



## EnVision FLEX+, Mouse, High pH (Link)

Code / Code / Code-Nr. K8002

The kit contains reagents sufficient for 400–600 tests. For Autostainer Link instruments.

Les réactifs contenus dans ce kit permettent d'effectuer 400 à 600 tests. Pour les appareils Autostainer Link.

Die in diesem Kit enthaltenen Reagenzien sind ausreichend für 400-600 Tests. Für Autostainer Link Geräte.

Optional reagents / Réactifs en option / Optionale Reagenzien:

Code / Code (Réf.) / Code-Nr.	Product name / Nom du produit / Produktbezeichnung	Tests
K8004	EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x)	200–430
K8005	EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x)	200–430
K8006	EnVision FLEX Antibody Diluent	400–600
K8007	EnVision FLEX Wash Buffer (20x)	
K8008	EnVision FLEX Hematoxylin, (Link)	400–600
K8009	EnVision FLEX+ Rabbit (LINKER), (Link)	130–200
K8021	EnVision FLEX+ Mouse (LINKER), (Link)	130–200

Other options / Autres options / Weitere Optionen:

K8020	FLEX IHC Microscope Slides	500
-------	----------------------------	-----

# Contents / Table des matières / Inhalt

Page / Page / Seite

## **ENGLISH**

Intended Use .....	4
Summary and Explanation.....	4
Reagents .....	5
A. Materials provided .....	5
B. Materials required but not provided.....	6
C. Optional reagents .....	6
Precautions .....	7
Storage.....	8
Reagent Preparation.....	9
Specimen Collection and Preparation .....	9
Procedure.....	10
A. Pre-treatment procedure .....	10
B. Staining procedure.....	11
Quality Control.....	12
Staining Evaluation .....	12
Cross-reactivity of Secondary Antibodies.....	12
Limitations .....	12
Explanation of symbols.....	36

## **FRANÇAIS**

Utilisation prévue .....	12
Résumé et explication .....	13
Réactifs .....	14
A. Matériel fourni.....	14
B. Matériels requis mais non fournis .....	15
C. Réactifs en option.....	15
Précautions d'emploi .....	16
Conservation .....	18
Préparation des réactifs.....	18
Prélèvement et préparation des échantillons .....	19
Procédure.....	19
A. Procédure de prétraitement .....	19
B. Procédure de coloration.....	21
Contrôle qualité .....	21
Évaluation de la coloration.....	21
Réactivité croisée des anticorps secondaires .....	22
Limites.....	22
Explication des symboles .....	36

## **DEUTSCH**

Verwendungszweck.....	23
Zusammenfassung und Erklärung .....	23
Reagenzien .....	24
A. Mitgelieferte Materialien.....	24
B. Erforderliches, aber nicht mitgeliefertes Material.....	25
C. Optionale Reagenzien .....	25
Vorsichtsmaßnahmen.....	26
Lagerung .....	28
Vorbereitung der Reagenzien .....	28
Entnahme und Vorbereitung der Probe.....	29
Verfahren.....	29
A. Arbeitsablauf der Vorbehandlung.....	29
B. Färbeverfahren .....	31
Qualitätskontrolle.....	31
Auswertung der Färbung .....	32
Kreuzreaktivität von sekundären Antikörpern.....	32
Einschränkungen.....	32
Erläuterung der Symbole .....	36

## **ENGLISH**

### **Intended Use**

For in vitro diagnostic use.

EnVision FLEX+ visualization system is intended for automated laboratory use in qualitative or semiquantitative immunohistochemistry together with Autostainer Link instruments. The system is intended for detection of primary mouse and rabbit antibodies in formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue sections. The presence of formed antibody/antigen complexes in FFPE tissue is visualized by EnVision FLEX DAB+ Chromogen. If used with EnVision FLEX+ Mouse (LINKER) (Code K8021) or EnVision FLEX+ Rabbit (LINKER) (Code K8009) signal amplification of primary mouse antibodies or primary rabbit antibodies, respectively, can be achieved.

### **Summary and Explanation**

EnVision FLEX+ visualization system has been designed to be a flexible system for visualization of antibody/antigen complexes. It gives an optimal staining on Autostainer Link instruments, when using the protocol recommended in this Instructions for Use. As a guideline, using EnVision FLEX+ Mouse (Code K8002) increases signal amplification **4-5 fold** and using EnVision FLEX+ Rabbit (Code K8009, optional reagent) increases signal amplification **2-3 fold**.

Prior to staining, formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections should be subjected to deparaffinization and hydration followed by heat-induced epitope retrieval (HIER) using the target retrieval method specified in the Instructions for Use for the primary antibody. See also Procedure section for 3-in-1 specimen preparation. Code K8002 includes EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x). Alternatively, EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code K8004) or EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Code K8005) is recommended. Some primary antibodies require enzymatic pre-treatment of tissue for optimal staining instead of HIER.

Endogenous peroxidase should be blocked with EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (SM801) included in the kit. Due to an effective washing procedure and the presence of stabilizing proteins in the reagents, extra blocking steps to reduce nonspecific background staining are unnecessary.

EnVision FLEX Wash Buffer (20x) (DM831) included in the kit or available as optional reagent (Code K8007) is recommended.

Primary antibodies are not provided with the kit. We recommend the use of FLEX Ready-to-Use primary antibodies or concentrated primary antibodies from Agilent. EnVision FLEX Antibody Diluent (Code K8006) is recommended for the dilution of concentrated primary antibodies.

EnVision FLEX+ Mouse (LINKER) (DM824) included in the kit or available as optional reagent (Code K8021) may be replaced by EnVision FLEX+ Rabbit (LINKER) (Code K8009) when using rabbit primary antibodies. EnVision FLEX+ Mouse (LINKER) and EnVision FLEX+, Rabbit (LINKER) may be applied for an optional signal amplification of mouse and rabbit primary antibodies, respectively. As a guideline: EnVision FLEX+ Mouse (LINKER) provides 4-5 fold signal amplification and EnVision FLEX+ Rabbit (LINKER) provides 2-3 fold signal amplification.

EnVision FLEX /HRP visualization reagent (SM802) in the kit consists of a dextran backbone to which a large number of peroxidase (HRP) molecules and secondary antibody molecules have been coupled. A unique chemistry is used for the coupling reaction, which permits the binding of up to 100 HRP molecules and up to 20 antibody molecules per backbone.

The substrate system in the kit consists of two components: EnVision FLEX DAB+ Chromogen (DM827), a concentrated diaminobenzidine (DAB) solution, and EnVision FLEX Substrate Buffer (SM803) containing hydrogen peroxide. Before use EnVision FLEX DAB+ Chromogen must be diluted in EnVision FLEX Substrate Buffer. The substrate system produces a crisp brown end product at the site of the target antigen.

EnVision FLEX Hematoxylin (Code K8008) is recommended for counterstaining. The reagent provides a clear blue, nuclear staining.

The stained tissue sections may be mounted with either aqueous or organic-solvent-based mounting medium.

Refer to our *General Instructions for Immunohistochemical Staining* (PD00730) for: Principle of Procedure; Materials Required, but Not Supplied; Storage; Specimen Preparation; Staining Procedure; Quality Control; Staining Evaluation; Interfering Substances; General Limitations; Troubleshooting. Available at [agilent.com/library/eifu](http://agilent.com/library/eifu).

## Reagents

### A. Materials provided

SM801

EnVision FLEX  
PEROXIDASE-BLOCKING  
REAGENT

#### EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent

3 x 40 mL, ready-to-use

Phosphate buffer containing hydrogen peroxide, 15 mmol/L NaN<sub>3</sub> and detergent.

SM802

EnVision FLEX  
/HRP

#### EnVision FLEX /HRP

3 x 40 mL, ready-to-use

Dextran coupled with peroxidase molecules and goat secondary antibody molecules against rabbit and mouse immunoglobulins. In buffered solution containing stabilizing protein and preservative.

DM827

EnVision FLEX  
DAB+ CHROMOGEN

#### EnVision FLEX DAB+ Chromogen

3 x 3 mL

3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride in organic solvent.

The color of this reagent may vary from strong violet to colorless without having any influence on the performance of the kit.

SM803

EnVision FLEX  
SUBSTRATE BUFFER

#### EnVision FLEX Substrate Buffer

12 x 20 mL

Buffered solution containing hydrogen peroxide and preservative.

DM828

EnVision FLEX  
TARGET RETRIEVAL SOLUTION,  
HIGH pH (50x)

#### EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x)

9 x 30 mL, 50x concentrated

Tris/EDTA buffer, pH 9

DM831

EnVision FLEX  
WASH BUFFER (20x)

#### EnVision FLEX Wash Buffer (20x)

4 x 1 L, 20x concentrated

Tris-buffered saline solution containing Tween 20, pH 7.6 (±0.1).

SM804

EnVision FLEX+  
MOUSE (LINKER)

#### EnVision FLEX+, Mouse (LINKER)

3 x 40 mL, ready-to-use

Buffered solution containing stabilizing protein and an antimicrobial agent.

Kit components from different EnVision FLEX (Link) kits and with different lot numbers may be used in combination.

## B. Materials required but not provided

Antibody diluent, see Instructions for Use for concentrated primary antibody

Autostainer Link instrument

Autostainer Link instrumentation utensils

Distilled or de-ionized water (reagent-grade water)

FLEX Ready-to-Use primary antibodies or suitably diluted concentrated primary rabbit or mouse antibodies from Agilent.

FLEX Ready-to-Use Rabbit or Mouse Universal Negative Control (Code IR600/IR750) or suitable negative control reagent for the primary antibody

Proteinase K, Ready-to-Use (if necessary) (Code S3020)

PT Link and accessories

Microscope slides, e.g. FLEX IHC Microscope Slides (Code K8020) or SuperFrost Plus microscope slides

Mounting medium (aqueous or organic-solvent-based) and coverslips

General laboratory reagents for deparaffinization of paraffin-embedded tissue sections

Refer to our *General Instructions for Immunohistochemical Staining* (PD00730).

## C. Optional reagents

**K8004**  
DM828

EnVision FLEX  
TARGET RETRIEVAL SOLUTION  
HIGH pH (50x)

### EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x)

3 x 30 mL, 50x concentrated  
Tris/EDTA buffer, pH 9

**K8005**  
DM829

EnVision FLEX  
TARGET RETRIEVAL SOLUTION  
LOW pH (50x)

### EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x)

3 x 30 mL, 50x concentrated  
Citrate buffer, pH 6.1

**K8006**  
DM830

EnVision FLEX  
ANTIBODY DILUENT

### EnVision FLEX Antibody Diluent

120 mL, ready-to-use  
Tris buffer, pH 7.2, containing 15 mmol/L NaN<sub>3</sub>, and protein.

**K8007**  
DM831

EnVision FLEX  
WASH BUFFER (20x)

### EnVision FLEX Wash Buffer (20x)

1 L, 20x concentrated  
Tris-buffered saline solution containing Tween 20, pH 7.6 (±0.1).

**K8008**  
SM806

EnVision FLEX  
HEMATOXYLIN

### EnVision FLEX Hematoxylin

3 x 45 mL, ready-to-use  
Aqueous solution of hematoxylin.

