

GEBRAUCHSANLEITUNG

Der Januar, 2019

N-Histofine® Simple Stain MAX PO (R)

Universelles Immun-Peroxidase Polymer, Anti-Kaninchen
N-Histofine® Immunhistochemisches Färbereagenz

Lagerung bei 2-8°C

Beinhaltete Reagenzien

17 ml x 1 Flasche	(170 Tests)	Katalog-Nr.: 414141F
17 ml x 3 Flaschen	(500 Tests)	Katalog-Nr.: 414142F
17 ml x 9 Flaschen	(1500 Tests)	Katalog-Nr.: 414144F

1. EINLEITUNG

NICHIREI BIOSCIENCES hat ein einzigartiges immunhistochemisches Färbesystem mit den Namen Universelles Immun-Enzym Polymer (UIP) entwickelt und patentiert (US-Patent Nr. 6.252.053). **N**-Histofine® Simple Stain MAX PO (R) bietet zugleich eine hohe Sensitivität und spart Zeit bei immunhistochemischen Applikationen.

2. BESCHREIBUNG

Flüssig, Gebrauchsfertig.

N-Histofine® Simple Stain MAX PO (R) (Universelles Immun-Peroxidase Polymer, Anti-Kaninchen) besteht aus einem Polymer aus Aminosäuren, welches mit Peroxidase und Ziege Anti-Kaninchen Ig, reduziert zu F(ab')₂-Fragmenten, konjugiert ist. Es wird in MOPS (3-Morpholinpropansulfonsäure) Puffer (pH 6,5) gelagert, welches einen Stabilisator und einen antibakteriellen Zusatz enthält.

Die IgG-Fraktion wird aus immunisierten Ziegenserum aufgereinigt und enzymatisch zu F(ab')₂-Fragmenten reduziert. Diese antigenspezifischen F(ab')₂-Fragmente werden mit dem Antigen affinitäts-gereinigt. Mit Humanserumprotein wird eine Festphasenabsorption durchgeführt. Die zu F(ab)-reduzierten F(ab')₂-Fragmente werden an das peroxidase-markierte Aminosäurepolymer konjugiert. Dieses System enthält weder Biotin noch Streptavidin und vermeidet so die durch traditionelle Biotin basierte Detektionssysteme entstehenden Hintergrundreaktionen.

3. VERWENDUNGSZWECK

Zur In-vitro-Diagnostik.

Die Interpretation der Ergebnisse sollte stets im Zusammenhang mit dem klinischen Bild der Patienten und weiteren diagnostischen Parametern durch einen qualifizierten Pathologen erfolgen.

N-Histofine® Simple Stain MAX PO (R) wurde zur Durchführung immunhistochemischer Tests entwickelt. Das System weist auf humanen Geweben und Zellen Kaninchenprimärantikörper nach, die vom Anwender zum Erkennen von Antigenen eingesetzt werden.

4. TESTPRINZIP

Der Antigen/Antikörper/Universelle Immun-Peroxidase Polymerkomplex kann hergestellt werden, in dem das Reagenz mit einem Kaninchenprimärantikörper reagiert, der an ein Antigen auf einem Gewebeschnitt gebunden ist. Die enzymatische Aktivität dieses Komplexes resultiert in einem farbigen Niederschlag, der die Stelle des nachzuweisenden Antigens färbt.

5. VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Vor Verwendung des Reagenzes bitte die Gebrauchsanweisung lesen.
2. Verfallene Reagenzien dürfen nicht mehr benutzt werden.
3. Nur für professionelle Anwender.
4. Das Reagenz enthält Material tierischen Ursprungs. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass auf Grund der Herstellungsverfahren auch Spuren von Material menschlichen Ursprungs enthalten sind. Wie alle Produkte biologischen Ursprungs muss auch dieses entsprechend gehandhabt werden.

5. Einatmen oder Verschlucken des hochallergischen Formaldehyds ist gesundheitsschädlich. Schutzmaske tragen. Bei Verschlucken Erbrechen induzieren. Bei Haut- oder Augenkontakt gut mit Wasser auswaschen.
6. Organische Reagenzien sind entzündlich, bitte nicht in der Nähe einer offenen Flamme verwenden.
7. Die Reagenzien nie mit dem Mund pipettieren und den Kontakt mit Haut, Schleimhäuten und Kleidung vermeiden.
8. Mikrobielle Kontamination der Reagenzien vermeiden, weil diese die Ergebnisse verfälschen könnten.
9. Das Verspritzen von Reagenzien oder das Entstehen von Aerosolen ist zu vermeiden.
10. Die chromogene DAB-Lösung sollte mit Vorsicht behandelt werden, weil sie Karzinogene enthält. Nicht verwendete DAB-Lösung sollte entsprechend den Vorschriften entsorgt werden.
11. Die national verbindlichen Arbeitsvorschriften sind zu beachten.

