của HER2 và Nhiễm sắc thể số 17 với %CVs < 10% qua tất cả các ngày và hệ thống kiểm tra.
- Độ tái lập qua các lô của bộ kit phát hiện *ultraView* Red ISH DIG được xác định bằng cách

kiểm tra mỗi lô của 3 lô bộ mẫu dò INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail với 3 lô của bộ kit phát hiện ultraView SISH DNP và ultraView Red ISH DIG trên các tiêu bản giống nhau của 3 trường hợp ung thư biểu mô vú ở người và các tiêu bản HER2 Dual ISH 3-in-1 Xenograft. Tất cả tiêu bản (100%) đạt yêu cầu tương thích của tiêu bản và được định lượng bởi một người đọc đủ tiêu chuẩn cho các bản sao thô của HER2 và Chr17 trong 20 nhân/mẫu thử. Các dữ liệu này được phân tích thành phần khác biệt dựa trên mô hình ảnh hưởng ngẫu nhiên, và kết quả cho thấy tất cả tiêu chuẩn chấp nhận đều đạt trong nghiên cứu này. Các giá trị %CV qua các lô mẫu dò, lô của bộ kit phát hiện, và trong một lần chạy đều <11%, biểu thị độ chính xác xuất sắc của xét nghiệm.

3. Độ nhạy và độ đặc hiệu lâm sàng được xác định bởi một nghiên cứu so sánh xét nghiệm INFORM HER2 DNA Probe, trong đó số lượng bản sao HER2 và Nhiễm sắc thể số 17 được xác định trên các tiêu bản riêng biệt chỉ sử dụng bộ phát hiện SISH, với xét nghiệm INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, trong đó số lượng bản sao HER2 và Nhiễm sắc thể số 17 được xác định trên một tiêu bản duy nhất sử dụng bộ phát hiện SISH và Red ISH. Một nhóm gồm 213 trường hợp ung thư biểu mô vú chứa một hỗn hợp ~50/50 trạng thái gen khuếch đại và không khuếch đại được xét nghiệm với cả hai xét nghiệm trên máy nhuộm tiêu bản tự động BenchMark XT (Bảng 5). Kết quả thể hiện chi tiết tỷ lệ tương đồng âm tính, dương tính và tổng thể trong các mẫu lâm sàng của xét nghiệm INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail (nhuộm hai màu) với INFORM HER2 DNA Probe (nhuộm đơn màu) được trình bày trong Bảng 2.

**Bảng 1.** Sự tương đồng giữa INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail sử dụng bộ kit phát hiện ultraView SISH DNP và ultraView Red ISH DIG và INFORM HER2 DNA Probe chỉ sử dụng bộ phát hiện SISH.

Trạng thái khuếch đại HER2 Dual ISH	Trạng thái khuếch đại HER2 SISH	
	Khuếch đại	Non-Amp
Khuếch đại	101	7
Non-Amp	13	92

**Bảng 2.** Tóm tắt tỷ lệ đồng thuận âm tính, dương tính và tổng thể cho INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail sử dụng bộ kit phát hiện ultraView SISH DNP và ultraView Red ISH DIG so sánh với INFORM HER2 DNA Probe chỉ sử dụng bộ phát hiện SISH.

Tỷ lệ đồng thuận âm tính		Tỷ lệ đồng thuận dương tính		Tỷ lệ đồng thuận tổng thể	
Dữ liệu thô / Tổng trường hợp	Phần trăm (95% Điểm CI)	Dữ liệu thô / Tổng trường hợp	Phần trăm (95% Điểm CI)	Dữ liệu thô / Tổng trường hợp	Phần trăm (95% Điểm CI)
92/99	92.9 (86.1 – 96.5)	101/114	88.6 (81.5 – 93.2)	193/213	90.6 (85.9 – 93.8)

## XỬ LÝ SỰ CỐ

Vui lòng tham khảo mục Xử lý sự cố trong tờ hướng dẫn sử dụng của mẫu dò thích hợp.



## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Elias JM, Gown AM, Nakamura RM, Wilbur DC, Herman GE, Jaffe ES, Battifora H, Brigati DJ. Quality control in immunohistochemistry. Report of a workshop sponsored by the Biological Stain Commission. Am J Clin Pathol 1989;92(6):836-843.
2. Sheehan DC, Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology, 2<sup>nd</sup> Edition. St. Louis, MO: The C.V. Mosby Company; 1980.
3. Baloglu G, Haholu A, Kucukodaci Z, Yilmaz I, Yildirim S, Baloglu H. The effects of tissue fixation alternatives on DNA content: a study on normal colon tissue. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2008;16:485-492.
4. Middleton LP et al. Implementation of American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists HER2 Guideline Recommendations in a tertiary care facility increases HER2 immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization concordance and decreases the number of inconclusive cases. Arch Pathol Lab Med. 2009;133:775-780.
5. Khoury T, Sait S, Hwang H, Chandrasekhar R, Wilding G, Tan D, Kulkarni S. Delay to formalin fixation effect on breast biomarkers. Mod Pathol. 2009;22:1457-1467.
6. College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2001.
7. CLSI (formerly NCCLS). Quality Assurance for Immunocytochemistry: Approved Guideline. CLSI document MM4-A- (ISBN 1-56238-396-5). CLSI, 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 1991;66(4):194-199.
9. Roche PC, Hsi ED. Immunohistochemistry-Principles and Advances. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6<sup>th</sup> edition. In: NR Rose, ed. ASM Press, 2002.
10. Taylor C, Cote RJ. Immunomicroscopy: A Diagnostic Tool for the Surgical Pathologist. 2<sup>nd</sup> edition. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Company; 1986.

