

## FITC Anti-IgA Primary Antibody

Katalogové číslo 760-2681

### INDIKACE A POUŽITÍ

#### Určené použití

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

Primární protilátka FITC anti-IgA (immunoglobulin A) Primary Antibody od společnosti Ventana® Medical Systems (Ventana) je koží polyklonální protilátka značená fluoresceinem, specificky cílená proti lidskému IgA. Tuto reagensii je třeba používat ve spojení s panelem protilátek jako pomocný prostředek při identifikaci imunoglobulinu A v cílové tkáni IgA (např. v diagnostice renální nebo dermální patologie). FITC anti-IgA je určena ke kvalitativnímu barvení řezů zmrazené tkáně na barvicím automatu Ventana.

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

#### Souhrn a vysvětlení

Fluorescenční protilátky se používají k detekci specifických antigenů v buňkách nebo tkáních již více než 40 let.<sup>1</sup> Informační přehled použití konjugovaných protilátek FITC jako účinných a specifických imunofluorescenčních markerů proti buněčným antigenům je k dispozici v článku od Faulka a Hijmanse.<sup>2</sup> Použití imunofluorescenční techniky vedlo ke zlepšení celkového porozumění renálních<sup>3</sup> a dermálních<sup>4</sup> patologií.

FITC anti-IgA obsahuje koží polyklonální protilátku proti purifikovanému lidskému IgA. Protilátka se získává imunoafinitní chromatografickou purifikací frakce koží gama globulinu a následnou reakcí s fluorescein izothiokyanátem ve výsledném poměru fluoresceinu a proteinů přibližně 3,0 mol/mol. Přebytečné barvivo se pak odstraní pomocí dialýzy a konjugovaný globulin je dále frakcionován za použití DEAE celulózy, aby se odstranil více a méně značený protein.<sup>5</sup> Imunofluorescenční detekce IgA v lidské renální<sup>6,7,8</sup> a dermální<sup>9,4</sup> tkáni je již popsána v jiném dokumentu. Anti-IgA se specificky váže k těžkému řetězci lidského imunoglobulinu A. Nereaguje s těžkými řetězci na lidském IgM či IgG ani s lehkými řetězci společnými pro většinu imunoglobulinů.

#### Principy a postupy

FITC anti-IgA lze použít jako primární protilátku pro imunohistochemické barvení řezů zmrazené tkáně. Imunohistochemické barvení obecně umožňuje vizualizaci antigenu pomocí postupné aplikace konkrétní protilátky (primární protilátka) na antigen, sekundární protilátky (spojovací protilátka) na primární protilátku, enzymového komplexu a chromogenního substrátu s vloženými mezikroky promytí. Enzymatická aktivace chromogenu zapříčiní vznik viditelného reakčního produktu v místě antigenu. U protilátek značených přímo FITC je fluorochrom vázán na primární protilátku, a proto není potřeba žádná sekundární protilátka nebo chromogenní detekce. Primární protilátka se váže specificky na cílový antigen a lze ji pak vizualizovat. Výsledky jsou interpretovány pomocí fluorescenčního mikroskopu s příslušným filtrem a pomáhají při rozlišení diagnosticky patofyziologických procesů, které mohou nebo nemusí souviset s konkrétním antigenem.

FITC anti-IgA je optimálně naředěna pro použití s barvicími automaty. Každý krok barvicího protokolu je definován přesnou dobou inkubace a specifickou teplotou, při které inkubace probíhá. Na konci každého inkubačního kroku jsou řezy v barvicím automatu Ventana opláchnuty, aby se ukončila probíhající reakce a odstranil nenavázaný materiál, který by mohl bránit požadované reakci v následujících krocích. Aby odpařování vodných reagensii ze vzorků na sklíčkách bylo co nejmenší, aplikuje barvicí automat na sklíčka krycí roztok. Více informací o provozu přístroje naleznete v návodu k obsluze příslušného barvicího automatu Ventana.

### MATERIÁLY A METODY

#### Dodané reagensie

FITC anti-IgA obsahuje dostatek reagensie k provedení 50 testů.