**K8009**  
SM805

**EnVision FLEX+  
RABBIT (LINKER)**

**EnVision FLEX+ Rabbit (LINKER)**

40 mL, ready-to-use

Buffered solution containing stabilizing protein and an antimicrobial agent.

Contains reagent sufficient for 130-200 tests based on the use of 200-300 µL per test.

**K8021**  
SM804

**EnVision FLEX+  
MOUSE (LINKER)**

**EnVision FLEX+ Mouse (LINKER)**

40 mL, ready-to-use

Buffered solution containing stabilizing protein and an antimicrobial agent.

Contains reagent sufficient for 130-200 tests based on the use of 200-300 µL per test.

## Precautions

1. For in vitro diagnostic use.
2. For professional users.
3. For prescription use only (Rx Only).
4. EnVision FLEX /HRP and EnVision FLEX+ Mouse (LINKER) contain material of animal origin and it cannot be excluded that trace amounts of human material could be present due to manufacturing procedures. As with any product derived from biological sources, proper handling should be used in accordance with local requirements.
5. Do not expose EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent, EnVision FLEX /HRP, EnVision FLEX Substrate Buffer, EnVision FLEX DAB+ Chromogen or EnVision FLEX Substrate Working Solution to strong light.
6. Safety data sheets are available on [www.agilent.com](http://www.agilent.com) or on request.
7. EnVision FLEX Substrate Buffer contains an endocrine disruptor impacting the environment: Unused solution and waste generated containing traces of hazardous substance should be disposed of in accordance with all local, regional, national, and international regulations.
8. Other vials: Unused solution should be disposed of in accordance with all local, regional, national and international regulations.
9. EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) is labeled:



**Warning**

H319

P280

P305 + P351 + P338

P337 + P313

Causes serious eye irritation.

Wear eye or face protection.

IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

If eye irritation persists: Get medical advice or attention.

10. EnVision FLEX Wash Buffer (20x) is labeled:



**Warning**

H319

P280

P305 + P351 + P338

Causes serious eye irritation.

Wear eye or face protection.

IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

P337 + P313

If eye irritation persists: Get medical advice or attention.

11. EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent and EnVision FLEX /HRP are labeled: Safety data sheet available on request.

12. EnVision FLEX Substrate Buffer is labeled:



**Danger**

Contains - imidazole

H360D

May damage the unborn child.

P201

Obtain special instructions before use.

P280

Wear protective gloves, protective clothing and eye or face protection.

P308 + P313

IF exposed or concerned: Get medical advice or attention.

P501

Dispose of contents and containers in accordance with all local, regional, national and international regulations.

13. EnVision FLEX DAB+ Chromogen is labeled:



**Danger**

Contains 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride

H341

Suspected of causing genetic defects.

H350

May cause cancer.

P201

Obtain special instructions before use.

P280

Wear protective gloves, protective clothing and eye or face protection.

P308 + P313

IF exposed or concerned: Get medical advice or attention.

P501

Dispose of contents and container in accordance with all local, regional, national and international regulations.

14. EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent and EnVision FLEX+ Mouse (LINKER), contain sodium azide ( $\text{NaN}_3$ ), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing.

15. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.

16. Contact Agilent Pathology Support via [www.agilent.com](http://www.agilent.com) to report any unusual staining. Any serious incident that has occurred in relation to the device shall be reported to the manufacturer and the competent authority of the country in which the user and/or the patient is established.

As a general rule, persons under 18 years of age are not allowed to work with this product. Users must be carefully instructed in the proper work procedure, the dangerous properties of the product and the necessary safety instructions. Please refer to the Safety Data Sheet (SDS) for additional information.

## Storage

Store EnVision FLEX and EnVision FLEX+ reagents at 2–8 °C.

Store EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent, EnVision FLEX /HRP and EnVision FLEX Substrate Buffer in the dark at 2–8 °C.

Do not use after expiration date stamped on the vials. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user. When not in use on Autostainer Link instruments the cap should be closed. The prepared Substrate Working Solution should be stored in the dark at 2–8 °C and used within 5 days.



There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously using the same protocol as the patient specimens, preferably on the same slide. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the product is suspected, contact Agilent Pathology Support.

## Reagent Preparation

### A.1 EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (DM828, Code K8004)

Dilute a sufficient quantity of EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) 1:50 using distilled or de-ionized water for the staining procedure that is planned. If PT Link is used for pre-treatment, dilution can be performed by emptying the content of the Target Retrieval Solution (50x) vial into the PT Link tank and adding distilled or de-ionized water to the marked line (Fill Line). Unused diluted solution may be stored at 2–8 °C for 1 month. Discard solution if cloudy in appearance. When used in PT Link for 3-in-1 specimen preparation procedure, the diluted solution can be used three times within a 5 day period if stored at room temperature (20–25 °C).

### A.2 EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (DM829, Code K8005)

Dilute a sufficient quantity of EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) 1:50 using distilled or de-ionized water for the staining procedure that is planned. If PT Link is used for pre-treatment, dilution can be performed by emptying the content of the Target Retrieval Solution (50x) vial into the PT Link tank and adding distilled or de-ionized water to the marked line (Fill Line). Unused diluted solution may be stored at 2–8 °C for 1 month. Discard solution if cloudy in appearance. When used in PT Link for 3-in-1 specimen preparation procedure, the diluted solution can be used three times within a 5 day period if stored at room temperature.

### A.3 EnVision FLEX Wash Buffer (20x) (DM831, Code K8007)

Dilute a sufficient quantity of EnVision FLEX Wash Buffer (20x) 1:20 using distilled or de-ionized water for the staining procedure that is planned. Dilute by adding the concentrated Wash Buffer to a pre-measured quantity of distilled or de-ionized water to minimize foaming. Stir gently until the diluted solution appears homogenous. Unused diluted solution may be stored at 2–8 °C for 1 month. Discard solution if cloudy in appearance. When used in PT Link Rinse Station for wash step after the 3-in-1 specimen preparation procedure, the diluted solution can be used three times within a 5 day period if stored at room temperature.

### A.4 EnVision FLEX Substrate Working Solution

The DAB-containing EnVision FLEX Substrate Working Solution is prepared by mixing it thoroughly with one drop EnVision FLEX DAB+ Chromogen (DM827) per 1 mL EnVision FLEX Substrate Buffer (SM803). Use EnVision FLEX Substrate Working Solution within 5 days (store in the dark at 2–8 °C).

## Specimen Collection and Preparation

The specimens may be formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections.

Fixation time is dependent on fixative and tissue type/thickness. For example, tissue blocks with a thickness of 3–4 mm should be fixed in neutral-buffered formalin for 18–24 hours.

The optimal thickness of paraffin-embedded sections is approximately 4 µm.

After sectioning, tissues should be mounted on FLEX IHC Microscope Slides (Code K8020) or SuperFrost Plus microscope slides and then placed in a 58 ± 2 °C calibrated oven for 1 hour. For greater adherence of tissue sections to glass slides, the use of FLEX IHC Microscope Slides (Code K8020) is recommended.

The sections should be mounted on the slides as flat and wrinkle-free as possible. Wrinkles will have a negative impact on the staining results.

**NOTE:** The microscope slides must have a width suitable for the Autostainer Link instrument. Please refer to the User Guide for the individual Agilent instrument for definition of usable microscope slides.

## Procedure

Before running protocols on your Autostainer Link instrument, please read carefully the User Guide **for the dedicated Agilent instrument**. Please refer to the PT Link User Guide for instructions on how to use PT Link.

In order to ascertain reproducible epitope retrieval, it is recommended always to load the slide holder fully with slides. This ensures an identical heating of sections in every run.

### A. Pre-treatment procedure

#### *Recommended 3-in-1 specimen preparation procedure using PT Link:*

Deparaffinization, rehydration and heat-induced epitope retrieval (HIER) can be performed on formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections using the 3-in-1 procedure:

1. Prepare a working solution by diluting the EnVision FLEX Target Retrieval Solution (50x) concentrate 1:50 in distilled or de-ionized water.
2. Fill PT Link tanks with sufficient quantity (1.5 L) of working solution to cover the tissue sections.
3. Set PT Link to pre-heat the solution to 65 °C.
4. Immerse the mounted, formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections into the pre-heated EnVision FLEX Target Retrieval Solution (working solution) in PT Link tanks and incubate for 20–40 minutes at 97 °C. The optimal incubation time should be determined by the user.
5. Leave the sections to cool in PT Link to 65 °C.
6. Remove each Autostainer slide rack with the slides from the PT Link tank and immediately dip slides into a jar/tank (e.g., PT Link Rinse Station, Code PT109) with diluted, room temperature EnVision FLEX Wash Buffer (20x).
7. Leave slides in the diluted, room temperature EnVision FLEX Wash Buffer (20x) for 1–5 minutes.
8. Place slides on an Autostainer Link instrument and proceed with staining. The sections should not dry out during the treatment or during the immunohistochemical staining procedure.
9. After staining it is recommended to perform dehydration, clearing and permanent mounting.

**NOTE:** When used in PT Link for 3-in-1 specimen preparation procedure, the diluted Target Retrieval Solution and diluted Wash Buffer can be used three times within a 5 day period if stored at room temperature.

#### *HIER procedure using PT Link:*

After deparaffinization and hydration to buffer (water), the tissue sections should be subjected to heat-induced epitope retrieval (HIER):

1. Prepare a working solution by diluting the EnVision FLEX Target Retrieval Solution (50x) concentrate 1:50 in distilled or de-ionized water.
2. Fill PT Link tanks with sufficient quantity (1.5 L) of working solution to cover the tissue sections.
3. Set PT Link to pre-heat the solution to 65 °C.
4. Manually deparaffinize and rehydrate tissue sections mounted on glass slides. For better adhesion of tissue to slide, use of coated or silanized slides is recommended.
5. Immerse room temperature tissue sections into the pre-heated EnVision FLEX Target Retrieval Solution (working solution), and incubate for 20–40 minutes at 97 °C. The optimal incubation time should be determined by the user.
6. Leave the sections to cool in PT Link to 65 °C.
7. Remove each slide rack from PT Link tank and immediately dip slides into a jar/tank (e.g. PT Link Rinse Station, Code PT109) with diluted, room temperature EnVision FLEX Wash Buffer (20x).
8. Leave slides in the diluted, room temperature EnVision FLEX Wash Buffer (20x) for 1–5 minutes.
9. Place slides on an Autostainer Link instrument and proceed with staining. The sections should not dry out during the treatment or during the immunohistochemical staining procedure.
10. After staining the slides should be mounted using aqueous or permanent mounting medium.

**NOTE:** When used in PT Link for HIER procedure, the diluted Target Retrieval Solution and diluted Wash Buffer can be used three times within a 5 day period if stored at room temperature.

*HIER procedure using Coplin jars:*

After deparaffinization and hydration to buffer (water), the tissue sections should be subjected to heat-induced epitope retrieval (HIER):

1. Place staining jars containing diluted EnVision FLEX Target Retrieval Solution (50x) in water bath.
2. Heat water bath and jars filled with EnVision FLEX Target Retrieval Solution (working solution) to 95–99 °C. Cover jars with lids to stabilize the temperature and avoid evaporation.
3. Immerse the room temperature sections in the preheated EnVision FLEX Target Retrieval Solution (working solution) in the staining jars.
4. Bring temperature of the water bath and EnVision FLEX Target Retrieval Solution back to 95–99 °C. Incubate for 20 (±1) minutes at 95–99 °C.
5. Remove the entire jar with slides from the water bath. Allow slides to cool in the EnVision FLEX Target Retrieval Solution for 20 (±1) minutes at room temperature.
6. Decant the EnVision FLEX Target Retrieval Solution and rinse sections with diluted, room temperature EnVision FLEX Wash Buffer (20x) for 1–5 minutes.
7. Place the rack with rinsed sections on an Autostainer Link instrument. Immediately begin the pre-programmed staining run.

