

**Dako**  
**EnVision+ System- HRP**  
**Labelled Polymer**  
**Anti-Rabbit**

**Code K4002** 15 mL  
**Code K4003** 110 mL

**ENGLISH**

**Intended use**

For In Vitro diagnostic use.

These instructions apply to the **Dako EnVision®+, Peroxidase** (DC EnVision+ System, HRP).

This kit is intended for use with primary antibodies from **rabbit** supplied by the user for the qualitative identification of antigens by light microscopy in normal and pathological paraffin-embedded tissues, cryostat tissues or cell preparations. Tissues processed in a variety of fixatives including ethanol, B-5, Bouin's, zinc formalin, and neutral buffered formalin may be used.

Refer to the "General Instructions for Immunohistochemical Staining" or the Detection System "Instructions" of IHC procedures for: (1) Principle of Procedure, (2) Materials Required, Not Supplied, (3) Storage, (4) Specimen Preparation, (5) Staining Procedure, (6) Quality Control, (7) Troubleshooting, (8) Interpretation of Staining, (9) General Limitations.

**Summary and explanation**

The EnVision+ System, HRP is a two-step IHC staining technique. This system is based on an HRP labelled polymer which is conjugated with secondary antibodies. The labelled polymer does not contain avidin or biotin. Consequently, nonspecific staining resulting from endogenous avidin-biotin activity in liver, kidney, lymphoid tissues and cryostat sections is eliminated or significantly reduced. The reagent in the EnVision+, HRP is ready-to-use. This system is an extremely sensitive method and, as a result, optimal dilutions of the primary antibody are up to 20 times higher than those used for the traditional PAP technique, and several-fold greater than those used for the traditional ABC or LSAB methods. This protocol offers an enhanced signal generating system for the detection of antigens present in low concentrations or for low titer primary antibodies. Primary antibodies produced in rabbit react well with the labelled polymer. The interpretation of any positive staining or its absence should be complemented by morphological and histological studies with proper controls.

**Principles of procedure**

Any endogenous peroxidase activity is quenched by incubating the specimen with an appropriate endogenous blocking reagent. The specimen is then incubated with an appropriately characterized and diluted rabbit primary antibody, followed by incubation with the labelled polymer, using two sequential 30-minute incubations. ***It should be noted that for antibodies requiring enzyme digestion or target retrieval, it may be necessary to increase incubation times of the primary antibody and labelled polymer by 5 to 10 minutes.*** Staining is completed by a 5-10 minute incubation with a suitable substrate-chromogen.

**Reagent provided**

**Code K4002**

The following is sufficient for 150 tissue sections, based upon 100 µL per section:

<i>Bottle No.</i>	<i>Quantity</i>	<i>Description</i>
2	1x15 mL	<b>Labelled Polymer:</b> Peroxidase labelled polymer conjugated to goat anti-rabbit immunoglobulins in Tris-HCl buffer containing stabilizing protein and an anti-microbial agent.

**Code K4003**

The following is sufficient for 1100 tissue sections, based upon 100 µL per section:

<i>Bottle No.</i>	<i>Quantity</i>	<i>Description</i>
1	1x110 mL	<b>Labelled Polymer:</b> Peroxidase labelled polymer conjugated to goat anti-rabbit immunoglobulins in Tris-HCl buffer containing stabilizing protein and an anti-microbial agent.

**Materials required, but Not Supplied**

Absorbent wipes  
Control tissue, positive and negative  
Counterstain; aqueous based, such as Mayer's Hematoxylin or Lillie's Modified Mayer's Hematoxylin (code S3309)  
Coverslips  
Distilled water  
Endogenous peroxide blocking reagent such as Peroxidase Block (code S2001)  
Ethanol, absolute and 95%  
Light microscope (20x–800x)  
Mounting media, such as GlycerGel® Mounting Medium (code C0563) or Faramount, Aqueous Mounting Medium, Ready-to-use (code S3025) or nonaqueous permanent mounting medium, Ultramount (code S1964)  
Primary antibodies and negative control reagent  
Slides, poly-L-lysine coated or Silanized Slides (code S3003)  
Staining jars or baths  
Substrate-Chromogen solution such as AEC+ Substrate-Chromogen (code K3469, 110 mL, ready-to-use) or Liquid DAB+ (code K3468)  
Timer (capable of 3–40 minute intervals)  
Wash bottles  
Wash Buffer Solution  
Xylene, toluene or xylene substitutes

**Optional materials required, but not supplied**

Ammonium hydroxide, 15 mol/L diluted to 0.037 mol/L  
PAP Pen (code S2002)

**Precautions**

1. For professional users.
2. Do not use reagents beyond expiration date for prescribed storage method. If reagents are stored under any conditions other than those specified in the product insert, they must be validated by the user.
3. Do not substitute reagents from other lot numbers or from kits of other manufacturers.
4. Enzymes and substrate-chromogens may be affected adversely if exposed to excessive light levels. Do not store kit components or perform staining in strong light, such as direct sunlight.
5. Incubation times or temperatures other than those specified may give erroneous results; any such changes must be validated by the user.
6. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.
7. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.
8. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.

**Storage**

EnVision+, HRP is to be stored at 2–8°C. Do not freeze.  
Do not use after expiration printed on reagent vials and product label.

Alteration in the appearance of any reagent, such as precipitation, may indicate instability or deterioration. In such cases, the reagent(s) is (are) not to be used.

There are no obvious signs to indicate instability of these products. Therefore, positive and negative controls should be tested simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variation in laboratory procedures and a problem with the kit is suspected, contact Dako Technical Support.

**Reagent preparation** It is convenient to prepare the following reagents prior to staining.

**Wash Buffer Solution**

TBST, 0.05 mol/L Tris Buffered Saline with Tween (code S3006) is the recommended wash buffer for automated and manual IHC detection. TBS, 0.05 mol/L Tris Buffered Saline (code S1968) and PBS, 0.02 mol/L Phosphate Buffered Saline (code S3024) are also suitable wash buffer solutions for manual staining. Wash buffer solutions containing sodium azide are not recommended. Sodium azide will inactivate horseradish peroxidase (HRP) resulting in negative staining. Store unused buffer at 2–8°C. Discard buffer if cloudy in appearance.

Distilled water may be used for rinsing the peroxidase block, substrate and counterstain.

**Primary Antibody**

NP-Series "Plus" ready-to-use antibodies are optimized and recommended for use with Dako "Plus" high-sensitivity detection systems. Concentrated antibodies are also available from Dako. Optimization of concentrated antibodies is required by the end user. Dilutions should be prepared using Antibody Diluent (code S0809) or a diluent containing 0.05 mol/L Tris-HCl buffer with 1% bovine serum albumin (BSA). Dako N-Series ready-to-use antibodies are not optimized for use with Dako "Plus" detection systems. For most primary antibodies used with this kit, an incubation time of 30 minutes is sufficient.

**Negative Control Reagent**

Ideally, a negative control reagent contains an antibody which exhibits no specific reactivity with human tissues or normal/ nonimmune serum in the same matrix/solution as the diluted primary antibody. The negative control reagent should be the same subclass and animal species as the primary antibody, diluted to the same immunoglobulin or protein concentration as the diluted primary antibody using the same diluent. The incubation period for the negative control reagent should correspond to the primary antibody.

When using Dako NP-Series "Plus" ready-to-use antibodies, Universal Negative Control+ optimized for use with rabbit (code NP001) NP-Series "Plus" ready-to-use antibodies is recommended as a negative control reagent.

For specific information regarding negative control reagent preparation, refer to Quality Control section.

**Counterstain**

The colored end-product of the staining reaction is alcohol insoluble and may be used with alcohol or aqueous-based counterstains such as Mayer's hematoxylin or Lillie's Modified Mayer's Hematoxylin (code S3309). Follow counterstaining of hematoxylin with a thorough rinse in distilled water, then immerse tissue slides into a bath of 0.037 mol/L ammonia or similar bluing agent. 0.037 mol/L ammonia water is prepared by mixing 2.5 mL of 15 mol/L (concentrated) ammonium hydroxide with 1 liter of water.