## SỞ HỮU TRÍ TUỆ

Ventana, BenchMark, *ultraView*, INFORM, và logo Ventana là các thương hiệu của Roche.

Tất cả các thương hiệu khác là tài sản của các nhà sở hữu tương ứng.

Ventana cấp cho khách hàng bản quyền sử dụng chỉ một lần theo các bằng sáng chế sau: Nos. 6045759, 6192945, 6416713, 6945128, và 7378058 và các đối tác nước ngoài.

## THÔNG TIN LIÊN HỆ



Roche Diagnostics GmbH

Sandhofer Strasse 116

D-68305 Mannheim

Đức



[www.ventanamed.com](http://www.ventanamed.com)



## **ultraView SISH DNP Detection Kit**

**REF** 800-098

05907136001

### **MỤC ĐÍCH SỬ DỤNG**

*ultraView SISH DNP Detection Kit* của Ventana Medical Systems (Ventana) là một hệ thống gián tiếp, không có biotin dùng để phát hiện các mẫu dò được đánh dấu DNP. Bộ kit được dùng để nhận biết vùng đích bằng phương pháp lai tại chỗ (ISH) gắn bạc trong các lát cắt mô cố định bằng formalin, vùi trong paraffin được nhuộm trên các máy dòng Benchmark của Ventana.

Biện luận lâm sàng dựa trên sự bắt màu hoặc không bắt màu, phải được kết hợp với thử nghiệm mô học và đánh giá các mẫu chứng thích hợp. Đánh giá kết quả phải được thực hiện bởi một người đọc đủ tiêu chuẩn trong bối cảnh lâm sàng của bệnh nhân và các xét nghiệm chẩn đoán khác.

Bộ kit phát hiện này được sử dụng trong chẩn đoán *in vitro* (IVD).

### **TÓM TẮT VÀ GIẢI THÍCH**

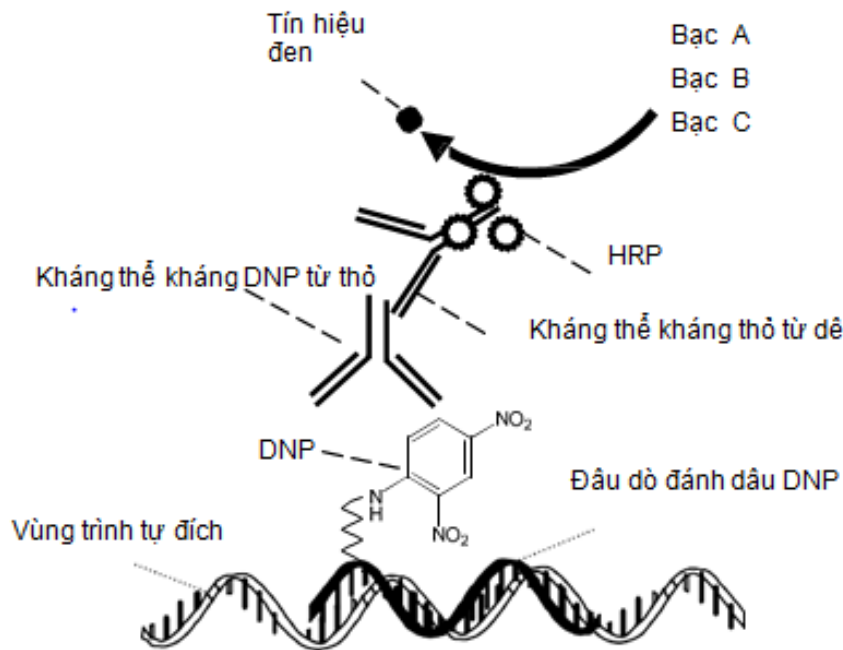
Phương pháp lai tại chỗ (ISH) nhìn chung sử dụng mẫu dò được đánh dấu để phát hiện các trình tự DNA hoặc RNA đích đặc hiệu trong các mô được cố định. Phương pháp này được thực hiện bằng cách gia nhiệt mô và dung dịch mẫu dò để gây biến tính acid nucleic. Sau đó phản ứng được làm nguội, cho phép mẫu dò acid nucleic được đánh dấu lai với trình tự đích bổ sung tương ứng trong mô.

Mẫu dò khi lai với trình tự đích được quan sát qua phương pháp phát hiện gián tiếp cho phép định vị được mẫu dò gắn kết và tạo ra tín hiệu. Kỹ thuật phổ biến nhất đối với các phương pháp phát hiện gián tiếp là sử dụng một kháng thể thứ cấp kháng trực tiếp loại kháng thể sơ cấp (kháng hapten) và một enzyme với hệ thống cơ chất tạo màu tương ứng. Sự kết hợp này tạo ra kết tủa có màu tại vị trí gắn kết kháng thể đặc hiệu. *ultraView SISH DNP Detection Kit* sử dụng phương pháp gián tiếp để hiển thị các kháng thể đặc hiệu gắn kết với kháng nguyên bởi kết tủa có màu đen lắng xuống.

