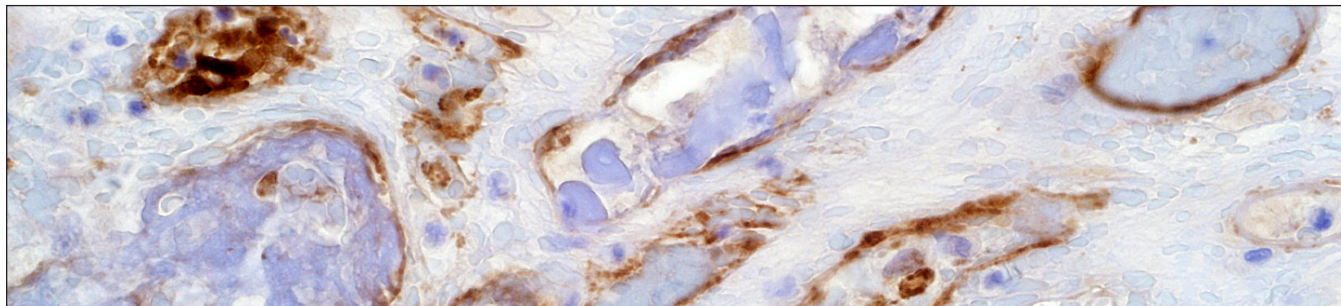


# anti-C4d (SP91)

## Rabbit Monoclonal Primary Antibody



### DOSTUPNOST PŘÍPRAVKU

Ventana Katalogové č. 760-4803	Roche Katalogové č. 06732364001	Popis Dávkovač na 50 testů
-----------------------------------	------------------------------------	----------------------------------

### DEFINICE SYMBOLŮ

<b>A</b>	ascites
<b>S</b>	supernatant

<b>E</b>	sérum
<b>KEY-CODE</b>	kód

### URČENÉ POUŽITÍ

Tato protilátka je určena pro diagnostiku *in vitro* (IVD).

Protilátka Cell Marque C4d (SP91) je určena pro kvalifikované laboratoře ke kvalitativní identifikaci přítomnosti souvisejících antigenů pomocí světelného mikroskopu v tkáňových řezech fixovaných formalínem a zalitých v parafínu zkušebními metodami IHC (imunohistochemie). Použití této protilátky je indikováno, následně po klinické diferenciální diagnostice, jako pomůcka při identifikaci a diferenciaci C4d v rámci panelu protilátek, klinické anamnézy pacienta a dalších diagnostických testů vyhodnocených kvalifikovanými patology.

### SOUHRN A VYSVĚTLENÍ

C4d je stabilní rozdělený zbytkový produkt klasického aktivačního doplňku, který se kovalentně váže na endotel a bazální membránu po indukci klasické dráhy indukované protilátkou. Jako určený marker protilátkově zprostředkovaného akutního odmítnutí alotransplantátu ledvin (AR) a díky jeho náklonnosti k endotelu může být tato složka detekována v peritubulárních kapilárách při chronickém odmítnutí alotransplantátu, akutním vaskulárním odmítnutí, akutním buněčném odmítnutí a hraničním odmítnutí. Bylo prokázáno, že to úzce koreluje s přežitím po transplantaci ledvin<sup>1-3</sup>. Anti-C4d v kombinaci s anti-C3d může být využita jako nástroj pro diagnostiku AR, který může sloužit jako výstražné upozornění na nutnost nasadit agresivní léčbu proti odmítnutí.<sup>1-6</sup>

### PRINCIPY A POSTUPY

Protilátka anti-C4d (SP91) se používá jako primární protilátka při imunohistochemickém barvení tkáňových řezů fixovaných formalínem a zalitých v parafínu. Obecně umožňuje imunohistochemické barvení ve spojení s detekčním systémem se streptavidinem a biotinem vizualizací antigenů prostřednictvím sekvenční aplikace konkrétní protilátky (primární protilátka) proti antigenu, sekundární protilátky (spojovací protilátka) proti primární protilátce, komplexu enzymů a chromogenního substrátu, která je proložena promývacími kroky. Alternativně lze použít detekční systém bez biotinu. Enzymatická aktivace chromogenu vede k viditelnému reakčnímu produktu v místě antigenu. Vzorek pak může být doplňkově obarven a zakryt krycím sklíčkem. Výsledky se interpretují pomocí světelné mikroskopie a pomáhají v diferenciální diagnostice patofyziologických procesů, které mohou a nemusejí souviset s konkrétním antigenem.