Unused 0.037 mol/L ammonia may be stored at room temperature (20–25°C) in a tightly capped bottle for up to 12 months.

Consult manufacturers' guidelines for alternative counterstaining procedures.

**Mounting Media**

Glycergel Mounting Medium (code C0563) or Faramount, Aqueous Mounting Medium, Ready-to-use (code S3025) is recommended for aqueous mounting. Glycergel must be heated to at least 50°C just prior to use. Non-aqueous permanent mounting medium (Ultramount, code S1964) may also be used.

**Specimen preparation** Refer to the "General Instructions for Immunohistochemical Staining" and/or the Antibody Specification Sheet.

Prior to IHC staining, tissues must be fixed and processed. Fixation prevents autolysis and putrefaction of excised tissues, preserves antigenicity, enhances the refractive index of tissue constituents and increases the resistance of cellular elements to tissue processing. Tissue processing includes dehydration, clearing of dehydrating agents, infiltration of embedding media, embedding and sectioning of tissues. The most common fixatives for IHC tissue preparations are discussed in the General Instructions for Immunohistochemical Staining. These are guidelines only. Optimal procedures must be determined and verified by the user.

## Staining procedure

### Procedural Notes

The user should read these instructions carefully and become familiar with the product content prior to use. The reagent and instructions supplied have been designed for optimal performance. Further dilution of the reagent or alteration of incubation times or temperatures may give erroneous results. All reagents should be equilibrated to room temperature (20–25°C) prior to immunostaining. Likewise, all incubations should be performed at room temperature.

Do not allow tissue sections to dry during the staining procedure. Dried tissue sections may display increased nonspecific staining. Cover slides exposed to drafts. If prolonged incubations are used, place tissues in a humid environment.

The sensitivity of the EnVision+ System, HRP can be further increased by lengthening the incubation times of Steps 2 and 3 for 5-10 minutes.

### Staining Protocol

#### STEP 1 PEROXIDASE BLOCK

Tap off excess buffer. Using a lintless tissue (such as Kimwipe or gauze pad), carefully wipe around the specimen to remove any remaining liquid and to keep reagent within the prescribed area. Apply enough Peroxidase Block from Bottle 1 to cover specimen. Incubate 5 (±1) minutes. Rinse gently with distilled water or buffer solution from a wash bottle (do not focus flow directly on tissue) and place in a fresh buffer bath.

#### STEP 2 PRIMARY ANTIBODY OR NEGATIVE CONTROL REAGENT

Tap off excess buffer and wipe slides as before. Apply enough optimally diluted primary antibody or negative control reagent to cover specimen. Incubate 30 (±1) minutes. Rinse gently with buffer solution from a wash bottle (do not focus flow directly on tissue) and place in a fresh buffer bath.

If the staining procedure must be interrupted, slides may be kept in a buffer bath following incubation of the primary antibody (Step 2) for up to one hour at room temperature (20–25°C) without affecting the staining performance.

#### STEP 3 PEROXIDASE LABELLED POLYMER

Tap off excess buffer and wipe slides as before. Apply enough Labelled Polymer from Bottle 2 to cover specimen. Incubate 30 (±1) minutes. Rinse slides as in Step 2.

#### STEP 4 SUBSTRATE-CHROMOGEN

Wipe slides as before. Apply enough substrate-chromogen solution to cover specimen. Incubate for 5–10 minutes. Rinse gently with distilled water from a wash bottle (do not focus flow directly on tissue). Collect substrate-chromogen waste in a hazardous materials container for proper disposal.

#### STEP 5 HEMATOXYLIN COUNTERSTAIN (optional)

Immerse slides in a bath of aqueous hematoxylin (code S3309). Length of incubation depends on the strength of hematoxylin used. Rinse gently in a distilled water bath. Dip slides 10 times into a bath of 0.037 mol/L ammonia or similar bluing agent. Rinse slides in a bath of distilled or deionized water for 2–5 minutes.

#### STEP 6 MOUNTING

Specimens may be mounted and coverslipped with an aqueous-based mounting medium such as Glycergel Mounting Medium (code C0563) or Faramount (code S3025) or non-aqueous permanent mounting media, Ultramount (code S1964). Slides can also be dehydrated and permanently mounted.

## Quality control

Differences in tissue processing and technical procedures in the user's laboratory may produce significant variability in results, necessitating regular performance of in-house controls.

Consult the quality control guidelines of the College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry and references 1 through 3 for additional information. Refer to the specification sheet of each primary antibody used for details regarding sensitivity and immunoreactivity.

Refer to the "General Instructions for Immunohistochemical Staining" for further information on positive and negative controls.

## Staining interpretation

Refer to the "General Instructions for Immunohistochemical Staining" for interpretation guidelines.

**Product specific limitations**

Tissue staining is dependent on the proper handling and processing of tissues prior to staining. Improper fixation, freezing, thawing, washing, drying, heating, sectioning or contamination with other tissues or fluids may produce artifacts, antibody trapping, or false-negative results.

Use of old or unbuffered fixatives, or exposure of tissues to excessive heat (greater than 60°C) during processing may result in decreased staining sensitivity.

Endogenous peroxidase or pseudoperoxidase activity can be found in hemoproteins such as hemoglobin, myoglobin, cytochrome, and catalase as well as in eosinophils.<sup>4,5</sup> This activity can be inhibited by incubating specimens with Peroxidase Block for five minutes prior to the application of the primary antibody. Blood and bone marrow smears and frozen tissues can also be treated with this reagent. However, this procedure does not abolish the reddish-brown pigment of hemoproteins. Alternately, a solution of methanol-hydrogen peroxide can be used. Some antigens may become denatured with this procedure.

Tissues from persons infected with hepatitis B virus and containing hepatitis B surface antigen (HBsAg) may exhibit nonspecific staining with horseradish peroxidase.<sup>6</sup>

Normal/nonimmune sera from the same animal source as the secondary antisera used in blocking steps may cause false-negative or false-positive results due to auto-antibodies or natural antibodies. The reagents supplied in this kit have been optimally diluted. Further dilution may result in loss of antigen detection.

**Troubleshooting**

Problem	Probable Cause	Suggested Action
1. No staining of any slides.	1a.Reagents not used in proper order.	1a.Review application of reagents.
	1b.Sodium azide in buffer bath.	1b.Use fresh, azide-free buffer.
2. Weak staining of all slides.	2a.Sections retain too much solution after wash bath.	2a.Gently tap off excess solution before wiping around section.
	2b.Slides not incubated long enough with antibodies or substrate mixture.	2b.Review recommended incubation times.
3. Excessive background staining in all slides.	3a.Specimens contain high endogenous peroxidase activity.	3a.Use longer incubation time of peroxidase block, Bottle 1.
	3b.Paraffin incompletely removed.	3b.Use fresh xylene or toluene baths. If several slides are stained simultaneously, the second xylene bath should contain fresh xylene.
	3c.Slides not properly rinsed.	3c.Use fresh solutions in buffer baths and wash bottles. Alternately, use TBST 0.05 mol/L Tris Buffer containing 0.3 mol/L NaCl and 0.1% Tween (code S3306).
	3d.Faster than normal substrate reaction due to e.g. excessive room temperature.	3d.Use shorter incubation time with substrate-chromogen solution.
	3e.Sections dried during staining procedure.	3e.Use humidity chamber. Wipe only three to four slides at a time before applying reagent.
	3f.Nonspecific binding of reagents to tissue section.	3f.Apply a blocking solution containing and irrelevant protein.
	3g.Antibody too concentrated.	3g.see higher dilution of the primary antibody.

NOTE: If the problem cannot be attributed to any of the above causes, or if the suggested corrective action fails to resolve the problem, please call Dako Technical Support for further assistance.

Additional information on staining techniques and specimen preparation can be found in the *Handbook - Immunochemical Staining Methods*<sup>7</sup> (available from Dako), *Atlas of Immunohistology*<sup>8</sup> and *Immunoperoxidase Techniques, A Practical Approach to Tumor Diagnosis*.<sup>9</sup>

**Code K4002** 15 mL  
**Code K4003** 110 mL

## FRENCH

### Intérêt

Pour diagnostic in vitro.

