

INSTRUCTIONS

January, 2019

N-Histofine® Simple Stain MAX PO (MULTI)**Universal Immuno-peroxidase Polymer, Anti-Mouse and -Rabbit**
N-Histofine® Immunohistochemical staining reagent

Store at 2-8°C

Reagents supplied	17 ml x 1 bottle (170 tests)	Code : 414151F
	17 ml x 3 bottles (500 tests)	Code : 414152F
	17 ml x 9 bottles (1500 tests)	Code : 414154F

1. INTRODUCTION

NICHIREI BIOSCIENCES developed a unique immunohistochemical staining system called **Universal Immuno-enzyme Polymer (UIP)** method (US Patent No.6,252,053). This is NICHIREI BIOSCIENCES's original technique. **N-Histofine® Simple Stain MAX PO (MULTI)**, this provides both high sensitivity and time saving in immunohistochemical applications.

2. DESCRIPTION

Liquid. Ready to use.

N-Histofine® Simple Stain MAX PO (MULTI) (Universal Immuno-peroxidase Polymer, Anti-Mouse and -Rabbit) is the labeled polymer prepared by combining amino acid polymers with peroxidase and goat anti-mouse Ig and goat anti-rabbit Ig which are reduced to Fab'. It is stored in MOPS (3-Morpholinopropanesulfonic acid) buffer (pH 6.5) containing stabilizer and antibacterial agent.

The IgG fraction purified from immunized goat serum is digested to prepare F(ab')₂. Antigen-specific F(ab')₂ is affinity-purified with the antigen. Solid-phase absorption is carried out with human serum protein. Peroxidase-labeled amino acid polymer is conjugated to Fab' obtained by reducing F(ab')₂.

The system does not contain biotin nor streptavidin, so the background found with traditional biotin based detection system is completely avoided.

3. INTENDED USE

For In-vitro Diagnostic Use.

Interpretation must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

N-Histofine® Simple Stain MAX PO (MULTI) is designed to allow immunohistochemical tests, to reveal antigens that reacts with a user-supplied mouse primary antibody or rabbit primary antibody on human tissues and cells.

4. PRINCIPLE

The antigen / antibody / Universal Immuno-peroxidase Polymer complex can be prepared by allowing the reagent to react with a mouse or rabbit primary antibody bound to the antigen on tissue section. The enzymatic activity of this complex results in a colored deposit, thus staining the antigen site.

5. PRECAUTIONS

1. Before using this reagent, read these instructions.
2. Do not use reagents after the expiration date.
3. For professional users.
4. Specimens, before and after fixation, and all other materials exposed to them, should be handled like biohazardous materials with proper precautions.
5. Inhalation or ingestion of the highly allergic fixative formaldehyde is harmful. Wear protective mask. If swallowed, induce vomiting. If skin or eye contact occurs, wash thoroughly with water.

N-Histofine® is NICHIREI BIOSCIENCES's registered trademark. The registration countries would be referred to us.

6. Organic reagents are flammable. Do not use near open flame.
7. Never pipette reagents by mouth and avoid their contact with skin, mucous membranes and clothes.
8. Avoid microbial contamination of reagents as incorrect result may occur.
9. Avoid splashing of reagents or generation of aerosols.
10. As a chromogen, DAB solution should be handled with care for it contains carcinogen.
11. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.

6. STAINING PROCEDURES

□ Reagents and Materials required but not provided

- Xylene
- 95% ethanol
- 100% ethanol
- Phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.6±0.2)
 - NaCl 7.75 g
 - K₂HPO₄ 1.50 g
 - KH₂PO₄ 0.20 g
 - distilled water 1L
- 3% solution of hydrogen peroxide in absolute methanol (Add 1 part of 30% hydrogen peroxide to 9 parts of absolute methanol)
- Mouse or rabbit primary antibody
- Negative control reagent
- Chromogen/substrate reagent
- Counter staining solution
- Distilled water
- Humidified chamber for slide incubation
- Light microscope
- Cover slips
- Mounting media
- Timer
- Staining racks or Coplin jars
- Absorbent wipes
- Adhesive for tissue section (0.02% poly-L-lysine, silane or the like)

□ Specimen preparation

[Paraffin-embedded tissue sections]

Specimens may undergo histological disintegration or antigenic denaturation when subjected to highly concentrated fixative or prolonged fixing. Thus, in order to obtain an optimal fixing, maintaining tissue morphology and antigen activity, tissues which are as fresh as possible and small in size (about 1 cm x 1 cm x 0.5 cm) should be used. The fixatives as shown below are recommended.

Fixing reagent	Fixing time
10% formalin or buffered formalin	24-48 hours
20% formalin	12-24 hours

[Frozen tissue sections]

Specimens are embedded in compounds (like OTC compound) and snap-frozen in n-hexan cooled in dry ice-acetone or liquid nitrogen.

□ Section preparation

[Paraffin embedded tissue sections]

The cut sections should be 3-6 µm and placed on slides. When further treatments are to be done such as Antigen Recovery, Heat-Induced Epitope Retrieval (HIER) or trypsin treatment, the glass slides should be coated with an adhesive like 0.02% poly-L-lysine or silane for tissue sections.

[Frozen tissue sections]

The cryostat sections are mounted on an adhesive (like 0.02% poly-L-lysine) - coated slides and air-dried well. The sections are fixed in 100% acetone for 10 minutes at room temperature or 4% paraformaldehyde-PBS solution for 10 minutes at 4°C and then stained.

[Control slides]

A positive control slide, negative control slide and reagent control slide are needed and processed in the same way as the unknown specimen slide to interpret staining results.

- Positive control slide
A specimen containing the target antigen which is processed in the same way as the unknown specimen.
- Negative control slide
A specimen not containing the target antigen which is processed in the same way as the unknown specimen.
- Reagent control slide
The control specimen is used and processed in the same way as the test specimen except that negative control reagent is used instead of primary antibody.

□ Deparaffinization and Rehydration

1. Treatment with xylene
 - (1) Immerse the slides in xylene. After 3 minutes, take out and shake off the excessive xylene in the slides.
 - (2) Repeat 1.(1) twice using fresh xylene.
2. Treatment with ethanol
 - (1) Immerse slides in 100% ethanol. After 3 minutes, take out and shake off the excessive 100% ethanol in the slides.
 - (2) Repeat 2.(1) once with fresh 100% ethanol.
 - (3) Then, treat them twice with 95% ethanol in the same way as described above.
3. Washing
After excessive ethanol is shaken off, immerse slides in PBS for 5 minutes.

□ Staining Procedures

1. Quenching of endogenous peroxidase
 - (1) Wipe areas around the sections on the slides carefully to remove excess solution.
 - (2) Immerse them in 3% solution of hydrogen peroxide in absolute methanol for 10-15 minutes at room temperature (15 - 25°C).
 - (3) Rinse them in fresh PBS for 3 times, each of 5 minutes duration.
2. Addition and reaction of the primary antibody
 - (1) Wipe areas around the sections on the slides carefully.
 - (2) Apply 2 drops (100 µl) of primary antibody to specimen slide, positive control slide and negative control slide respectively so as to provide a complete cover of the sections.
 - (3) To the reagent control slide, apply two drops of negative control reagent (normal serum) in place of primary antibody.
 - (4) Incubate them at room temperature or 4°C. (Follow the instructions for incubation time data designated in the package insert of primary antibody)
 - (5) Rinse them in fresh PBS for 3 times, each of 5 minutes duration.
3. Addition and reaction of **N-Histofine®** Simple Stain MAX PO (MULTI) (Universal Immuno-peroxidase Polymer, Anti-Mouse and -Rabbit).
 - (1) Wipe areas around the sections on the slides carefully.
 - (2) Apply 2 drops (100 µl) of Simple Stain MAX PO (MULTI) to each slide so as to provide a complete cover of the sections. Incubate at room temperature (15 - 25°C) for 30 minutes.
 - (3) Rinse them in fresh PBS for 3 times, each of 5 minutes duration.
4. Addition and reaction of chromogen/substrate reagent
 - (1) Wipe areas around the sections on the slides carefully.
 - (2) Apply 2 drops (100 µl) of the chromogen/substrate reagent to each slide so as to provide a complete cover of the sections. Incubate at room temperature (15 - 25°C) for 5-20 minutes.
 - (3) Rinse them in distilled water for 3 times, each of 5 minutes duration.
5. Counter-staining
 - (1) Immerse them in the counterstain solution.
 - (2) Wash them well with tap water.
6. Mounting
In case of alcohol soluble substrates like AEC, the tissue sections are mounted with water-based mounting media without further treatment. In case of alcohol insoluble substrates like DAB, they are mounted with permanent mounting media after washing with water, dehydrated in graded series of alcohol and cleared in xylene.

□ Interpretation of results

Microscopic observation

The slides are examined under a light microscope for a positive reaction. It is necessary to make comparison with three types of the control slides for interpreting staining results.

- Positive control slide
Positive staining is observed.
- Negative control slide
Positive staining isn't observed.
- Reagent control slide
If the slide is stained, it is probably due to non-specific reaction by non-specific protein binding.

The specificity and sensitivity of antigen detection is dependent on the specific primary antibody used.

7. STORAGE & SHELF LIFE

Store at 2-8°C. The reagent is stable 18 months after manufacturing.

8. GENERAL LIMITATION

(1) Allow these reagents to come to room temperature (15 - 25°C) before staining.

(2) To minimize denaturing of antigens, do not expose tissues to temperature in excess of 58°C during processing.

(3) Don't make tissues dry in each staining step.

(4) The optimal concentration and incubation time of primary antibodies should be determined by the investigation. In some cases, further dilution of primary antibodies may be required to prevent over staining.

(5) If the sections contain few endogenous peroxidase, few erythrocytes and few granulocytes, quenching of endogenous peroxidase may be omitted.

(6) Tissue staining is dependent on the handling and processing of the tissue prior to staining. Improper fixation, freezing, thawing, washing, drying, heating, or sectioning may produce artifacts or false-negative results.

(7) Results will not be optimal if old or unbuffered fixatives are used, or excessively heated during embedding or during attachment of sections to slides.