Protilátka Anti-C4d (SP91) je optimálně zředěná, aby byla vhodná pro detekční soupravy a barvicí automaty Ventana Roche. 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 Roche opláchnuty za účelem ukončení probíhající reakce a k odstranění nenavázaného materiálu, který by mohl bránit požadované reakci v následujících krocích. Aby odpařování vodných činitelů ze vzorků na podložních sklech bylo co nejmenší, aplikuje barvicí automat na sklíčka krycí roztok. Více informací o operacích přístroje naleznete v příslušném Návodu k použití barvicího automatu Ventana Roche.

### MATERIÁLY A METODY

#### Dodávaná činidla

Jeden dávkovač primární protilátky C4d (SP91) obsahuje dostatečné množství předředěného činidla na 50 testů. Protilátka je zředěna v tlumivém roztoku Tris, pH 7,3 - 7,7, s 1% BSA a < 0,1% azidem sodným.

Rozsah koncentrace imunoglobulinu v tomto přípravku je 2,5-10,0 µg/ml.

Koncentrace imunoglobulinu v činidle je uvedena na štítku přípravku.

Izotyp: IgG

Pro údaje o zdroji protilátky viz štítek přípravku.

### Rekonstituce, smísení, ředění nebo titrace

Protilátka je optimalizována pro použití v barvicím automatu Ventana Roche ve spojení s detekčními systémy Ventana Roche. Není vyžadována rekonstituce, smísení, ředění nebo titrace. Další ředění může způsobit ztrátu barvení antigenu. Uživatel musí všechny takové změny ověřit. Rozdíly ve zpracování tkáně a technických postupech v laboratoři mohou způsobit výraznou variabilitu výsledků a vyžadují pravidelné používání kontrolních vzorků. (Viz část Postupy kontroly kvality).

### Potřebné nedodávané materiály a činidla

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

- |  |  |
|--|--|
| 1. Pozitivní a negativní kontrolní vzorek tkáně  | 13. Specifický software pro detekční systém (pouze barvicí automat ES®)                    |
| 2. Mikroskopická sklíčka, s pozitivním nábojem   | 14. Barvicí roztok APK (barvicí automaty ES® a NexES IHC®)                                 |
| 3. Sušicí pec schopná udržovat teplotu 58 - 60 °C ± 5 °C   | 15. Roztok Liquid Coverslip™ (barvicí automaty ES® a NexES IHC®)                           |
| 4. Štítky s čárovými kódy (vhodné štítky s čárovými kódy pro negativní kontrolu a testovanou primární protilátkou) | 16. Roztok EZ Prep™ (barvicí automaty BenchMark®, BenchMark® XT a BenchMark® ULTRA)        |
| 5. Barvicí misky nebo lázně  | 17. Reakční tlumivý roztok (barvicí automaty BenchMark®, BenchMark® XT a BenchMark® ULTRA) |
| 6. Stopky  | 18. LCS (barvicí automaty BenchMark®, BenchMark® XT a BenchMark® ULTRA)                    |
| 7. Zasilovač (pokud je vhodné)   | 19. Hematoxylin nebo jiné doplňkové barvivo  |
| 8. Xylen nebo substituty xylenu  | 20. Negativní kontrolní činidlo  |
| 9. Etanol nebo jiný alkohol  | 21. Nosné médium   |
| 10. Deionizovaná nebo destilovaná voda   | 22. Krycí sklíčko  |
| 11. Barvicí automaty ES®, NexES IHC®, BenchMark®, BenchMark® XT a BenchMark® ULTRA                                 | 23. Světelný mikroskop (40-400x)   |
| 12. Detekční soupravy iVIEW™ DAB (Preferovaný), ultraView™, AEC, V Red (ALK PHOS) a Enhanced V Red                 |  |

### Skladování a zacházení

Skladujte při 2 - 8 °C. Nezmrazujte.