Ces instructions s'appliquent au **Dako EnVision®+, Peroxidase** (DC EnVision+ System, HRP).

Ce kit est destiné pour un usage avec les anticorps primaires de **lapin** fournis par l'utilisateur pour l'identification qualitative des antigènes par microscopie optique des tissus normaux et pathologiques inclus en paraffine, tissus cryostat ou préparations cellulaires. Les tissus traités de fixateurs variés y compris l'éthanol, B-5, solution de Bouin, formol de zinc et formol tamponné neutre peuvent être utilisés.

Se reporter aux « Instructions Générales pour le Marquage Immunohistochimique » ou aux « Instructions » du Système de Détection des procédures IHC, pour: (1) Principes de Procédure, (2) Matériaux Requis, Non Fournis, (3) Conservation, (4) Préparation de l'Echantillon, (5) Procédure d'immunomarquage, (6) Contrôle de Qualité, (7) Résolution de Problèmes, (8) Interprétation d'immunomarquage, (9) Limites Générales.

### Résumé et explication

Le Système EnVision+, HRP est une technique de marquage IHC à deux étapes. Ce système est basé sur un polymère marqué au HRP qui est conjugué avec les anticorps secondaires. Le polymère marqué ne contient pas d'avidine ou de biotine. Par conséquent, un marquage non spécifique résultant d'une activité d'avidine-biotine endogène dans le foie, le rein, les tissus lymphoïdes et coupes cryostat est éliminé ou réduit significativement. Le réactif dans EnVision+, HRP est prêt à l'emploi. Ce système est une méthode extrêmement sensible et, par conséquent, des dilutions optimales de l'anticorps primaire sont 20 fois plus élevées que celles utilisées pour la technique PAP classique, et plusieurs fois plus élevées que celles utilisées par les méthodes ABC ou LSAB classiques. Ce protocole offre un système générant un signal rehaussé pour la détection d'antigènes présents en faibles concentrations ou pour titrage faible des anticorps primaires. Des anticorps primaires produits par le lapin réagissent adéquatement au polymère marqué. L'interprétation de tout marquage positif ou de son absence doit être complété par des études morphologiques et histologiques avec témoins appropriés.

### Principes de la procédure

Toute activité de peroxydase endogène est supprimée en incubant l'échantillon avec un réactif de blocage endogène approprié. L'échantillon est ensuite incubé avec un anticorps primaire de lapin adéquatement dilué et caractérisé, suivi par l'incubation avec un polymère marqué, en utilisant deux incubations séquentielles de 30 minutes. **Il doit être noté que les anticorps nécessitent une digestion enzymatique ou un démasquage de la cible, il est probablement nécessaire d'augmenter la durée d'incubation de l'anticorps primaire et du polymère marqué par 5 à 10 minutes.** Un marquage est complété par une incubation de 5 à 10 minutes avec un chromogène-substrat approprié.

### Réactif fourni

#### Code K4002

Ce qui suit est suffisant pour 150 coupes de tissus, basées sur 100 µL par coupe :

No. du Flacon	Quantité	Description
2	1x15 mL	<b>Polymère Marqué</b> : Le polymère marqué à la peroxydase conjugué aux immunoglobulines anti-lapin de chèvre dans un tampon Tris-HCl contenant une protéine stabilisante et un agent anti-microbien.

#### Code K4003

Ce qui suit est suffisant pour 1100 coupes de tissus, basé sur 100 µL par coupe :

No. Du Flacon	Quantité	Description
1	1x110 mL	<b>Polymère Marqué</b> : Le polymère marqué à la peroxydase conjugué aux immunoglobulines anti-lapin de chèvre dans un tampon Tris-HCl contenant une protéine stabilisante et un agent anti-microbien.

**Matériaux requis, mais Non Fournis**

Lingettes absorbantes,  
Tissu de Témoin positif et négatif,  
Marquage de contraste ; aqueux, tel que l'Hématoxyline de Mayer ou l'Hématoxyline de Mayer Modifiée de Lillie (code S3309);  
Lamelles,  
Eau Distillée,  
Réactif bloquant de la peroxyde endogène, tel que Peroxidase Block (code S2001),  
Ethanol, absolu et 95%,  
Microscope optique (20x à 800x),  
Milieu de Montage, tel que Glycergel® Mounting Medium (code C0563) ou Faramount Aqueous Mounting Medium, prêt à l'emploi (code S3025) ou un milieu de montage permanent non aqueux, Ultramount (code S1964),  
Réactif de témoin négatif et anticorps primaire,  
Lames, revêtues en poly-L-lysine ou Silanized Slides (code S3003),  
Fioles de marquage ou baignoires,  
Solution Chromogène-Substrat, telle que AEC+ Substrate-Chromogen (code K3469, 110 mL, prêt à l'emploi) ou Liquid DAB+ (code K3468),  
Chronomètre (à intervalles de 3 à 40 minutes),  
Flacons de Lavage,  
Solution Tampon de Lavage,  
Xylène, Toluène ou Substituts de Xylène.

**Matériaux facultatifs requis, mais non fournis**

Ammonium hydroxide, 15 mol/L dilué à 0,037 mol/L PAP Pen (code S2002)

**Précautions d'emploi**

1. Pour utilisateurs professionnels.
2. Ne pas utiliser de réactifs au delà de la date de péremption pour la méthode de conservation prescrite. Si des réactifs sont stockés sous des conditions autres que celles spécifiées sur l'étiquette du produit, ils doivent être validés par l'utilisateur.
3. Ne pas remplacer les réactifs avec d'autres de lots différents ou kits fournis par d'autres fabricants.
4. Les enzymes et les chromogènes-substrat peuvent être défavorablement affectés si exposés à des niveaux de lumière excessifs. Ne pas stocker les composants du kit ou accomplir un marquage en forte lumière, telle que la lumière du soleil.
5. Les durées d'incubation ou températures autres que celles spécifiées peuvent donner des résultats erronés; de telles changements doivent être validés par l'utilisateur.
6. Comme pour tout produit dérivé d'origine biologique, des procédures de manipulation appropriées doivent être utilisées.
7. Porter un équipement de protection personnelle afin d'éviter un contact avec les yeux et la peau.
8. Une solution inutilisée doit être mise au rebut conformément aux réglementations locales, régionales et nationales.

**Stockage**

EnVision+, HRP est à stocker entre 2 et 8°C. Ne pas congeler.  
Ne pas utiliser après la date de péremption inscrite sur les flacons de réactifs et l'étiquette du produit.

Un changement dans l'apparence de tout réactif, tel que la précipitation, peut indiquer une instabilité ou une détérioration. Dans de tels cas, les réactifs ne doivent pas être utilisés.

Aucun signe particulier n'existe pour indiquer une instabilité de ces produits. Par conséquent, les témoins positifs et négatifs doivent être opérés simultanément avec les échantillons du patient. Si un marquage imprévu est observé qui ne peut être expliqué par les changements dans les procédures de laboratoire et qu'un problème est suspecté avec le kit, contacter les Services Techniques de Dako.

**Préparation du réactif**

Il est pratique de préparer les réactifs suivants avant le marquage.

**Solution Tampon de Lavage**

TBST, 0,05 mol/L Solution Saline Tamponnée Tris avec Tween (code S3006) est le tampon de lavage recommandé pour détection automatique et manuelle IHC. TBS, 0,05 mol/L Tris Buffered Saline (code S1968) et PBS, 0,02 mol/L Phosphate Buffered Saline (code S3024) sont aussi des solutions tampons de lavage appropriées pour un marquage manuel. Les solutions tampons contenant de l'azide de sodium n'est pas recommandé. L'azide de sodium rendra la peroxyde de se raifort (HRP) inactive, produisant un marquage négatif. Stocker le tampon inutilisé entre 2 et 8°C. Rebuter le tampon s'il a une apparence trouble.

L'eau distillée peut être utilisée pour rincer le peroxyde block, substrat et marquage de contraste.