**NOTE:** When used in Coplin jars HIER procedure, the diluted Target Retrieval Solution and diluted Wash Buffer can be used only one time (single use).

A few epitopes do not tolerate the HIER and some require enzymatic pre-treatment. Please refer to the Instructions for Use for the individual primary antibody.

The tissue sections should not dry out during the treatment or during the following immunohistochemical staining procedure. For greater adherence of tissue sections to glass slides, the use of FLEX IHC Microscope Slides (Code K8020) is recommended.

## **B. Staining procedure**

FLEX Ready-to-Use primary antibodies can be used with EnVision FLEX+ visualization system, applied on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections.

A dilution guideline for concentrated primary antibodies is provided in the Instructions for Use of the concentrated primary antibody from Agilent.

The staining steps and recommended incubation times are pre-programmed into the Autostainer Link software as the following visualization system protocols:

FLEX and FLEX 2x5 DAB (FLEX protocols)

FLEX+ Mouse and FLEX+ Mouse 2x5 DAB (FLEX+ Mouse (LINKER) protocols)

FLEX+ Rabbit and FLEX+ Rabbit 2x5 DAB (FLEX+ Rabbit (LINKER) protocols)

The recommended reagent application volume is 1 x 200 µL or 2 x 150 µL per slide. If the protocols are not available on the used Autostainer Link instrument, please contact Agilent Pathology Support.

Optimal incubation times of primary antibody and EnVision FLEX /HRP are dependent on the applied primary antibody. Please refer to the Instructions for Use for the individual primary antibody. The user must verify the applied protocol.

When the staining procedure is completed, the specimens must be mounted. It is recommended to perform dehydration, clearing and permanent mounting when slides have been treated with the 3-in-1 specimen preparation procedure. Slides treated with HIER procedure can be mounted using aqueous or permanent mounting medium. For aqueous mounting, mounting media such as Glycergel Mounting Medium (Code C0563), or Faramount Aqueous Mounting Medium (Code S3025) is recommended. Do not allow sections to dry prior to mounting.

## Quality Control

Each staining run should include a known positive control specimen to ascertain a proper performance of all the applied reagents. If the positive control specimen fails to demonstrate positive staining, labeling of test specimens should be considered invalid.

A negative control reagent should be used with each specimen to identify any nonspecific staining. If nonspecific staining cannot be clearly differentiated from the specific staining, the labeling of the test specimen should be considered invalid.

Positive and negative control tissue as well as negative control reagent should be run simultaneously using the same protocol as the patient specimens, preferably on the same slide, to ensure the validity of the staining procedure, including reagents, tissue processing and instrument.

## Staining Evaluation

The diaminobenzidine-containing Substrate Working Solution gives a brown color at the site of the target antigen recognized by the primary antibody. The brown color should be present on the positive control specimen at the expected localization of the target antigen. If nonspecific staining is present, this will be recognized as a rather diffuse, brown staining on the slides treated with the negative control reagent. Nuclei will be stained blue by the hematoxylin counterstain.

## Cross-reactivity of Secondary Antibodies

The goat anti-mouse antibody used in the EnVision FLEX/HRP visualization reagent reacts with all mouse IgG subclasses, mouse IgA and mouse IgM. Cross-reactions as determined by ELISA for the unconjugated antibody: Human, cow and rabbit immunoglobulins, less than 1%. Fetal calf serum, less than 0.1%. Cross-reactions with other immunoglobulins are typically: Guinea pig, about 8%; swine, about 4%; and rat, about 30%. The cross-reaction with human serum is typically below 0.1%.

The goat anti-rabbit antibody used in the EnVision FLEX/HRP visualization reagent reacts with rabbit immunoglobulins of all classes. Cross-reactions as determined by ELISA for the unconjugated antibody: Human, rat and mouse immunoglobulins, less than 1%. Bovine immunoglobulins and fetal calf serum, less than 0.1%. Cross-reactions with other immunoglobulins are typically: Guinea pig, about 10% and swine, about 1%. The cross-reaction with human serum is typically below 0.1%.

## Limitations

1. For automated use on Autostainer Link instruments only. The product has not been validated for use in manual staining procedures.
2. For use on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections only. The product has not been validated for use with frozen sections or cell smears.
3. Changes in the procedure may have impact on the number of tests provided with the kit.

## FRANÇAIS

### Utilisation prévue

Pour utilisation en diagnostic in vitro.

Le système de visualisation EnVision FLEX+ est destiné à une utilisation automatisée en laboratoire pour l'immunohistochimie qualitative ou semi-quantitative avec les instruments Autostainer Link. Le système est conçu pour la détection des anticorps primaires de souris et de lapin dans des coupes de tissus fixées au formol et incluses en paraffine (FFPE). La présence de complexes anticorps/antigène formés dans les tissus FFPE est visualisée par le EnVision FLEX DAB+ Chromogen. Utilisé avec le produit EnVision FLEX+ Mouse (LINKER) (réf. K8021) ou le produit EnVision FLEX+ Rabbit (LINKER)

(réf. K8009), une amplification du signal des anticorps primaires de souris ou de lapin, respectivement, peut être obtenue.

## Résumé et explication

Le système de visualisation EnVision FLEX+ a été conçu pour être un système flexible de visualisation des complexes anticorps/antigènes. Il fournit une coloration optimale sur les appareils Autostainer Link, lors de l'utilisation du protocole de coloration recommandé dans ces instructions d'utilisation. En règle générale, le produit EnVision FLEX+ Mouse (réf. K8002) fournit une amplification du signal de **4 à 5 fois** et le produit EnVision FLEX+ Rabbit (réf. K8009, en option) fournit une amplification du signal de **2 à 3 fois**.

Avant de procéder à la coloration, les coupes de tissus fixées au formol et incluses en paraffine doivent être soumises à un déparaffinage et à une réhydratation, puis à une procédure de restauration d'épitope induite par la chaleur (HIER) à l'aide de la méthode de restauration des cibles indiquée dans les instructions d'utilisation de l'anticorps primaire. Pour la procédure de préparation des échantillons 3 en 1, consulter aussi la section Procédure. La référence K8002 inclut le produit EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x). Il est également possible d'utiliser les solutions EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (réf. K8004) ou EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (réf. K8005). Certains anticorps primaires nécessitent un prétraitement enzymatique du tissu pour une coloration optimale au lieu d'une procédure HIER.

La peroxydase endogène doit être bloquée à l'aide du réactif EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (SM801) inclus dans le kit. En raison d'une procédure de lavage efficace et de la présence de protéines stabilisantes dans les réactifs, des étapes de blocage supplémentaires ne sont pas nécessaires pour réduire la coloration du bruit de fond non spécifique.

Il est recommandé d'utiliser le tampon de lavage EnVision FLEX Wash Buffer (20x) (DM831) inclus dans le kit ou disponible comme réactif en option (réf. K8007).

Les anticorps primaires ne sont pas fournis dans le kit. L'utilisation des anticorps primaires FLEX Ready-to-Use ou des anticorps primaires concentrés Agilent est recommandée. Le diluant EnVision FLEX Antibody Diluent (réf. K8006) est recommandé pour la dilution des anticorps primaires concentrés.

Le produit EnVision FLEX+ Mouse (LINKER) (DM824) inclus dans le kit ou disponible comme réactif en option (réf. K8021) peut être remplacé par le produit EnVision FLEX+ Rabbit (LINKER) (réf. K8009) lorsque des anticorps primaires de lapin sont utilisés. Les produits EnVision FLEX+ Mouse (LINKER) et EnVision FLEX+ Rabbit (LINKER) peuvent être appliqués pour obtenir une amplification du signal des anticorps primaires de souris et de lapin (respectivement). Le produit EnVision FLEX+ Mouse (LINKER) fournit une amplification du signal de 4 à 5 fois et le produit EnVision FLEX+ Rabbit (LINKER) fournit une amplification du signal de 2 à 3 fois.

Le réactif de visualisation EnVision FLEX /HRP (SM802) du kit se compose d'une chaîne de dextrane sur laquelle un grand nombre de molécules de peroxydase (HRP) et de molécules d'anticorps secondaires ont été couplées. Une seule réaction chimique est utilisée pour la réaction de couplage, ce qui permet la liaison de 100 molécules de HRP maximum et de 20 molécules d'anticorps maximum par chaîne.

Le système du substrat contenu dans le kit est formé de deux composants : le produit EnVision FLEX DAB+ Chromogen (DM827), une solution de diaminobenzidine (DAB) concentrée, et le tampon EnVision FLEX Substrate Buffer (SM803) contenant du peroxyde d'hydrogène. Avant utilisation, le produit EnVision FLEX DAB+ Chromogen doit être dilué dans le tampon EnVision FLEX Substrate Buffer. Le système du substrat forme un produit brun vif sur le site de l'antigène cible.

L'hématoxyline EnVision FLEX Hematoxylin (réf. K8008) est recommandée pour la contre-coloration. Le réactif provoque une coloration nucléaire bleu clair.

Les coupes de tissus colorés peuvent être montées soit avec un milieu de montage aqueux, soit avec un milieu de montage organique à base de solvant.

Consulter notre document *General Instructions for Immunohistochemical Staining* (PD00730) (Instructions générales de coloration immunohistochimique) : Principe de la procédure, Matériel requis mais non fourni, Conservation, Préparation des échantillons, Procédure de coloration, Contrôle qualité,

Évaluation de la coloration, Substances interférentes, Limites générales, Dépannage. Disponible sur le site [agilent.com/library/eifu](http://agilent.com/library/eifu).

## Réactifs

### A. Matériel fourni

SM801

**EnVision FLEX  
PEROXIDASE-BLOCKING  
REAGENT**

#### **EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent**

3 x 40 mL, prêt à l'emploi

Tampon phosphate contenant du peroxyde d'hydrogène, 15 mmol/L de  $\text{NaN}_3$  et du détergent.

SM802

**EnVision FLEX  
/HRP**

#### **EnVision FLEX /HRP**

3 x 40 mL, prêt à l'emploi

Dextrane couplé à des molécules de peroxydase et à des molécules d'anticorps secondaires de chèvre dirigés contre les immunoglobulines de souris et de lapin. Dans une solution tamponnée contenant une protéine stabilisante et un agent conservateur.

DM827

**EnVision FLEX  
DAB+ CHROMOGEN**

#### **EnVision FLEX DAB+ Chromogen**

3 x 3 mL

Tétrahydrochlorure de 3,3'-diaminobenzidine dans un solvant organique.

La couleur de ce réactif peut varier de violet foncé à incolore, sans que cela ait une quelconque influence sur la performance du kit.

SM803

**EnVision FLEX  
SUBSTRATE BUFFER**

#### **EnVision FLEX Substrate Buffer**

12 x 20 mL

Solution tamponnée contenant du peroxyde d'hydrogène et un agent conservateur.