Aby byl zajištěn správný výkon činidla a stabilita protilátky, musí se dávkovač po každém použití uzavřít víčkem a musí se okamžitě umístit ve vertikální poloze do chladničky.

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

Tento produkt nejeví žádné známky indikující nestabilitu, proto by se současně s testováním neznámých vzorků měly provádět testy s pozitivními i negativními kontrolními vzorky. V případě podezřelých známek nestability činidla se obraťte na zákaznický servis Cell Marque.

### Sběr vzorků a příprava pro analýzu

Pro použití této primární protilátky s detekčními systémy Ventana Roche a barvicím automatem Ventana Roche (viz Potřebné materiály a činidla, která se nedodávají) jsou vhodné tkáně zpracované běžným způsobem, fixované v neutrálním pufovaném formalínu a zalité v parafínu. Doporučené vhodné fixativum je 10% neutrální pufovaný formalín. V důsledku delší fixace nebo speciálních procesů, jako např. dekalifikace preparátů kostní dřevě, mohou být získány variabilní výsledky.

Každý řez je třeba nařezat na správnou tloušťku (asi 3 µm) a umístit na pozitivně nabitě podložní sklíčko. Sklíčka obsahující řezy tkání je třeba sušit po dobu nejméně 2 hodin (avšak ne déle než 24 hodin) při teplotě 58 až 60 °C ± 5 °C.

### UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ PŘEDPISY

- Při zacházení s činidly buďte opatrní. Používejte jednorázové rukavice a laboratorní pláště při manipulaci s podezřelými karcinogenními nebo jedovatými materiály (například: xylen).
- Vyvarujte se kontaktu činidel s očima nebo sliznicemi. Jestliže se činidla dostanou do kontaktu s citlivými oblastmi, omyjte je vydatným množstvím vody.
- Se vzorky pacientů a všemi materiály, které s nimi přišly do styku, je třeba zacházet jako s biologicky nebezpečnými materiály a zneškodňovat je podle správných opatření. Nikdy nepipetujte ústy.
- Vyvarujte se mikrobiologické kontaminaci činidel, protože by to mohlo způsobit nesprávné výsledky.
- Doby a teploty inkubace jiné než uvedené mohou vést k chybným výsledkům.
- Činidla musí být případně zředěny a další ředění může vést ke ztrátě barvení antigenu. Jakékoli změny tohoto druhu musí uživatel ověřit.
- Při použití v souladu s pokyny není tento přípravek klasifikován jako nebezpečná látka. Konzervační látkou v činidle je azid sodný s koncentrací nižší než 0,1 %, který při uvedené koncentraci nenaplnuje kritéria OSHA (USA) pro nebezpečnou látku. Viz bezpečnostní list.
- Uživatel musí ověřit jakékoli skladovací podmínky, které jsou jiné, než je uvedeno v příbalovém letáku.
- Ředící roztok může obsahovat bovinní sérový albumin a supernatant může obsahovat bovinní sérum. Přípravky obsahující fetální bovinní sérum a přípravky obsahující bovinní sérový albumin jsou kupovány od komerčních dodavatelů. Certifikáty původu pro zvířecí zdroje použité v těchto přípravcích jsou uloženy ve společnosti Cell Marque. Tyto certifikáty dokládají, že zdroj bovinních přípravků je ze země se zanedbatelným rizikem BSE a uvádějí zdroje bovinních přípravků z USA a Kanady.
- Stejně jako v případě jiných produktů odvozených z biologických zdrojů je třeba používat správné postupy zacházení.

## NÁVOD K POUŽITÍ

### Jednotlivé kroky postupu

Primární protilátky Cell Marque byly vyvinuty pro použití v barvicích automatech Ventana Roche ve spojení s detekčními soupravami a příslušenstvím Ventana Roche.