### **Anticorps Primaire**

Anticorps NP-Series 'Plus' prêts à l'emploi sont optimisés et recommandés pour un usage avec Dako 'Plus' des systèmes de détection à haute sensibilité. Les anticorps concentrés sont également fournis par Dako. L'optimisation des anticorps concentrés est recommandée par l'utilisateur final. Les dilutions doivent être préparées en utilisant Antibody Diluent (code S0809) ou un diluant contenant 0,05 mol/L, tampon Tris-HCl avec 1% de l'albumine de sérum bovin (BSA). Les anticorps Dako N-Series prêts à l'emploi ne sont pas optimisés pour un usage avec Dako "Plus" des systèmes de détection. Pour la plupart des anticorps primaires utilisés avec ce kit, une durée d'incubation de 30 minutes est suffisante.

### **Réactif de Témoin Négatif**

Idéalement, un réactif de témoin négatif contient un anticorps qui ne montre pas de réactivité spécifique aux tissus humains ou sérum non immunisé/normal dans la même matrice/solution que l'anticorps primaire dilué. Le réactif du témoin négatif doit être de la même sous-classe et espèces animales que l'anticorps primaire, dilué à la même concentration protéinique ou d'immunoglobuline que l'anticorps primaire dilué en utilisant le même diluant. La période d'incubation pour le réactif de témoin négatif doit correspondre à l'anticorps primaire.

En utilisant Dako Anticorps NP-Series 'Plus' prêt à l'emploi, Universal Negative Control+ optimisé pour un usage avec (code NP001) Anticorps NP-Series 'Plus' de lapin est recommandé comme réactif de témoin négatif.

Pour des informations spécifiques à la préparation du réactif de témoin négatif, se reporter à la section Contrôle de Qualité.

### **Marquage de contraste**

Le produit final coloré de la réaction de marquage est insoluble dans l'alcool, et peut être utilisé avec de l'alcool ou un marquage de contraste à base d'alcool et aqueuse, tel que Hématoxyline de Mayer ou Hématoxyline de Mayer Modifié de Lillie (code S3309). Après le marquage de contraste avec l'hématoxyline rincer soigneusement à l'eau distillée, puis immerger les lames de tissus dans un bain de 0,037 mol/L d'ammoniaque ou agent bleu similaire. 0,037 mol/L d'eau d'ammoniaque est préparée en mélangeant 2,5 mL de 15 mol/L d'hydroxyde d'ammonium (concentré) avec 1 litre d'eau.

L'ammoniaque inutilisée de 0,037 mol/L peut être stockée à température ambiante (20 à 25°C) dans un flacon à bouchon bien fermé pour un maximum de 12 mois.

Consulter les directives du fabricant pour les procédures de marquage de contraste alternatives.

### **Milieu de Montage**

GlycerGel Mounting Medium (code C0563) ou Faramount, Aqueous Mounting Medium, Prêt à l'emploi (code S3025) est recommandé pour le montage aqueux. GlycerGel doit être chauffé à au moins 50°C juste avant usage. Le milieu de montage permanent non aqueux (Utramount, code S1964) peut être utilisé.

### **Préparation de l'échantillon**

Se référer aux « Instructions Générales pour le Marquage Immunohistochimique » et/ou la Fiche de Spécifications de l'Anticorps.

Avant le marquage IHC, les tissus doivent être fixés et traités. La fixation empêche l'autolyse et la putréfaction des tissus coupés, préserve l'antigénicité, rehausse l'index réfractive des constituants tissulaires et augmente la résistance des éléments cellulaires au traitement tissulaire. Le traitement tissulaire comprend la déshydratation, l'évacuation des agents déshydratants, l'infiltration du milieu d'inclusion, l'inclusion et le sectionnement des tissus. Les fixateurs les plus communs pour les préparations tissulaires IHC sont étudiés aux Instructions Générales pour le Marquage Immunohistochimique. Ces informations ne sont délivrées qu'à titre indicatif. Les procédures optimales doivent être déterminées et vérifiées par l'utilisateur.

### **Procédure d'immunomarquage**

#### **Notes de procédures**

L'utilisateur doit lire attentivement ces instructions et se familiariser avec le contenu du produit avant son utilisation. Le réactif et instructions fournis ont été conçus pour une performance optimale. Une dilution supplémentaire du réactif ou une altération des durées d'incubation ou de température peut donner des résultats erronés. Tous les réactifs doivent être équilibrés à température ambiante (20 à 25°C) avant l'immunomarquage. De même, toutes les incubations doivent être accomplies à température ambiante.

Ne pas laisser sécher les coupes de tissus pendant la procédure d'immunomarquage. Les coupes tissulaires sèches peuvent montrer un marquage non spécifique accru. Couvrir les lames exposées au courant d'air. Si des incubations prolongées sont utilisées, placer les tissus dans un endroit humide.

La sensibilité du Système EnVision+, HRP peut être augmentée davantage par la prolongation des durées d'incubation des Etapes 2 et 3 de 5 à 10 minutes.



### **Protocole de Marquage**

#### **ETAPE 1 BLOCAGE DE PEROXIDASE**

Tapoter l'excédant de tampon. En utilisant un tissu non pelucheux (tel que Kimwipe ou bande de gaze), essuyer parfaitement le contour de l'échantillon pour éliminer tout excédant de liquide et pour garder le réactif dans la zone prescrite.

Appliquer suffisamment de Peroxidase Block du Flacon 1 pour couvrir l'échantillon.

Incuber pendant 5 (± 1) minutes.

Rincer soigneusement avec de l'eau distillée ou solution tampon du flacon de lavage (ne pas concentrer le flux directement sur le tissu) et placer dans un bain tampon frais.

#### **ETAPE 2 ANTICORPS PRIMAIRE OU REACTIF DE TEMOIN NEGATIF**

Tapoter l'excédant de tampon et essuyer les lames comme auparavant.

Appliquer suffisamment d'anticorps primaire dilué de façon optimale ou le réactif du témoin négatif pour couvrir l'échantillon.

Incuber pendant 30 (± 1) minutes.

Rincer délicatement avec une solution tampon du flacon de lavage (ne pas placer le flux directement sur le tissu) et placer

dans un bain tampon frais.

Si la procédure de marquage doit être interrompue, les lames peuvent être gardés dans un bain tampon suite à l'incubation de l'anticorps primaire (Etape 2) pour un maximum d'une heure à température ambiante (20 à 25°C) sans affecter la performance du marquage.

#### **ETAPE 3 POLYMERE MARQUE A LA PEROXYDASE**

Tapoter l'excédant de tampon et essuyer les lames comme auparavant.

Appliquer suffisamment de Polymère Marqué du Flacon 2 pour couvrir l'échantillon.

Incuber pendant 30 (± 1) minutes.

Rincer les lames comme à l'étape 2.

#### **ETAPE 4 CHROMOGENE-SUBSTRAT**

Essuyer les lames comme auparavant.

Appliquer suffisamment de la solution chromogène-substrat pour couvrir l'échantillon

Incuber pendant 5 à 10 minutes.

Rincer parfaitement avec de l'eau distillée d'un flacon de lavage (ne pas concentrer le flux directement sur le tissu). Rassembler le rebut de chromogène-substrat dans un récipient pour matériaux dangereux pour une évacuation adéquate.

#### **ETAPE 5 MARQUAGE DE CONTRASTE HEMATOXYLINE (facultatif)**

Immerger les lames dans un bain d'hématoxyline aqueuse (code S3309). La durée de l'incubation dépend de la teneur de l'hématoxyline utilisée.

Rincer parfaitement dans un bain d'eau distillée.

Tremper les lames à 10 reprises dans un bain de 0,037 mol/L d'ammoniaque ou d'agent bleu similaire.

Rincer les lames dans un bain d'eau distillée ou déionisée pendant 2 à 5 minutes.

#### **ETAPE 6 MONTAGE**

Les échantillons peuvent être montés sur des lames et recouverts avec des lamelles avec le milieu de montage aqueux tel que le Glycergel Mounting Medium (code C0563) ou Faramount (code S3025) ou un milieu permanent non aqueux, Ultramount (code S1964). Les lames peuvent également être déshydratées et montées en permanence.