(8) False-positive results may be seen due to nonspecific binding of proteins. Although **N-Histofine®** Simple Stain MAX PO (MULTI) does not require the use of blocking reagent separately, in some cases the application of blocking reagent containing an irrelevant protein, prior to incubation with the primary antibody, may be useful for reducing the background.

(9) **N-Histofine®** Simple Stain MAX PO (MULTI) is designed for in-vitro diagnostic use. NICHIREI BIOSCIENCES INC., NICHIREI BIOSCIENCES sales agents and distributors will take no responsibility for **N-Histofine®** Simple Stain MAX PO (MULTI) when used in a way which directly or indirectly violates local regulations or patents. Neither NICHIREI BIOSCIENCES nor its sales agents can be held responsible for any patent infringement which may occur as a result of improper use of the product.

9. TROUBLE SHOOTING

table 1

Problem	Possible cause	Solution
No staining or only weak staining results on the positive control slide and the unknown specimen slide	- Drying-out of specimens during staining prior to addition of the reagents. - The embedding agent is not suitable, or paraffin is not thoroughly removed from paraffin-embedded sections. - Any trace amount of sodium azide present in the buffer inactivates the peroxidase, making the staining impossible. - Inadequate incubation of the enzyme and antibody.	- Use the Humidified chamber not to allow the tissue to dry out. - Select a suitable embedding agent or remove paraffin thoroughly from sections embedded. - Change xylene or ethanol as the case may be. - Use sodium azide free buffer solution. - Change buffer solution. - Change stale chromogen/substrate reagent. - Blot off excess solution thoroughly at each stage. - Provide sufficient time for reaction with antibody. In particular, primary antibody should be incubated for the time period specified in the insert.
The unknown specimen slide is not stained while the positive control slide is stained.	- Antigen is denatured or masked during fixing or embedding process. - Antigen is decomposed by autolysis. - Less antigen is present in the sections.	- Some antigens are sensitive to fixation or embedding. So use less potent fixative and decrease the fixing time. - The pretreatment is required for some tissues, in order to reveal the antigen, such as Antigen Recovery, Heat-Induced Epitope Retrieval (HIER) or trypsin treatment. - Use tissues obtained by biopsy or surgery, whenever possible. - Prolong the incubation time.
The backgrounds are intensively stained in all the slides.	- Endogenous enzyme activity was not completely blocked. - Non -specific binding compositions are found. - Autolysis results in excessive antigens isolated in histological solutions. - Insufficient removal of paraffin. - Insufficient washing of antibody. - A high room temperature accelerates enzyme reactions. - Drying-out of specimens during staining after of the reagents.	- Ensure that the procedure for quenching of endogenous peroxidase is right. - Before adding primary antibody, treat with 10% normal goat serum. - Obtain fresh tissues whenever available. - Change xylene or ethanol as the case may be. - Ensure thorough washing of antibody. - Keep room temperature at 15 to 25°C - Shorten reaction time. - Never allow the tissue to dry out.
During the reaction, tissue sections come off from the slides.	Some antigens require heat induced antigen retrieval procedure or prolonged reaction time with primary antibody, which may render the sections easily come off.	Mount tissue sections on slides coated with an adhesive such as 0.02% poly-L-lysine or silane.

10. REFERENCE

- (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*: Cytochrome/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 Catalog/Code Number	 Temperature Limitations	 IVD In Vitro Diagnostic Medical Device
 Manufacturer	 LOT Batch Code	 Contains Sufficient for <N> Tests
 Use By	 Consult Instructions for Use	 EC REP Authorized Representative in the European Community
 CE-mark, code of the notified body	 For IVD Performance Evaluation only	 SAMPLE Sample



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

GEBRAUCHSANLEITUNG

Der Januar, 2019

N-Histofine® Simple Stain MAX PO (MULTI)

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

Lagerung bei 2-8°C

Beinhaltete Reagenzien

17 ml x 1 Flasche	(170 Tests)	Katalog-Nr.: 414151F
17 ml x 3 Flaschen	(500 Tests)	Katalog-Nr.: 414152F
17 ml x 9 Flaschen	(1500 Tests)	Katalog-Nr.: 414154F

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 (MULTI) bietet zugleich eine hohe Sensitivität und spart Zeit bei immunhistochemischen Applikationen.

2. BESCHREIBUNG

Flüssig, Gebrauchsfertig.

N-Histofine® Simple Stain MAX PO (MULTI) (Universelles Immun-Peroxidase Polymer, Anti-Maus- und Kaninchen) besteht aus einem Polymer aus Aminosäuren, welches mit Peroxidase und Ziege Anti-Maus- und 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 (MULTI) wurde zur Durchführung immunhistochemischer Tests entwickelt. Das System weist auf humanen Geweben und Zellen Maus- und 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 Maus- und Kaninchen primärantikörper 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)
- Maus- und 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.

□ Schnittpreparation

(Paraffineingebettete Gewebeschnitte)

Die Schnittdicke sollte zwischen 3 und 6 µm liegen. Wenn eine enzymatische Vorbehandlung oder andere Antigendemarkierung 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 Waschlösung 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 Waschlösung 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 (MULTI) (Universelles Immun-Peroxidase Polymer, Anti-Maus und -Kaninchen).**
 - (1) Überschüssigen Waschlösung um die Schnitte mit einem saugfähigen Tuch entfernen.
 - (2) Zwei Tropfen (100 µl) von Simple Stain MAX PO (MULTI) 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 Waschlösung 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 (MULTI) keine Blockierungsreagenzien benötigt, kann in einigen Fällen die Benutzung eines proteinhaltigen Blockierungsreagenzes vor Inkubation mit dem Primärantikörper sinnvoll sein, um Hintergrund zu reduzieren.
- (9) **N-Histofine®** Simple Stain MAX PO (MULTI) 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 (MULTI), 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
Keine Färbung oder nur schwache Färbegergebnisse auf dem positiven Kontrollobjektträger und der Patientenprobe	- Austrocknen der Proben vor der Zugabe des Färbereagenzes. - Das Eindeckmedium ist nicht geeignet. Die Schnitte sind nicht genügend entparaffiniert. - Jegliches Vorhandensein von Natriumazid im Puffer inaktiviert die Peroxidase und macht eine Färbung unmöglich. - Substrat fehlerhaft. Unzureichende Inkubation mit Polymer oder Antikörper.	- Die Schnitte dürfen nie austrocknen. - Auswahl eines geeigneten Einbettmediums oder Entfernung des Paraffins aus den eingebetteten Schnitten. - Xylol oder Ethanol austauschen. - Natriumazid-freie Puffer verwenden. - Die Pufferlösung austauschen. - Ein anderes Substrat verwenden. - Überschüssige Puffer sorgfältig vor jedem Schritt entfernen. - Primärantikörperinkubationszeit verlängern.
Die unbekannte Probe ist nicht gut gefärbt, aber die positive Kontrollprobe	- Das Antigen kann während der Fixation oder während des Einbettprozesses denaturiert oder maskiert worden sein. - Das Antigen wird durch Autolyse zerstört. - In den unbekannten Schnitten ist weniger Antigen.	- Einige Antigene sind empfindlich gegenüber Fixierung oder Einbettung. Ein schwächeres Fixativ benutzen oder die Fixierungszeit verkürzen. - Änderung der Antigendemaskierung (Hitzevorbehandlung, Enzym (Trypsin etc.) - verdau) - Wenn irgend möglich, Gewebe aus Biopsien oder von Operationen verwenden. - Verlängerung der Inkubationszeit.
Hoher Hintergrund auf allen Schnitten	- Die endogene Enzymaktivität wurde nicht vollständig blockiert. - Unspezifische Bindung. - Durch Autolyse entstehen überschüssige isolierte Antigene in den histologischen Lösungen. - Ungenügende Entfernung von Paraffin. - Ungenügendes Waschen. - Eine hohe Raumtemperatur kann die Enzymreaktionen beschleunigen. - Austrocknen der Proben nach der Polymerzugabe.	- Die Durchführung der Blockierung der endogenen Peroxidase kontrollieren. - Unspezifische Bindungen vor Zugabe des Primärantikörpers mit 10 % normalem Ziegsenserum blockieren. - Wenn möglich, frisches gut fixiertes Gewebe nutzen. - Xylol oder Ethanol austauschen. - Waschschritte kontrollieren. - Die Raumtemperatur zwischen 15-25°C halten oder die Reaktionszeit verkürzen. - Niemals das Gewebe austrocknen lassen.
Schnitte lösen sich von den Objektträgern während der Reaktion .	Einige Antigene benötigen eine Hitzedemaskierung oder eine verlängerte Reaktion mit dem Primärantikörper, was dazu führt, dass sich die Schnitte leicht ablösen.	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 splanchic 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.

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

FICHE TECHNIQUE

Janvier 2019

N-Histofine® Simple Stain MAX PO (MULTI)

Polymère Universel d'Immuno-peroxydase Anti-Souris et Anti-Lapin

N-Histofine® Réactif de coloration Immuno-histochimique

Conserver entre 2 et 8°C

Réactifs fournis - 1 flacon de 17 ml (170 tests) Code : 414151F
- 3 flacons de 17 ml (500 tests) Code : 414152F
- 9 flacons de 17 ml (1500 tests) Code : 414154F

1. PRESENTATION DU PRODUIT

NICHIREI BIOSCIENCES a développé un système unique de coloration immuno-histochimique appelé méthode de **Polymère Universel d'Immuno-enzyme (UIP)** (US Patent No.6,252,053). Il s'agit de la technique originale de NICHIREI BIOSCIENCES's **N-Histofine®** Simple Stain MAX PO (MULTI) qui offre deux avantages significatifs :
- un taux de sensibilité élevé
- un gain de temps notable dans le cadre de la réalisation pratique de tests immuno-histochimiques.

2. DESCRIPTION

Liquide. Prêt à l'emploi.

N-Histofine® Simple Stain MAX PO (MULTI) (Polymère Universel d'Immuno-peroxydase, Anti-Souris et Anti-Lapin) est le polymère marqué à la peroxydase, préparé par combinaison de polymères d'aminoacides, fixé à la fraction Fab d'une IgG de chèvre anti-souris et d'une IgG de chèvre anti-lapin. La solution est conservée dans du MOPS (acide 3-Morpholinopropanesulfonique) tampon (pH 6.5) contenant un agent stabilisant et un agent bactéricide.