1–5ml dávkovač FITC anti-IgA (polyklonální) obsahuje přibližně 188 µg (37,6 µg/ml) koží polyklonální protilátky proti lidskému IgA. Protilátka je naředěna v tris pufru s obsahem proteinového nosiče a konzervačního prostředku.

Celková koncentrace proteinu v reagensii je přibližně 50 µg/ml.

### Rekonstituce, mísení, ředění, titrace

Tato protilátka je optimalizována pro použití v barvicím automatu Ventana. Nevyžaduje se rekonstituce, mísení, ředění ani titrace.

Po dalším ředění by nemuselo dojít k obarvení antigenu. Uživatel musí všechny takové změny ověřit. Rozdíly v přípravě tkání a technických postupech v laboratoři mohou vést k výrazně rozdílným výsledkům a vyžadují pravidelné používání kontrol (viz část Postupy kontroly kvality).

### Potřebné materiály a reagensie, které nejsou součástí dodávky

Následující reagensie a materiály mohou být při barvení potřebné, ale nejsou součástí dodávky:

1. Mikroskopická sklíčka, pozitivně nabitá
2. Tkáně pro pozitivní a negativní kontrolu
3. Sušička schopná udržovat teplotu 70 °C ± 5 °C
4. Štítky s čárovým kódem (odpovídající testované negativní kontrole a primární protilátce)
5. Aceton
6. Nádoby nebo lázně na barvení
7. Stopky
8. Deionizovaná nebo destilovaná voda
9. Barvicí automaty ES®, NexES® IHC, BenchMark® a BenchMark XT
10. Software k příslušné detekční soupravě (pouze pro barvicí automat ES)
11. Ventana APK Wash Solution Concentrate (10X) (barvicí automaty ES a NexES IHC)
12. Ventana Low Temperature Liquid Coverslip™ Solution Pre-dilute (barvicí automaty ES a NexES IHC)
13. Ventana Reaction Buffer Solution Concentrate (10X)\* (barvicí automaty BenchMark a BenchMark XT)
14. Ventana High Temperature Liquid Coverslip Solution Pre-dilute (barvicí automaty BenchMark a BenchMark XT)
15. Vodné fixační médium, vhodné pro fluorescenci
16. Krycí sklo
17. Epifluorescenční mikroskop (20–80x) vybavený filtrem FITC

\* Podle konkrétní aplikace.

### Skladování a manipulace

Uchovávejte při teplotě 2–8 °C. Chraňte před mrazem. Uživatel musí ověřit, jestli se neliší tyto podmínky pro skladování od podmínek specifikovaných v příbalové informaci.

Aby byly zajištěny správné nadávkování reagensie a stabilita protilátky, je po každém cyklu nutno vyměnit víčko dávkovače a okamžitě jej uložit ve svislé poloze do chladničky.

Každý dávkovač s protilátkou má stanovenou dobu expirace. Při řádném skladování zůstane reagensie stabilní do data uvedeného na štítku. Nepoužívejte reagensii po uplynutí data expirace pro předepsanou metodu skladování.

Tento produkt nejeví žádné zjevné známky nestability; proto by se současně s neznámými vzorky měly provádět pozitivní a negativní kontroly. Objeví-li se příznak nestability reagensie, obraťte se na místní zastoupení společnosti Ventana.

### Odběr vzorků a příprava pro analýzu

Pro použití této primární protilátky na barvicích automatech Ventana jsou vhodné zmrazené tkáně zpracované běžným způsobem (viz část Potřebné materiály a reagensie, které nejsou součástí dodávky). Doporučujeme tkáň fixovat 10 minut ve studeném acetonu. Mohou se vyskytnout rozdílné výsledky jako důsledek prodloužené fixace nebo speciálních postupů, například odvápnování preparátů kostní dřevě.

Každý řez je třeba nařezat na potřebnou tloušťku a umístit na pozitivně nabitou sklíčku.

### VAROVÁNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

1. Při manipulaci s reagensii je nutné dodržovat příslušná bezpečnostní opatření. Při manipulaci s podezřelými karcinogeny či toxickým materiálem (např. xylen nebo formaldehyd) používejte jednorázové rukavice.
2. V místě manipulace se vzorky nebo reagensii nekuřte, nejzte a nepijte.
3. Zabraňte kontaktu reagensii s očima a sliznicemi. Jestliže se reagensie dostanou do kontaktu s citlivými oblastmi, omyjte je velkým množstvím vody.
4. Se vzorky pacientů a všemi materiály, které byly v kontaktu s těmito vzorky, by měly být zacházeno jako s biologicky nebezpečným materiálem a měly by být zlikvidovány dle příslušných bezpečnostních opatření. Nikdy nepipetujte ústy.
5. Zamezte mikrobiologické kontaminaci reagensii; mohly by pak vykazovat nesprávné výsledky.
6. Nedodržení příslušných inkubačních dob a teplot může vést k chybným výsledkům. Jakoukoli změnu tohoto druhu musí uživatel ověřit.

- Reagencie jsou již optimálně nařaděny a po dalším ředění by nemuselo dojít k obarvení antigenu. Jakoukoli změnu tohoto druhu musí uživatel ověřit.
- Při použití v souladu s pokyny není tento produkt klasifikován jako nebezpečná látka. Konzervačním prostředkem v reagentii je ProClin 300. Příznaky nadměrné expozice látkou ProClin 300 zahrnují podráždění kůže a očí a podráždění sliznic a horních cest dýchacích. Koncentrace látky ProClin 300 v tomto produktu činí 0,05 % a nesplňuje kritéria OSHA pro nebezpečné látky. U citlivých jedinců se mohou objevit systémové alergické reakce.
- Doporučené metody likvidace jsou uvedeny v celostátních a místních předpisech.

## NÁVOD K POUŽITÍ

### Jednotlivé kroky postupu

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 níže v tabulce 1. Parametry automatických postupů lze zobrazit, vytisknout a upravovat podle postupů uvedených v návodu k obsluze. Některé parametry obsluhy barvicího automatu jsou předem nastaveny výrobcem.

Tabulka 1. Doporučené barvicí protokoly pro FITC anti-IgA

Typ postupu	Platforma/Metoda	
	ES nebo NexES IHC	BenchMark nebo BenchMark XT
<b>Volba protokolu</b>	Zmrazený	Zmrazený
<b>Odparafinování</b>	Neuvádí se	Neuvádí se
<b>Kondicionování buněk (odmaskování antigenu)</b>	Není vyžadováno	Není vyžadováno
<b>Enzym (proteáza)</b>	Není vyžadováno	Není vyžadováno
<b>Protilátka (primární)</b>	FITC anti-IgA, 8 minut	FITC anti-IgA, 8 minut
<b>Kontrastní barvení</b>	Neuvádí se	Neuvádí se

Postupy barvení na barvicích automatech Ventana jsou následující. Podrobnější pokyny a další možnosti protokolů jsou uvedeny v návodu k obsluze.

### Pro všechny přístroje

- Označte sklička štítkem s čárovým kódem odpovídajícím protokolu protilátky, který se má provést.
- Do zásobníku reagentii vložte primární protilátku a zásobník umístíte do barvicího automatu. Zkontrolujte nádoby na tekutiny a odpad.
- Vložte sklička do barvicího automatu.
- Spustte barvicí cyklus.
- Po dokončení cyklu vyjměte sklička z barvicího automatu.
- Použije-li se chromogen FITC, nedehydratujte a neprojasňujte. Pro montáž skliček s primární protilátkou obarvenou FITC použijte fixační médium na vodní bázi. Účinné odstranění krycího roztoku Liquid Coverslip Solution ze skliček po jejich vyjmutí z přístroje významně sníží autofluorescenci pozadí. Toho se docílí důkladným opláchnutím skliček roztokem APK Wash nebo reakčním pufrům Reaction Buffer. Sklička pak lze opláchnout destilovanou vodou a zakrýt. Obarvená sklička se odečítají ve stejný den, v jaký jsou barvena. Skladují se v temnu a chladu (–20 °C). Sklička s primárními protilátkami obarvenými FITC nejsou stabilní, avšak obarvení lze zachovat, pokud se sklička skladují při teplotě –20 °C nebo –80 °C ve tmě. Sklička s primárními protilátkami obarvenými FITC mohou časem nebo při delším vystavení světlu blednout. Chraňte před světlem.