### **Contrôle de Qualité**

Les différences dans le traitement tissulaire et les procédures techniques dans le laboratoire de l'utilisateur peuvent produire une variabilité importante dans les résultats, nécessitant une performance régulière des contrôles en interne.

Consulter les directives de contrôle de qualité du College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry et les références 1 à 3 pour des informations supplémentaires. Se référer à la fiche des spécifications de chaque anticorps primaire utilisé pour les détails relatifs à la sensibilité et l'immunoréactivité.

Se référer aux « Instructions Générales pour le Marquage Immunohistochimique » pour toute information complémentaire sur les témoins négatifs et positifs.

### **Interprétation du marquage**

Se référer aux « Instructions Générales pour le Marquage Immunohistochimique » pour les indications d'interprétation.

## Limites du produit

Le marquage de tissu dépend du maniement adéquat et du traitement des tissus avant le marquage. Une fixation incorrecte, une congélation, décongélation, lavage, séchage, chauffage, sectionnement ou contamination avec d'autres tissus ou liquides peuvent produire des artefacts, au piègeage d'anticorps, ou à des résultats négatifs erronés.

L'usage de fixateurs anciens ou non tamponnés, ou l'exposition de tissus à un échauffement excessif (plus de 60°C) durant le traitement peut produire une sensibilité de marquage réduite.

La peroxydase endogène ou pseudo-péroxydase peut être trouvée dans les hémoprotéines telles que l'hémoglobine, la myoglobine, le cytochrome et la catalase aussi bien que dans les éosinophiles. Cette activité peut être inhibée en incubant des échantillons avec Peroxidase Block pendant cinq minutes avant l'application de l'anticorps primaire. Le sang et les frottis de la moelle osseuse et tissus congelés peuvent également être traités avec ce réactif. Cependant, cette procédure n'élimine pas le pigment rouge - marron des hémoprotéines. Alternativement, une solution de méthanol-péroxyde d'hydrogène peut être utilisée. Certains antigènes peuvent devenir dénaturés pendant cette procédure.

Des tissus de personnes infectées par le virus de l'hépatite B et contenant un antigène de surface de l'hépatite B (HBsAg) peuvent montrer un marquage non spécifique à la peroxydase de raifort.<sup>6</sup>

Un sérum normal/non immunitaire de la même source animale que l'antisérum secondaire utilisé dans les étapes de blocage peut causer des résultats positifs erronés et négatifs erronés à cause des auto-anticorps ou anticorps naturels. Les réactifs fournis dans ce kit ont été dilués optimalement. Une dilution supplémentaire peut produire une perte de la détection de l'antigène.

## Résolution de problèmes

<i>Problème</i>	<i>Cause Probable</i>	<i>Action suggérée</i>
1. Aucun marquage des lames.	1a. Réactifs non utilisés dans le bon ordre. 1b. Azide de sodium dans un bain tampon.	1a. Révision de l'application des réactifs. 1b. Utiliser un tampon frais et libre d'azide.
2. Un faible marquage de toutes les lames.	2a. Les coupes retiennent trop de solution après un bain-marie.  2b. Les lames pas incubées assez longtemps avec les anticorps ou le mélange substrat.	2a. Tapoter soigneusement l'excédant de la solution avant d'essuyer le contour de la coupe. 2b. Revoir les durées d'incubation requises.
3. Fond excessif de marquage de toutes les lames.	3a. Les échantillons contiennent une activité élevée de peroxydase. 3b. La paraffine n'est pas complètement éliminée.  3c. Les lames ne sont pas adéquatement rincées.  3d. Une réaction substrat plus rapide que la normale grâce à, par ex. une température ambiante excessive. 3e. Les coupes ont séchées pendant la procédure de marquage.  3f. Une liaison non spécifique des réactifs à la coupe de tissu. 3g. Anticorps excessivement concentré.	3a. Utiliser une durée d'incubation plus longue de peroxydase block, Flacon 1. 3b. Utiliser des bains de xylène ou de toluène frais. Si plusieurs lames sont marquées simultanément, le second bain xylène doit contenir du xylène frais. 3c. Utiliser des solutions fraîches dans des bains tampons et flacons de lavage. Alternativement, utiliser TBST 0,05 mol/L Tampon Tris contenant 0,3 mol/L NaCl et 0,1 % Tween (code S3306). 3d. Utiliser une période plus courte d'incubation avec la solution chromogène-substrat. 3e. Utiliser une chambre humide. Essuyer seulement trois à quatre lames à la fois avant d'appliquer le réactif. 3f. Appliquer une solution bloquante contenant et protéine non pertinente. 3g. Procéder à une dilution plus élevée de l'anticorps primaire.

NOTE : Si le problème ne peut être attribué à chacune des causes citées ci-dessus, ou si l'action corrective suggérée n'offre pas de solution au problème, veuillez contacter les Services Techniques de Dako pour de plus amples informations.

Des informations supplémentaires sur les techniques de marquage et la préparation de l'échantillon peuvent être trouvées dans *Handbook- Immunochemical Staining Methods* (disponibles chez Dako), *Atlas of Immunohistology et Immunoperoxidase Techniques, A practical Approach to Tumor Diagnosis*.<sup>9</sup>

**Code K4002 15 mL**  
**Code K4002 110 mL**

## GERMAN

**Zweckbestimmung** Zur Verwendung für In-vitro-Untersuchungen.

Diese Anleitungen gelten für **Dako EnVision®+, Peroxidase** (DC EnVision+ System, HRP).

Das Kit ist für die Verwendung mit vom Benutzer bereitgestellten primären Antikörpern von **Kaninchen** für die qualitative Identifizierung von Antigenen anhand von Lichtmikroskopie in normalen und pathologischen paraffineingebetteten Geweben, Kryostatgeweben oder Zellpräparationen vorgesehen. In einer Vielzahl von Fixativen, wie u.a. Ethanol, B-5, Bouin-Lösung, Zinkformalin und neutrales gepuffertes Formalin, verarbeitetes Gewebe kann verwendet werden.

Siehe "Allgemeine Anweisungen für die immunhistochemische Färbung" oder die „Anleitungen“ zu immunhistochemischen Verfahren des Nachweissystems für: (1) Verfahrensprinzip, (2) Erforderliche Materialien, die nicht im Testkit enthalten sind, (3) Lagerung, (4) Probenvorbereitung, (5) Färbeverfahren, (6) Qualitätskontrolle, (7) Fehlerbehebung, (8) Interpretation der Färbung, (9) Allgemeine Beschränkungen.

## **Zusammenfassung und Erläuterung**

Beim EnVision+ System, HRP handelt es sich um eine zweistufige IHC-Färbungsmethode. Dieses System basiert auf einem HRP-markierten Polymer, das mit sekundären Antikörpern konjugiert ist. Das markierte Polymer enthält kein Avidin oder Biotin. Infolgedessen entfällt die nicht-spezifische Färbung aufgrund endogener Avidin-Biotin-Aktivität in Leber, Niere, Lymphgeweben und Kryostatschnitten oder reduziert diese erheblich. Das Reagenz in EnVision+, HRP ist gebrauchsfertig. Dieses System ist eine extrem sensible Methode und infolgedessen sind optimale Verdünnungen des primären Antikörpers 20-mal höher, als jene, die in der herkömmlicheren PAP-Methode verwendet werden und mehrfach höher als jene, die in der herkömmlichen ABC- oder LSAB-Methode verwendet werden. Dieses Protokoll stellt ein verstärktes Signalerzeugungssystem für den Nachweis von Antigenen bereit, die in niedrigen Konzentrationen vorliegen oder für primäre Antikörper mit niedrigem Titer. In Kaninchen produzierte primäre Antikörper reagieren gut mit dem markierten Polymer. Die Interpretation jeder positiven Färbung bzw. deren Fehlen sollte durch morphologische und histologische Studien mit richtigen Kontrollen ergänzt werden.