Le fragment F(ab)₂ est extrait, par digestion, de la fraction purifiée d'IgG provenant de sérum de chèvre immunisée. Le F(ab)₂ spécifique de l'Antigène est purifié par affinité avec l'antigène. L'absorption en phase solide est réalisée avec une protéine de sérum humain. Le polymère d'aminoacides marqués à la peroxydase est conjugué au fragment Fab obtenu par réduction de F(ab)₂.

Le principe analytique ne contient ni biotine ni streptavidine, ce qui élimine complètement les problèmes de bruit de fond provoqués par l'utilisation de biotine, problème que l'on retrouve fréquemment dans les systèmes d'analyse traditionnels.

3. APPLICATIONS

Pour utilisation Diagnostic In vitro.

L'Interprétation des résultats doit être faite par un biologiste qualifié, en prenant en considération l'historique de la pathologie du patient ainsi que le bilan complet des tests qui ont été pratiqués.

N-Histofine® Simple Stain MAX PO (MULTI) a été conçu dans le but de mettre en évidence des antigènes, contenus dans des coupes de tissus ou dans des cellules, qui vont réagir avec un anticorps primaire de lapin prêt à l'emploi par méthode immuno-histochimique.

4. PRINCIPE

Le Complexe de Polymère Universel antigène / anticorps / Immuno-peroxydase peut être formé en mettant en présence le réactif qui va réagir avec l'anticorps primaire de souris ou de lapin en se fixant sur l'antigène contenu dans la coupe de tissus. L'activité enzymatique de ce complexe fera apparaître un dépôt coloré, mettant ainsi en évidence la présence du site antigénique recherché dans l'échantillon testé.

5. PRECAUTIONS D'EMPLOI

1. Lire soigneusement ce mode d'emploi avant de réaliser ce test.
2. Ne pas utiliser le réactif au delà de sa date de péremption.
3. A usage professionnel exclusivement.
4. Avant et après fixation, manipuler les échantillons ainsi que toutes autres substances auxquelles ils sont exposés avec toutes les précautions s'appliquant aux matières présentant un danger de

contamination biologique.

5. Le fixateur à base de formol est sévèrement allergisant et présente un grave danger en cas d'inhalation ou d'ingestion. Porter un masque de protection. **En cas d'ingestion, provoquer des vomissements. En cas de contact avec la peau ou les yeux, rincer abondamment avec de l'eau.**
6. Les réactifs organiques sont inflammables. Ne pas les utiliser en présence d'une flamme ouverte.
7. Ne jamais pipeter les réactifs à la bouche, éviter tout contact avec la peau, les muqueuses et les vêtements.
8. Eviter toutes contaminations microbiennes des réactifs, car celles-ci peuvent être la cause de faux négatifs ou faux positifs
9. Eviter de faire gicler les réactifs ou de générer des vapeurs.
10. La solution chromogène DAB doit être manipulée avec précaution car elle contient des éléments cancérigènes
11. Eliminer les réactifs non utilisés selon les dispositions légales locales, départementales et nationales.

6. METHODES DE COLORATION

□ Réactifs et Matériel nécessaire non fournis

- Xylène
- Ethanol à 95%
- Ethanol à 100%
- Tampon Phosphate (PBS) (pH 7.6±0.2)
NaCl 7.75 g
K₂HPO₄ 1.50 g
KH₂PO₄ 0.20 g
Eau distillée qsp 1L
- Solution d'eau oxygénée à 3% dans du méthanol absolu. (ajouter 1 volume d'eau oxygénée à 30% , à 9 volumes de méthanol absolu.)
- Anticorps primaire de souris ou de lapin
- Réactif contrôle Négatif
- Réactif substrat/ Chromogène
- Solution de contre-coloration.
- Eau distillée
- Chambre Humide pour l'incubation des lames
- Microscope éclairant
- Lamelles
- Milieu de montage
- Minuteur
- Bacs à colorant ou jarres de Coplin
- Papier Absorbant
- Adhésif pour coupe de tissus (0.02% poly-L-lysine, silane ou identique)

□ I -Préparation de l'échantillon

A-Coupes de tissus dans la Paraffine

Les échantillons doivent subir une désintégration histologique ou une dénaturation antigénique lorsqu'ils sont soumis à une fixation extrêmement concentrée ou très prolongée. Pratiquer le test sur des coupes de tissus les plus fraîches possible, de petite taille, (environ 1 cm x 1 cm x 0.5 cm) pour conserver la morphologie et l'activité antigénique. Ceci permettra d'obtenir une fixation optimale antigène/anticorps.

Schéma de fixation recommandé :

Réactif de Fixation	Temps de Fixation
Formol à 10% ou formol tamponné	24-48 heures
Formol à 20%	12-24 heures

B- Coupes de tissus congelés

Les échantillons sont insérés dans un composant tel que l'OTC et soumis à une congélation éclair dans le n-hexsan réfrigéré à la neige carbonique à base d'acétone, ou au nitrogène liquide.

□ II- Préparation des coupes de tissus

A- Coupes de tissus dans la paraffine

Placer une coupe de 3 à 6 µ sur la lame. Si un traitement ultérieur tel que régénération d'antigène, extraction d'épitope (HIER) ou traitement à la trypsine doit être appliqué, la lame de verre devrait être recouverte d'un produit adhésif tel que la poly-L-lysine à 0.02% ou le silane pour coupes de tissu.

B- Coupes de tissus congelés

Les coupes provenant du cryostat sont montées sur des lames enduites d'un adhésif (tel que la poly-L-lysine à 0.02%) puis séchées à l'air soigneusement. Elles sont, ensuite, fixées à l'acétone à 100% durant 10 minutes, à température ambiante, ou, dans une solution de para formol-PBS à 4%, incubées durant 10 minutes à 4°C, puis colorées.

C-Lames de Contrôle

Afin de garantir une interprétation optimale des résultats, tester respectivement, en parallèle avec l'échantillon inconnu, une lame contrôle positif, une lame contrôle négatif, et une lame contrôle réactif.

- **Lame contrôle positif**

Un échantillon contenant l'antigène recherché testé selon les mêmes conditions que l'échantillon inconnu.

- **Lame contrôle négatif**

Un échantillon ne contenant pas l'antigène recherché testé dans les mêmes conditions que l'échantillon inconnu.

- **Lame contrôle réactif**

Le contrôle échantillon est utilisé et testé dans les mêmes conditions que l'échantillon à tester à l'exception du fait que le contrôle réactif négatif est utilisé à la place de l'anticorps primaire.

□ Déparaffinage et Réhydratation

1. *Traitement au xylène.*

- (1) Immerger les lames dans le xylène. Sortir les lames après 3 minutes, les secouer pour éliminer l'excédent de xylène.
- (2) Répéter 1(1) 2 fois en renouvelant le xylène.

2. *Traitement à l'éthanol*

- (1) Immerger les lames dans l'éthanol à 100%. Sortir les lames après 3 minutes, les secouer pour éliminer l'excédent d'éthanol.
- (2) Répéter 2(1) une fois en renouvelant l'éthanol à 100%.
- (3) Ensuite, traiter les lames 2 fois avec de l'éthanol à 95% selon la technique décrite ci-dessus.

3. *Lavage*

Après avoir éliminé l'excédent d'éthanol immerger les lames dans du PBS durant 5 minutes.

□ Méthodes de Coloration

1. *Extinction de la peroxydase endogène*

- (1) Essuyer soigneusement les pourtours de la coupe de tissus sur la lame afin d'éliminer tout excédent de liquide.
- (2) Immerger les lames dans une solution d'eau oxygénée à 3% dans le méthanol absolu durant 10 à 15 minutes, à température ambiante (15 - 25°C).
- (3) Rincer les lames 3 fois, 5 minutes, dans du PBS, en renouvelant le PBS à chaque opération.

2. *Addition et réaction de l'anticorps primaire.*

- (1) Essuyer soigneusement les pourtours de la coupe de tissus sur la lame afin d'éliminer tout excédent de liquide.
- (2) Déposer 2 gouttes (100 µl) d'anticorps primaire, respectivement sur la lame échantillon à tester, le contrôle positif, et le contrôle négatif en recouvrant complètement la coupe de tissus.
- (3) Déposer 2 gouttes de réactif contrôle négatif (sérum normal à la place de l'anticorps primaire) sur la lame contrôle réactif.
- (4) Laisser incuber la lame contrôle réactif à température ambiante ou à 4°C. (Suivre les instructions de temps d'incubation données dans le mode d'emploi de l'anticorps primaire).
- (5) Rincer les lames 3 fois, 5 minutes, dans du PBS, en renouvelant le PBS à chaque opération.

3. *Addition et réaction de **N-Histofine**® Simple Stain MAX PO (MULTI) (Polymère Universel d'Immuno-peroxydase anti-souris et anti-lapin).*

- (1) Essuyer soigneusement les pourtours de la coupe de tissus sur la lame afin d'éliminer tout excédent de liquide.
- (2) Déposer 2 gouttes (100 µl) de Simple Stain MAX PO (MULTI) sur chaque lame en recouvrant complètement la coupe de tissus. Incuber à température ambiante (15 - 25°C) durant 30 minutes.
- (3) Rincer les lames 3 fois, 5 minutes, dans du PBS, en renouvelant le PBS à chaque opération.

4. *Addition et réaction du réactif substrat / chromogène*

- (1) Essuyer soigneusement les pourtours de la coupe de tissus sur la lame afin d'éliminer tout excédent de liquide.
- (2) Déposer 2 gouttes (100 µl) de Réactif substrat/chromogène sur chaque lame en recouvrant complètement la coupe de tissus. Incuber à température ambiante (15 - 25°C) durant 5 à 20 minutes.
- (3) Rincer les lames 3 fois, 5 minutes, dans de l'eau distillée.

5. *Contre Coloration*

- (1) Immerger les lames dans la solution de contre colorant.
- (2) Laver les lames soigneusement sous l'eau du robinet.