### Příprava dávkovače, pokyny k manipulaci a skladování

#### Příprava k použití:

V případě použití: Pro automatické přístroje NexES® IHC, BenchMark® Series a Discovery®, verze softwaru 8.0 a vyšší.

1. Odstranění přepravního klíče  
Pro odstranění přepravního klíče (podle obrázku A) odstraňte klobouček trysky, držte dávkovač ve vztyčené poloze a zatáhněte za poutko klíče pro jeho uvolnění. NEZAKRÝVEJTE klobouček trysky, mohlo by dojít k trvalému poškození dávkovače. NEMAČKEJTE dávkovač při odstraňování klíče, mohlo by dojít k vylištění činidla. Přepravní klíč zlikvidujte.
2. Příprava dávkovače na použití  
Odstraňte klobouček trysky a umístěte jen na držák kloboučku. V kloboučku trysky se může nacházet tekutina. Nainstalujte dávkovač do karuselu na činidlo. Zapojený dávkovač je „připraven k použití“ pomocí softwaru NexES® verze 8.0 nebo vyšší. Před každým cyklem software automaticky zjistí na karuselu nový dávkovač a naplní jej. Manuální naplnění dávkovače není nutné a NIKDY by nemělo být prováděno, protože by mohlo dojít k plýtvání činidlem a ke snížení počtu dostupných dávek.

*Poznámka - starší verze softwaru: Po odstranění přepravního klíče odstraňte klobouček trysky a NAPLNĚTE DÁVKOVAČ RYCHLÝM PUMPOVÁNÍM 3 AŽ 4 TAHY, přičemž dávkovač musí být ve svislé poloze. Naplnění je nutné pouze před prvním použitím. (Viz část Kontrola naplnění před použitím.)*

3. Skladování a zacházení s dávkovačem  
Pro zajištění spolehlivého provozu musí být nepoužívaný dávkovač vždy uzavřen víčkem a NIKDY by nemělo docházet k manuálnímu dávkování. (Viz část Co dělat a nedělat.)

### Co dělat a nedělat

#### CO DĚLAT:

1. Před každým použitím zkontrolujte plnicí komoru a meniskus. (Viz část Kontrola naplnění před použitím).
2. Klobouček trysky skladujte na dávkovači. Držák je také součástí dodávky.
3. Dávkovač zakryjte, když se nepoužívá, abyste zabránili vypařování. Nepoužívané dávkovače ve stojanu pro činidla lze také uzavřít (zdola pod stojanem).
4. Skladujte dávkovače ve vztyčené poloze ve stojanu a na karuselu s činidly.
5. Při umístění dávkovače na karuselu sevřete spojku, abyste zabránili náhodnému ručnímu dávkování.

#### CO NEDĚLAT:

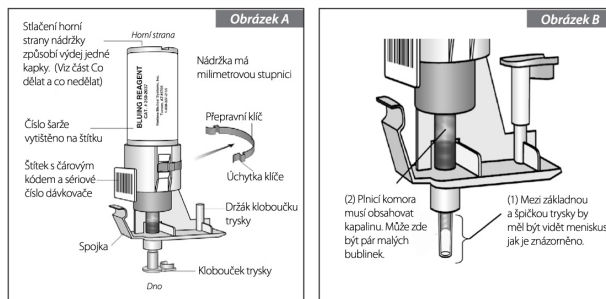
1. Neprovádějte ruční dávkování v obrácené poloze (spodní stranou vzhůru). Došlo by ke ztrátě náplně, jejíž obnova by mohla být nemožná.
2. Neprovádějte ruční dávkování s nasazeným kloboučkem trysky. Mohlo by dojít k trvalému poškození dávkovače.
3. Neprovádějte ruční dávkování nebo plnění před každým použitím. Není to nutné a dochází k plýtvání činidlem.
4. Nedržte nádrž v dolní poloze. Při stisknutí nádrže by mohlo dojít k úniku tekutiny.
5. Nedávejte karusely na sebe, když jsou v nich dávkovače. Z dávkovačů by se činidlo mohlo rozlévat.