### **NGUYÊN TẮC CỦA QUY TRÌNH**

*ultraView SISH DNP Detection Kit* phát hiện mẫu dò được đánh dấu dinitrophenyl (DNP) gắn với trình tự đích sử dụng phương pháp lai tại chỗ gắn bạc (SISH) trên lát cắt mô được vùi trong paraffin. Đầu tiên, lát cắt mô được lai với một mẫu dò được đánh dấu DNP, sau đó là quá trình ủ với một kháng thể kháng DNP từ thỏ, kháng thể này gắn với DNP hapten trên mẫu dò. Một dung dịch multimer, là một kháng thể thứ cấp kháng thỏ từ dê có gắn cộng hợp enzyme horseradish peroxidase (HRP), được sử dụng để phát hiện kháng thể kháng DNP từ thỏ. Kháng thể thứ cấp gắn kết được nhận diện qua phản ứng do enzyme (HRP) xúc tác tạo ra kết tủa bạc có màu đen. Ion bạc ( $Ag^+$ ) của dung dịch Silver ISH DNP Chromogen A (Silver A) được khử bởi hydroquinone của dung dịch Silver ISH DNP Chromogen B (Silver B) thành ion bạc kim loại ( $Ag^0$ ). Phản ứng này được cung cấp năng lượng từ cơ chất cho HRP, hydrogen peroxide (Silver C). Kết tủa bạc tích tụ trong nhân và trình tự đích được nhận diện dưới dạng một chấm đen dễ dàng quan sát được dưới kính hiển vi quang học.

Hình 1 minh họa phản ứng SISH. Mẫu thử sau đó được nhuộm tương phản với Hematoxylin II để biện luận bằng kính hiển vi quang học.



Hình 1. Phản ứng SISH

Bộ kit phát hiện *ultraView* SISH DNP được tối ưu hóa để sử dụng với các mẫu dò, thuốc thử phụ trợ của Ventana, và máy dòng BenchMark của Ventana. Quy trình nhuộm bao gồm nhiều bước trong đó các thuốc thử được ủ trong thời gian xác định ở nhiệt độ quy định. Ở cuối mỗi bước ủ, các máy BenchMark của Ventana rửa các lát cắt để loại bỏ các vật liệu không gắn kết và sử dụng một dung dịch phủ bảo vệ để giảm thiểu sự bay hơi của các thuốc thử tan trong nước từ tiêu bản.<sup>1</sup> Kết quả được biện luận sử dụng kính hiển vi quang học và dùng để hỗ trợ trong chẩn đoán phân biệt về sinh lý bệnh.

Để biết thêm thông tin về vận hành máy, tham khảo Hướng dẫn vận hành máy BenchMark thích hợp.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Thuốc thử được cung cấp

Bộ kit phát hiện *ultraView* SISH DNP cung cấp thuốc thử đủ cho 100 xét nghiệm.

- |               |  |
|---------------|--|
| 1 – Ống 10 mL | Ống thuốc thử <i>ultraView</i> Silver ISH DNP Rabbit anti-DNP Antibody chứa ít hơn 150 µg/mL kháng thể đơn dòng từ thỏ kháng trực tiếp DNP được pha trong dung dịch đệm chứa protein mang cùng với 0.05% chất bảo quản ProClin 300.* |
| 1 – Ống 10 mL | Ống thuốc thử <i>ultraView</i> Silver ISH DNP HRP chứa horseradish peroxidase (HRP) cộng hợp với kháng thể kháng thỏ từ dê (<20 µg/mL) trong dung dịch đệm chứa protein ổn định cùng với 0.05% chất bảo quản ProClin 300.*           |

- 1 – Ống 20 mL                      Ống thuốc thử *ultraView* Silver ISH DNP Chromogen A 20 mL chứa <1% CH<sub>3</sub>COOAg trong dung dịch nước
- 1 – Ống 10 mL                      Ống thuốc thử *ultraView* Silver ISH DNP Chromogen B 10 mL chứa <1% hydroquinone trong dung dịch đệm citrate.
- 1 – Ống 10 mL                      Ống thuốc thử *ultraView* Silver ISH DNP Chromogen C chứa <0.2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> trong một dung dịch nước.

\*Để biết thông tin chất bảo quản, vui lòng tham khảo mục Cảnh báo và Thận trọng.

### **Pha chế, trộn, pha loãng, chuẩn độ thuốc thử**

Không cần phải pha chế, trộn, pha loãng, hay chuẩn độ thuốc thử. Người sử dụng cần phải thẩm định lại quy trình nếu có bất cứ sự thay đổi nào.