6. *Montage*

Lorsque l'on travaille avec un substrat soluble dans l'alcool tel que l'AEC, les coupes de tissus sections sont montées avec un milieu de montage aqueux sans traitement ultérieur. Par contre, lorsque l'on travaille avec un substrat insoluble dans l'alcool tel que le DAB, les lames sont montées avec un milieu de montage permanent, après un lavage à l'eau et une déshydratation par une série de traitement à l'alcool de différents grades puis une clarification au xylène.

□ Interprétation des résultats

Observation au Microscope

Les lames sont observées au microscope éclairant pour déceler une réaction positive. Il est impératif d'établir une comparaison entre les 3 types de lames contrôles pour interpréter les résultats de la coloration obtenue sur les échantillons inconnus.

- **Lame Contrôle Positif**
On observe une Coloration Positive
- **Lame Contrôle Négatif**
On observe aucune coloration Positive
- **Lame Contrôle Réactif**

Si cette lame présente une coloration, il s'agit probablement d'une réaction non spécifique provenant d'une liaison de protéine non spécifique.

La spécificité et la sensibilité de détection de l'antigène dépend directement de l'anticorps spécifique primaire utilisé.

7. STOCKAGE & PEREMPTION

Conservé entre 2 et 8°C. Le réactif est stable Durant 18 mois après sa date de fabrication.

8. LIMITES D'UTILISATION

(1) Avant utilisation, laisser les réactifs revenir à température ambiante entre 15 et 25°C.

(2) Afin de minimiser la dénaturation des antigènes durant le processus, ne pas soumettre les coupes de tissus à des températures supérieures à 58°C.

(3) Ne pas laisser sécher les coupes de tissus entre chaque étape de coloration.

(4) Les concentrations et temps d'incubation optimales des anticorps primaires seront déterminées en réalisant le test. Dans certains cas, il sera nécessaire de re-diluer les anticorps primaires à un taux de dilution supérieur pour éviter une coloration trop intense.

(5) Si les coupes de tissus testées contiennent un taux faible de peroxydase endogène, peu d'érythrocytes et peu de granulocytes, l'étape d'extinction de la peroxydase endogène n'est pas nécessaire.

(6) La coloration des tissus dépend de la manipulation, du traitement et des procédés appliqués sur ces derniers avant l'étape de coloration. Si la fixation, la congélation, la décongélation, les lavages, les séchages, les traitements à la chaleur ou la coupe des tissus ne sont pas effectués correctement, il peut en résulter des réactions artefacts ou des faux négatifs.

(7) Les résultats ne seront pas valables si l'on utilise des fixateurs périmés ou non tamponnés, ou si le traitement à la chaleur durant l'insertion et la fixation des coupes de tissus sur la lame, est excessif.

(8) Des résultats faux positifs peuvent être observés lorsque l'on se trouve en présence de liaisons de protéines non spécifiques.

En principe, **N-Histofine**® Simple Stain MAX PO (MULTI) ne nécessite pas l'utilisation séparée d'un réactif de blocage. Néanmoins dans certains cas de figure, l'addition d'un réactif de blocage, contenant une protéine non significative, avant l'incubation avec l'anticorps primaire, peut s'avérer très utile pour réduire le bruit de fond.

(9) **N-Histofine**® Simple Stain MAX PO (MULTI) a été développé pour une utilisation diagnostic in vitro. Les agents commerciaux et les distributeurs de NICHIREI BIOSCIENCES INC., NICHIREI BIOSCIENCES ne sauraient assumer la responsabilité du produit **N-Histofine**® Simple Stain MAX PO (MULTI) lorsque celui-ci est utilisé d'une manière qui enfreindrait directement ou indirectement la réglementation en vigueur ou les brevets. En aucun cas, les agents commerciaux de NICHIREI BIOSCIENCES ne saurait être tenus pour responsables de contrefaçon pouvant résulter d'une utilisation non conforme du produit.

9. RESOLUTIONS DES PROBLEMES

tableau 1		
Problème	Cause Probable	Solution
○ Pas de coloration ou une coloration très faible sur la lame contrôle positif ainsi que sur la lame échantillon inconnu	1. Durant la coloration, les échantillons se sont desséchés avant l'addition des réactifs. 2. Soit, l'agent d'inclusion n'est pas conforme, soit, lorsqu'il s'agit de coupes incluses dans la paraffine, la paraffine n'a pas été totalement éliminée des coupes. 3. Toute présence d'azide de sodium dans le tampon, même à l'état de trace, rend la peroxydase inactive. Dans ce cas de figure, toute coloration est impossible. 4. Incubation enzyme- anticorps non conforme	1. Utiliser la chambre humide pour éviter le dessèchement des coupes de tissus. 2. Changer l'agent d'inclusion, ou s'assurer que toute la paraffine a été soigneusement éliminée des sections incluses. 2 Changer le xylène ou l'éthanol suivant le cas. 3. Utiliser un tampon ne contenant pas d'azide de sodium. 3 Changer de tampon. 4. Changer le réactif substrat / chromogène. 4. A chaque étape, absorber soigneusement l'excédent de liquide sur la lame. 4. Le temps d'incubation avec l'anticorps doit être suffisamment long. En particulier, l'anticorps primaire devrait être incubé suivant les indications de temps spécifiées sur le mode d'emploi du produit.
○ La lame échantillon inconnu n'est pas colorée alors que le contrôle positif est coloré.	1. L'Antigène a été dénaturé ou masqué durant l'étape de fixation ou durant l'inclusion dans la paraffine. 2. L'Antigène est décomposé par autolyse. 3. Une quantité inférieure d'antigène est présente dans les coupes.	1. Certains antigènes sont sensibles à la fixation ou l'inclusion. Pour y remédier, utiliser un fixatif moins puissant et diminuer le temps de fixation. 1. Dans certains tissus, pour révéler l'antigène, un prétraitement est nécessaire, par exemple le test de régénération d'antigène, l'extraction d'épitope par la chaleur (HIER), ou un traitement à la trypsine. 2. Dans la mesure du possible, utiliser des coupes de tissus obtenues par biopsies ou chirurgie. 3. Prolonger le temps d'incubation.
○ Coloration intense de l'arrière plan sur toutes les lames.	1. L'activité enzymatique endogène n'a pas été bloquée complètement. 2. Présence de composés de liaisons non spécifiques. 3. Par suite d'autolyse, un excès d'antigène est isolé dans les solutions histologiques. 4. La paraffine n'a pas été totalement éliminée des coupes de tissus. 5. Le lavage de l'anticorps est insuffisant. 6. Une température ambiante élevée accélère les réactions enzymatiques. 7. Dessèchement des échantillons durant la coloration après addition des réactifs.	1. S'assurer que la méthode d'extinction de la peroxydase endogène est correcte. 2. Avant d'ajouter l'anticorps primaire, traiter avec un sérum normal de chèvre à 10%. 3. Dans la mesure du possible, travailler sur des tissus fraîchement prélevés. 4. Changer le xylène ou l'éthanol suivant le cas. 5. S'assurer de laver soigneusement l'anticorps. 6. Réaliser le test à une température ambiante comprise entre 15 et 25°C 6. Diminuer le temps de réaction. 7. Ne jamais laisser les coupes de tissus s'assécher.
○ Pendant la réaction, les coupes de tissus se détachent de la lame.	1. Certains antigènes nécessitent un processus d'extraction d'antigène par la chaleur ou un temps de réaction supérieur avec l'anticorps primaire ce qui peut être la cause du décollement des coupes de leurs lames.	1. Monter les coupes de tissus sur des lames recouvertes avec un adhésif tel que la poly-L-lysine à 0.02% ou le silane.

10. BIBLIOGRAPHIE

- (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*: Cytochrome/STAP, its unique localization in splanchic 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.

	Référence du catalogue		limites de températures		dispositif médical de diagnostic in vitro
	Fabricant		code du lot		quantité suffisante pour <N> tests
	Utiliser jusque		consulter les instructions d'utilisation		représentant autorisé dans la communauté européenne
	marquage CE		Pour l'évaluation des performances IVD seulement		echantillon



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

ISTRUZIONI D'USO

Gennaio, 2019

N-Histofine® Simple Stain MAX PO (MULTI)

Universal Immuno-peroxidase Polymer, Anti-Mouse and -Rabbit
N-Histofine® Immunohistochemical staining reagent

Conservare a 2-8°C

Reagenti forniti	1 flacone da 17 ml (170 tests)	Codice : 414151F
	3 flaconi da 17 ml (500 tests)	Codice : 414152F
	9 flaconi da 17 ml (1500 tests)	Codice : 414154F

1. INTRODUZIONE

NICHIREI BIOSCIENCES ha sviluppato un innovativo sistema di rivelazione immunostochimica, il metodo **Universal Immuno-enzyme Polymer (UIP)**- Brevetto No.6,252,053). **N**-Histofine® Simple Stain MAX PO (MULTI) consente di ottenere un'alta sensibilità in tempi ridotti.

2. DESCRIZIONE

Liquido. Pronto all'uso.

N-Histofine® Simple Stain MAX PO (MULTI) (Universal Immuno-peroxidase Polymer, Anti-Mouse and -Rabbit) è un polimero marcato, preparato coniugando polimeri amminoacidici con perossidasi, Ig Goat anti-Mouse e Ig Goat anti-Rabbit ridotte a Fab'. Il tampone di diluizione MOPS (3-Morpholinopropanesulfonic acid) (pH 6.5) contiene agenti stabilizzanti e agenti antimicrobici. La frazione IgG purificata da siero di capra immunizzata è sottoposta a digestione per ottenere F(ab')₂. I F(ab')₂ sono poi purificati per affinità e adsorbiti su fase solida con proteine seriche umane. Il polimero marcato con Perossidasi è infine coniugato con i Fab' ottenuti riducendo i F(ab')₂.

Il sistema non contiene né biotina né streptavidina, in questo modo il background solitamente presente nei campioni trattati con i sistemi a base di biotina è completamente eliminato.

3. USO PREVISTO

Per uso diagnostico in vitro.

L'interpretazione deve essere effettuata da un patologo qualificato entro il contesto dell'anamnesi clinica del paziente ed in considerazione di altri test diagnostici.