## **Verfahrensprinzip**

Jede endogene Peroxidaseaktivität wird durch die Inkubation der Probe mit einer entsprechenden endogenen Blockingsubstanz gelöscht. Die Probe wird dann mit einem entsprechend charakterisierten und verdünnten primären Antikörper von Kaninchen inkubiert, gefolgt von einer Inkubation mit dem markierten Polymer unter Verwendung von zwei aufeinander folgenden 30-minütigen Inkubationen. **Es sollte beachtet werden, dass es notwendig sein kann, bei Antikörpern, für die Enzymverdauung oder Antidemaskierung erforderlich ist, die Inkubationszeiten des primären Antikörpers und markierten Polymers um 5 bis 10 Minuten zu verlängern.** Färbung wird mit einer Inkubation von 5-10 Minuten mit einem geeigneten Substrat-Chromogen abgeschlossen.

## **Geliefertes Reagenz**

### **Code K4002**

Das Folgende ist für 150 Gewebeschnitte, bei 100 µL pro Schnitt, ausreichend:

<i>Flaschen-Nr.</i>	<i>Menge</i>	<i>Beschreibung</i>
2	1x15 mL	<b>Markiertes Polymer:</b> Peroxidasemarkiertes Polymer konjugiert an Ziegen Anti-Kaninchen Immunglobuline in Tris-HCl-Puffer, das stabilisierendes Protein und eine antimikrobielle Substanz enthält.

### **Code K4003**

Das Folgende ist für 1100 Gewebeschnitte, ausgehend von 1100 Gewebeschnitten, bei 100 µL pro Schnitt, ausreichend:

<i>Flaschen-Nr.</i>	<i>Menge</i>	<i>Beschreibung</i>
1	1x110 mL	<b>Markiertes Polymer:</b> Peroxidase-markiertes Polymer konjugiert an Ziegen Anti-Kaninchen Immunglobuline in Tris-HCl-Puffer, das stabilisierendes Protein und eine antimikrobielle Substanz enthält.

**Zusätzlich benötigte Reagenzien und Zubehör (außerhalb des Lieferumfangs)**

Absorbierende Tücher  
Kontrollgewebe, positiv und negativ  
Gegenfärbung; auf wässriger Basis, wie z.B. Mayers Hämatoxylin oder Lillies modifizierte Mayers Hämatoxylin  
(Code S3309)  
Deckglas  
Destilliertes Wasser  
Endogenes Peroxidblockingreagenz wie z.B. Peroxidase Block (Code S2001)  
Ethanol, absolut und 95%  
Lichtmikroskop (20x–800x)  
Eindeckmedium wie z.B. Glycergel® Eindeckmedium (Code C0563) oder Faramount, Wässriges Eindeckmedium, Gebrauchsfertig (Code S3025) oder nicht-wässriges permanentes Eindeckmedium, Ultramount (Code S1964)  
Primäre Antikörper und Negativkontrollreagenz  
Objektträger, Poly-L-Lysin-beschichtete oder silanisierte Objektträger (Code S3003)  
Färbungsschalen oder -bäder  
Substrat-Chromogen-Lösung wie z.B. AEC+ Substrat-Chromogen (Code K3469, , gebrauchsfertig) oder Liquid DAB+ ( Code K3468)  
Stoppuhr (mit Kapazität für 3–40 Minuten Intervalle)  
Waschflaschen  
Waschpufferlösung  
Xylen-, Toluol- oder Xylenersatz

**Wahlweise erforderliche Materialien, die außerhalb des Lieferumfangs sind**

Salmiakgeist, 15 mol/L verdünnt auf 0,037 mol/L  
PAP Pen (Code S2002)

**Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen**

1. Für geschultes Fachpersonal.
2. Die Reagenzien nicht nach dem Verfallsdatum für vorgeschriebene Lagerungsmethoden verwenden. Falls die Reagenzien unter anderen Bedingungen als den in der Packungsbeilage beschriebenen aufbewahrt werden, so müssen diese vom Anwender validiert werden.
3. Die Reagenzien nicht mit anderen Chargennummern oder Kits anderer Hersteller ersetzen.
4. Enzyme und Substrat-Chromogene können nachteilig beeinträchtigt werden, wenn sie übermäßiger Lichteinwirkung ausgesetzt sind.  
Die Bestandteile des Kits nicht bei starkem Licht, wie direkter Sonneneinstrahlung, lagern oder Färbungen durchführen.
5. Inkubationszeiten oder –temperaturen, die außerhalb der spezifizierten Bereiche liegen, können zu fehlerhaften Ergebnissen führen; solche Änderungen müssen vom Benutzer validiert werden.
6. Wie bei allen aus biologischen Materialien gewonnenen Produkten müssen die ordnungsgemäßen Handhabungsverfahren eingehalten werden.
7. Entsprechende Schutzkleidung tragen, um Kontakt mit Augen und Haut zu vermeiden.
8. Nicht verwendete Lösung sollte entsprechend der örtlich, staatlich oder bundesstaatlich anwendbaren Vorschriften entsorgt werden.

**Lagerung**

EnVision+, HRP muss bei 2–8°C gelagert werden. Nicht einfrieren.  
Nicht nach dem auf den Reagenzfläschchen und Produktetiketten aufgedruckten Verfallsdatum verwenden.

Änderungen des Erscheinungsbilds von Reagenzien, wie beispielsweise Präzipitation, kann auf Instabilität oder Verfall hinweisen.

In solchen Fällen darf/dürfen das/die Reagenz(ien) nicht verwendet werden.

Es gibt keine offensichtlichen Anhaltspunkte für eine mögliche Instabilität dieses Produktes. Es sollten daher die Positiv- und Negativkontrollen gleichzeitig mit den Patientenproben mitgeführt werden. Wenn unerwartete Verfärbung beobachtet wird, welche durch Änderungen in den Labormethoden nicht erklärt werden kann und falls Verdacht auf ein Problem mit dem Kit besteht, ist bitte Kontakt mit dem technischen Kundendienst von Dako aufzunehmen.

**Reagenzienvorbereitung** Es ist von Vorteil, die folgenden Reagenzien vor der Färbung vorzubereiten.

#### **Waschpufferlösung**

TBST, 0,05 mol/L Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween (Code S3006) wird als Waschpuffer für den automatisierten und manuellen immunhistochemischen Nachweis empfohlen. TBS, 0,05 mol/L Tris gepufferte Kochsalzlösung (Code S1968) und PBS, 0,02 mol/L phosphatgepufferte Kochsalzlösung (Code S3024) sind auch als Waschpufferlösungen beim manuellen Färben geeignet. Natriumazidhaltige Waschpufferlösungen werden nicht empfohlen. Natriumazid macht Meerrettich-Peroxidase (HRP) inaktiv, was zu negativer Färbung führt. Nicht verwendeten Puffer bei 2–8°C lagern. Puffer entsorgen, wenn er trübe wird.

Destilliertes Wasser kann für das Spülen von Peroxidaseblock, Substrat und Gegenfärbung verwendet werden.

#### **Primärer Antikörper**

NP-Serie "Plus" gebrauchsfertige Antikörper sind optimiert und werden für die Verwendung mit dem Dako "Plus" Hoch-Sensitivitäts-Nachweissystem empfohlen. Konzentrierte Antikörper sind auch von Dako erhältlich. Die Optimierung konzentrierter Antikörper muss vom Endverbraucher erstellt werden. Verdünnungen sollten mit der Antikörperverdünnungslösung (Code S0809) oder einer Verdünnungslösung, die 0,05 mol/L Tris-HCl Puffer mit 1% Rinderserumalbumin (BSA) enthält, vorbereitet werden. Dako N-Serie gebrauchsfertige Antikörper sind nicht für die Verwendung mit dem Dako "Plus" Nachweissystem optimiert. Für die meisten mit diesem Kit verwendeten Antikörper ist eine Inkubationszeit von 30 Minuten ausreichend.