6. FÄRBEVERFAHREN

Erforderliches aber nicht mitgeliefertes Material und Reagenzien

- Xylol
- 95% Ethanol
- 100% Ethanol
- PBS (pH 7,6±0,2)
NaCl 7,75 g
K₂HPO₄ 1,50 g
KH₂PO₄ 0,20 g
destilliertes Wasser 1 l
- 3% Wasserstoffperoxid in absoluten Methanol (1 Teil 30% Wasserstoffperoxid mit 9 Teilen absoluten Methanol vermengen)
- Kaninchenprimärantikörper
- Negativkontrolle
- Chromogen/Substrat
- Gegenfärbemittel
- Destilliertes Wasser
- Feuchte Kammer für die Inkubation der Objektträger
- Lichtmikroskop
- Deckgläschen
- Eindeckmedium
- Stoppuhr
- Färbegestelle oder Küvetten
- Absorbierende Tücher
- Beschichtete Objektträger (beschichtet mit 0,02% Poly-L-Lysin, Silan o.ä.)

□ Probenvorbereitung

(Paraffineingebettete Gewebeschnitte)

Um Fixationsartefakte oder eine Denaturierung des Antigens durch zu hoch konzentriertes Fixativ, zu kurze oder zu lange Fixation der Probe zu vermeiden und die Gewebemorphologie und Antigenaktivität zu erhalten, sollten die Gewebe möglichst frisch und möglichst kleine Gewebestücke ca. 1 x 1 x 0,5 cm verwendet werden. Die empfohlenen Fixative:

Fixativ	Fixationszeit
10% Formalin oder gepuffertes Formalin	24 - 48 Stunden
20% Formalin	12 - 24 Stunden

(Gefrierschnitte)

Die Proben werden eingebettet (z. B. in OTC compound) und schnell in n-Hexan auf Trockeneis, Azeton oder flüssigem Stickstoff gefroren.

□ Schnittpräparation

(Paraffineingebettete Gewebeschnitte)

Die Schnittdicke sollte zwischen 3 und 6 µm liegen. Wenn eine enzymatische Vorbehandlung oder andere Antigendemaskierung durchgeführt werden soll, sollte der Glasobjektträger vor Aufziehen der Schnitte mit einem Adhäsiv beschichtet werden (z.B. 0,02% Poly-L-Lysin oder Silan).

(Gefrierschnitte)

Die Kryostatschnitte werden auf mit Adhäsiv beschichteten Objektträger aufgezogen und luftgetrocknet. Die Schnitte sollten in 100% Azeton für 10 Minuten bei Raumtemperatur oder 4% Paraformaldehyd (PBS-Lösung) für 10 Minuten bei 4 °C fixiert und dann gefärbt werden.

(Kontrollschnitte)

Eine positive Kontrolle, eine negative Kontrolle und eine Reagenzienkontrolle werden benötigt und sollten auf dieselbe Weise wie die unbekannte Probe prozessiert werden, um die Färberegebnisse richtig zu interpretieren.

- Positiver Kontrollobjektträger
Eine Probe, die das Zielantigen enthält und genauso wie die unbekannte Probe behandelt wird.
- Negativer Kontrollobjektträger
Eine Probe, die das Zielantigen nicht enthält und genauso wie die unbekannte Probe behandelt wird.
- Reagenzien-Kontrollobjektträger
Eine Kontrollprobe wird benutzt und auf dieselbe Art und Weise wie die unbekannte Probe behandelt. Der Primärantikörper wird durch ein negatives Kontrollreagenz ersetzt.

□ Entparaffinierung und Dehydrierung

1. Behandlung mit Xylol
 - (1) Die Schnitte in Xylol tauchen, nach 3 Minuten herausnehmen und das überschüssige Xylol abschütteln.
 - (2) Zweimal wiederholen von Schritt 1.(1) mit frischem Xylol.
2. Behandlung mit Ethanol
 - (1) Die Schnitte in 100% Ethanol tauchen, nach 3 Minuten herausnehmen und das überschüssige Ethanol abschütteln.
 - (2) Einmal wiederholen von Schritt 2.(1) mit frischen 100 % Ethanol.
 - (3) Dann zweimal mit 95% Ethanol auf dieselbe Art, wie oben beschrieben, behandeln.
3. Waschen
Nach Abschütteln des überschüssigen Ethanols, die Schnitte für 5 Minuten in PBS tauchen.