### **Vật liệu và thuốc thử cần thiết nhưng không được cung cấp**

Các thuốc thử và vật liệu sau có thể cần cho quá trình nhuộm nhưng không được cung cấp kèm:

1. Mẫu dò được đánh dấu DNP của Ventana
2. Ventana HybReady Solution [Số danh mục 780-4409]
3. Ventana *ultraView* Red ISH DIG Detection Kit [Số danh mục 800-505]\*
4. Ventana *ultraView* Silver Wash II [Số danh mục 780-003 hoặc tương đương]
5. Ventana ISH Block [Số danh mục 780-4461]\*
6. Ventana ISH Protease 2 [Số danh mục 780-4148] \*
7. Ventana ISH Protease 3 [Số danh mục 780-4149] \*
8. Ventana Hematoxylin II Counterstain [Số danh mục 790-2208]\*
9. Ventana Bluing Reagent [Số danh mục 760-2037]\*
10. Ventana Reaction Buffer (Dung dịch đệm phản ứng) (10X) [Số danh mục 950-300]
11. Ventana SSC (10X) [Số danh mục 950-110]
12. Ventana EZ Prep (10X) [Số danh mục 950-102]
13. Ventana Cell Conditioning 2 (Tiền pha loãng) [Số danh mục 950-123]\*
14. Ventana ULTRA CC2 (Tiền pha loãng) [Số danh mục 950-223]\*
15. Ventana Liquid Coverslip (Nhiệt độ cao) [Số danh mục 650-010]
16. Ventana ULTRA LCS [Số danh mục 650-210]
17. Máy nhuộm Ventana dòng BenchMark
18. Nhãn mã vạch của tiêu bản [Số danh mục 1358501]
19. Lam kính hiển vi Superfrost Plus (VWR Số danh mục 48311-703 hoặc tương đương)
20. Nước khử ion hay nước cất
21. Xylene (mức độ mô học)
22. Ethanol hay thuốc thử alcohol (Mức độ mô học)\*
23. Môi trường cố định, (như CytoSeal 60) hoặc Thiết bị phủ bảo vệ tự động (như Tissue-Tek SCA automated coverslipper)
24. Lam kính (đủ để che phủ mô như VWR Số danh mục 48393-60 hoặc tương đương)
25. Lọ nhuộm hay bể nhuộm
26. Tủ sấy có khả năng duy trì ở 60°C
27. Đồng hồ bấm giờ.
28. Kính hiển vi quang học

\* Dành cho các ứng dụng đặc biệt khi cần.

## **Bảo quản và Xử lý**

Bảo quản ở 2-8°C. Không trữ đông. Kit phát hiện có thể được dùng ngay sau khi lấy ra khỏi tủ lạnh.

Để đảm bảo độ ổn định và phân phối đúng của mỗi thuốc thử, sau mỗi lần chạy mẫu thay nắp ống thuốc thử và để ống thuốc thử theo hướng thẳng đứng vào tủ lạnh ngay lập tức.

Mỗi kit phát hiện đều có hạn dùng. Nếu bảo quản đúng, các thuốc thử sẽ ổn định đến hạn dùng in trên nhãn. Không sử dụng bộ kit phát hiện đã hết hạn sử dụng. Liên hệ ngay với văn phòng đại diện của Ventana tại địa phương nếu thuốc thử có dấu hiệu không ổn định.

## **Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu phân tích**

Các mẫu mô được cố định bởi formalin, vùi trong paraffin, theo quy trình thường quy thích hợp sử dụng với thuốc thử này. Mỗi lát cắt cần được cắt đến độ dày thích hợp (khoảng 4 µm) và được đặt trên một lam kính Superfrost Plus (tích điện dương). Dung dịch dung cố định mô được đề nghị sử dụng là dung dịch đệm formalin trung tính 10%.<sup>2</sup> Ventana đã thẩm định các mẫu thử được cố định trong kềm formalin hoặc alcohol formalin cũng là loại mẫu phù hợp. Mẫu được cố định trong Prefer cũng cho thấy một bản sao được phát hiện với xét nghiệm này, nhưng hình thái mô có thể bị ảnh hưởng. Không sử dụng các mô cố định bởi AFA hoặc chất định hình Bouin cho xét nghiệm này. Các mẫu cố định >6 giờ với AFA hoặc chất định hình Bouin có hiệu quả nhuộm yếu hoặc không bắt màu nhuộm.<sup>3</sup> Ngoài các xét nghiệm của Ventana, các nghiên cứu gần đây đã phát hiện phần lớn kết quả không rõ ràng của gen HER2 thu được từ FISH liên quan đến các yếu tố tiền phân tích bao gồm cố định dưới mức và quá mức,<sup>4</sup> cũng như cố định muộn.<sup>5</sup> Thực hiện chính xác quy trình cố định (như sử dụng một người/thiết bị chuyên dụng để đảm bảo thời gian cố định tối thiểu là 6 giờ) giúp giảm 64% các trường hợp không rõ ràng từ 10.8% lỗi còn 3.4%. Mẫu được cố định trong formalin <6 giờ có thể bị mất tín hiệu và phân cắt nhân quá mức, như quan sát thấy khi nhuộm với hematoxylin nhạt/yếu.