#### **Negativkontrollreagenz**

Idealerweise enthält ein Negativkontrollreagenz einen Antikörper, der bei humanen Geweben oder normalem/nicht-immunem Serum in derselben Matrix/Lösung wie der verdünnte primäre Antikörper keine spezifische Reaktivität aufweist. Das Negativkontrollreagenz sollte aus derselben Unterklasse und Tiergattung wie der primäre Antikörper stammen, auf dieselbe Immunglobulin- oder Proteinkonzentration verdünnt sein, wie der verdünnte primäre Antikörper bei Verwendung desselben Verdünnungsmediums. Die Inkubationszeit für das Negativkontrollreagenz sollte dem des primären Antikörpers entsprechen.

Bei Verwendung von Dako NP-Serie "Plus" gebrauchsfertige Antikörper, wird Universal Negative Control+ optimiert für die Verwendung mit Kaninchen (Code NP001) NP-Serie "Plus" gebrauchsfertige Antikörper als Negativkontrollreagenz empfohlen.

Für spezifische Information in Bezug auf die Vorbereitung des Negativkontrollreagenz siehe Abschnitt Qualitätskontrolle.

#### **Gegenfärbung**

Das farbige Endprodukt der Färbungsreaktion ist nicht alkohollöslich und kann mit Gegenfärbung auf Alkohol- oder wässriger Basis wie z. B. Mayers Hämatoxylin oder Lillies modifiziertes Mayers Hämatoxylin (Code S3309) verwendet werden. Nach der Gegenfärbung mit Hämatoxylin gründlich in destilliertem Wasser spülen, dann die Gewebeobjektträger in ein Bad mit 0,037 mol/L Ammoniak oder ähnlicher blaufärbender Substanz legen. 0,037 mol/L Teerwasser wird vorbereitet, indem 2,5 mL 15 mol/L (konzentriert) Salmiakgeist mit 1 Liter Wasser gemischt wird.

Nicht verwendeter 0,037 mol/L Ammoniak kann bei Raumtemperatur (20–25°C) in einer fest verschlossenen Flasche für bis zu 12 Monaten gelagert werden.

Die Richtlinien des Herstellers für alternative Gegenfärbungsverfahren zurateziehen.

#### **Eindeckmedium**

Glycergel Mounting Medium (Code C0563) oder Faramount, Aqueous Mounting Medium, Gebrauchsfertig (Code S3025) wird für die wässrige Eindeckung empfohlen. Glycergel muss kurz vor der Verwendung auf mindestens 50°C aufgewärmt werden. Nicht-wässriges permanentes Eindeckmedium (Ultramount, code S1964) kann auch verwendet werden.

#### **Probenvorbereitung**

Siehe die „Allgemeinen Anleitungen für immunhistochemische Färbung“ und/oder das Antikörper-Spezifikations-Blatt.

Vor der immunhistochemischen Färbung müssen die Gewebe fixiert und verarbeitet werden. Fixation verhindert Autolyse und Verwesung von exzidierten Geweben, konserviert Antigenität, verstärkt den Refraktionsindex der Gewebebestandteile und erhöht die Resistenz der Zellelemente gegenüber Gewebeverarbeitung. Gewebeverarbeitung umfasst Dehydrierung, Klärung der Dehydrationssubstanzen, Infiltration der eingebetteten Medien, Einbettung und Schneiden der Gewebe. Die gebräuchlichsten Fixative für immunhistochemische Gewebepreparationen werden in den allgemeinen Anleitungen für immunhistochemische Färbung besprochen. Es handelt sich hierbei nur um Richtlinien. Optimale Verfahren müssen vom Verwender bestimmt und verifiziert werden.

## Färbeprozedur

### Verfahrenshinweise

Der Benutzer sollte diese Anleitungen sorgfältig lesen und sich vor der Verwendung mit dem Inhalt des Produkts vertraut machen. Die in diesem Kit gelieferten Reagenzien und Anleitungen sind für eine optimale Leistung konzipiert. Weitere Verdünnung der Kitreagenzien oder Änderungen der Inkubationszeiten oder –temperaturen können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Alle Reagenzien sollten vor der Immunfärbung auf Zimmertemperatur gebracht werden (20–25°C). Gleichermaßen sollten alle Inkubationen bei Zimmertemperatur durchgeführt werden.

Gewebeschnitte während des Färbungsverfahrens nicht austrocknen lassen. Getrocknete Gewebeschnitte können erhöhte nicht-spezifische Färbung aufweisen. Zugluft ausgesetzte Objektträger abdecken. Werden längere Inkubationen verwendet, Gewebe in eine feuchte Umgebung stellen.

Die Sensitivität von EnVision+ System, HRP kann noch weiter gesteigert werden, indem die Inkubationszeiten von Schritten 2 und 3 um 5-10 Minuten verlängert werden.

### Färbungsprotokoll

#### SCHRITT 1 PEROXIDASEBLOCK

Überschüssige Flüssigkeit abtupfen. Mit einem fusselfreien Tuch (wie Kimwipe oder Gaze) vorsichtig um die Probe herumwischen, um etwa verbleibende Flüssigkeit zu entfernen und die Reagenzien in dem vorgeschriebenen Bereich zu behalten.

Genügend Wasserstoffperoxid aus Flasche 1 applizieren, um Probe zu bedecken.

5 (±1) Minuten inkubieren.

Vorsichtig mit destilliertem Wasser oder Pufferlösung aus einer Waschflasche spülen (Wasserstrom nicht direkt auf Gewebe richten) und in ein frisches Pufferbad legen.

#### SCHRITT 2 PRIMÄRER ANTIKÖRPER ODER NEGATIVKONTROLLREAGENZ

Überschüssiges Puffer wegtupfen und Objektträger wie zuvor wischen.

Ausreichend vom Verwender vorbereiteten primären Antikörper oder Negativkontrollreagenz applizieren, um Probe abzudecken.

30 (±1) Minuten inkubieren.

Vorsichtig mit Pufferlösung aus einer Waschflasche spülen (Wasserstrom nicht direkt auf Gewebe richten) frisches Pufferbad legen.

Wenn das Färbungsverfahren unterbrochen werden muss, können Objektträger nach der Inkubation des primären Antikörpers (Schritt 2) bis maximal eine Stunde bei Zimmertemperatur (20–25°C) in einem Pufferbad gelassen werden, ohne dadurch die Färbungsleistung

#### SCHRITT 3 PEROXIDASE-MARKIERTES POLYMER

Überschüssiges Puffer wegtupfen und Objektträger wie zuvor wischen.

Genügend markiertes Polymer aus Flasche 2 applizieren, um Probe zu bedecken.

30 (±1) Minuten inkubieren.

Objektträger wie in Schritt 2 spülen.

#### SCHRITT 4 SUBSTRAT-CHROMOGEN

Objektträger wie zuvor wischen.

Genügend Substrat-Chromogen-Lösung applizieren, um die Probe zu bedecken

5-10 Minuten inkubieren.

Vorsichtig mit destilliertem Wasser aus einer Waschflasche spülen (Wasserstrom nicht direkt auf das Gewebe richten). Substrat-Chromogen in einem Behälter für Gefahrenstoffe für die richtige Entsorgung sammeln.

#### SCHRITT 5 HÄMATOXYLIN-GEGENFÄRBUNG (wahlweise)

Objektträger in ein Bad mit wässrigem Hämatoxylin (Code S3309) eintauchen. Die Länge der Inkubation hängt von der Stärke des verwendeten Hämatoxylins ab.

Vorsichtig in einem Bad mit destilliertem Wasser spülen.

Objektträger 10-mal in ein Bad mit 0,037 mol/L Ammoniak oder eine vergleichbare blaufärbende Substanz eintauchen.

Objektträger 2-5 Minuten in einem Bad mit destilliertem oder deionisiertem Wasser spülen.

#### SCHRITT 6 ABDECKUNG

Proben können mit einem Eindeckmedium auf wässriger Basis wie beispielsweise Glycergel Eindeckmedium (Code C0563) oder Faramount (Code S3025) oder nicht-wässriges permanentes Eindeckmedium, Ultramount (Code S1964) eingedeckt werden. Objektträger können auch dehydriert und permanent eingedeckt werden.

**Qualitätskontrolle**

Unterschiede bei der Gewebeerarbeitung und bei den technischen Verfahren im Labor des Benutzers können zu erheblicher Variabilität der Ergebnisse führen, die eine regelmäßige Durchführung von hausinternen Kontrollen erforderlich macht.