### Postupy kontroly kvality

#### Positivní kontrola tkáně

S každým provedeným barvicím postupem je třeba provést pozitivní kontrolu tkáně. Příkladem vhodné pozitivní kontroly pro FITC anti-IgA je zmrazená tonzila nebo lymfatická uzlina. Složky tkáně s pozitivním zbarvením (barvení lymfocytů v germinálních centrech) se používají k potvrzení, že protilátka byla aplikována a přístroj pracuje správně. Tkáň může obsahovat pozitivně i negativně zbarvené buňky nebo složky tkáně a může sloužit jako tkáň pro pozitivní i negativní kontrolu. Kontrolní tkáň musí být čerstvé vzorky z pitvy, biopsie nebo operace připravené nebo fixované co nejdříve a stejným způsobem jako testované řezy. Takové tkáně mohou monitorovat všechny kroky postupu, od přípravy tkáně až po barvení. Použití tkáňového řezu fixovaného nebo zpracovaného jiným

způsobem než testovaný vzorek zajistí kontrolu pro všechny reagentie a všechny kroky metody kromě fixace a zpracování tkáně.

Tkáň se slabým pozitivním zbarvením je vhodnější pro optimální kontrolu kvality a pro rozpoznání nižších úrovní degradace reagentie.

Znamé pozitivní kontroly tkání by měly být používány pouze ke sledování správné funkce zpracovaných tkání a testovacích reagentií, nikoliv jako pomůcka k formulaci specifické diagnózy vzorků pacientů. Pokud se u tkání určených pro pozitivní kontrolu pozitivní zbarvení neobjeví, lze považovat výsledky testovacích vzorků za neplatné.

#### Negativní kontrola tkáně

Pro negativní kontrolu tkáně může posloužit stejná tkáň, která byla použita pro pozitivní kontrolu. Různé typy buněk přítomných ve většině tkáňových řezů nabízejí možnost interní negativní kontroly, to si ale musí uživatel ověřit. Složky, které se nebarví, by měly prokázat nepřítomnost specifického zbarvení a zajistit indikaci nespecifického zbarvení pozadí. Pokud se u tkání určených pro negativní kontrolu objeví specifické zbarvení, lze považovat výsledky vzorků pacienta za neplatné.

#### Nevysvětlitelný nesoulad

Nevysvětlitelný nesoulad v kontrolách by měl být ihned oznámen místnímu zastoupení společnosti Ventana. Pokud se výsledky kontroly kvality neshodují se specifikací, výsledky pacienta jsou neplatné. Viz část Řešení problémů v této příbalové informaci. Zjistěte problém a zjednejte nápravu. Potom analýzu vzorků pacienta zopakujte.

#### Ověření testu

Před prvním použitím protilátky nebo barvicího systému při diagnostickém postupu by měla být ověřena specifická protilátky testováním na řadě dostupných tkáních se známou imunohistochemickou charakteristikou, které představují známé pozitivní a negativní tkáně (seznamte se s Postupy pro kontrolu kvality popsány v této části příbalové informace a s požadavky pro kontrolu kvality akreditačního programu College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist,<sup>10</sup> a schválenou směrnicí NCCLS<sup>11</sup>). Tyto postupy kontroly kvality musejí být provedeny vždy, když se změní šarže protilátky nebo když se změní parametry testu. Tkáně uvedené v části Souhrn očekávaných výsledků jsou k dispozici pro ověření testu.

#### Interpretace výsledků

Postup automatizovaného imunologického barvení Ventana způsobuje, že cílový antigen je vizualizován označenou primární protilátkou a vázaným fluorochromem. Protilátky značené FITC poskytují reakční produkt v barvě zeleného jablka. Před interpretací výsledků musí vyhodnotit pozitivní a negativní kontroly kvalifikovaný patolog se zkušeností s postupy v imunohistochemii.