Lát cắt dày hơn 4 µm có thể cần được xử lý với protease mạnh hơn điều kiện khuyến cáo và có thể cho thấy có bọt trong nhân nhiều hơn so với lát cắt mỏng hơn do lượng paraffin dư trong mô. Có thể phải khử paraffin trong alcohol và xylene trước khi nhuộm trên máy. Hiện tượng bọt trong nhân có thể xảy ra trong hai bối cảnh khác: 1) cố định quá mức (ví dụ >24 giờ) có thể khắc phục được với quy trình khử paraffin ngoại tuyến đề cập ở trên, và 2) cố định dưới mức (1-3 giờ với formalin) có ít bọt rời rạc trong nhân. Điều này có thể khắc phục tại thời điểm cố định 3 giờ bằng cách thay đổi phương pháp xử lý tế bào/xử lý protease, nhưng ở thời điểm 1 giờ hầu như không thể khắc phục.

## **CẢNH BÁO VÀ THẬN TRỌNG**

1. Dùng trong chẩn đoán *in vitro* (IVD).
2. Làm sạch bình chứa chất thải trước khi bắt đầu nhuộm trên máy. Nếu biện pháp phòng ngừa này không được thực hiện, các bình chứa chất thải có thể tràn và người sử dụng có nguy cơ trượt và ngã. Trên máy BenchMark XT, một lượt chạy sẽ chỉ bắt đầu khi bình chứa chất thải được làm sạch trước khi bắt đầu chạy.
3. ProClin 300 được sử dụng làm chất bảo quản trong hai thuốc thử trong số các thuốc thử này. Nó được phân loại là chất kích ứng và có thể gây mẫn cảm khi tiếp xúc với da. Thận



trọng khi thao tác các thuốc thử. Tránh để thuốc thử tiếp xúc với mắt, da và niêm mạc. Sử dụng quần áo bảo hộ và găng tay thích hợp.

4. Nếu thuốc thử tiếp xúc với các vùng da nhạy cảm, rửa với thật nhiều nước. Tránh hít thuốc thử.
5. Vật liệu có nguồn gốc từ người hoặc động vật nên được xử lý như chất sinh học nguy hiểm tiềm tàng và với các biện pháp đề phòng thích hợp.
6. Tránh để nhiễm vi sinh vật vào thuốc thử vì có thể làm sai lệch kết quả.
7. Tham khảo hướng dẫn sơ tại về phương pháp khuyến cáo để loại bỏ chất thải.

## HƯỚNG DẪN SỬ DỤNG

### Quy trình nhuộm được đề xuất

Bộ kit phát hiện *ultraView* SISH DNP được phát triển để sử dụng trên các máy nhuộm tiêu bản tự động dòng BenchMark của Ventana kết hợp với các thuốc thử phụ của Ventana. Các thông số của quy trình tự động hóa có thể được hiển thị, in và chỉnh sửa theo quy trình ghi trong Hướng dẫn vận hành của mỗi máy nhuộm tiêu bản tự động riêng biệt. Các thông số vận hành khác cho các máy BenchMark của Ventana đã được cài đặt sơ bộ tại xưởng sản xuất.

Quy trình nhuộm trên các máy BenchMark của Ventana như sau (để biết hướng dẫn chi tiết và các lựa chọn quy trình bổ sung, tham khảo Hướng dẫn vận hành và tờ hướng dẫn sử dụng của mẫu dò Ventana được sử dụng):

1. Dán nhãn mã vạch lên tiêu bản tương ứng với quy trình nhuộm của mẫu dò sử dụng.
2. Đặt ống đựng mẫu dò, bộ kit phát hiện phù hợp và các thuốc thử phụ cần thiết vào khay thuốc thử và đặt khay thuốc thử lên máy nhuộm tiêu bản tự động.
3. Kiểm tra hóa chất cơ bản và dọn sạch chất thải trước khi bắt đầu chạy.
4. Đặt các tiêu bản vào máy nhuộm tiêu bản tự động.
5. Khởi động máy nhuộm.
6. Khi kết thúc quá trình, lấy các tiêu bản ra khỏi máy nhuộm tiêu bản tự động.

### Quy trình xử lý khuyến cáo sau chạy máy

#### Xét nghiệm nhuộm màu duy nhất với bộ kit phát hiện *ultraView* SISH DNP

Lưu ý: Để đảm bảo hoàn tất quá trình khử nước, các bể ethanol cần được đổi thường xuyên và bổ sung một bể ethanol 100 % thứ ba.

1. Để loại bỏ dung dịch phủ bảo vệ (LCS), rửa tiêu bản lần lượt trong 2 dung dịch rửa chén nhẹ (không dùng chất tẩy thiết kế cho máy rửa chén tự động).
2. Rửa kỹ tiêu bản với nước cất, trong khoảng 1 phút. Loại bỏ nước dư.
3. Chuyển tiêu bản vào bể ethanol 80 % trong khoảng 1 phút.
4. Chuyển tiêu bản vào bể ethanol 90 % trong khoảng 1 phút.
5. Chuyển tiêu bản vào bể ethanol 100 % trong khoảng 1 phút.
6. Chuyển tiêu bản vào bể ethanol 100 % thứ hai trong khoảng 1 phút.
7. Nhúng tiêu bản 10 lần vào acetone 100 % (chỉ sử dụng một lần, thay acetone sau mỗi lượt nhuộm). Không để tiêu bản trong acetone.
8. Chuyển tiêu bản vào bể xylene đầu tiên trong khoảng 30 giây.
9. Chuyển tiêu bản vào bể xylene thứ hai trong khoảng 30 giây.