□ Färbeprozedur

1. Blockieren endogener Peroxidase
 - (1) Überschüssigen Waschpuffer um die Schnitte mit einem saugfähigen Tuch entfernen.
 - (2) Die Schnitte in 3% Wasserstoffperoxid/Methanol für 10-15 Minuten bei Raumtemperatur tauchen. (15 - 25°C)
 - (3) Mit frischem PBS dreimal je 5 Minuten waschen.
2. Zugabe und Reaktion mit Primärantikörper
 - (1) Überschüssigen Waschpuffer um die Schnitte mit einem saugfähigen Tuch entfernen.
 - (2) Zwei Tropfen (100 µl) des Primärantikörpers auf die unbekannte Probe, den positiven Kontrollobjektträger und die negative Kontrolle geben, so dass die Schnitte komplett bedeckt sind.
 - (3) Auf den Reagenzienkontrollobjektträger zwei Tropfen des negativen Kontrollreagenzes anstelle des Primärantikörpers geben.
 - (4) Inkubieren bei Raumtemperatur oder 4 °C, gemäß den Anleitungen der Packungsbeilagen des Primärantikörpers.
 - (5) In frischem PBS dreimal für 5 Minuten waschen.
3. Zugabe und Reaktion von **N-Histofine®** Simple Stain MAX PO (R) (Universelles Immun-Peroxidase Polymer, Anti-Kaninchen).
 - (1) Überschüssigen Waschpuffer um die Schnitte mit einem saugfähigen Tuch entfernen.
 - (2) Zwei Tropfen (100 µl) von Simple Stain MAX PO (R) auf jeden Schnitt geben, so dass die Schnitte komplett bedeckt sind. Bei Raumtemperatur (15 - 25°C) für 30 Minuten inkubieren.
 - (3) In frischem PBS dreimal für je 5 Minuten waschen.
4. Zugabe und Reaktion des Chromogen-/Substrat-Reagenzes
 - (1) Überschüssigen Waschpuffer um die Schnitte mit einem saugfähigen Tuch entfernen.
 - (2) Zwei Tropfen des Chromogen-/Substrat-Reagenzes (100 µl) auf jeden Schnitt geben, so dass die Schnitte komplett bedeckt sind. Bei Raumtemperatur (15 - 25°C) für 5 - 20 Minuten inkubieren.
 - (3) Spülen in destilliertem Wasser dreimal je 5 Minuten.
5. Gegenfärbung
 - (1) Eintauchen der Schnitte in die Gegenfärbelösung.
 - (2) Mit Leitungswasser waschen.
6. Eindecken
Bei Benutzung von alkohollöslichen Substraten wie AEC sollten die Schnitte mit einem Eindeckmittel auf wässriger Basis ohne weitere Behandlung eingedeckt werden. Bei alkoholunlöslichen Substraten wie DAB sollten sie permanent eingedeckt werden. Dafür ist eine Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit anschließendem Xylolbad notwendig.

□ Interpretation der Ergebnisse

Mikroskopische Beobachtung

Die Schnitte werden unter ein Lichtmikroskop nach einer positiven Reaktion untersucht.

- Positiver Kontrollobjektträger
Positive Färbung wird beobachtet.
- Negativer Kontrollobjektträger
Positive Färbung wird nicht beobachtet.
- Reagenzien-Kontrollobjektträger
Eine Färbung des Schnittes kann durch eine unspezifische Proteinbindung verursacht werden.

Die Spezifität und Sensitivität der Antigendetektion ist abhängig von dem spezifischen Primärantikörper.

7. LAGERUNG & HALTBARKEIT

Bei 2 - 8 °C zu lagern. Nach Herstellung ist das Reagenz 18 Monate stabil.