N-Histofine® Simple Stain MAX PO (MULTI) è destinato all'utilizzo in immunostochimica, per rilevare antigeni che reagiscono con un anticorpo primario di topo o coniglio su cellule e tessuti umani.

4. PRINCIPIO

Il complesso antigene/anticorpo/Polimero immunoperossidasi si forma attraverso la reazione del reagente con l'anticorpo primario di topo o coniglio legato all'antigene sulla sezione. L'attività enzimatica di tale complesso genera un deposito colorato che identifica così il sito antigenico.

5. PRECAUZIONI

1. Prima di utilizzare questo reagente leggere le istruzioni.
2. Non utilizzare dopo la data di scadenza.
3. Per operatori specializzati.
4. Prima e dopo la fissazione, i campioni e tutti i materiali venuti a contatto con questi devono essere considerati pericolosi e maneggiati con le opportune precauzioni.
5. L'inalazione o l'ingestione della formaldeide è pericolosa. Indossare una maschera protettiva. Se ingerita, indurre vomito. A seguito contatto con pelle o occhi, sciacquare accuratamente con acqua.
6. I reagenti organici sono infiammabili, non utilizzare in prossimità di fuoco.
7. Non utilizzare la bocca per pipettare i reagenti ed evitare il contatto con pelle, mucose e vestiti.

N-Histofine® is NICHIREI BIOSCIENCES's registered trademark. The registration countries would be referred to us.

8. Evitare contaminazioni microbiche dei reagenti, possono generare risultati alterati.
9. Evitare spargimento dei reagenti o generazione di aerosols.
10. Il cromogeno DAB deve essere maneggiato con cura poiché contiene un agente carcinogeno.
11. Lo smaltimento deve essere effettuato in accordo con la regolazione vigente.

6. PROCEDURA DI COLORAZIONE

□ Reagenti e materiali richiesti ma non forniti

- Xilolo
- Etanolo 95%
- Etanolo 100%
- Tampone salino fosfato (PBS) (pH 7.6±0.2)

NaCl	7.75 g
K ₂ HPO ₄	1.50 g
KH ₂ PO ₄	0.20 g
Acqua distillata	1L
- Soluzione al 3% di perossido d'idrogeno in metanolo (Aggiungere 1 parte di perossido d'idrogeno a 9 parti di metanolo assoluto)
- Anticorpo primario di topo o di coniglio
- Reagente di controllo negativo
- Cromogeno/substrato
- Soluzione per controcolorazione
- Acqua distillata
- Camera umida per incubazione dei vetrini
- Microscopio
- Vetrini coprioggetto
- Montante
- Timer
- Staining racks o Coplin jars
- Carta assorbente
- Adesivo per sezioni tissutali (0.02% poly-L-lysine, silano o analoghi)

□ Preparazione dei campioni

[Sezioni incluse in paraffina]

Campioni soggetti a fissazione prolungata possono deteriorarsi o andare incontro a denaturazione antigenica. Per ottenere una fissazione ottimale, utilizzare tessuti freschi di dimensioni ridotte (circa 1 cm x 1 cm x 0.5cm). Si raccomanda l'utilizzo dei seguenti fissativi:

Fissativo	Tempi di fissazione
10% formalina o formalina tamponata	24-48 ore
20% formalina	12-24 ore

[Sezioni congelate]

I campioni sono inclusi in composti (es. OTC compound) e congelati rapidamente in n-hexsan raffreddato in azoto liquido..

□ Preparazione delle sezioni

[Sezioni incluse in paraffina]

Le sezioni devono essere tagliate ad uno spessore di 3-6 µm e posizionate sui vetrini. Se occorrono pretrattamenti es. recupero antigenico al calore o incubazione con tripsina, i vetrini devono essere rivestiti con un adesivo es. 0.02% poly-L-lysine o silano.

[Sezioni congelate]

Le sezioni criostatate sono montate su vetrini rivestiti con un adesivo es. 0.02% poly-L-lysine e asciugate all'aria. I campioni sono poi fissati in 100% acetone a temperatura ambiente per 10 minuti o in una soluzione 4% paraformaldeide-PBS per 10% a 4°C.

[Vetrini di controllo]

Per interpretare correttamente i risultati della colorazione, occorre processare, insieme ai campioni, un vetrino di controllo negativo, un vetrino positivo e un vetrino con reagente di controllo.

- Vetrino di controllo positivo
Un campione noto contenente l'antigene target, viene processato insieme agli altri campioni.
- Vetrino di controllo negativo
Un campione noto non contenente l'antigene target, viene processato insieme agli altri campioni.
- Vetrino con reagente di controllo
Questo vetrino è processato analogamente ai campioni, tranne che per il reagente di controllo negativo, utilizzato in sostituzione dell'anticorpo primario.

□ Sparaffinatura e reidratazione

1. Trattamento con Xilolo
(1) Immergere i vetrini in xilolo. Dopo 3 minuti, rimuovere dallo xilolo e scuotere i vetrini per eliminare il liquido in eccesso.
(2) Ripetere 1.(1) due volte utilizzando xilolo fresco.
2. Trattamento con etanolo
(1) Immergere i vetrini in 100% etanolo. Dopo 3 minuti, rimuovere dall'etanolo e scuotere i vetrini per eliminare il liquido in eccesso.
(2) Ripetere 2.(1) una volta utilizzando etanolo 100% fresco
(3) Trattare i vetrini con etanolo 95% allo stesso modo descritto precedentemente.
3. Lavaggi
Immergere i vetrini in PBS per 5 minuti.

□ Colorazione

1. Quenching della perossidasi endogena
(1) Asciugare l'area circostante la sezione per rimuovere l'eccesso di liquido.
(2) Immergere i vetrini in una soluzione di perossido d'idrogeno al 3% in metanolo assoluto per 10-15 minuti a temperatura ambiente (15 - 25°C).
(3) Risciacquare in PBS fresco 3 volte x 5 minuti.
2. Anticorpo primario
(1) Asciugare l'area circostante la sezione per rimuovere l'eccesso di liquido.
(2) Applicare 2 gocce (100 µl) di anticorpo primario ai campioni, al vetrino di controllo positivo e al vetrino di controllo negativo in modo da coprire completamente la sezione.
(3) Il vetrino di controllo reagente deve essere trattato con il reagente di controllo negativo (siero normale) invece che con l'anticorpo primario.
(4) Incubare a temperatura ambiente o a 4°C. (Seguire le istruzioni presenti sulla scheda tecnica dell'anticorpo)
(5) Risciacquare in PBS fresco 3 volte x 5 minuti.
3. **N-Histofine®** Simple Stain MAX PO (MULTI) (Universal Immuno-peroxidase Polymer, Anti-Mouse and -Rabbit).
(1) Asciugare l'area circostante la sezione per rimuovere l'eccesso di liquido.
(2) Applicare 2 gocce (100 µl) di Simple Stain MAX PO (MULTI) su ogni vetrino, in modo da coprire completamente la sezione. Incubare a temperatura ambiente (15 - 25°C) per 30 minuti.
(3) Risciacquare in PBS fresco 3 volte x 5 minuti
4. Reagente cromogeno/substrato
(1) Asciugare l'area circostante la sezione per rimuovere l'eccesso di liquido.
(2) Applicare 2 gocce (100 µl) di reagente cromogeno/substrato su ogni vetrino, in modo da coprire completamente la sezione. Incubare a temperatura ambiente (15 - 25°C) per 5-20 minuti.
(3) Risciacquare in acqua distillate 3 volte x 5 minuti.
5. Controcolorazione
(1) Immergere i vetrini nella soluzione di controcolorazione
(2) Risciacquare accuratamente con acqua corrente.
6. Montaggio

In caso di substrati alcool-solubili (es. AEC), le sezioni vanno montate con mezzi di montaggio a base acquosa senza ulteriori trattamenti. I substrati alcool-insolubili (es. DAB) sono montati con un mezzo permanente dopo aver lavato con acqua, disidratato attraverso una scala di alcol e chiarificato i vetrini in xilolo.

□ Interpretazione dei risultati

Osservazione al microscopio

I vetrini sono esaminati al microscopio luce confrontando i risultati con i 3 tipi di controlli.

- Vetrino di controllo positivo
Si osserva colorazione positiva.
- Vetrino di controllo negativo
Non si osserva colorazione positiva
- Vetrino con reagente di controllo
In caso di colorazione positiva, questa è probabilmente dovuta ad una reazione aspecifica.

La sensibilità e la specificità della reazione antigenica dipendono dall'anticorpo primario utilizzato.

7. CONSERVAZIONE E VALIDITA'

Conservare a 2-8°C. Il reagente è stabile per 18 mesi dalla data di produzione.

8. LIMITAZIONI GENERALI

(1) Porre i reagenti a temperature ambiente (15 - 25°C) prima dell'utilizzo.

(2) Per limitare la denaturazione degli antigeni, durante la processazione non esporre i tessuti a temperature superiori ai 58°C.

(3) Non lasciare seccare i campioni durante la colorazione.

(4) I tempi di incubazione e le concentrazioni ottimali di anticorpo primario devono essere determinati dall'utilizzatore. In alcuni casi, per evitare un eccesso di colorazione è opportuno diluire ulteriormente l'anticorpo primario.

(5) Se la quantità di perossidasi endogena, di eritrociti e granulociti è molto bassa, è possibile omettere il passaggio di quenching

(6) I risultati della colorazione sono strettamente correlati ai passaggi di fissazione e processazione precedenti, errori in queste fasi possono comportare artefatti o risultati falsi negativi.

(7) I risultati possono essere non ottimali se si utilizzano fissativi non freschi o non tamponati o se i campioni vengono riscaldati eccessivamente durante l'inclusione o il montaggio sui vetrini.

(8) A causa dei legami aspecifici con le proteine, è possibile ottenere risultati falsi-positivi. Sebbene **N-Histofine®** Simple Stain MAX PO (MULTI) non richieda l'utilizzo di blocking, in alcuni casi l'applicazione di un reagente bloccante prima dell'incubazione con l'anticorpo primario può essere utile per ridurre il background.

(9) **N-Histofine®** Simple Stain MAX PO (MULTI) è per uso diagnostico in vitro. NICHIREI BIOSCIENCES INC., i suoi agenti di vendita e distributori non saranno responsabili di un eventuale uso improprio di **N-Histofine®** Simple Stain MAX PO (MULTI).