10. Đặt lam kính phủ lên tiêu bản.

### **Xét nghiệm nhuộm màu kép kết hợp với bộ kit phát hiện *ultraView Red ISH DIG***

Lưu ý: Chất tạo màu Fast Red tan trong cồn và acetone. Không sử dụng alcohol và acetone hoặc rửa quá lâu trong xylene để khử nước và làm sạch tiêu bản.

1. Để loại bỏ dung dịch phủ bảo vệ, rửa tiêu bản lần lượt trong 2 dung dịch rửa chén nhẹ (không dùng chất tẩy thiết kế cho máy rửa chén tự động).
2. Rửa kỹ tiêu bản với nước khử ion, trong khoảng 1 phút. Loại bỏ nước dư.
3. Sấy tiêu bản trong tối thiểu 15 phút trong tủ sấy (45-60°C) hoặc sấy bằng không khí khô ở nhiệt độ môi trường. Đảm bảo tiêu bản khô hoàn toàn trước khi phủ lam kính.
4. Chuyển tiêu bản vào bể xylene để rửa nhanh trong khoảng 30 giây.
5. Đặt lam kính phủ lên tiêu bản.

### **Quy trình kiểm tra chất lượng**

#### **Mẫu mô chứng dương**

Xem tờ hướng dẫn sử dụng của mẫu dò sử dụng nếu cần.

#### **Mẫu mô chứng âm**

Xem tờ hướng dẫn sử dụng của mẫu dò sử dụng nếu cần.

#### **Thuốc thử chứng dương.**

Xem tờ hướng dẫn sử dụng của mẫu dò sử dụng nếu cần.

### **Những sai lệch không xác định**

Những sai lệch không xác định trong các mẫu chứng cần được tham khảo ngay lập tức với văn phòng Ventana tại địa phương. Nếu kết quả kiểm tra chất lượng không đạt các tiêu chuẩn cần thiết thì kết quả của bệnh nhân không có giá trị. Nếu sai lệch xảy ra, tham khảo phần Xử lý sự cố trong tờ hướng dẫn này. Cần tìm ra nguyên nhân và khắc phục, và chạy lại mẫu bệnh phẩm.

### **Thẩm định xét nghiệm**

Trước khi bắt đầu sử dụng một hệ thống nhuộm trong quy trình chẩn đoán, hiệu năng của mẫu dò cần phải được thẩm định bằng cách làm xét nghiệm trên một loạt các mẫu mô có đặc tính hiệu năng ISH đã được xác định (tham khảo tờ hướng dẫn sử dụng của mẫu dò thích hợp), và Khuyến cáo về Kiểm tra Chất lượng của Chương trình thẩm định phòng xét nghiệm của Hội Giải phẫu bệnh Hoa Kỳ, phần Danh mục Giải phẫu bệnh tế bào,<sup>6</sup> và/hoặc Hướng dẫn đã được phê duyệt của CLSI.<sup>7</sup> Các quy trình kiểm tra chất lượng này cần được lặp lại với mỗi lô hoặc thuốc thử mới, hay bất cứ khi nào có sự thay đổi các thông số xét nghiệm.

### **Biện luận kết quả**

Ventana *ultraView SISH DNP Detection Kit* tạo thành sản phẩm phản ứng có màu đen kết tủa tại các vị trí được định vị bởi mẫu dò và kháng thể sơ cấp. Một người đọc đủ tiêu chuẩn có kinh nghiệm về quy trình lai tại chỗ phải đánh giá các mẫu chứng và đánh giá sản phẩm nhuộm trước khi biện luận kết quả. Xem mô tả chi tiết về thẩm định mô chứng trong tờ hướng dẫn sử dụng của từng mẫu dò tương ứng thích hợp.