8. GRENZEN DES VERFAHRENS

- (1) Die Reagenzien sollten vor Benutzung auf Raumtemperatur (15 - 25°C) gebracht werden.
- (2) Um eine Denaturierung der Antigene auszuschließen, sollten die Gewebe während des Verfahrens nicht über 58 °C gebracht werden.
- (3) Die Schnitte dürfen nicht austrocknen.
- (4) Die optimale Konzentration und Inkubationszeit der Primärantikörper sollte von jedem Labor selbst bestimmt werden. In einigen Fällen müssen Primärantikörper stärker verdünnt werden, um eine Überfärbung zu vermeiden.
- (5) Wenn die Schnitte wenig endogene Peroxidase, wenig Erythrozyten und Granulozyten enthalten, kann auf das Blockieren der endogenen Peroxidase verzichtet werden.
- (6) Die Gewebefärbung ist abhängig von der Behandlung und Prozessierung des Gewebes vor der Färbung. Nicht ausreichende Fixierung, Einfrieren und Auftauen, Waschen, Eintrocknen, Erhitzung oder auch das Schneiden kann Artefakte oder falsch-negative Ergebnisse hervorbringen.
- (7) Suboptimale Ergebnisse können durch alte oder ungepufferte Fixative verursacht werden oder wenn die Gewebe während des Einbettens oder während des Aufziehens der Schnitte übermäßig erhitzt werden.
- (8) Falsch-positive Ergebnisse können durch unspezifisches Binden von Proteinen entstehen. Obwohl **N-Histofine®** Simple Stain MAX PO (R) keine Blockierungsreagenzien benötigt, kann in einigen Fällen die Benutzung eines proteinhaltigen Blockierungsreagenzes vor Inkubation mit dem Primärantikörper sinnvoll sei, um Hintergrund zu reduzieren.

(9) **N-Histofine®** Simple Stain MAX PO (R) wurde für die In-vitro-Diagnostik entwickelt. NICHIREI BIOSCIENCES INC., NICHIREI BIOSCIENCES Verkaufsagenten und Vertreiber übernehmen keine Verantwortung für **N-Histofine®** Simple Stain MAX PO (R), wenn dieses Reagenz dort benutzt wurde, wo lokale Regeln oder Patente verletzt werden. Weder NICHIREI BIOSCIENCES noch die Verkaufsagenten können verantwortlich für eine Patentverletzung gemacht werden, die durch unsachgemäßen Gebrauch des Produktes auftreten.

9. TROUBLE SHOOTING

table 1

Problem	Möglicher Grund	Lösung
<ul style="list-style-type: none"> ○ Keine Färbung oder nur schwache Färbegergebnisse auf dem positiven Kontrollobjektträger und der Patientenprobe 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Austrocknen der Proben vor der Zugabe des Färbereagenzes. 2. Das Eindeckmedium ist nicht geeignet. Die Schnitte sind nicht genügend entparaffiniert. 3. Jegliches Vorhandensein von Natriumazid im Puffer inaktiviert die Peroxidase und macht eine Färbung unmöglich. 4. Substrat fehlerhaft. Unzureichende Inkubation mit Polymer oder Antikörper. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Die Schnitte dürfen nie austrocknen. 2. Auswahl eines geeigneten Einbettmediums oder Entfernung des Paraffins aus den eingebetteten Schnitten. 2. Xylol oder Ethanol austauschen. 3. Natriumazid-freie Puffer verwenden. 3. Die Pufferlösung austauschen. 4. Ein anderes Substrat verwenden. 4. Überschüssige Puffer sorgfältig vor jedem Schritt entfernen. 4. Primärantikörperinkubationszeit verlängern.
<ul style="list-style-type: none"> ○ Die unbekannte Probe ist nicht gut gefärbt, aber die positive Kontrollprobe 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Das Antigen kann während der Fixation oder während des Einbettprozesses denaturiert oder maskiert worden sein. 2. Das Antigen wird durch Autolyse zerstört. 3. In den unbekanntenen Schnitten ist weniger Antigen. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Einige Antigene sind empfindlich gegenüber Fixierung oder Einbettung. Ein schwächeres Fixativ benutzen oder die Fixierungszeit verkürzen. 1. Änderung der Antigendemaskierung (Hitzevorbehandlung, Enzym (Trypsin etc.) - verdau) 2. Wenn irgend möglich, Gewebe aus Biopsien oder von Operationen verwenden. 3. Verlängerung der Inkubationszeit.
<ul style="list-style-type: none"> ○ Hoher Hintergrund auf allen Schnitten 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Die endogene Enzymaktivität wurde nicht vollständig blockiert. 2. Unspezifische Bindung. 3. Durch Autolyse entstehen überschüssige isolierte Antigene in den histologischen Lösungen. 4. Ungenügende Entfernung von Paraffin. 5. Ungenügendes Waschen. 6. Eine hohe Raumtemperatur kann die Enzymreaktionen beschleunigen. 7. Austrocknen der Proben nach der Polymerzugabe. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Die Durchführung der Blockierung der endogenen Peroxidase kontrollieren. 2. Unspezifische Bindungen vor Zugabe des Primärantikörpers mit 10 % normalem Ziegen Serum blockieren. 3. Wenn möglich, frisches gut fixiertes Gewebe nutzen. 4. Xylol oder Ethanol austauschen. 5. Waschschritte kontrollieren. 6. Die Raumtemperatur zwischen 15-25°C halten oder die Reaktionszeit verkürzen. 7. Niemals das Gewebe austrocknen lassen.
<ul style="list-style-type: none"> ○ Schnitte lösen sich von den Objektträgern während der Reaktion . 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Einige Antigene benötigen eine Hitzedemaskierung oder eine verlängerte Reaktion mit dem Primärantikörper, was dazu führt, dass sich die Schnitte leicht ablösen. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Die Schnitte auf beschichtete Objektträger mit einem Adhäsiv wie 0,02 % Poly-L-Lysin oder Silan-beschichtete Objektträger bringen.