DM828

**EnVision FLEX  
TARGET RETRIEVAL SOLUTION,  
HIGH pH (50x)**

#### **EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x)**

9 x 30 mL, concentré 50x

Tampon Tris/EDTA, pH 9

DM831

**EnVision FLEX  
WASH BUFFER (20x)**

#### **EnVision FLEX Wash Buffer (20x)**

4 x 1 L, concentré 20x

Solution saline de tampon Tris contenant du Tween 20, pH 7,6 ( $\pm 0,1$ ).

SM804

**EnVision FLEX+  
MOUSE (LINKER)**

#### **EnVision FLEX+, Mouse (LINKER)**

3 x 40 mL, prêt à l'emploi

Solution tampon contenant des protéines stabilisantes et un agent antimicrobien.

Des composants de kit provenant de différents kits EnVision FLEX (Link) et portant des numéros de lot différents peuvent être utilisés ensemble.

## B. Matériels requis mais non fournis

Diluant d'anticorps, voir les instructions d'utilisation pour les anticorps primaires concentrés

Instrument Autostainer [Link](#)

Ustensiles d'appareillage Autostainer [Link](#)

Eau distillée/déionisée (eau de qualité réactif)

Anticorps primaires FLEX Ready-to-Use ou anticorps primaires de lapin ou de souris concentrés dilués de façon appropriée obtenus auprès d'Agilent.

FLEX Ready-to-Use Rabbit ou Mouse Universal Negative Control (réf. IR600/IR750) ou réactif de contrôle négatif approprié pour l'anticorps primaire

Protéinase K, Ready-to-Use (si nécessaire) (réf. S3020)

PT [Link](#) et accessoires

Lames de microscope : Lames de contrôle FLEX IHC Microscope Slides (réf. K8020) ou lames SuperFrost Plus

Milieu de montage (aqueux ou organique à base de solvant) et lamelles de protection

Réactifs généraux de laboratoire pour le déparaffinage des coupes de tissus incluses en paraffine

Consulter le document *General Instructions for Immunohistochemical Staining* (Instructions générales de coloration immunohistochimique) (PD00730).

## C. Réactifs en option

**K8004**  
DM828

EnVision FLEX  
TARGET RETRIEVAL SOLUTION  
HIGH pH (50x)

**EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x)**

3 x 30 mL, concentré 50x

Tampon Tris/EDTA, pH 9

**K8005**  
DM829

EnVision FLEX  
TARGET RETRIEVAL SOLUTION  
LOW pH (50x)

**EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x)**

3 x 30 mL, concentré 50x

Tampon citrate, pH 6,1

**K8006**  
DM830

EnVision FLEX  
ANTIBODY DILUENT

**EnVision FLEX Antibody Diluent**

120 mL, prêt à l'emploi

Tampon Tris, pH 7,2, contenant 15 mmol/L de NaN<sub>3</sub> et des protéines.

**K8007**  
DM831

EnVision FLEX  
WASH BUFFER (20x)

**EnVision FLEX Wash Buffer (20x)**

1 L, concentré 20x

Solution saline de tampon Tris contenant du Tween 20, pH 7,6 (± 0,1).

**K8008**  
SM806

EnVision FLEX  
HEMATOXYLIN

**EnVision FLEX Hematoxylin**

3 x 45 mL, prêt à l'emploi

Solution aqueuse d'hématoxyline.

**K8009**  
SM805

**EnVision FLEX+  
RABBIT (LINKER)**

**EnVision FLEX+ Rabbit (LINKER)**

40 mL, prêt à l'emploi

Solution tampon contenant des protéines stabilisantes et un agent antimicrobien.  
Contient suffisamment de réactif pour 130 à 200 tests, sur la base de 200 µL à 300 µL par test.

**K8021**  
SM804

**EnVision FLEX+  
MOUSE (LINKER)**

**EnVision FLEX+ Mouse (LINKER)**

40 mL, prêt à l'emploi

Solution tampon contenant des protéines stabilisantes et un agent antimicrobien.  
Contient suffisamment de réactif pour 130 à 200 tests, sur la base de 200 µL à 300 µL par test.

## Précautions d'emploi

1. Pour utilisation diagnostique in vitro.
2. Pour utilisateurs professionnels.
3. Sur prescription uniquement (Rx Only).
4. Les produits EnVision FLEX /HRP et EnVision FLEX+ Mouse (LINKER) contiennent des substances d'origine animale et on ne peut exclure le fait que des quantités infimes de substances humaines puissent être présentes en raison des procédures de fabrication. Comme avec tout produit d'origine biologique, une manipulation appropriée doit être respectée conformément aux exigences locales.
5. Ne pas exposer les produits EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent, EnVision FLEX /HRP, EnVision FLEX Substrate Buffer, EnVision FLEX DAB+ Chromogen ou EnVision FLEX Substrate Working Solution à une lumière intense.
6. Les fiches de données de sécurité sont disponibles sur le site [www.agilent.com](http://www.agilent.com) ou sur demande.
7. Le produit EnVision FLEX Substrate Buffer contient un perturbateur endocrinien ayant un impact sur l'environnement : Toute solution non utilisée et les déchets générés contenant des traces de substances dangereuses doivent être éliminés conformément à toutes les réglementations locales, régionales, nationales et internationales.
8. Autres flacons : La solution non utilisée doit être éliminée conformément à toutes les réglementations locales, régionales, nationales et internationales.
9. Le produit EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) porte les mentions suivantes :



### Avertissement

H319

P280

P305 + P351 + P338

Provoque une sévère irritation des yeux.

Porter un équipement de protection du visage ou des yeux.

**EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX :** Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.

P337 + P313

Si l'irritation des yeux persiste : Consulter un médecin.

10. Le tampon de lavage EnVision FLEX Wash Buffer (20x) porte les mentions suivantes :



### Avertissement

H319

Provoque une sévère irritation des yeux.



P280 P305 + P351 + P338	Porter un équipement de protection du visage ou des yeux. <b>EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX</b> : Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.
P337 + P313	Si l'irritation des yeux persiste : Consulter un médecin.

11. Les produits EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent et EnVision FLEX /HRP portent la mention suivante : Fiche de données de sécurité disponible sur demande.

12. Le produit EnVision FLEX Substrate Buffer porte les mentions suivantes :



**Danger**

Contient de l'imidazole

H360D	Peut nuire au fœtus.
P201	Se procurer les instructions avant utilisation.
P280	Porter des gants de protection, des vêtements de protection et/ou un équipement de protection des yeux et du visage.
P308 + P313	En cas d'exposition prouvée ou suspectée : Consulter un médecin.
P501	Éliminer le contenu et le récipient conformément à toutes les réglementations locales, régionales, nationales et internationales.

13. Le produit EnVision FLEX DAB+ Chromogen porte les mentions suivantes :



**Danger**

Contient du tétrachlorhydrate de 3,3'-diaminobenzidine

H341	Susceptible d'induire des anomalies génétiques.
H350	Peut provoquer le cancer.
P201	Se procurer les instructions avant utilisation.
P280	Porter des gants de protection, des vêtements de protection et/ou un équipement de protection des yeux et du visage.
P308 + P313	En cas d'exposition prouvée ou suspectée : Consulter un médecin.
P501	Éliminer le contenu et le récipient conformément à l'ensemble des réglementations locales, régionales, nationales et internationales.

14. Les produits EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent et EnVision FLEX+ Mouse (LINKER) contiennent de l'azide de sodium ( $\text{NaN}_3$ ), un produit chimique hautement toxique dans sa forme pure. Aux concentrations du produit, bien que non classé comme dangereux, l'azide de sodium peut réagir avec le cuivre et le plomb des canalisations et former des accumulations d'azides métalliques hautement explosives. Lors de l'élimination, rincer abondamment à l'eau pour éviter toute accumulation d'azide métallique dans les canalisations.

15. Porter un équipement de protection individuelle approprié pour éviter tout contact avec les yeux et la peau.

16. Contacter l'assistance Agilent relative aux problèmes pathologiques via le site [www.agilent.com](http://www.agilent.com) pour faire part de toute coloration inhabituelle. Tout incident grave survenu en relation avec le dispositif doit être signalé au fabricant et à l'autorité compétente du pays dans lequel l'utilisateur et/ou le patient sont établis.

En règle générale, les personnes âgées de moins de 18 ans ne sont pas autorisées à manipuler ce produit. Les utilisateurs doivent être formés aux procédures de travail adéquates, aux propriétés dangereuses du produit et aux instructions de sécurité nécessaires. Se reporter à la fiche de données de sécurité pour plus d'informations.

## Conservation

Conserver les réactifs EnVision FLEX et EnVision FLEX+ entre 2 et 8 °C.

Conserver les produits EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent, EnVision FLEX /HRP et EnVision FLEX Substrate Buffer à l'abri de la lumière entre 2 et 8 °C.

Ne pas utiliser après la date de péremption imprimée sur les flacons. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles indiquées, celles-ci doivent être validées par l'utilisateur. Lorsqu'il n'est pas utilisé sur les appareils Autostainer Link, le bouchon doit être fermé. La solution Substrate Working Solution doit être conservée à l'abri de la lumière entre 2 et 8 °C et utilisée dans les 5 jours suivant sa préparation.

Il n'existe pas de signe particulier pour indiquer l'instabilité de ce produit. Par conséquent, des contrôles positifs et négatifs doivent être effectués en même temps et à l'aide du même protocole que celui utilisé sur les échantillons de patient, de préférence sur la même lame. Si une coloration inattendue est observée, qui ne peut être expliquée par des variations de procédures de laboratoire, et en cas de suspicion d'un problème lié au produit, contacter l'assistance Agilent relative aux problèmes pathologiques.

## Préparation des réactifs

### A.1 EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (DM828, réf. K8004)

Diluer une quantité suffisante de produit EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) au 1/50e en utilisant de l'eau distillée ou déionisée pour la procédure de coloration prévue. Si l'appareil PT Link est utilisé pour effectuer un prétraitement, la dilution peut être réalisée en vidant le contenu du flacon de Target Retrieval Solution (50x) dans la cuve du PT Link et en ajoutant de l'eau distillée ou déionisée jusqu'au trait indiqué (ligne de remplissage). La solution diluée restante peut être conservée entre 2 °C et 8 °C pendant un mois. Jeter la solution si elle a un aspect trouble. En cas d'utilisation sur un appareil PT Link pour une procédure de préparation des échantillons 3 en 1, la solution diluée peut être utilisée trois fois sur une période de cinq jours si elle est conservée à température ambiante (entre 20 et 25 °C).

### A.2 EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (DM829, réf. K8005)

Diluer une quantité suffisante de produit EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) au 1/50e en utilisant de l'eau distillée ou déionisée pour la procédure de coloration prévue. Si l'appareil PT Link est utilisé pour effectuer un prétraitement, la dilution peut être réalisée en vidant le contenu du flacon de Target Retrieval Solution (50x) dans la cuve du PT Link et en ajoutant de l'eau distillée ou déionisée jusqu'au trait indiqué (ligne de remplissage). La solution diluée restante peut être conservée entre 2 °C et 8 °C pendant un mois. Jeter la solution si elle a un aspect trouble. Quand on l'utilise sur un appareil PT Link pour une procédure de préparation des échantillons 3 en 1, la solution diluée peut être réutilisée 3 fois sur une période de 5 jours si elle est conservée à température ambiante.