## HẠN CHẾ

### Các hạn chế chung

1. ISH là một quy trình chẩn đoán gồm nhiều bước đòi hỏi phải được đào tạo chuyên môn trong việc lựa chọn thuốc thử và mô thích hợp, cố định, xử lý, chuẩn bị tiêu bản lai hóa in situ, và biện luận kết quả nhuộm.
2. Sự nhuộm mô phụ thuộc vào quy trình thao tác và xử lý mô trước khi nhuộm. Cố định, đông lạnh, rửa đông, rửa, sấy, gia nhiệt, cắt lát không đúng, hay để nhiễm với các mẫu mô hay mẫu dịch khác có thể gây sai lệch, hoặc bị nhiễm kháng thể, hay kết quả âm tính giả. Các kết quả không nhất quán có thể là hậu quả của sự thay đổi phương pháp cố định và vùi, hay tính bất thường vốn có của mô.
3. Nhuộm tương phản quá mức hay không hoàn toàn có thể làm giảm tính chính xác của việc biện luận kết quả.
4. Biện luận lâm sàng bất kỳ mẫu bất màu dương tính, hay âm tính, cần phải được đánh giá cùng với tiền sử lâm sàng, hình thái học và các tiêu chuẩn mô bệnh học khác. Biện luận lâm sàng bất kỳ mẫu bất màu, hay âm tính, phải được bổ sung bằng các nghiên cứu hình thái học và các mẫu chứng thích hợp cũng như các xét nghiệm chẩn đoán khác. Bác sĩ Giải phẫu bệnh phải được đào tạo để quen thuộc với các loại mẫu dò, thuốc thử và các phương pháp nhuộm được sử dụng. Quá trình nhuộm phải được thực hiện ở một phòng thí nghiệm được chứng nhận, cấp phép dưới sự giám sát của một bác sĩ giải phẫu bệnh chịu trách nhiệm xem lại các tiêu bản đã nhuộm và đảm bảo tính chính xác của các chứng dương và âm.
5. Ventana cung cấp các thuốc thử với độ pha loãng tối ưu để sử dụng theo hướng dẫn kèm theo. Pha loãng nhiều hơn có thể làm mất sự nhuộm màu thích hợp; người sử dụng cần phải thẩm định lại quy trình nếu có bất cứ sự thay đổi nào.
6. Các mẫu chứng thích hợp phải được sử dụng và ghi nhận lại.
7. Các thuốc thử có thể cho các phản ứng không mong muốn trên các mô chưa được xét nghiệm trước đó. Không thể loại bỏ hoàn toàn khả năng phản ứng không mong muốn xảy ra trên các nhóm mô đã được xét nghiệm do sự đa dạng sinh học của biểu hiện kháng nguyên trên các tế bào ung thư, hay các mô bệnh khác.<sup>8</sup> Liên hệ với văn phòng Ventana tại địa phương để được chỉ dẫn về các phản ứng không mong muốn.
8. Kết quả dương tính giả có thể xảy ra do sự gắn protein không theo cơ chế miễn dịch hay do sản phẩm phản ứng của cơ chất.

### Các giới hạn chuyên biệt

1. Mỗi bước của quy trình kit phát hiện đã được tối ưu hóa trên các máy BenchMark của Ventana và được cài đặt trước. Vì có sự biến thiên trong quy trình cố định và xử lý mô, cần điều chỉnh một số biến số cho từng mẫu thử. Để có thêm thông tin về sự biến thiên trong cố định mẫu, tham khảo mục Xử lý sự cố và tài liệu “Immunohistochemistry Principles and Advances” (“Các nguyên tắc Hóa mô miễn dịch và các tiến bộ”)<sup>9</sup> hoặc “Immunomicroscopy: A Diagnostic Tool for the Surgical Pathologist” (“Hiển vi miễn dịch: Công cụ chẩn đoán cho Bác sĩ giải phẫu bệnh”).<sup>10</sup>
2. Không sử dụng các mô cố định với AFA hoặc chất định hình Bouin cho xét nghiệm này (Xem mục Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu phân tích).
3. Bộ kit phát hiện, cùng với mẫu dò, kháng thể sơ cấp và các phụ kiện của Ventana, phát hiện các trình tự acid nucleic đặc hiệu còn tồn tại sau các bước cố định thường quy bằng formalin, xử lý và cắt lát mô. Người sử dụng nếu thay đổi quy trình xét nghiệm, nhiệt độ,



hoặc thời gian ủ được đề nghị phải chịu trách nhiệm biện luận và thẩm định kết quả của bệnh nhân.

## ĐẶC TÍNH HIỆU NĂNG

1. Độ tái lập của bộ kit phát hiện ultraView SISH DNP được kiểm tra qua năm trường hợp ung thư biểu mô vú ở người khác nhau (đại diện cho khoảng động học của trạng thái gen HER2) và các tiêu bản HER2 Dual ISH 3-in-1 Xenograft trong năm ngày không liên tục trên sáu máy (2 BenchMark, 2 BenchMark XT, 2 BenchMark ULTRA). Số bản sao trung bình của HER2 và Nhiễm sắc thể số 17 thu được từ mỗi máy (qua 3 hệ thống) trong mỗi lần của năm lượt chạy. Trên 95% tất cả các tiêu bản được nhuộm và thẩm định trong nghiên cứu này (tổng cộng 506) đạt yêu cầu tương thích của tiêu bản và tạo ra số lượng bản sao tái lập của HER2 và Nhiễm sắc thể số 17 với %CVs < 10% qua tất cả các ngày và hệ thống kiểm tra.
2. Độ tái lập qua các lô của bộ kit phát hiện ultraView SISH DNP được xác định bằng cách kiểm tra mỗi lô của 3 lô bộ mẫu dò INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail với 3 lô của bộ kit phát hiện ultraView SISH DNP và ultraView Red ISH DIG trên các tiêu bản giống nhau của 3 trường hợp ung thư biểu mô vú ở người và các tiêu bản HER2 Dual ISH 3-in-1 Xenograft. Tất cả tiêu bản (100%) đạt yêu cầu tương thích của tiêu bản và được định lượng bởi một người đọc đủ tiêu chuẩn cho các bản sao thô của HER2 và Chr17 trong 20 nhân/mẫu thử. Các dữ liệu này được phân tích thành phần khác biệt dựa trên mô hình ảnh hưởng ngẫu nhiên, và kết quả cho thấy tất cả tiêu chuẩn chấp nhận đều đạt trong nghiên cứu này. Các giá trị %CV qua các lô mẫu dò, lô của bộ kit phát hiện, và trong một lần chạy đều <11%, biểu thị độ chính xác xuất sắc của xét nghiệm.
3. Độ nhạy và độ đặc hiệu lâm sàng được xác định bởi một nghiên cứu so sánh xét nghiệm INFORM HER2 DNA Probe, trong đó số lượng bản sao HER2 và Nhiễm sắc thể số 17 được xác định trên các tiêu bản riêng biệt chỉ sử dụng bộ phát hiện SISH, với xét nghiệm INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, trong đó số lượng bản sao HER2 và Nhiễm sắc thể số 17 được xác định trên một tiêu bản duy nhất sử dụng bộ phát hiện SISH và Red ISH. Một nhóm gồm 213 trường hợp ung thư biểu mô vú chứa một hỗn hợp ~50/50 trạng thái gen khuếch đại và không khuếch đại được xét nghiệm với cả hai xét nghiệm trên máy nhuộm tiêu bản tự động BenchMark XT (Bảng 1). Kết quả thể hiện chi tiết tỷ lệ tương đồng âm tính, dương tính và tổng thể trong các mẫu lâm sàng của xét nghiệm INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail (nhuộm hai màu) với INFORM HER2 DNA Probe (nhuộm đơn màu) được trình bày trong Bảng 2.