#### Positivní kontrola tkáně

Nejprve je nutné provést pozitivní kontrolu zbarvené tkáně a ověřit tak řádnou funkčnost všech reagentií. Znamkou pozitivní reaktivity je přítomnost správně zbarveného reakčního produktu v cílových buňkách. Pokud se u pozitivních kontrol tkání pozitivní zbarvení neprojeví, je nutno považovat výsledky testovaných vzorků za neplatné.

#### Negativní kontrola tkáně

Tkáň pro negativní kontrolu je nutno testovat po tkání pro pozitivní kontrolu, aby byla ověřena specifická značení cílového antigenu primární protilátkou. Nepřítomnost specifického zbarvení v tkáni pro negativní kontrolu potvrzuje nepřítomnost zkrfžené reaktivity s buňkami nebo složkami buněk. Pokud se projeví specifické zbarvení ve tkáni pro negativní kontrolu, je nutno považovat výsledky vzorků pacienta za neplatné.

Pokud je přítomno nespecifické barvení, projeví se jasně žlutou až nazelenalou barvou. Sporadické slabé zbarvení pojivové tkáně lze také pozorovat v řezech příliš fixovaných tkání. U vzorků zbarvených tkání se může vyskytnout autofluorescence. K interpretaci výsledků barvení používejte pouze intaktní buňky. Nekrotické nebo degenerované buňky se mohou často barvit nespecificky.

#### Tkáň pacienta

Vzorky pacienta se testují jako poslední. Intenzitu pozitivního zbarvení je třeba hodnotit s ohledem na případné zbarvení pozadí negativní reagenční kontroly. Jako u každého imunohistochemického testu znamená negativní výsledek, že antigen nebyl detekován, nikoli že daný 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 a příslušné klinické údaje pacienta musí interpretovat kvalifikovaný patolog.

## OMEZENÍ

### Všeobecná omezení

1. Imunohistochemie je diagnostický proces zahrnující více kroků a vyžadující specializované školení ve výběru vhodných reagensů, řezů tkáně, fixaci a zpracování, přípravě imunohistochemického sklíčka a interpretaci výsledků zbarvení.
2. Zbarvení tkáně závisí na způsobu zacházení s tkání a na jejím zpracování před barvením. Nesprávná fixace, zmrazení, rozmrazení, oplach, sušení, zahřívání, řezání nebo kontaminace jinými tkáněmi nebo tekutinami může vést ke vzniku artefaktů, záchytu protilátky nebo k falešně negativním výsledkům. V důsledku odchylek při fixaci a metodách zalévání či následkem stávajících nerovnoměrností ve tkáni mohou být výsledky nekonzistentní.
3. Klinická interpretace jakéhokoli pozitivního zbarvení nebo jeho nepřítomnosti musí být vyhodnocena v kontextu klinické anamnézy, morfologie a jiných histopatologických kritérií. Klinická interpretace jakéhokoli zbarvení nebo jeho nepřítomnosti musí být doplněna morfologickými studii a řádnými kontrolami a také dalšími diagnostickými testy. Tato protilátka je určena pro užití v panelu protilátek. Je odpovědností kvalifikovaného patologa, aby se seznámil s protilátkami, reagensy a metodami používanými k barvení preparátů. Barvení se musí provádět v certifikované akreditované laboratoři pod dohledem patologa zodpovědného za hodnocení barvených sklíček, který zajistí adekvátnost pozitivních a negativních kontrol.
4. Společnost Ventana dodává protilátky a reagensie pro použití optimálně naředěné, pokud jsou dodrženy pokyny, které jsou součástí produktu. Jakákoli odchylka od doporučených postupů testu může vést k tomu, že očekávané výsledky budou neplatné. Je nutno používat a dokumentovat příslušné kontroly. Uživatel, který se od doporučených postupů odchýlí, musí přijmout odpovědnost za interpretaci výsledků pacientů.
5. Tento produkt není určen pro průtokovou cytometrii, charakteristiky účinnosti zatím nejsou známy.
6. U tkání, které nebyly předem testovány, mohou reagensie vykazovat neočekávané reakce. V důsledku biologické variability exprese antigenu v novotvarech nebo jiných patologických tkáních nelze zcela vyloučit možnost neočekávaných reakcí ani v testovaných skupinách tkání.<sup>12</sup> Se zdokumentovanými neočekávanými reakcemi se obraťte na místní zastoupení společnosti Ventana.
7. Falešně pozitivní výsledky se mohou vyskytovat v důsledku neimunologické vazby proteinů.
8. Jako u každého imunohistochemického testu znamená negativní výsledek pouze to, že antigen nebyl detekován, nikoli že antigen není v testovaných buňkách nebo tkáni přítomen.