#### Kontrola naplnění před použitím:

Odstraňte klobouček trysky a podívejte se na obrázek B.

Dávkovač je připraven k použití, když:

1. Meniskus je přítomný v oblasti znázorněné na obrázku B.
2. Plnicí komora obsahuje kapalinu.



Postupy barvení pomocí barvicích automatů Ventana Roche jsou následující: Další podrobné pokyny a další vlastnosti protokolu naleznete v Návodu k obsluze.

#### Doporučené barvicí protokoly pro C4d (SP91)

##### ultraView™:

1. Vložte sklíčka, protilátku a dávkovače detekční sady ultraView™ do přístroje BenchMark®.
2. Vyberte standardní předúpravu CC1
3. Inkubace protilátky by měla být nastavena na 32 minut při 37 °C.
4. Spusťte cyklus.
5. Po dokončení barvicího cyklu vyjměte sklíčka z přístroje a dobře opláchněte mycím tlumivým roztokem.
6. Zakryjte sklíčkem.

**OptiView:**

1. Vložte sklíčka, protilátku a dávkovače detekční soupravy do přístroje BenchMark\*\*.
2. Vyberte 32 minutovou předběžnou úpravu CC1.
3. Vyberte předběžný primární inhibitor peroxidázy.
4. Inkubace protilátky by měla být nastavena na 32 minut při 37 °C.
5. Spustte cyklus.
6. Po dokončení barvicího cyklu vyjměte sklíčka z přístroje a dobře opláchněte mycím tlumivým roztokem.
7. Zakryjte sklíčkem.

**POSTUPY KONTROLY KVALITY**
**Pozitivní kontrolní vzorek tkáně**

Při každém provedeném barvicím postupu je třeba použít i pozitivní kontrolní vzorek tkáně. Tkáň může obsahovat pozitivně i negativně zbarvené buňky nebo části tkáně a slouží jako pozitivní i negativní kontrolní vzorek tkáně. Kontrolní vzorky by měly být čerstvé vzorky z pítvy, biopsie nebo operace připravené nebo fixované co nejdříve a zalité stejným způsobem jako testované řezy. 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 pro optimální kontrolu kvality a pro detekci i malé degradace činidla vhodnější. Pozitivní tkáňová kontrola pro primární protilátku C4d (SP91) může zahrnovat následující:

Akutní odmítnutý transplantát ledviny	Membránové, Cytoplasmatická
Mandle/lymfatická uzlina	Membránové, Cytoplasmatická

Známé pozitivní kontrolní vzorky tkání by měly být používány pouze ke sledování správné funkce zpracovaných tkání a testových činidel, nikoliv jako pomůcka k formulaci specifické diagnózy vzorků pacientů. Pokud se u pozitivních kontrolních vzorků tkání neprojeví odpovídající pozitivní zbarvení, je nutno považovat výsledky testovacích vzorků za neplatné.

**Negativní kontrolní vzorek tkáně**

Jako negativní kontrolní vzorek tkáně lze použít stejnou tkáň, která se používá jako pozitivní kontrolní vzorek. Rozmanitost různých typů buněk, které se nacházejí ve většině řezů tkání, nabízí oblasti pro negativní kontrolní vzorky, 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 negativního kontrolního vzorku tkáně, je nutno považovat výsledky vzorků pacienta za neplatné.

**Nevysvětlené rozdíly**

Nevysvětlitelné rozdíly v kontrolních vzorcích by měly být ihned ohlášeny místnímu zastoupení společnosti Ventana Roche. Pokud se

výsledky kontrol neshodují se specifikacemi, výsledky pacienta jsou neplatné. Viz část Řešení problémů v tomto letáku. Zjistěte a napravte problém, a pak zopakujte celý postup se vzorky pacienta.