### A.3 EnVision FLEX Wash Buffer (20x) (DM831, réf. K8007)

Diluer une quantité suffisante du tampon de lavage EnVision FLEX Wash Buffer (20x) au 1/20e en utilisant de l'eau distillée ou déionisée pour la procédure de coloration prévue. Diluer en ajoutant le tampon de lavage concentré à une quantité pré-mesurée d'eau distillée ou déionisée afin de minimiser la formation de mousse. Mélanger doucement jusqu'à ce que la solution diluée apparaisse homogène. La solution diluée restante peut être conservée entre 2 °C et 8 °C pendant un mois. Jeter la solution si elle a un aspect trouble. En cas d'utilisation sur une station de rinçage PT Link Rinse Station pour l'étape de lavage après la procédure de préparation des échantillons 3 en 1, la solution diluée peut être utilisée trois fois sur une période de cinq jours si elle est conservée à température ambiante.

### A.4 EnVision FLEX Substrate Working Solution

La solution EnVision FLEX Substrate Working Solution contenant de la DAB est préparée en mélangeant vigoureusement une goutte de produit EnVision FLEX DAB+ Chromogen (DM827) par 1 mL de tampon EnVision FLEX Substrate Buffer (SM803). Utiliser le produit EnVision FLEX Substrate Working Solution dans les 5 jours (conserver à l'abri de la lumière entre 2 et 8 °C).

## Prélèvement et préparation des échantillons

Les échantillons peuvent être des coupes de tissus fixées au formol et incluses en paraffine.

Le temps de fixation dépend du fixateur et du type/de l'épaisseur du tissu. Par exemple, les blocs de tissu d'une épaisseur de 3 mm à 4 mm doivent être fixés au formol neutre tamponné pendant 18 heures à 24 heures.

L'épaisseur optimale des coupes incluses en paraffine est d'environ 4 µm.

Après la coupe, les tissus doivent être montés sur les lames FLEX IHC Microscope Slides (réf. K8020) ou SuperFrost Plus, puis placés dans un four calibré à  $58 \pm 2$  °C pendant une heure. Pour une meilleure adhérence des coupes de tissus aux lames de verre, il est recommandé d'utiliser les lames FLEX IHC Microscope Slides (réf. K8020).

Les coupes doivent être montées sur les lames, en restant aussi plates que possible et avec le moins de plis possible. Les plis auront un impact négatif sur les résultats de la coloration.

**REMARQUE :** Les lames de microscope doivent posséder une largeur adaptée à l'instrument Autostainer Link. Se reporter au Guide d'utilisation de chaque instrument Agilent pour la définition des lames de microscope utilisables.

## Procédure

Avant d'exécuter des protocoles sur votre instrument Autostainer Link, veuillez lire attentivement le Guide d'utilisation **spécifique à l'instrument Agilent utilisé**. Reportez-vous au Guide d'utilisation du PT Link pour obtenir des instructions sur l'utilisation du PT Link.

Pour assurer une restauration d'épitope reproductible, il est recommandé de toujours charger complètement le portoir à lames. Ceci assure un chauffage identique des coupes lors de chaque cycle.

### A. Procédure de prétraitement

*Procédure 3 en 1 recommandée pour la préparation des échantillons à l'aide du PT Link :*

Le déparaffinage, la réhydratation et la restauration d'épitope induite par la chaleur (HIER) peuvent être réalisés sur des coupes de tissus fixées au formol et incluses en paraffine en utilisant la procédure 3 en 1 :

1. Préparer une solution de travail en diluant le produit EnVision FLEX Target Retrieval Solution (50x) concentrée au 1/50e dans de l'eau distillée ou déionisée.
2. Remplir les cuves du PT Link avec une quantité de solution de travail suffisante (1,5 L) pour recouvrir les coupes de tissus.
3. Régler le PT Link afin de préchauffer la solution à 65 °C.
4. Immerger les coupes de tissus fixées au formol et incluses en paraffine montées dans le produit EnVision FLEX Target Retrieval Solution (solution de travail) préchauffée contenue dans les cuves du PT Link et incuber à 97 °C pendant 20 à 40 minutes. La durée optimale d'incubation doit être déterminée par l'utilisateur.
5. Laisser les coupes refroidir dans le PT Link jusqu'à 65 °C.
6. Retirer chaque portoir à lames Autostainer avec les lames de la cuve du PT Link et plonger immédiatement les lames dans un récipient/une cuve (par ex., PT Link Rinse Station, réf. PT109) contenant du tampon de lavage EnVision FLEX Wash Buffer (20x) dilué et à température ambiante.
7. Laisser les lames dans le tampon de lavage EnVision FLEX Wash Buffer (20x) dilué et à température ambiante pendant 1 à 5 minutes.
8. Placer les lames sur un instrument Autostainer Link et procéder à la coloration. Les coupes ne doivent pas sécher lors du traitement ou lors de la procédure de coloration immunohistochimique.
9. Après coloration, il est recommandé d'effectuer une déshydratation, une élimination des agents de déshydratation et un montage permanent.

**REMARQUE :** Lors d'une utilisation pour une procédure de préparation des échantillons 3 en 1 sur un appareil PT Link, le produit Target Retrieval Solution dilué ainsi que le tampon de lavage Wash

Buffer dilué peuvent être utilisés 3 fois sur une période de 5 jours à condition d'être conservés à température ambiante.

*Procédure HIER à l'aide du PT Link :*

Après un déparaffinage et une réhydratation dans un bain de tampon (eau), les coupes de tissus doivent être soumises à une restauration d'épitope induite par la chaleur (HIER) :

1. Préparer une solution de travail en diluant le produit EnVision FLEX Target Retrieval Solution (50x) concentrée au 1/50e dans de l'eau distillée ou déionisée.
2. Remplir les cuves du PT Link avec une quantité de solution de travail suffisante (1,5 L) pour recouvrir les coupes de tissus.
3. Régler le PT Link afin de préchauffer la solution à 65 °C.
4. Déparaffiner et réhydrater manuellement les coupes de tissus montées sur des lames de verre. Pour une meilleure adhérence du tissu sur la lame, il est recommandé d'utiliser des lames prétraitées ou silanisées.
5. Plonger les coupes de tissus à température ambiante dans le produit EnVision FLEX Target Retrieval Solution (solution de travail) préchauffée et incuber à 97 °C pendant 20 minutes à 40 minutes. La durée optimale d'incubation doit être déterminée par l'utilisateur.
6. Laisser les coupes refroidir dans le PT Link jusqu'à 65 °C.
7. Retirer chaque portoir à lames de la cuve du PT Link et plonger immédiatement les lames dans un récipient/une cuve (par ex. PT Link Rinse Station, réf. PT109) contenant du tampon de lavage EnVision FLEX Wash Buffer (20x) dilué et à température ambiante.
8. Laisser les lames dans le tampon de lavage EnVision FLEX Wash Buffer (20x) dilué et à température ambiante pendant 1 à 5 minutes.
9. Placer les lames sur un instrument Autostainer Link et procéder à la coloration. Les coupes ne doivent pas sécher lors du traitement ou lors de la procédure de coloration immunohistochimique.
10. Après coloration, un montage aqueux ou permanent des lames est recommandé.

**REMARQUE :** Lors d'une utilisation pour une procédure HIER sur un appareil PT Link, le produit Target Retrieval Solution dilué ainsi que le tampon de lavage Wash Buffer dilué peuvent être utilisés 3 fois sur une période de 5 jours à condition d'être conservés à température ambiante.

*Procédure HIER utilisant des jarres de Coplin :*

Après un déparaffinage et une réhydratation dans un bain de tampon (eau), les coupes de tissus doivent être soumises à une restauration d'épitope induite par la chaleur (HIER) :

1. Placer les récipients de coloration contenant le produit EnVision FLEX Target Retrieval Solution (50x) dilué dans un bain-marie.
2. Porter le bain-marie et les récipients remplis de produit EnVision FLEX Target Retrieval Solution (solution de travail) à 95-99 °C. Couvrir les cuves à l'aide de leur couvercle pour stabiliser la température et éviter l'évaporation.
3. Plonger les coupes se trouvant à température ambiante dans le produit EnVision FLEX Target Retrieval Solution (solution de travail) préchauffée contenue dans les récipients de coloration.
4. Rééquilibrer la température du bain-marie et du produit EnVision FLEX Target Retrieval Solution à 95-99 °C. Incuber pendant 20 minutes ( $\pm 1$  minute) entre 95 et 99 °C.
5. Retirer la cuve contenant les lames du bain-marie. Laisser les lames refroidir dans le produit EnVision FLEX Target Retrieval Solution pendant 20 minutes ( $\pm 1$  minute) à température ambiante.
6. Vider le produit EnVision FLEX Target Retrieval Solution et rincer les coupes à l'aide du produit EnVision FLEX Wash Buffer (20x) dilué et à température ambiante pendant 1 à 5 minutes.
7. Placer le portoir contenant les coupes rincées dans un instrument Autostainer Link. Lancer immédiatement le cycle de coloration préprogrammé.

**REMARQUE :** Lors d'une procédure HIER avec des jarres de Coplin, n'utiliser le produit Target Retrieval Solution et le tampon de lavage Wash Buffer dilués qu'une seule fois (usage unique).

Quelques épitopes ne tolèrent pas la procédure HIER et certains requièrent un prétraitement enzymatique. Veuillez vous reporter aux instructions d'utilisation pour l'anticorps primaire individuel.

Les coupes de tissus ne doivent pas sécher lors du traitement ni lors de la procédure de coloration immunohistochimique suivante. Pour une meilleure adhérence des coupes de tissu sur les lames de verre, il est recommandé d'utiliser les lames FLEX IHC Microscope Slides (réf. K8020).

## **B. Procédure de coloration**

Les anticorps primaires FLEX Ready-to-Use peuvent être utilisés avec le système de visualisation EnVision FLEX+, appliqué sur des coupes de tissus fixées au formol et incluses en paraffine.

Une directive de dilution pour les anticorps primaires concentrés est fournie dans les instructions d'utilisation de l'anticorps primaire concentré Agilent.

Les étapes de la coloration ainsi que les temps d'incubation recommandés sont préprogrammés dans le logiciel de l'Autostainer Link sous les protocoles des systèmes de visualisation suivants :

FLEX et FLEX 2x5 DAB (protocoles FLEX)

FLEX+ Mouse et FLEX+ Mouse 2x5 DAB (protocoles FLEX+ Mouse (LINKER))

FLEX+ Rabbit et FLEX+ Rabbit 2x5 DAB (protocoles FLEX+ Rabbit (LINKER))

Le volume de réactif recommandé devant être appliqué est de 1 x 200 µL ou 2 x 150 µL par lame. Si les protocoles ne sont pas disponibles sur l'appareil Autostainer Link utilisé, contacter l'assistance Agilent relative aux problèmes pathologiques.

Les temps d'incubation optimaux de l'anticorps primaire et du produit EnVision FLEX/HRP dépendent de l'anticorps primaire utilisé. Veuillez vous reporter aux instructions d'utilisation pour l'anticorps primaire individuel. L'utilisateur doit vérifier le protocole appliqué.