10. REFERENZEN

- (1) Kimura, N., *et al*: Synaptotagmin I Expression in Mast Cells of Normal Human Tissues, Systemic Mast Cell Disease, and a Human Mast Cell Leukemia Cell Line. *J. Histochem. Cytochem.* 49: 341-346, 2001.
- (2) Naito, Z., *et al*: Expression and accumulation of lumican protein in uterine cervical cancer cells at the periphery of cancer nests. *Int. J. Oncol.* 20: 943-948, 2002.
- (3) Hoshino, Y., *et al*: Maximal HIV-1 Replication in Alveolar Macrophages during Tuberculosis Requires both Lymphocyte Contact and Cytokines. *J. Exp. Med.* 195: 495-505, 2002.
- (4) Sawada, H., *et al*: Characterization of an Anti-Decorin Monoclonal Antibody, and Its Utility. *J. Biochem.* 132: 997-1002, 2002.
- (5) Ozaki, K., *et al*: Mast Cell Tumors of the Gastrointestinal Tract in 39 Dogs. *Vet. Pathol.* 39:557-564, 2002.
- (6) Zen, Y., *et al*: Lipopolysaccharide Induces Overexpression of MUC2 and MUC5AC in Cultured Biliary Epithelial Cells. Possible Key Phenomenon of Hepatolithiasis. *Am. J. Pthol.* 161: 1475-1484, 2002.
- (7) Sawada, H., *et al*: Case report: Altered decorin expression of systemic sclerosis by UVA1 (340-400 nm) phototherapy: Immunohistochemical analysis of 3 cases. *BMC Dermatol.* 3:2, 2003.
- (8) Takagi-Morishita, Y., *et al*: Mouse Uterine Epithelial Apoptosis is Associated with Expression of Mitochondrial Voltage-Dependent Anion Channels, Release of Cytochrome c from Mitochondria, and the Ratio of Bax to Bcl-2 or Bcl-X^l. *Biol. Reprod.* 68: 1178-1184, 2003.
- (9) Morimoto, R., *et al*: Co-expression of vesicular glutamate transporters (VGLUT1 and VGLUT2) and their association with synaptic-like microvesicles in rat pinealocytes. *J. Neurochem.* 84: 382-391, 2003.
- (10) Nakatani, K., *et al*: Cytoglobin/STAP, its unique localization in splanchnic fibroblast-like cells and function in organ fibrogenesis. *Lab. Invest.* 84: 91-101, 2003.
- (11) Kitada, M., *et al*: Translocation of Glomerular p47phox and p67phox by Protein Kinase C-beta Activation is Required for Oxidative Stress in Diabetic Nephropathy. *Diabetes.* 52: 2603-2614, 2003.

 REF Bestellnr.	 Temperaturgrenzen	 IVD In-vitro-Diagnostikum
 Hersteller	 LOT Chargenbezeichnung	 für <N> Bestimmungen
 Verwendbar bis	 Gebrauchsanweisung beachten	 EC REP Autorisierter Repräsentant in der EU
 CE-Kennzeichen, Kennnummer der bekannten Stelle	 Nur zur IVD Leistungs-bewertung	 SAMPLE Muster



NICHIREI BIOSCIENCES INC.
6-19-20, Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-8402, JAPAN
Phone:81-3-3248-2208, Facsimile:81-3-3248-2243



EMERGO EUROPE
Prinsessegracht 20
2514 AP The Hague
The Netherlands