**Negativní kontrolní činidlo**

K usnadnění interpretace výsledků je třeba provést pro každý vzorek cyklus s negativní kontrolním činidlem. Negativní kontrolní činidlo se používá místo primární protilátky, aby se dalo vyhodnotit nespecifické zbarvení. Krycí sklíčko by mělo být ošetřeno negativním kontrolním činidlem, které odpovídá druhu hostitele primární protilátky a ideálně má stejnou IgG koncentraci. Inkubační doba negativního kontrolního činidla by měla odpovídat inkubační době primární protilátky.

**INTERPRETACE VÝSLEDKŮ**

Proces imunobarvení na barvicích automatech Ventana Roche způsobuje červeně zbarvený reakční produkt, který se vysráží v oblastech antigenu lokalizovaných primární protilátkou. V příbalovém letáku k příslušnému detekčnímu systému naleznete očekávané reakční barvy. Před interpretací výsledků musí pozitivní a negativní kontrolní vzorky vyhodnotit kvalifikovaný patolog se zkušeností s imunohistochemií.

**Pozitivní kontrolní vzorek tkáně**

Nejprve je nutné provést test zbarveného pozitivního kontrolního vzorku tkáně, a ověřit tak správnost funkce všech reagentů. Přítomnost správně zbarveného reakčního produktu uvnitř cílových buněk indikuje pozitivní reaktivitu. V příbalovém letáku k detekčnímu systému naleznete očekávané reakční barvy. V závislosti na délce inkubační doby a potenci použitého hematoxylinu způsobí kontrastní barvení bleděmodré až tmavomodré zbarvení buněčných jader. Přílišné nebo neúplné kontrastní zbarvení může ohrozit správnou interpretaci výsledků. Pokud se u pozitivních kontrolních tkání neprojeví příslušné pozitivní zbarvení, je nutno považovat výsledky testovaných vzorků za neplatné.

**Negativní kontrolní vzorek tkáně**

Negativní kontrolní vzorek tkáně je nutno testovat po pozitivním kontrolním vzorku, abychom ověřili specifitu značení cílového antigenu primární protilátkou. Nepřítomnost specifického zbarvení v negativním kontrolním vzorku potvrzuje nepřítomnost zkřížené reaktivity s buňkami nebo částmi buněk. Pokud se projeví specifické zbarvení v negativním kontrolním vzorku tkáně, 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, které nejsou optimálně fixované. K interpretaci výsledků barvení používejte pouze intaktní buňky. Nekrotické nebo degenerované buňky vykazují nespecifické zbarvení.

**Tkáň pacienta**

Vzorky pacienta se vyšetřují jako poslední. Intenzitu pozitivního zbarvení je nutno posuzovat v kontextu jakéhokoli zbarvení pozadí negativního kontrolního činidla. Jako u každého imunohistochemického testu, negativní výsledek znamená, že antigen nebyl detekován, nikoli že antigen není v testovaných buňkách nebo tkáni přítomen. Při



identifikaci falešných negativních reakcí může pomoci 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 musí interpretovat kvalifikovaný patolog.