9. PROBLEMI

table 1

Problema	Possibile causa	Soluzione
Assenza di colorazione o segnale debole nei campioni e nel vetrino di controllo positivo.	- I campioni si sono asciugati durante i passaggi di colorazione. - Inclusione non adeguata, oppure la paraffina non è stata completamente rimossa dalle sezioni. - Tracce di sodio azide presenti nei tamponi possono inattivare la perossidasi, impedendo la colorazione. - Inadeguata incubazione con l'enzima o l'anticorpo.	- Utilizzare una camera umida per prevenire l'essiccamento delle sezioni. - Utilizzare un adeguato agente di inclusione o rimuovere completamente la paraffina dalle sezioni cambiando xilolo ed etanolo. - Utilizzare tamponi privi di sodio azide. Cambiare il tampone di lavaggio. - Utilizzare cromogeno/substrato freschi. Ad ogni passaggio, eliminare l'eccesso di soluzione. Incubare con l'anticorpo per il tempo necessario.
Il campione non è colorato, mentre il controllo positivo sì.	- L'antigene è denaturato o mascherato durante i processi di fissazione ed inclusione. - L'antigene è decomposto per autolisi. - Scarsa quantità di antigene nelle sezioni.	- Alcuni antigeni sono sensibili alla fissazione e all'inclusione. Utilizzare un fissativo meno concentrato e diminuire i tempi di fissazione. Per poter rilevare l'antigene, alcuni tessuti richiedono un pretrattamento es. recupero antigenico al calore (HIER) o trattamento con tripsina. - Se possibile, utilizzare tessuti ottenuti da biopsia o intervento chirurgico. - Prolungare i tempi di incubazione.
Eccesso di background in tutti i campioni	- L'attività enzimatica endogena non è stata completamente bloccata. - Legami aspecifici. - Un eccesso di reattività può essere dovuto ad autolisi del campione. - Insufficiente rimozione della paraffina. - Insufficiente lavaggio dopo l'incubazione con l'anticorpo. - Un'elevata temperatura ambientale accelera le reazioni enzimatiche. - Asciugatura dei campioni durante la colorazione.	- Assicurarsi che il quenching della Perossidasi sia effettuato correttamente. - Prima di aggiungere l'anticorpo primario, trattare con siero normale di capra al 10%. - Se possibile, utilizzare tessuti freschi. - Cambiare lo xilolo o l'etanolo. - Assicurarsi che i lavaggi siano sufficienti. - Mantenere la temperatura ambientale tra i 15 e i 25°C. Abbreviare i tempi di reazione. - Impedire l'asciugatura dei campioni durante la colorazione.
Distacco delle sezioni durante le reazioni.	Alcuni antigeni richiedono recupero antigenico al calore o prolungate incubazioni con l'anticorpo primario, ciò può indurre il distacco della sezione.	Montare le sezioni su vetrini rivestiti da un adesivo es. 0.02% poly-L-lysine o silano.

10. BIBLIOGRAFIA

- (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*: Cytochrome/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.

 Numero di catalogo	 Limiti di Temperatura	 Dispositivo per Uso Diagnostico In Vitro
 Azienda Produttrice	 Numero di Lotto	 Numero di Tests
 Utilizzare entro	 Consultare le Istruzioni	 Rappresentante Autorizzato nella Comunità Europea
 marchio CE	 Solo per valutazione conformità IVD	 Campione



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

N-Histofine® Simple Stain MAX PO (MULTI)

Γενικό Πολυμερές Ανοσο-υπεροξειδάσης, Αντί-ποντικού και
αντί-Κουνελιού

N-Histofine® Ανοσοϊστοχημικό αντιδραστήριο χρώσης

Αποθηκεύεται στους 2-8°C

Παρεχόμενα Αντιδραστήρια

17 ml x 1 φιάλη (170 τεστ)	Κωδικός: 414151F
17 ml x 3 φιάλες (500 τεστ)	Κωδικός: 414152F
17 ml x 9 φιάλες (1500 τεστ)	Κωδικός: 414154F

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η NICHIREI BIOSCIENCES ανέπτυξε ένα μοναδικό ανοσοϊστοχημικό σύστημα χρώσης που ονομάζεται μέθοδος **Γενικού Ανοσο-ενζυμικού πολυμερούς (UIP)** (Πατέντα ΗΠΑ Αρ.6,252,053). Αυτή είναι η αυθεντική τεχνική της NICHIREI BIOSCIENCES. Το **N-Histofine® Simple Stain MAX PO (MULTI)**, παρέχει τόσο υψηλή ευαισθησία όσο και εξοικονόμηση χρόνου σε ανοσοϊστοχημικές εφαρμογές.

2. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Υγρό. Έτοιμο για χρήση.

Το **N-Histofine® Simple Stain MAX PO (MULTI)** (Γενικό Πολυμερές Ανοσο-υπεροξειδάσης, Αντί-Ποντικού και Αντί-Κουνελιού) είναι το ιχνηθετημένο πολυμερές που έχει παρασκευαστεί συνδυάζοντας πολυμερή αμινοξέων με υπεροξειδάση και Ig κατσίκας αντί-ποντικού και Ig κατσίκας αντί-κουνελιού που μειώνονται σε τμήμα Fab'. Αποθηκεύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα MOPS (3-Morpholinopropanesulfonic acid) (pH 6.5) που περιέχει σταθεροποιητή και αντιβακτηριακό συντελεστή.

Το τμήμα IgG που έχει καθαριστεί από ανοσοποιημένο ορό κατσίκας αποσυντίθεται και μαλακώνει ώστε να παρασκευαστεί τμήμα F(ab')₂. Το ειδικό αντιγόνου F(ab')₂ καθαρίζεται με χημική συνάφεια με το αντιγόνο. Η απορρόφηση της σταθερής φάσης διενεργείται με πρωτεΐνη ανθρώπινου ορού. Το ιχνηθετημένο με υπεροξειδάση πολυμερές αμινοξέος μετατρέπεται μέσω σύζευξης σε τμήμα Fab που λαμβάνεται με την μείωση σε F(ab')₂.

Το σύστημα δεν περιέχει βιοτίνη ούτε στρεπταβιδίνη, έτσι αποφεύγεται εντελώς το υπόβαθρο που υπήρχε στα παραδοσιακά συστήματα εντοπισμού με βάση τη βιοτίνη.

3. ΕΠΙΔΙΩΚΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Για In-vitro Διαγνωστική Χρήση.

Η ερμηνεία πρέπει να γίνει εντός του φάσματος του κλινικού ιστορικού του ασθενούς και άλλων διαγνωστικών τεστ από τον αρμόδιο παθολόγο.

Το **N-Histofine® Simple Stain MAX PO (MULTI)** είναι σχεδιασμένο να επιτρέπει ανοσοϊστοχημικά τεστ, να αποκαλύπτει αντιγόνα που αντιδρούν με ένα πρωτεΐν αντισώμα ποντικού ή πρωτεΐν αντισώμα κουνελιού που παρέχεται από τον χρήστη σε ανθρώπινο ιστό και κύτταρα.

4. ΑΡΧΗ

Το σύμπλεγμα αντιγόνου/ αντισώματος/ Γενικό Πολυμερούς Ανοσο-υπεροξειδάσης μπορεί να παρασκευαστεί επιτρέποντας στο αντιδραστήριο να αντιδράσει με ένα πρωτεΐν αντισώμα ποντικού ή πρωτεΐν αντισώμα κουνελιού που δεσμεύεται στο αντιγόνο στο τμήμα του ιστού. Η ενζυματική δραστηριότητα αυτού του συμπλέγματος οδηγεί σε ένα χρωματισμένο απόθεμα, συνεπώς χρωματίζεται ο χώρος του αντιγόνου.

5. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

1. Πρωτό χρησιμοποίησετε το αντιδραστήριο, διαβάστε τις οδηγίες.
2. Μην χρησιμοποιείτε αντιδραστήρια μετά την ημερομηνία λήξεως.
3. Για επαγγελματική χρήση.
4. Τα δείγματα, πριν και μετά τη δέσμευση, και όλα τα υλικά που έχουν εκτεθεί σ' αυτά, θα πρέπει να διαχειρίζονται ως βιολογικά επικίνδυνα με τις κατάλληλες προφυλάξεις.
5. Η εισπνοή ή πέψη της άκρας αλλεργιογόνου στερεωτικού

φορμαλδεΐδης είναι επιβλαβής. Φορέστε προστατευτική μάσκα. Σε περίπτωση κατάποσης, προκαλέστε εμετό. Σε περίπτωση επαφής με το δέρμα ή τα μάτια, ξεπλύνετε εκτενώς με νερό.

6. Τα οργανικά αντιδραστήρια είναι εύφλεκτα. Μην χρησιμοποιούνται κοντά σε εστία φλόγας.
7. Μην αντλείτε ποτέ αντιδραστήρια με το στόμα και αποφύγετε επαφή με το δέρμα, τις βλεννογόνους μεμβράνες και τα ρούχα.
8. Αποφύγετε την μικροβιακή μόλυνση των αντιδραστηρίων καθώς μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένα αποτελέσματα.
9. Αποφύγετε πιεσίσιμα αντιδραστηρίων ή παραγωγή αεροζόλης.
10. Ως χρωμογόνο, το διάλυμα DAB πρέπει να διαχειρίζεται με προσοχή καθώς περιέχει καρκινογόνα.
11. Το μη χρησιμοποιημένο διάλυμα θα πρέπει να απορρίπτεται σύμφωνα με τους τοπικούς, Κρατικούς και Ομοσπονδιακούς κανονισμούς.

6. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΧΡΩΣΗΣ

□ Αντιδραστήρια και Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται.