Une fois la procédure de coloration terminée, les échantillons doivent être montés. Il est recommandé de réaliser une déshydratation, un éclaircissement et un montage permanent quand les lames ont subi une procédure de préparation des échantillons 3 en 1. Pour les lames ayant subi une procédure HIER, elles peuvent être montées avec un milieu de montage aqueux ou permanent. Pour un montage aqueux, un milieu de montage de type Glycergel Mounting Medium (réf. C0563) ou Faramount Aqueous Mounting Medium (réf. S3025) est recommandé. Ne pas laisser sécher les coupes avant le montage.

## **Contrôle qualité**

Chaque cycle de coloration doit comprendre un échantillon de contrôle positif connu pour vérifier la bonne performance de tous les réactifs appliqués. Si l'échantillon de contrôle positif ne présente pas de coloration positive, le marquage des échantillons à analyser doit être considéré comme non valide.

Un réactif de contrôle négatif doit être utilisé avec chaque échantillon afin d'identifier toute coloration non spécifique. Si une coloration non spécifique ne peut pas être clairement différenciée de la coloration spécifique, le marquage de l'échantillon à analyser doit être considéré comme non valide.

Le tissu de contrôle positif et négatif ainsi que le réactif de contrôle négatif doivent être testés simultanément selon le même protocole que pour les échantillons de patient, de préférence sur la même lame, pour garantir la validité de la procédure de coloration, y compris des réactifs, du traitement du tissu et de l'appareil.

## **Évaluation de la coloration**

La solution de travail du substrat contenant de la diaminobenzidine produit une coloration brune sur le site de l'antigène cible reconnu par l'anticorps primaire. La couleur brune doit être présente sur l'échantillon de contrôle positif là où l'antigène cible est attendu. Si une coloration non spécifique est présente, elle sera reconnue comme une coloration brune diffuse sur les lames traitées avec le réactif de contrôle négatif. Les noyaux seront colorés en bleu par le contre-colorant à l'hématoxyline.

## Réactivité croisée des anticorps secondaires

L'anticorps de chèvre anti-souris utilisé dans le réactif de visualisation EnVision FLEX/HRP réagit avec toutes les sous-classes d'IgG de souris, les IgA de souris et les IgM de souris. Comme déterminé par ELISA, les réactions croisées pour l'anticorps non conjugué avec les immunoglobulines humaines, de vache et de lapin sont inférieures à 1%. Avec le sérum foetal de veau, elles sont inférieures à 0,1%. Les réactions croisées avec d'autres immunoglobulines représentent en général environ 8% chez le cobaye, 4% chez le porc et 30% chez le rat. La réaction croisée avec le sérum humain est généralement inférieure à 0,1%.

L'anticorps de chèvre anti-lapin utilisé dans le réactif de visualisation EnVision FLEX/HRP réagit avec toutes les classes d'immunoglobulines de lapin. Comme déterminé par ELISA, les réactions croisées pour l'anticorps non conjugué avec les immunoglobulines humaines, de rat et de souris sont inférieures à 1%. Les réactions croisées avec les immunoglobulines bovines et le sérum foetal de veau sont inférieures à 0,1%. Les réactions croisées avec d'autres immunoglobulines représentent en général environ 10% chez le cobaye et 1% chez le porc. La réaction croisée avec le sérum humain est généralement inférieure à 0,1%.

## Limites

1. Pour une utilisation automatisée sur les appareils Autostainer Link uniquement. Le produit n'a pas été validé pour une utilisation dans les procédures de coloration manuelles.
2. Réservé à une utilisation sur des coupes de tissus fixées au formol et incluses en paraffine uniquement. Le produit n'a pas été validé pour une utilisation avec des coupes congelées ou des frottis de cellules.
3. Des modifications apportées à la procédure peuvent avoir une influence sur le nombre de tests que le kit permet d'effectuer.

# DEUTSCH

## Verwendungszweck

Zur In-vitro-Diagnostik.

Das Detektionssystem EnVision FLEX+ ist für den automatisierten Laboreinsatz in der qualitativen oder semiquantitativen Immunhistochemie in Verbindung mit Autostainer Link Geräten bestimmt. Das System ist für den Nachweis von primären Maus- und Kaninchen-Antikörpern in formalinfixierten, paraffineingebetteten (FFPE-)Gewebeschnitten vorgesehen. Die gebildeten Antikörper-/Antigen-Komplexe im FFPE-Gewebe werden durch EnVision FLEX DAB+ Chromogen detektiert. Durch Verwendung von EnVision FLEX+ Mouse (LINKER) (Code-Nr. K8021) bzw. EnVision FLEX+ Rabbit (LINKER) (Code-Nr. K8009) können die Signale der primären Maus- bzw. Kaninchenantikörper verstärkt werden.

## Zusammenfassung und Erklärung

Das Detektionssystem EnVision FLEX+ wurde als flexibles System zur Detektion von Antikörper-/Antigen-Komplexen konzipiert. Bei Verwendung des in dieser Gebrauchsanweisung empfohlenen Protokolls sorgt es für eine optimale Färbung in Autostainer Link Geräten. Als Richtwert ergibt sich mit EnVision FLEX+ Mouse (Code-Nr. K8002) eine **4- bis 5-fache** Signalverstärkung und mit EnVision FLEX+ Rabbit (Code-Nr. K8009, optionales Reagenz) eine **2- bis 3-fache** Signalverstärkung.

Vor der Färbung müssen die formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitte einer Entparaffinierung und Rehydrierung, gefolgt von hitzeinduzierter Epitopdemaskierung (HIER) mit der in der Gebrauchsanweisung des primären Antikörpers angegebenen Demaskierungsmethode unterzogen werden. Lesen Sie dazu auch die 3-in-1-Probenvorbereitung im Abschnitt Verfahren. Code-Nr. K8002 enthält EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x). Alternativ kann EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code-Nr. K8004) oder EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Code-Nr. K8005) eingesetzt werden. Bei einigen primären Antikörpern sind die Färbeergebnisse besser, wenn anstelle des HIER-Verfahrens eine Gewebevorbereitung mit Enzymen vorgenommen wird.

Endogene Peroxidase sollte mit dem im Kit enthaltenen EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (SM801) blockiert werden. Das wirkungsvolle Waschverfahren und die in den Reagenzien vorhandenen Stabilisationsproteine machen weitere Blockierungsschritte zur Verminderung einer unspezifischen Hintergrundfärbung überflüssig.

Empfohlen wird der EnVision FLEX Wash Buffer (20x) (DM831), der im Kit enthalten oder auf Wunsch auch als optionales Reagenz einzeln (Code-Nr. K8007) erhältlich ist.

Primäre Antikörper gehören nicht zum Lieferumfang. Wir empfehlen gebrauchsfertige FLEX primäre Antikörper bzw. konzentrierte primäre Antikörper von Agilent. Zur Verdünnung von konzentrierten primären Antikörpern wird EnVision FLEX Antibody Diluent (Code-Nr. K8006) empfohlen.

Bei der Verwendung von primären Kaninchenantikörpern kann der im Kit enthaltene oder auch als optionales Reagenz zur Verfügung stehende EnVision FLEX+ Mouse (LINKER) (DM824) (Code-Nr. K8021) durch den EnVision FLEX+ Rabbit (LINKER) (Code-Nr. K8009) ersetzt werden. EnVision FLEX+ Mouse (LINKER) und EnVision FLEX+ Rabbit (LINKER) können wahlweise zur Verstärkung des Signals von primären Maus- bzw. Kaninchen-Antikörpern eingesetzt werden. Als Richtwert liefert EnVision FLEX+ Mouse (LINKER) vier- bis fünffache Signalverstärkung, EnVision FLEX+ Rabbit (LINKER) zwei- bis dreifache Signalverstärkung.

EnVision FLEX/HRP Detektionsreagenz (SM802) im Kit besteht aus einem Dextran-Backbone, an das zahlreiche Peroxidase (HRP)-Moleküle und Moleküle sekundärer Antikörper gekoppelt sind. Die Kupplungsreaktion besteht aus einer einzigartigen chemischen Reaktion, die es ermöglicht, pro Backbone bis zu 100 HRP-Moleküle und bis zu 20 Antikörper-Moleküle zu binden.

Das Substratsystem im Kit besteht aus zwei Komponenten: EnVision FLEX DAB+ Chromogen (DM827), einer konzentrierten Diaminobenzidinlösung (DAB-Lösung), und dem wasserstoffperoxidhaltigen EnVision FLEX Substrate Buffer (SM803). Vor der Anwendung muss EnVision FLEX DAB+ Chromogen mit EnVision FLEX Substrate Buffer verdünnt werden. Das Substratsystem führt zu einem kontrastreichen braunen Endprodukt am Ort des Zielantigens.

Zur Gegenfärbung wird EnVision FLEX Hematoxylin (Code-Nr. K8008) empfohlen. Dieses Reagenz ruft eine deutliche nukleare Blaufärbung hervor.

Zum Eindecken der gefärbten Gewebeschnitte eignen sich sowohl Eindeckmedien auf wässriger Basis als auch auf Basis organischer Lösungsmittel.

Folgende Angaben bitte den *Allgemeinen Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung* (General Instructions for Immunohistochemical Staining) (PD00730) entnehmen: Verfahrensprinzipien; erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien; Lagerung; Probenvorbereitung; Färbeverfahren; Qualitätskontrolle; Auswertung der Färbung; Störsubstanzen; allgemeine Beschränkungen; Fehlerbehandlung. Verfügbar unter [agilent.com/library/eifu](http://agilent.com/library/eifu).

## Reagenzien

### A. Mitgelieferte Materialien

SM801

EnVision FLEX  
PEROXIDASE-BLOCKING  
REAGENT

#### EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent

3 x 40 ml, gebrauchsfertig

Phosphatpuffer mit Wasserstoffperoxid, 15 mmol/l  $\text{NaN}_3$  und Detergens.

SM802

EnVision FLEX  
/HRP

#### EnVision FLEX/HRP

3 x 40 ml, gebrauchsfertig

Mit Peroxidasemolekülen und sekundären Ziegenantikörpermolekülen gegen Kaninchen- und Maus-Immunglobuline gekoppeltes Dextran. In gepufferter Lösung mit Stabilisatorprotein und Konservierungsmittel.

DM827

EnVision FLEX  
DAB+ CHROMOGEN

#### EnVision FLEX DAB+ Chromogen

3 x 3 ml

3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid in einem organischen Lösungsmittel. Farbschwankungen bei diesem Reagenz (kräftig violett bis farblos) haben keinerlei Einfluss auf die Leistung des Kits.

SM803

EnVision FLEX  
SUBSTRATE BUFFER

#### EnVision FLEX Substrate Buffer

12 x 20 ml

Gepufferte Lösung mit Wasserstoffperoxid und Konservierungsmittel.

DM828

EnVision FLEX  
TARGET RETRIEVAL SOLUTION,  
HIGH pH (50x)

#### EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x)

9 x 30 ml, 50fach konzentriert

Tris/EDTA-Puffer, pH 9

DM831

EnVision FLEX  
WASH BUFFER (20x)

#### EnVision FLEX Wash Buffer (20x)

4 x 1 L, 20fach konzentriert

Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20, pH 7,6 ( $\pm 0,1$ ).