### Specifická omezení

1. Protilátka byla optimalizována pro inkubační dobu 8 minut ve spojení s barvicími automaty Ventana. Vzhledem k různým způsobům fixace tkání může být u jednotlivých vzorků zapotřebí zvýšit nebo snížit inkubační dobu primární protilátky. Další informace o proměnných faktorech fixace naleznete v dokumentu „Immunohistochemistry Principles and Advances“.<sup>13</sup>
2. Protilátka detekuje antigen, který přežívá běžnou fixaci a řezání. Uživatelé, kteří nedodrží doporučené postupy, nesou odpovědnost za interpretaci výsledků pacienta.

### SOUHRN OČEKÁVANÝCH VÝSLEDKŮ

1. Specifita FITC anti-IgA byla stanovena pomocí studie, která prokázala správné zbarvení normálních a patologických tkání. 9 kožních biopsií a 2 patologické ledviny bylo obarveno reagensy FITC anti-IgA s očekávanými klinickými výsledky. 8 z 11 barvených tkání vykazovalo pozitivní výsledky barvení. 2 lupusové vzorky se barvily pozitivně a 2 pemfigoidní vzorky také vykazovaly pozitivní výsledky. Pomocí FITC anti-IgA byly barveny různé typy normální tkáně. Následující tkáně byly negativní: plice, mozek, štítná žláza a bránice. U nervů vykazovaly 3 ze 3 vzorků nespecifické pozadí. U děloh byly 3 ze 3 vzorků negativní, ale vykazovaly určité nespecifické lymfocytární zbarvení. U tenkého střeva byly 3 ze 3 vzorků negativní, ale vykazovaly nespecifické zbarvení v kryptách a nekrotických oblastech.
2. Senzitivita závisí na zachování antigenu. Nesprávné zacházení s tkání během fixace, řezání, zalévání nebo skladování, které změní antigenicitu, oslabí detekci IgA reagensy FITC anti-IgA a může tak způsobit falešně negativní výsledky.
3. Reprodukovatelnost barvení s FITC anti-IgA v rámci cyklu byla stanovena na základě barvení 5 sklíček se stejnou tkání v jednom cyklu přístroje. 5 z 5 sklíček bylo zbarveno pozitivně. U všech sklíček byla intenzita zbarvení stejná. Uživatel musí ověřit reprodukovatelnost výsledků v rámci jednoho cyklu barvením různých sad sériových řezů s nízkou, střední a vysokou hustotou antigenu v jednom cyklu.

4. Reprodukovatelnost barvení s FITC anti-IgA mezi cykly byla stanovena na základě barvení sklíček se stejnou tkání v 5 cyklech na různých přístrojích. 5 z 5 sklíček bylo zbarveno pozitivně. U všech sklíček byla intenzita zbarvení podobná. Uživatelé by měli ověřit výsledky reprodukovatelnosti mezi cykly barvením několika sad sériových řezů s nízkou, střední a vysokou hustotou antigenu v různých dnech.

### ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ

1. Jestliže vykazují pozitivní kontroly slabší zbarvení, než je očekáváno, měly by být zkontrolovány během stejného cyklu na přístroji další cykly pozitivní kontroly, aby bylo možné stanovit, zda je to způsobeno primární protilátkou, nebo některou z běžných sekundárních reagensů.
2. Pokud je pozitivní kontrola negativní, je nutno ji zkontrolovat, aby bylo zajištěno, že sklíčko má správný štítek s čárovým kódem. Jestliže je sklíčko označeno správným štítkem, je třeba během jednoho cyklu na přístroji zkontrolovat další cykly pozitivní kontroly, aby bylo možné stanovit, zda je to způsobeno primární protilátkou, nebo některou z běžných sekundárních reagensů. Odběr, fixace nebo odparafinování tkání mohlo být provedeno nesprávným způsobem. Odběr tkáně, její skladování a fixace musí probíhat dle správného postupu.
3. Je-li zbarvení specifickou protilátkou příliš intenzivní, je třeba cyklus opakovat při inkubační době zkrácené vždy o 4 minuty tak dlouho, dokud není dosaženo požadované intenzity zbarvení.
4. Jestliže dochází ke smývání řezů tkání ze sklíčka, zkontrolujte, zda jsou sklíčka pozitivně nabitá.
5. Správné postupy najdete v části Jednotlivé kroky postupu návodu k obsluze barvicího automatu nebo se obraťte na místní zastoupení společnosti Ventana.

### LITERATURA

1. Coons AH, Leduc EH, Kaplan MH. Localization of antigen in tissue cells. VI. The fate of injected foreign proteins in the mouse. *J Exp Med.* Feb;93(2):173-88, 1951.
2. Faulk WP, Hijmans W. Recent developments in immunofluorescence. *Prog Allergy*;16:9-39, 1972.
3. McCluskey RT, Collins AB. The value of immunofluorescence in the study of renal disease. *Ann N Y Acad Sci*;420:302-8, 1983.
4. Wick MR, Ritter JH, Humphrey PA, Swanson PE. Immunopathology of nonneoplastic skin disease: a brief review. *Am J Clin Pathol.* Apr;105(4):417-29, 1996.
5. Wood BT, Thompson SH, Goldstein G. Fluorescent antibody staining. 3. Preparation of fluorescein-isothiocyanate-labeled antibodies. *J Immunol.* Aug;95(2):225-9, 1965.
6. Tomino Y, Sakai H, Miura M, Endoh M, Nomoto Y. Detection of polymeric IgA in glomeruli from patients with IgA nephropathy. *Clin Exp Immunol.* Aug;49(2):419-25, 1982.
7. Inoue W, Tomino Y, Miura M, Yagame M, Nomoto Y, Sakai H. Detection of immunoglobulins and other serum proteins in the dermal and glomerular capillary walls from patients with diabetes mellitus. *Acta Pathol Jpn.* Aug;36(8):1181-9, 1986.
8. Tokuda M, Shimizu J, Sugiyama N, Kiryu T, Matsuoka K, Sasaki O, Fukuda K, Hatase O, Monden H. Direct evidence of the production of IgA by tonsillar lymphocytes and the binding of IgA to the glomerular mesangium of IgA nephropathy patients. *Acta Otolaryngol Suppl.*523:182-4, 1996.
9. Chan LS, Traczyk T, Taylor TB, Eramo LR, Woodley DT, Zone JJ. Linear IgA bullous dermatosis. Characterization of a subset of patients with concurrent IgA and IgG anti-basement membrane autoantibodies. *Arch Dermatol.* 1995 Dec;131(12):1432-7.
10. College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2001.
11. 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.
12. Herman GE, Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. *Biotech Histochem* 66(4): 194-199, 1991.
13. 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™, MIEW™ a Liquid Coverslip™ jsou ochranné známky společnosti Ventana Medical Systems, Inc.; BenchMark®, ES®, Gen II®, NexES® a Ventana® jsou registrované ochranné známky společnosti Ventana Medical Systems, Inc.

Chráněno následujícími patenty: patenty USA č. 6045 759, 6192 945 B1, 6416 713 B1 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.ventana.com](http://www.ventana.com)

**EC REP**

Roche Diagnostics GmbH  
Sandhofer Strasse 116  
D-68305 Mannheim  
Germany