- Ξυλένιο
- 95% αιθανόλη
- 100% αιθανόλη
- Αλατούχο φωσφορικό διάλυμα (PBS) (pH 7.6±0.2)
NaCl 7.75 g
K₂HPO₄ 1.50 g
KH₂PO₄ 0.20 g
Απεσταγμένο νερό 1L
- 3% διάλυμα υπεροξειδίου υδρογόνου σε καθαρή μεθανόλη (Προσθέστε 1 μέρος του 30% υπεροξειδίου υδρογόνου σε 9 μέρη καθαρής μεθανόλης)
- Πρωτεΐν αντισώμα ποντικού ή κουνελιού
- Αντιδραστήριο αρνητικού μάρτυρα
- Αντιδραστήριο χρωμογόνου/ υποστρώματος
- Διάλυμα αντίθετης χρώσης
- Απεσταγμένο νερό
- Υγραμένος θάλαμος για την επώαση διαφανειών
- Μικροσκόπιο φωτός
- Ταινίες κάλυψης
- Μέσο στήριξης
- Χρονοδιακόπτης
- Αναρτήρες χρώσης ή φιάλες Coplin
- Απορροφητικά πανιά
- Συγκολλητικό για το τμήμα των ιστών (0.02% πολύ-L-λυσίνη, σιλάνιο ή παρόμοιο)

□ Προετοιμασία δείγματος

[Τμήματα ιστών εμβυθισμένα σε παραφίνη]

Τα δείγματα μπορεί να υποστούν ιστολογική αποσύνθεση ή αντιγονική αλλοίωση όταν υποβληθούν σε εξαιρετικά συμπτυκνωμένο στερεωτικό ή παρατεταμένη σταθεροποίηση. Συνεπώς για να επιτευχθεί η βέλτιστη στερέωση, η διατήρηση της μορφολογίας ιστού και της δραστηριότητας αντιγόνου, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται όσο το δυνατόν πιο φρέσκοι ιστοί και μικροί σε μέγεθος (περίπου 1 cm x 1 cm x 0.5 cm). Συνιστώνται τα στερεωτικά που αναγράφονται παρακάτω.

Στερεωτικό αντιδραστήριο	Χρόνος στερέωσης
10% φορμαλίνη ή διαλυμένη φορμαλίνη	24-48 ώρες
20% φορμαλίνη	12-24 ώρες

[Κατεψυγμένα τμήματα ιστών]

Τα δείγματα εμβυθίζονται σε ενώσεις (όπως η ένωση OTC) και καταψύχονται αμέσως σε n-hexsan που έχει ψυχθεί σε ξηρή παγωμένη ακετόνη ή υγρό άζωτο.

□ Ετοιμασία τμήματος

[Τμήματα ιστών εμβυθισμένα σε παραφίνη]

Τα κομμένα τμήματα πρέπει να είναι 3-6 μm και τοποθετούνται σε διαφάνειες. Όταν πρόκειται να γίνουν περαιτέρω ενέργειες όπως Ανάκτηση Αντιγόνου, Ανάκτηση Επιτόπου μέσω Θερμότητας (HIER) ή θεραπεία θρυψίνης, οι γυάλινες διαφάνειες θα πρέπει να καλύπτονται με συγκολλητικό όπως 0.02% πολύ-L-λυσίνη ή σιλάνιο για τμήματα ιστών.

[Κατεψυγμένα τμήματα ιστών]

Τα κρυοστατικά τμήματα στερεώνονται σε μια διαφάνεια καλυμμένη με συγκολλητικό (όπως 0.02% πολύ-L-λυσίνη) και στεγνώνονται καλά με αέρα. Τα τμήματα στερεώνονται με 100% ακετόνη για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ή με διάλυμα 4% παραφορμαλδεΐδης- PBS για 10 λεπτά στους 4°C και μετά χρωματίζονται.

[Διαφάνειες μάρτυρα]

Χρειάζονται μια διαφάνεια θετικού μάρτυρα, μια διαφάνεια αρνητικού μάρτυρα και μια διαφάνεια μάρτυρα αντιδραστήριου τις οποίες επεξεργάζεστε με τον ίδιο τρόπο με την διαφάνεια αγνώστου δείγματος για να ερμηνεύσετε τα αποτελέσματα χρώσης.

• Διαφάνεια θετικού μάρτυρα

Ένα δείγμα που περιέχει το στοχευόμενο αντιγόνο την οποία επεξεργάζεστε με τον ίδιο τρόπο όπως αυτή του αγνώστου δείγματος.

• Διαφάνεια αρνητικού μάρτυρα

Ένα δείγμα που δεν περιέχει το στοχευόμενο αντιγόνο την οποία επεξεργάζεστε με τον ίδιο τρόπο όπως αυτή του αγνώστου δείγματος.

• Διαφάνεια μάρτυρα αντιδραστήριου

Ένα δείγμα μάρτυρα χρησιμοποιείται και επεξεργάζεται με τον ίδιο τρόπο όπως το δείγμα που εξετάζεται, όμως χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο αρνητικού μάρτυρα αντί για το πρωτεύον αντίσωμα.

□ Αποπαραφήνιση και επανενυδάτωση

1. Χειρισμός με ξυλένιο

(1) Βυθίστε τις διαφάνειες σε ξυλένιο. Μετά από 3 λεπτά, βγάλτε τις και τινάξτε το πλεονάζον ξυλένιο από τις διαφάνειες.

(2) Επαναλάβετε το 1. (1) δύο φορές χρησιμοποιώντας φρέσκο ξυλένιο.

2. Χειρισμός με αιθανόλη

(1) Βυθίστε τις διαφάνειες σε 100% αιθανόλη. Μετά από 3 λεπτά, βγάλτε τις και τινάξτε την πλεονάζουσα 100% αιθανόλη από τις διαφάνειες.

(2) Επαναλάβετε το 2. (1) μια φορά με φρέσκια 100% αιθανόλη.

(3) Κατόπιν, επαναλάβετε δύο φορές με 05% με τον ίδιο τρόπο που περιγράφεται παραπάνω.

3. Πλύση

Αφού έχει αποτιναχθεί η πλεονάζουσα αιθανόλη, βυθίστε τις διαφάνειες σε PBS για 5 λεπτά.

□ Διαδικασίες Χρώσης

1. Ψύξη της ενδογενούς υπεροξειδάσης

(1) Σκουπίστε τις περιοχές γύρω από τα τμήματα στις διαφάνειες προσεκτικά για να βγάλετε το πλεονάζον διάλυμα.

(2) Βυθίστε τις σε 3% διάλυμα υπεροξειδίου υδρογόνου σε καθαρή μεθανόλη για 10-15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (15 - 25°C).

(3) Ξεβγάλετε τις σε φρέσκο PBS για 3 λεπτά, με κάθε βύθιση διάρκειας 5 λεπτών.

2. Πρόσθεση και αντίδραση του πρωτεύοντος αντισώματος.

(1) Σκουπίστε τις περιοχές γύρω από τα τμήματα στις διαφάνειες προσεκτικά.

(2) Προσθέστε 2 σταγόνες (100 μl) πρωτεύοντος αντισώματος στη διαφάνεια δείγματος, τη διαφάνεια θετικού μάρτυρα και τη διαφάνεια αρνητικού μάρτυρα αντίστοιχα παρέχοντας πλήρη κάλυψη των τμημάτων.

(3) Στην διαφάνεια του μάρτυρα αντιδραστήριου, προσθέστε δύο σταγόνες αντιδραστήριου αρνητικού μάρτυρα (κανονική ορού) στη θέση του πρωτεύοντος αντισώματος.

(4) Επώαστε τις σε θερμοκρασία δωματίου ή στους 4°C. (Ακολουθήστε τις οδηγίες για τον καθορισμένο χρόνο επώασης στα στοιχεία που αναγράφονται στο εσώκλειστο της συσκευασίας του πρωτεύοντος αντισώματος.)

(5) Ξεβγάλετε τις σε φρέσκο PBS 3 φορές, με διάρκεια 5 λεπτά η κάθε μια.

3. Πρόσθεση και αντίδραση του **N-Histofine®** Simple Stain MAX PO (MULTI) (Γενικό Πολυμερές Ανοσο-υπεροξειδάσης, Αντί-ποντικού και Αντι-κουνελιού).

(1) Σκουπίστε τις περιοχές γύρω από τα τμήματα στις διαφάνειες προσεκτικά.

(2) Προσθέστε 2 σταγόνες (100 μl) MAX PO Simple Stain (MULTI) σε κάθε διαφάνεια ώστε να πετύχετε πλήρη κάλυψη των τμημάτων. Επώαστε σε θερμοκρασία δωματίου (15 - 25°C) για 30 λεπτά.

(3) Ξεβγάλετε σε φρέσκο PBS 3 φορές, κάθε μια διάρκειας 5 λεπτών.

4. Πρόσθεση και αντίδραση του χρωμογόνου/ αντιδραστήριου υποστρώματος

(1) Σκουπίστε τις περιοχές γύρω από τα τμήματα στις διαφάνειες προσεκτικά.

(2) Προσθέστε 2 σταγόνες (100 μl) του χρωμογόνου/ αντιδραστήριου υποστρώματος σε κάθε διαφάνεια ώστε να πετύχετε πλήρη κάλυψη των τμημάτων. Επώαστε σε θερμοκρασία δωματίου (15 - 25°C) για 5 - 20 λεπτά.

(3) Ξεβγάλετε με απεσταγμένο νερό 3 φορές, κάθε μια διάρκειας 5 λεπτών.

5. Αντίστροφη χρώση

(1) Βυθίστε τις στο διάλυμα αντίστροφης χρώσης.

(2) Πλύνετε καλά με νερό βρύσης.

6. Στήριξη

Σε περίπτωση που αλκοολούχων διαλυτών υποστρωμάτων όπως το AEC, τα τμήματα ιστών στηρίζονται με μέσο στήριξης με βάση το νερό χωρίς περαιτέρω επεξεργασία. Σε περίπτωση αλκοολούχων διαλυτών υποστρωμάτων όπως το DAB, στηρίζονται με μόνιμο μέσο στήριξης μετά την πλύση με νερό, αφυδατώνονται σε διαβαθμισμένα στάδια αλκοόλης και καθαρίζονται σε ξυλένιο.

□ Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Παρατήρηση στο μικροσκόπιο

Οι διαφάνειες εξετάζονται κάτω από ένα μικροσκόπιο φωτός για θετική αντίδραση. Είναι απαραίτητο να γίνει η σύγκριση με τους τρεις τύπους των διαφανειών μαρτύρων για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων χρώσης.