SM804

**EnVision FLEX+  
MOUSE (LINKER)**

**EnVision FLEX+, Mouse (LINKER)**

3 x 40 ml, gebrauchsfertig

Gepufferte Lösung mit Stabilisatorprotein und einem antimikrobiellen Wirkstoff.

Kitkomponenten aus unterschiedlichen EnVision FLEX (Link) Kits und mit unterschiedlichen Chargennummern können zusammen verwendet werden.

**B. Erforderliches, aber nicht mitgeliefertes Material**

Antikörper-Verdünnungsmittel, siehe Gebrauchsanweisung für konzentrierte primäre Antikörper  
Autostainer Link Gerät

Zubehör für Autostainer Link Geräte

Destilliertes oder entionisiertes Wasser (Reagenzqualität)

Gebrauchsfertige FLEX primäre Antikörper oder entsprechend verdünnte konzentrierte primäre Kaninchen- bzw. Mausantikörper von Agilent

Gebrauchsfertige FLEX Rabbit oder Mouse Universal Negative Control (Code-Nr. IR600/IR750) oder ein anderes geeignetes Negativkontrollreagenz für den primären Antikörper

Proteinase K, Ready-to-Use (falls erforderlich) (Code-Nr. S3020)

PT Link und Zubehör

Mikroskop-Objektträger, z. B. FLEX IHC Microscope Slides (Code-Nr. K8020) oder SuperFrost Plus Objektträger

Eindeckmedium (wässrig oder auf Basis organischer Lösungsmittel) und Deckgläser

Für die Entparaffinierung bei paraffineingebetteten Gewebeschnitten gebräuchliche Laborreagenzien

Für folgende Angaben siehe *Allgemeinen Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung* (General Instructions for Immunohistochemical Staining) (PD00730).

**C. Optionale Reagenzien**

**K8004**  
DM828

**EnVision FLEX  
TARGET RETRIEVAL SOLUTION  
HIGH pH (50X)**

**EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x)**

3 x 30 ml, 50fach konzentriert

Tris/EDTA-Puffer, pH 9

**K8005**  
DM829

**EnVision FLEX  
TARGET RETRIEVAL SOLUTION  
LOW pH (50x)**

**EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x)**

3 x 30 ml, 50fach konzentriert

Zitratpuffer, pH 6,1

**K8006**  
DM830

**EnVision FLEX  
ANTIBODY DILUENT**

**EnVision FLEX Antibody Diluent**

120 ml, gebrauchsfertig

Tris-Puffer, pH 7,2, mit 15 mmol/l NaN<sub>3</sub> und Protein.

**K8007**  
DM831

**EnVision FLEX  
WASH BUFFER (20x)**

**EnVision FLEX Wash Buffer (20x)**

1 l, 20fach konzentriert

Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20, pH 7,6 (± 0,1).

**K8008**  
SM806

**EnVision FLEX  
HEMATOXYLIN**

**EnVision FLEX Hematoxylin**  
3 x 45 ml, gebrauchsfertig  
Wässrige Hämatoxylinlösung.

**K8009**  
SM805

**EnVision FLEX+  
RABBIT (LINKER)**

**EnVision FLEX+ Rabbit (LINKER)**  
40 ml, gebrauchsfertig  
Gepufferte Lösung mit Stabilisatorprotein und einem antimikrobiellen Wirkstoff.  
Ausreichend für 130-200 Tests bei Verwendung von 200-300 µl pro Test.

**K8021**  
SM804

**EnVision FLEX+  
MOUSE (LINKER)**

**EnVision FLEX+ Rabbit (LINKER)**  
40 ml, gebrauchsfertig  
Gepufferte Lösung mit Stabilisatorprotein und einem antimikrobiellen Wirkstoff.  
Ausreichend für 130-200 Tests bei Verwendung von 200-300 µl pro Test.

## Vorsichtsmaßnahmen

1. Zur In-vitro-Diagnostik.
2. Für Fachpersonal.
3. Verschreibungspflichtig (Rx Only).
4. EnVision FLEX/HRP und EnVision FLEX+ Mouse (LINKER) enthalten Material tierischen Ursprungs; es kann nicht ausgeschlossen werden, dass aufgrund der Herstellungsverfahren auch Spuren von Material menschlichen Ursprungs enthalten sind. Wie alle Produkte biologischen Ursprungs müssen auch diese gemäß den geltenden Bestimmungen gehandhabt werden.
5. EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent, EnVision FLEX/HRP, EnVision FLEX Substrate Buffer, EnVision FLEX DAB+ Chromogen und EnVision FLEX Substrate Working Solution keinem starken Lichteinfall aussetzen.
6. Sicherheitsdatenblätter sind auf [www.agilent.com](http://www.agilent.com) zu finden oder auf Anfrage erhältlich.
7. EnVision FLEX Substrate Buffer enthält einen endokrinen Disruptor, der die Umwelt belastet: Nicht verwendete Lösung und Abfälle, die Spuren gefährlicher Stoffe enthalten, müssen in Übereinstimmung mit allen örtlichen, regionalen, nationalen und internationalen Vorschriften entsorgt werden.
8. Andere Behälter: Nicht verwendete Lösung ist gemäß allen geltenden lokalen, regionalen, nationalen und internationalen Bestimmungen zu entsorgen.
9. EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) ist wie folgt gekennzeichnet:



### Achtung

H319

P280

P305 + P351 + P338

P337 + P313

Verursacht schwere Augenreizungen.

Augen- oder Gesichtsschutz tragen.

BEI AUGENKONTAKT: Vorsichtig mehrere Minuten lang mit Wasser spülen. Gegebenenfalls Kontaktlinsen herausnehmen. Spülung fortsetzen.

Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen bzw. ärztliche Hilfe hinzuziehen.

10. EnVision FLEX Wash Buffer (20x) ist wie folgt gekennzeichnet:



**Achtung**

H319	Verursacht schwere Augenreizungen.
P280	Augen- oder Gesichtsschutz tragen.
P305 + P351 + P338	BEI AUGENKONTAKT: Vorsichtig mehrere Minuten lang mit Wasser spülen. Gegebenenfalls Kontaktlinsen herausnehmen. Spülung fortsetzen.
P337 + P313	Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen bzw. ärztliche Hilfe hinzuziehen.

11. EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent und EnVision FLEX/HRP sind wie folgt gekennzeichnet: Das Sicherheitsdatenblatt ist auf Anfrage erhältlich.

12. EnVision FLEX Substrate Buffer ist wie folgt gekennzeichnet:



**Gefahr**

Enthält Imidazol	
H360D	Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
P201	Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
P280	Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
P308 + P313	Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P501	Inhalt und Behälter gemäß lokalen, regionalen, nationalen und internationalen Vorschriften der Entsorgung zuführen.

13. EnVision FLEX DAB+ Chromogen ist wie folgt gekennzeichnet:



**Gefahr**

Enthält 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid	
H341	Kann vermutlich genetische Defekte verursachen.
H350	Kann krebserregend wirken.
P201	Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
P280	Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
P308 + P313	Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P501	Inhalt und Behälter gemäß lokalen, regionalen, nationalen und internationalen Vorschriften der Entsorgung zuführen.

14. EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent und EnVision FLEX+ Mouse (LINKER) enthalten Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ), eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. Bei den in diesem Produkt verwendeten Konzentrationen kann Natriumazid, obwohl nicht als gefährlich klassifiziert, mit in Wasserleitungen vorhandenem Blei oder Kupfer reagieren und zur Bildung von hochexplosiven Metallazid-Anreicherungen führen. Nach der Entsorgung muss mit reichlich Wasser nachgespült werden, um Metallazid-Anreicherung zu vermeiden.

15. Geeignete persönliche Schutzausrüstung (PSA) tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.

16. Bei allen ungewöhnlichen Färbungen ist der Pathologie-Kundendienst von Agilent unter [www.agilent.com](http://www.agilent.com) zu verständigen. Jedes schwerwiegende Vorkommnis, das in Zusammenhang mit dem Produkt aufgetreten ist, ist dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Landes, in dem der Anwender und/oder der Patient ansässig ist, zu melden.

In der Regel ist es Personen unter 18 Jahren nicht gestattet, mit diesem Produkt zu arbeiten. Alle Anwender müssen sorgfältig in das richtige Arbeitsverfahren, die gefährlichen Eigenschaften des Produkts und die notwendigen Sicherheitsmaßnahmen eingewiesen werden. Zusätzliche Informationen bitte dem Sicherheitsdatenblatt (SDS) entnehmen.

## Lagerung

EnVision FLEX und EnVision FLEX+ Reagenzien bei 2-8 °C lagern.

EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent, EnVision FLEX/HRP und EnVision FLEX Substrate Buffer im Dunkeln bei 2-8 °C lagern.

Nach Ablauf des auf den Behältern aufgedruckten Verfallsdatums nicht mehr verwenden. Werden die Reagenzien unter anderen als den angegebenen Bedingungen aufbewahrt, müssen diese Bedingungen vom Benutzer überprüft werden. Wenn das Reagenz nicht auf einem Autostainer Link Gerät verwendet wird, ist der Deckel geschlossen zu halten. Die fertige Substrat-Arbeitslösung im Dunkeln bei 2-8 °C aufbewahren und innerhalb von 5 Tagen verbrauchen.

Es gibt keine offensichtlichen Anhaltspunkte für die mögliche Instabilität dieses Produkts. Daher sollten Positiv- und Negativkontrollen unter Anwendung desselben Protokolls gleichzeitig mit den Patientenproben mitgeführt werden, vorzugsweise auf demselben Objektträger. Falls es zu einer unerwarteten Färbung kommt, die sich nicht durch Unterschiede bei Laborverfahren erklären lässt und auf ein Problem mit dem Produkt hindeutet, ist der Pathologie-Kundendienst von Agilent zu verständigen.

## Vorbereitung der Reagenzien

### A.1 EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (DM828, Code-Nr. K8004)

Eine für das geplante Färbeverfahren ausreichende Menge EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) mit destilliertem oder entionisiertem Wasser im Verhältnis 1:50 verdünnen. Wenn PT Link zur Vorbehandlung genutzt wird, kann die Verdünnung durch Überführen des Inhalts des Behälters Target Retrieval Solution (50x) in den PT Link Tank und Hinzufügen von destilliertem oder entionisiertem Wasser bis zur Markierung (Fülllinie) erfolgen. Nicht verbrauchte verdünnte Lösung kann bei 2-8 °C einen Monat lang aufbewahrt werden. Angesetzte Lösung mit getrübttem Aussehen muss entsorgt werden. Bei Verwendung im PT Link für die 3-in-1-Probenvorbereitung kann die verdünnte Lösung dreimal innerhalb von 5 Tagen verwendet werden, wenn sie bei Raumtemperatur gelagert wird (20-25 °C).

### A.2 EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (DM829, Code-Nr. K8005)

Eine für das geplante Färbeverfahren ausreichende Menge EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) mit destilliertem oder entionisiertem Wasser im Verhältnis 1:50 verdünnen. Wenn PT Link zur Vorbehandlung genutzt wird, kann die Verdünnung durch Überführen des Inhalts des Behälters Target Retrieval Solution (50x) in den PT Link Tank und Hinzufügen von destilliertem oder entionisiertem Wasser bis zur Markierung (Fülllinie) erfolgen. Nicht verbrauchte verdünnte Lösung kann bei 2-8 °C einen Monat lang aufbewahrt werden. Angesetzte Lösung mit getrübttem Aussehen muss entsorgt werden. Bei Verwendung im PT Link für die 3-in-1-Probenvorbereitung kann die verdünnte Lösung dreimal innerhalb von 5 Tagen verwendet werden, wenn sie bei Raumtemperatur gelagert wird.