**Bảng 1.** Sự tương đồng giữa INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail sử dụng bộ kit phát hiện ultraView SISH DNP và ultraView Red ISH DIG và INFORM HER2 DNA Probe chỉ sử dụng bộ phát hiện SISH.

Trạng thái khuếch đại HER2 Dual ISH	Trạng thái khuếch đại HER2 SISH	
	Khuếch đại	Không khuếch đại
Khuếch đại	101	7
Không khuếch đại	13	92

**Bảng 2.** Tóm tắt tỷ lệ đồng thuận âm tính, dương tính và tổng thể cho INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail sử dụng bộ kit phát hiện ultraView SISH DNP và ultraView Red ISH DIG so sánh với INFORM HER2 DNA Probe chỉ sử dụng bộ phát hiện SISH.

Tỷ lệ đồng thuận âm tính		Tỷ lệ đồng thuận dương tính		Tỷ lệ đồng thuận tổng thể	
Dữ liệu thô / Tổng trường hợp	Phần trăm (95% Điểm CI)	Dữ liệu thô / Tổng trường hợp	Phần trăm (95% Điểm CI)	Dữ liệu thô / Tổng trường hợp	Phần trăm (95% Điểm CI)
92/99	92.9 (86.1 - 96.5)	101/114	88.6 (81.5 - 93.2)	193/213	90.6 (85.9 - 93.8)

## XỬ LÝ SỰ CỐ

Vui lòng tham khảo mục Xử lý sự cố trong tờ hướng dẫn sử dụng của mẫu dò thích hợp.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Elias JM, Gown AM, Nakamura RM, Wilbur DC, Herman GE, Jaffe ES, Battifora H, Brigati DJ. Quality control in immunohistochemistry. Report of a workshop sponsored by the Biological Stain Commission. Am J Clin Pathol. 1989;92(6):836- 843.
- Sheehan DC, Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. 2nd Edition. St. Louis, MO: The C.V. Mosby Company; 1980.
- Baloglu G, Haholu A, Kucukodaci Z, Yilmaz I, Yildirim S, Baloglu H. The effects of tissue fixation alternatives on DNA content: a study on normal colon tissue. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2008;16:485-492.
- Middleton LP et al. Implementation of American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists HER2 Guideline Recommendations in a tertiary care facility increases HER2 immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization concordance and decreases the number of inconclusive cases. Arch Pathol Lab Med. 2009;133:775-780.
- Khoury T, Sait S, Hwang H, Chandrasekhar R, Wilding G, Tan D, Kulkarni S. Delay to formalin fixation effect on breast biomarkers. Mod Pathol. 2009;22:1457-1467.
- College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2001.
- CLSI (formerly NCCLS). Quality Assurance for Immunocytochemistry: Approved Guideline. CLSI document MM4-A- (ISBN 1-56238-396-5). CLSI, 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. 1991;66(4):194-199.
- Roche PC, Hsi ED. Immunohistochemistry-Principles and Advances. Manual of Clinical Laboratory Immunology. 6th edition. In: NR Rose, ed. ASM Press; 2002.
- Taylor C, Cote RJ. Immunomicroscopy: A Diagnostic Tool for the Surgical Pathologist. 2nd Edition. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Company; 1986.

## SỞ HỮU TRÍ TUỆ

Ventana, BenchMark, ultraView, INFORM, và logo Ventana là các thương hiệu của Roche.

Tất cả các thương hiệu khác là tài sản của các nhà sở hữu tương ứng.

Ventana cấp cho khách hàng bản quyền sử dụng chỉ một lần theo các bằng sáng chế sau: 6045759, 6192945, 6416713, 6945128, và 7378058 và các đối tác nước ngoài.

## THÔNG TIN LIÊN HỆ



Roche Diagnostics GmbH

Sandhofer Strasse 116

D-68305 Mannheim

Đức



[www.ventana.com](http://www.ventana.com)