• Διαφάνεια θετικού μάρτυρα

Παρατηρείται θετική χρώση.

• Διαφάνεια αρνητικού μάρτυρα

Δεν παρατηρείται θετική χρώση.

• Διαφάνεια μάρτυρα αντιδραστήριου

Εάν η διαφάνεια παρουσιάζει χρώση, είναι πιθανό να οφείλεται σε μη-ειδική αντίδραση από μη-ειδική δέσμευση πρωτεΐνης.

Η ειδικότητα και ευαισθησία του εντοπισμού αντιγόνου εξαρτάται από το ειδικό πρωτεύον αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε.

7. ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ & ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΖΩΗΣ

Αποθηκεύεται στους 2-8°C. Το αντιδραστήριο παραμένει σταθερό για 18 μήνες μετά την παρασκευή.

8. ΓΕΝΙΚΟΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

(1) Αφήστε τα αντιδραστήρια να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου (15 - 25°C) πριν την χρώση.

(2) Για να ελαχιστοποιήσετε την αλλοίωση των αντιγόνων, μην εκθέτετε τους ιστούς σε θερμοκρασία πάνω από 58°C κατά την επεξεργασία.

(3) Μην ξηραίνετε τους ιστούς σε κάθε βήμα χρώσης.

(4) Η βέλτιστη συγκέντρωση και χρόνος επώασης των πρωτευνόντων αντισωμάτων θα πρέπει να καθορίζονται από την έρευνα. Σε κάποιες περιπτώσεις, μπορεί να απαιτείται περαιτέρω διάλυση των πρωτευνόντων αντισωμάτων ώστε να αποφευχθεί η υπερβολική χρώση.

(5) Εάν τα τμήματα περιέχουν λίγη ενδογενή υπεροξειδάση, λίγα ερυθροκύτταρα και λίγα κοκκιοκύτταρα, η ψύξη της ενδογενούς υπεροξειδάσης μπορεί να παραληφθεί.

(6) Η χρώση των ιστών εξαρτάται από τον χειρισμό και την επεξεργασία του ιστού πριν από την χρώση. Η ακατάλληλη στερέωση, ψύξη, απόψυξη, πλύση, στέγνωμα, θέρμανση ή τμηματοποίηση μπορεί να παράγει προϊόντα ή εσφαλμένα αρνητικά αποτελέσματα.

(7) Τα αποτελέσματα δεν θα είναι βέλτιστα εάν χρησιμοποιηθούν παλιά ή μη διαλυμένα στερεωτικά, ή θερμανθούν υπερβολικά κατά τη διάρκεια της εμβύθισης ή κατά την προσκόλληση των τμημάτων στις διαφάνειες.

(8) Μπορεί να εμφανιστούν εσφαλμένα θετικά αποτελέσματα λόγω της μη-ειδικής δέσμευσης πρωτεϊνών. Αν και το **N-Histofine®** Simple Stain MAX PO (MULTI) δεν απαιτεί την χρήση ξεχωριστής ουσίας αποκλεισμού, σε κάποιες περιπτώσεις η εφαρμογή μιας ουσίας αποκλεισμού που περιέχει μια μη σχετική πρωτεΐνη, πριν την επώαση με το πρωτεύον αντίσωμα, μπορεί να είναι χρήσιμη για την μείωση του υπόβαθρου.

(9) Το **N-Histofine®** Simple Stain MAX PO (MULTI) έχει σχεδιαστεί για in-vitro διαγνωστική χρήση. Η NICHIREI BIOSCIENCES INC., οι πωλητές της NICHIREI BIOSCIENCES και οι διανομείς της αποποιούνται κάθε ευθύνης όταν το **N-Histofine®** Simple Stain MAX PO (MULTI) χρησιμοποιείται με τρόπο τέτοιο που παραβιάζει τους τοπικούς κανονισμούς ή πατέντες. Ούτε η NICHIREI BIOSCIENCES ούτε οι πωλητές της μπορούν να θεωρηθούν υπεύθυνοι για οποιαδήποτε παραβίαση πατέντας που μπορεί να προκύψει ως αποτέλεσμα της μη ορθής χρήσης του προϊόντος.

9. ΕΠΙΛΥΣΗ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ

Πίνακας 1

Πρόβλημα	Πιθανή αιτία	Λύση
Καμία χρώση ή ελαφρά χρώση παρατηρείται στην διαφάνεια θετικού μάρτυρα και την διαφάνεια αγνώστου δείγματος	- Το στέγνωμα των δειγμάτων κατά την χρώση πριν την πρόσθεση των αντιδραστηρίων. - Η ουσία εμβύθισης δεν είναι κατάλληλη, ή δεν έχει αφαιρεθεί σωστά η παραφίνη από τα τμήματα που βυθίστηκαν σε παραφίνη. - Οποιοδήποτε ίχνος αζιδίου του νατρίου στο ρυθμιστικό διάλυμα αδρανοποιεί την υπεροξειδάση, καθιστώντας αδύνατη τη χρώση. - Ανεπαρκής επώαση του ενζύμου και αντισώματος.	- Χρησιμοποιήστε τον υγροποιημένο θάλαμο ώστε να μην ξεραθεί ο ιστός. - Επιλέξτε μια κατάλληλη ουσία εμβύθισης ή απομακρύνετε επαρκώς την παραφίνη από τα τμήματα που εμβυθίστηκαν. - Αλλάξτε το ξυλένιο ή την αιθανόλη ανάλογα με την περίπτωση. - Χρησιμοποιήστε ρυθμιστικό διάλυμα χωρίς αζίδιο νατρίου. - Αλλάξτε ρυθμιστικό διάλυμα. - Αλλάξτε το παλιό χρωμογόνο/ αντιδραστήριο υποστρώματος. - Απομακρύνετε το πλεονάζον διάλυμα εκτενώς σε κάθε στάδιο. - Παρέχετε αρκετό χρόνο για αντίδραση με το αντίσωμα. Συγκεκριμένα, το πρωτεύον αντίσωμα θα πρέπει να επωαστεί σύμφωνα με την χρονική περίοδο που αναγράφεται στο εσώκλειστο.
Η διαφάνεια αγνώστου δείγματος δεν χρωματίζεται ενώ χρωματίζεται η διαφάνεια θετικού μάρτυρα.	- Το αντιγόνο αλλοιώθηκε ή καλύφθηκε κατά την διάρκεια της διαδικασίας στερέωσης ή εμβύθισης. - Το αντιγόνο έχει αποσυντεθεί μέσω αυτόλυσης. - Είναι παρόν λιγότερο αντιγόνο στα τμήματα.	- Κάποια αντιγόνα είναι ευαίσθητα στην στερέωση ή εμβύθιση. Έτσι χρησιμοποιήστε λιγότερο πιθανά στερεωτικά και μειώστε τον χρόνο στερέωσης. - Η προετοιμασία απαιτείται για μερικούς ιστούς, ούτως ώστε να μπορέσει να αποκαλυφθεί το αντιγόνο, όπως η Ανάκτηση Αντιγόνου, η Ανάκτηση Επιτόπου μέσω Θερμότητας (HIER) ή η χρήση θρυψίνης. - Χρησιμοποιήστε ιστούς που λαμβάνονται από βιοψία ή χειρουργείο, όταν είναι δυνατόν. - Παρατείνετε τον χρόνο επώασης.
Το υπόβαθρό είναι έντονα χρωματισμένο σε όλες τις διαφάνειες.	- Η δραστηριότητα ενδογενούς ενζύμου δεν αποκλείστηκε πλήρως. - Βρέθηκαν μη-ειδικές συνθέσεις δέσμευσης. - Τα αποτελέσματα αυτόλυσης σε πλεονάζοντα αντιγόνα απομονώθηκαν σε ιστολογικά διαλύματα. - Ανεπαρκής απομάκρυνση παραφίνης. - Ανεπαρκής πλύση του αντισώματος. - Μια υψηλή θερμοκρασία δωματίου επιταχύνει τις ενζυμικές αντιδράσεις. - Το στέγνωμα των δειγμάτων κατά τη χρώση μετά τα αντιδραστήρια.	- Διασφαλίστε ότι η διαδικασία ψύξης της ενδογενούς υπεροξειδάσης είναι σωστή. - Προτού προσθέσετε το πρωτεύον αντίσωμα, προσθέστε 10% φυσιολογικό ορό κατσίκας. - Λάβετε φρέσκους ιστούς όταν αυτό είναι εφικτό. - Αλλάξτε ξυλένιο ή αιθανόλη ανάλογα με την περίπτωση. - Διασφαλίστε την επαρκή πλύση του αντισώματος. - Διατηρήστε τη θερμοκρασία δωματίου στους 15 έως 25°C - Μειώστε τον χρόνο αντίδρασης. - Μην επιτρέπετε στον ιστό να στεγνώσει.
Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, τα τμήματα ιστών βγαίνουν από τις διαφάνειες.	Κάποια αντιγόνα απαιτούν διαδικασία ανάκτησης αντιγόνου μέσω θερμότητας ή παρατεταμένο χρόνο αντίδρασης με το πρωτεύον αντίσωμα, που μπορεί να οδηγήσει στην εύκολη αποκόλληση των τμημάτων.	Δεσμεύστε τα τμήματα ιστών στις διαφάνειες που είναι επικαλυμμένες με συγκολλητικό όπως 0.02% πολύ-L-λυσίνη ή σιλάνιο.

10. ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

- (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*: Cytochrome b5/STAP, its unique localization in splanchic 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 Αριθμός καταλόγου/ Κωδικός	 Περιορισμοί Θερμοκρασίας	IVD In Vitro Διαγνωστική Ιατρική Συσκευή
 Κατασκευαστής	LOT Κωδικός Παρτίδας	 Περιέχει αρκετά τεμάχια για (N) Τεστ
 Χρήση έως	 Συμβουλευτείτε τις Οδηγίες Χρήσεως	EC REP Εξουσιοδοτημένος Αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα
 Ένδειξη CE, κωδικός του Δηλωμένου σώματος	 Μόνο για IVD Αξιολόγηση Απόδοσης	SAMPLE Δείγμα



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