### OMEZENÍ

- Toto činidlo je určeno pouze pro „odborné použití“, protože imunohistochemie je několikakrokový proces, který vyžaduje speciální školení při výběru vhodných činidel, tkání, fixace a zpracování, přípravě imunohistochemického sklíčka a interpretaci výsledků barvení.
- Pouze pro laboratorní užití.
- Pro diagnostiku *in vitro*.
- Barvení tkáně závisí na zacházení a zpracování tkáně 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. Následkem odchylek při fixaci a metodách zalévání, ale i následkem stávajících nerovnoměrností ve tkáni může docházet k inkonzistentním výsledkům.
- Přílišné nebo neúplné kontrastní zbarvení může ohrozit správnou interpretaci výsledků.
- Klinická interpretace jakéhokoli pozitivního zbarvení nebo jeho nepřítomnosti musí být posouzena v kontextu klinické anamnézy, morfologie, dalších histopatologických kritérií a rovněž dalších diagnostických testů. Tato protilátka je určena k použití v panelu protilátek. Je odpovědností kvalifikovaného patologa, aby se seznámil s protilátkami, činidly a metodami používanými k barvení preparátů. Barvení se musí provádět v certifikované laboratoři s příslušným oprávněním a pod dohledem patologa zodpovědného za hodnocení barvených podložních sklů a zaručení adekvátnosti pozitivních a negativních kontrolních vzorků.
- Společnost Cell Marque poskytuje protilátky v optimálním ředění pro použití podle pokynů. Jakákoli odchylka od doporučených testovacích postupů může způsobit neočekávané výsledky. Je nutno používat a zdokumentovat příslušné kontrolní vzorky. Uživatelé, kteří nedodrží doporučené postupy, musejí za těchto okolností přijmout zodpovědnost za interpretaci výsledků pacienta.
- Tento přípravek není určen pro průtokovou cytometrii; výkonové charakteristiky nebyly určeny.
- Činidla mohou prokázat neočekávané reakce na dříve netestovaných tkání. V důsledku biologické variability exprese antigenu v novotvarech nebo jiných patologických tkáních nelze zcela vyloučit možnost neočekávaných reakcí i v testovaných skupinách tkání. V případě zdokumentovaných neočekávaných reakcí kontaktujte zákaznický servis společnosti Cell Marque.
- Tkáně od osob infikovaných virem hepatitidy B a obsahující povrchový antigen hepatitidy B (HBsAg) mohou vykazovat nespecifické barvení křenové peroxidázy.

- Při použití v krocích blokování mohou normální séra ze stejného zvířecího zdroje jako sekundární protilátky způsobit falešně negativní nebo falešně pozitivní výsledky vzhledem k účinku autoimunitních protilátek nebo přirozených protilátek.
- Je možné pozorovat falešně pozitivní výsledky v důsledku neimunologické vazby bílkovin nebo reakčních produktů substrátu. Mohou být také způsobeny aktivitou pseudoperoxidázy (erythrocyty) a endogenní peroxidázy (cytochrome C) nebo endogenním biotinem (příklad: játra, mozek, prs, ledvina), v závislosti na použitém typu imunobarvení.
- Stejně jako u každého imunohistochemického testu, znamená negativní výsledek, že antigen nebyl zjištěn, nikoli, že antigen není přítomný ve vyšetřovaných buňkách nebo tkáni.

### Specifická omezení

- Protilátka je optimalizována pro inkubační dobu uvedenou v části Pokyny pro použití ve spojení s detekčními soupravami Ventana Roche a barvicími automaty Ventana Roche. Vzhledem k různým způsobům fixace a zpracování tkání může být potřeba pro jednotlivé vzorky prodloužit nebo zkrátit inkubační dobu primární protilátky.
- Protilátky Cell Marque, při použití v kombinaci s detekčními systémy a příslušenstvím Ventana Roche, detekují antigeny, které přečkají běžnou fixací formalínem, zpracování a rozřezání tkáně. Uživatelé, kteří nedodrží doporučené postupy, musejí za těchto okolností přijmout zodpovědnost za interpretaci výsledků pacienta.

### Souhrn očekávaných výsledků

Viz následující tabulky reaktivity:

Běžná studie			
Tkáň	Počet barvených	Celkem	Poznámky
Mozek	0	1	
Kůra nadledvin	0	1	
Vaječník	0	1	
Slinivka	0	1	
Příštitná tělíska	0	1	
Hypofýza	0	1	
Varle	0	1	
Štítná žláza	0	1	
Prso	0	1	
Slezina	0	1	
Mandle	1	1	
Brzlík	0	1	
Kostní dřev	0	1	
Plíce	0	1	
Srdce	0	1	
Jícen	0	1	
Břicho	0	1	

Běžná studie			
Tenké střevo	0	1	
Tlusté střevo	0	1	
Játra	0	1	
Slinná žláza	0	1	
Žlučník	0	1	
Ledviny	0	1	
Močový měchýř	0	1	
Prostata	0	1	
Děloha	0	1	
Vejcovod	0	1	
Močovod	0	1	
Čípek	0	1	
Kosterní sval	0	1	
Hladký sval	0	1	
Kůže	0	1	
Periferní nerv	0	1	
Mesothelium	0	1	
Tuk	0	1	
Placenta	0	1	

Tato protilátka barví normální tkáně, jak je uvedeno ve zveřejněné literatuře.