Ziehen Sie die Qualitätskontrollrichtlinien des College of American Pathologists (CAP) Certification Programms für Immunhistochemie und Literaturhinweise 1 bis 3 für zusätzliche Information zurate. Siehe das Spezifikationsblatt für jeden verwendeten primären Antikörper für Details in Hinsicht auf Sensitivität und Immunreaktivität.

Siehe die „Allgemeinen Anleitungen für die immunhistochemische Färbung“ für weitere Information über Positiv- und Negativkontrollen.

**Interpretation der Färbung**

Siehe die „Allgemeinen Anleitungen für die immunhistochemische Färbung“ für die Interpretationsrichtlinien.

**Produktspezifische Beschränkungen**

Gewebefärbung hängt von der richtigen Handhabung und Verarbeitung des Gewebes vor der Färbung ab. Falsche Fixation, falsches Einfrieren, Auftauen, Waschen, Trocknen, Erwärmen, Schneiden oder Kontamination mit anderen Geweben oder Flüssigkeiten können Artefakte, Antikörpereinschlüsse oder falsche Negativergebnisse erzeugen.

Die Verwendung alter oder ungepufferter Fixative oder wenn die Gewebe während der Verarbeitung übermäßiger Hitze (über 60°C) ausgesetzt werden, kann zu einer Herabsetzung der Färbungsintensität führen.

Endogene Peroxidase- oder Pseudoperoxidaseaktivität kann in Hämoproteinen wie Hämoglobin, Myoglobin, Cytochrom und Catalase sowie in Eosinophilen gefunden werden.<sup>4,5</sup> Diese Aktivität kann blockiert werden, indem Proben fünf Minuten vor der Anbringung des primären Antikörpers mit Peroxidase Block inkubiert werden. Blut- und Knochenmarkabstriche und Gefrierschnitte können auch mit diesem Reagenz behandelt werden. Dieses Verfahren schafft jedoch das rotbraune Pigment der Hämoproteine nicht ab. Alternativ kann eine Lösung aus Methanolwasserstoffperoxid verwendet werden. Einige Antigene werden bei diesem Verfahren denaturiert.

Gewebe von mit dem Hepatitis B Virus infizierten Personen und Hepatitis B Oberflächenantigen (HBsAg) enthaltendes Gewebe kann mit Meerrettichperoxidase eine nicht-spezifische Färbung aufweisen.<sup>6</sup>

Normale/nicht-immune Seren aus derselben Tierquelle wie die in Blockierschritten verwendeten sekundären Antiseren können zu falsch negativen oder falsch positiven Ergebnissen auf Grund der Auto-Antikörper oder natürlichen Antikörper führen. Die in diesem Kit gelieferten Reagenzien sind optimal verdünnt. Eine weitere Verdünnung kann zu einem Verlust des Antigennachweises führen.

## Fehlerbehebung

Problem	Wahrscheinliche Ursache	Vorgeschlagene Maßnahme
1. Keine Färbung der Objektträger.	1a. Reagenzien nicht in der richtigen Reihenfolge verwendet.	1a. Anwendung der Reagenzien überprüfen.
	1b. Natrium-Azid in Pufferbad.	1b. Frischen, azidfreien Puffer verwenden.
2. Schwache Färbung aller Objektträger.	2a. Schnitte behalten zu viel Lösung nach dem Wasserbad bei.	2a. Vorsichtig überschüssige Lösung abtupfen, bevor um den Schnitt herum gewischt wird.
	2b. Objektträger nicht lange genug mit Antikörpern oder Substratmischung inkubiert.	2b. Empfohlene Inkubationszeiten überprüfen.
3. Übermäßige Hintergrundfärbung auf allen Objektträgern.	3a. Proben enthalten eine hohe endogene Peroxidaseaktivität.	3a. Längere Inkubationszeit mit Peroxidaseblock, Flasche 1, verwenden.
	3b. Paraffin nicht vollständig entfernt.	3b. Frisches Xylen- oder Toluolbad verwenden. Wenn mehrere Objektträger gleichzeitig gefärbt werden, sollte das zweite Xylenbad frisches Xylen enthalten.
	3c. Objektträger nicht richtig gespült.	3c. Frische Lösung in Pufferbädern und Waschflaschen verwenden. Alternativ TBST 0,05 mol/L Tris Buffer, das 0,3 mol/L NaCl und 0,1% Tween (Code S3306) enthält, verwenden.
	3d. Substratreaktion schneller als normal, z.B. auf Grund erhöhter Zimmertemperatur.	3d. Kürzere Inkubationszeit mit Substrat-Chromogen-Lösung verwenden.
	3e. Schnitte während des Färbungsverfahrens eingetrocknet.	3e. Feuchtigkeitskammer verwenden. Nur drei bis vier Objektträger auf einmal wischen, bevor das Reagenz appliziert wird.
	3f. Nichtspezifische Bindung der Reagenzien an Gewebeschnitte.	3f. Eine Blockinglösung applizieren, die ein irrelevantes Protein enthält.
	3g. Antikörper zu konzentriert.	3g. siehe höhere Verdünnung des primären Antikörpers.

HINWEIS: Kann das Problem nicht auf eine der obigen Ursachen zurückgeführt werden oder falls die empfohlene Abhilfemaßnahme das Problem nicht behebt, bitte die Technische Unterstützung von Dako für weitere Hilfe anrufen.

Zusätzliche Information über Färbungsmethoden und Probenvorbereitung findet sich in dem Handbuch - *Immunochemical Staining Methods*<sup>7</sup> (von Dako erhältlich), *Atlas of Immunohistology*<sup>8</sup> und *Immunoperoxidase Techniques, A Practical Approach to Tumor Diagnosis*.<sup>9</sup>



**References**  
**Références**  
**Literatur**

1. Elias JM, et al. Special report: Quality control in immunohistochemistry. *Amer J Clin Pathol* 1989; 92:836
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Internal quality control testing: principles and definitions; approved guideline. Villanova, PA 1991; Order code C24-A:4
3. Herman GE and Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: The new era of quality control. *Biotech & Histochem* 1991; 66:194
4. Escribano LM, et al. Endogenous peroxidase activity in human cutaneous and adenoidal mast cells. *J Histochem Cytochem* 1987; 35:213
5. Elias JM. *Immunohistopathology: A practical approach to diagnosis*. Chicago: Amer Soc of Clin Pathol Press 1990; 46
6. Omata M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: A possible source of error in immunohistochemistry. *Amer J Pathol* 1980; 73:626
7. Naish SJ (ed). *Handbook-immunochemical staining methods*. Carpinteria: Dako 1989
8. Tubbs RR, et al. *Atlas of immunohistology*. Chicago: Amer Soc Clin Pathol Press 1986
9. Nadji M and Morales AR. *Immunoperoxidase techniques, a practical approach to tumor diagnosis*. Chicago: Amer Soc Clin Pathol Press 1986

**Additional references**  
**Références**  
**supplémentaires**  
**Weitere literatur**

- Cartun RW. Immunohistochemistry of infectious diseases. *J Histotechnol* 1995; 18(3):195
- Heras A, et al. Enhanced labelled-polymer system for immunohistochemistry. XVth Eur Cong Pathol. Copenhagen, Denmark 1995; Sept 3-8
- Bisgaard K and Pluzek K-P. Use of polymer conjugates in immunohistochemistry: A comparative study of a traditional staining method to a staining method utilizing polymer conjugates. Abstract. XXI Intl Cong Intl Acad Pathol and 12th World Cong Acad Environ Pathol. Budapest, Hungary 1996; Oct 20-25
- Pileri SA, et al. EnVision Plus: A new powerful tool for diagnosis and research. Symposium. XXI Intl Cong Intl Acad Pathol and 12th World Cong Acad Environ Pathol. Budapest, Hungary 1996; Oct 20-25
- Bisgaard K. EnVision Plus—Introduction to a new technology. Abstract. Dako Symposium. XXI Intl Cong Intl Acad Pathol. Budapest, Hungary 1996; Oct 20-25
-