Studie postižené tkáně			
Tkáň	Počet barvených	Celkem	Poznámky
Karcinom prsu	0	16	
Kolorektální karcinom	0	24	
Akutní odmítnutí renálního transplantátu	7	7	

Tato protilátka barví nádory, jak je uvedeno ve zveřejněné literatuře.

### ŘEŠENÍ PROBLÉMU

1. Pokud pozitivní kontrola ukáže slabší zbarvení, než očekávané, je třeba během stejného cyklu na přístroji zkontrolovat další pozitivní kontrolní vzorky, aby se dalo stanovit, zda je to způsobeno primární protilátkou nebo některým z běžných sekundárních antigenů.
2. Pokud je pozitivní kontrola negativní, je třeba zkontrolovat, zda má sklíčko správný štítek s čárovým kódem. Jestliže je sklíčko opatřeno správným štítkem, je třeba během stejného cyklu na automatu zkontrolovat další pozitivní kontrolní vzorky, aby se dalo stanovit, zda je to způsobeno primární protilátkou nebo některým z běžných sekundárních antigenů. Sběr, fixace nebo odstraňování parafinů

z tkání mohlo být provedeno nesprávným způsobem. Sběr tkáně, její fixace a skladování musí probíhat ve správném postupu.

3. Dojde-li k nadměrnému zbarvení pozadí, mohou být přítomné vysoké hladiny endogenního biotinu. Měl by být zahrnut i krok blokování biotinu, pokud není používán detekční systém bez biotinu; v takovém případě by přítomný biotin nepříspěval k zbarvení pozadí.
4. Pokud není veškerý parafin odstraněn, je třeba proces odstranění parafinu opakovat.
5. Pokud je zbarvení specifické protilátky příliš intenzivní, je třeba stanovení opakovat s inkubační dobou zkrácenou o interval 4 minut, dokud není dosažena požadovaná intenzita zbarvení.
6. Pokud se tkáňový řez spláchne ze sklíčka, je třeba sklíčka zkontrolovat zda jsou kladně nabitá.

Správné postupy naleznete v části Jednotlivé kroky postupu, Návodu k obsluze k barvicímu automatu nebo kontaktujte zákaznický servis společnosti Cell Marque.

### LITERATURA

1. Jianghua, C et al. C4d as a significant predictor for humoral rejection in renal allografts. Clin Transplant 2005; 19:785-91.
2. Kayler, LK et al. Acute renal allograft rejection: diagnostic significance of focal peritubular capillary C4d. Transplantation 2008; 85:813-20.
3. Ranjan, P et al. The role of C4d immunostaining in the evaluation of the causes of renal allograft dysfunction. Nephrol Dial Transplant 2008; 23:1735-41. Epub 2007 Dec 8.
4. Nadasdy, GM et al. Comparative study for the detection of peritubular capillary C4d deposition in human renal allografts using different methodologies. Hum Pathol 2005; 36:1178-85.
5. Seemayer, CA et al. C4d staining of renal allograft biopsies: a comparative analysis of different staining techniques. Nephrol Dial Transplant 2007; 22:568-76.
6. Bouron-Dal Soglio, D et al. An immunohistochemical evaluation of C4d deposition in pediatric inflammatory liver diseases. Hum Pathol 2008; 39:1103-10.

### ODMÍTNUTÍ ODPOVĚDNOSTI

\* Ventana®, ultraView™, iVIEW™ a BenchMark® jsou registrované ochranné známky společnosti Ventana Medical Systems, Inc. Protilátky Cell Marque jsou vyvíjeny, vyráběny a distribuovány společností Cell Marque Corporation a jejich prodej prostřednictvím Ventana Medical Systems, Inc. (člen skupiny Roche Group) neznámá schválení, potvrzení nebo záruka výkonu těchto protilátek Cell Marque společnosti Ventana Medical Systems, Inc.

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

 EMERGO EUROPE  
Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague, NL.



CM TEMPLATE #1.2