### A.3 EnVision FLEX Wash Buffer (20x) (DM831, Code-Nr. K8007)

Eine für das geplante Färbeverfahren ausreichende Menge EnVision FLEX Wash Buffer (20x) mit destilliertem oder entionisiertem Wasser im Verhältnis 1:20 verdünnen. Um ein Aufschäumen so weit wie möglich zu vermeiden, den konzentrierten Waschpuffer zu einer abgemessenen Menge destilliertem oder entionisiertem Wasser hinzufügen. Rühren Sie gleichmäßig, bis die verdünnte Lösung homogen erscheint. Nicht verbrauchte verdünnte Lösung kann bei 2-8 °C einen Monat lang aufbewahrt werden. Angesetzte Lösung mit getrübttem Aussehen muss entsorgt werden. Bei Verwendung in der PT Link Rinse Station für den Waschschrift nach der 3-in-1-Probenvorbereitung kann die verdünnte Lösung dreimal innerhalb von 5 Tagen verwendet werden, wenn sie bei Raumtemperatur gelagert wird.

#### A.4 EnVision FLEX Substrate Working Solution

Die DAB-haltige EnVision FLEX Substrate Working Solution wird durch gründliches Mischen von 1 Tropfen EnVision FLEX DAB+ Chromogen (DM827) und 1 mL EnVision FLEX Substrate Buffer (SM803) angesetzt. Die EnVision FLEX Substrate Working Solution innerhalb von 5 Tagen verbrauchen (bei 2-8 °C im Dunkeln aufbewahren).

### Entnahme und Vorbereitung der Probe

Als Proben kommen formalinfixierte, paraffineingebettete Gewebeschnitte in Betracht.

Die Fixierung hängt von Art/Dicke des Fixationsmittels und des Gewebes ab. Zum Beispiel sollten Gewebeblöcke mit einer Dicke von 3-4 mm in neutral gepuffertem Formalin 18-24 Stunden fixiert werden.

Die optimale Dicke paraffineingebetteter Schnitte beträgt etwa 4 µm.

Nach dem Schneiden sollten die Gewebe auf FLEX IHC Microscope Slides (Code-Nr. K8020) oder SuperFrost Plus Mikroskop-Objektträgern eingedeckt und anschließend für 1 Stunde in einen bei  $58 \pm 2$  °C kalibrierten Ofen gestellt werden. Für eine bessere Haftung der Gewebeschnitte an den Glas-Objektträgern werden FLEX IHC Microscope Slides (Code-Nr. K8020) empfohlen.

Die Schnitte so flach und faltenfrei wie möglich auf den Objektträgern aufbringen. Falten wirken sich negativ auf die Färbeergebnisse aus.

**HINWEIS:** Die Größe der Objektträger muss zum Autostainer Link Gerät passen. Angaben zu geeigneten Mikroskop-Objektträgern bitte dem Benutzerhandbuch des jeweiligen Agilent-Geräts entnehmen.

### Verfahren

Bitte lesen Sie vor der Durchführung von Färbungen mit Ihrem Autostainer Link Gerät das **Benutzerhandbuch des jeweiligen Agilent-Geräts** aufmerksam durch. Anweisungen zur Verwendung von PT Link finden sich im PT Link-Benutzerhandbuch.

Um für eine reproduzierbare Epitopdemaskierung zu sorgen, wird empfohlen, den Objektträgerhalter immer voll zu beladen. Dadurch wird eine gleichmäßige Erhitzung der Schnitte in jedem Durchlauf erreicht.

#### A. Arbeitsablauf der Vorbehandlung

*Empfohlenes Verfahren zur 3-in-1 Probenvorbereitung mit PT Link:*

Entparaffinierung, Rehydrierung und Hitze induzierte Epitopdemaskierung (HIER) können mit formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten unter Berücksichtigung des 3-in-1 Verfahrens durchgeführt werden.

1. Eine Arbeitslösung durch Verdünnen der konzentrierten EnVision FLEX Target Retrieval Solution (50x) mit destilliertem oder entionisiertem Wasser im Verhältnis 1:50 herstellen.
2. Tanks des PT Link mit einer ausreichenden Menge Arbeitslösung (1,5 l) füllen, um die Gewebeschnitte zu bedecken.
3. PT Link auf Erwärmen der Lösung auf 65 °C einstellen.
4. Tauchen Sie die auf Objektträger aufgebrachten, formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitte in die vorerhitzte EnVision FLEX Target Retrieval Solution (Arbeitslösung) in den PT Link-Behältern und lassen Sie diese 20-40 min bei 97 °C darin inkubieren. Die optimale Inkubationszeit muss vom Anwender ermittelt werden.
5. Die Schnitte im PT Link auf 65 °C abkühlen lassen.
6. Die Autostainer-Gestelle mit den Objektträgern aus dem PT Link-Tank nehmen und die Objektträger sofort in einen Behälter/Tank (z. B. PT Link Rinse Station, Code-Nr. PT109) mit verdünntem, auf Raumtemperatur gebrachtem EnVision FLEX Wash Buffer (20x) tauchen.
7. Die Objektträger für 1-5 Minuten im verdünnten und auf Raumtemperatur gebrachten EnVision FLEX Wash Buffer (20x) belassen.

8. Objektträger in ein Autostainer Link Gerät einsetzen und mit der Färbung fortfahren. Die Gewebeschnitte dürfen während der Behandlung oder des immunhistochemischen Färbeverfahrens nicht austrocknen.
9. Nach der Färbung sollte eine Dehydrierung, Spülung und Permanenteindeckung erfolgen.  
**HINWEIS:** Bei Verwendung im PT Link für die 3-in-1-Probenvorbereitung können die verdünnte Target Retrieval Solution und der verdünnte Waschpuffer innerhalb von 5 Tagen dreimal verwendet werden, wenn sie bei Raumtemperatur gelagert werden.

*HIER-Verfahren mit PT Link:*

Nach der Entparaffinierung und Rehydrierung mit Puffer (Wasser) ist bei den meisten Gewebeschnitten eine hitzeinduzierte Epitopdemaskierung (HIER) erforderlich.

1. Eine Arbeitslösung durch Verdünnen der konzentrierten EnVision FLEX Target Retrieval Solution (50x) mit destilliertem oder entionisiertem Wasser im Verhältnis 1:50 herstellen.
2. Tanks des PT Link mit einer ausreichenden Menge Arbeitslösung (1,5 l) füllen, um die Gewebeschnitte zu bedecken.
3. PT Link auf Erwärmen der Lösung auf 65 °C einstellen.
4. Gewebeschnitte auf Objektträgern manuell entparaffinieren und rehydrieren. Zur besseren Haftung des Gewebes auf dem Objektträger werden beschichtete oder silanisierte Objektträger empfohlen.
5. Die auf Raumtemperatur gebrachten Gewebeschnitte in die vorgewärmte EnVision FLEX Target Retrieval Solution (Arbeitslösung) geben und 20-40 Minuten bei 97 °C inkubieren. Die optimale Inkubationszeit muss vom Anwender ermittelt werden.
6. Die Schnitte im PT Link auf 65 °C abkühlen lassen.
7. Die Objektträgerhalter aus dem PT Link-Behälter nehmen und die Objektträger sofort in einen Behälter/Tank (z. B. PT Link Rinse Station, Code-Nr. PT109) mit verdünntem, auf Raumtemperatur gebrachtem EnVision FLEX Wash Buffer (20x) tauchen.
8. Die Objektträger für 1-5 Minuten im verdünnten und auf Raumtemperatur gebrachten EnVision FLEX Wash Buffer (20x) belassen.
9. Objektträger in ein Autostainer Link Gerät einsetzen und mit der Färbung fortfahren. Die Gewebeschnitte dürfen während der Behandlung oder des immunhistochemischen Färbeverfahrens nicht austrocknen.
10. Nach Durchführung des Färbeverfahrens müssen die Objektträger unter Verwendung eines geeigneten permanenten Eindeckmediums eingedeckt werden.

**HINWEIS:** Bei Verwendung im PT Link für das HIER-Verfahren können die verdünnte Demaskierungs-Lösung und der verdünnte Waschpuffer dreimal innerhalb von 5 Tagen verwendet werden, wenn sie bei Raumtemperatur gelagert werden.

*HIER Arbeitsverfahren mit Coplin-Gefäßen:*

Nach der Entparaffinierung und Rehydrierung mit Puffer (Wasser) ist bei den meisten Gewebeschnitten eine hitzeinduzierte Epitopdemaskierung (HIER) erforderlich.

1. Die Färbeschalen mit verdünnter EnVision FLEX Target Retrieval Solution (50x) in ein Wasserbad stellen.
2. Die Schalen mit der EnVision FLEX Target Retrieval Solution (Arbeitslösung) in dem Wasserbad auf 95-99 °C aufheizen. Zur Temperaturstabilisierung und zum Vermeiden von Verdunstung die Schalen mit Deckeln abdecken.
3. Die auf Raumtemperatur gebrachten Gewebeschnitte in die vorgewärmte EnVision FLEX Target Retrieval Solution (Arbeitslösung) in den Färbeschalen eintauchen.
4. Die Temperatur von Wasserbad und EnVision FLEX Target Retrieval Solution wieder auf 95-99 °C bringen. Bei 95-99 °C 20 (± 1) Minuten inkubieren.
5. Gesamte Färbeschale samt Objektträger aus dem Wasserbad heben. Die Objektträger in der EnVision FLEX Target Retrieval Solution bei Raumtemperatur 20 (± 1) Minuten abkühlen lassen.
6. Die EnVision FLEX Target Retrieval Solution ausgießen und die Schnitte mit verdünntem EnVision FLEX Wash Buffer (20x) bei Raumtemperatur 1-5 Minuten spülen.

7. Das Gestell mit den gespülten Schnitten in ein Autostainer Link Gerät einsetzen. Sofort mit dem vorprogrammierten Färbedurchlauf beginnen.

**HINWEIS:** Bei Verwendung von Coplin-Gefäßen für das HIER-Verfahren können die verdünnte Demaskierungs-Lösung und der verdünnte Waschpuffer nur einmal verwendet werden (Einmalgebrauch).

Einige Epitope vertragen das HIER-Verfahren nicht und andere erfordern enzymatische Vorbehandlung. Entsprechende Angaben bitte der Gebrauchsanweisung des jeweiligen primären Antikörpers entnehmen.

Die Gewebeschnitte dürfen weder während der Behandlung noch während des anschließenden immunhistochemischen Färbeverfahrens austrocknen. Für eine bessere Haftung der Gewebeschnitte an den Glas-Objektträgern werden FLEX IHC Microscope Slides (Code-Nr. K8020) empfohlen.

## **B. Färbeverfahren**

Gebrauchsfertige FLEX primäre Antikörper können mit dem Detektionssystem EnVision FLEX+ auf formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten verwendet werden.

Die Gebrauchsanweisung der konzentrierten primären Antikörper enthält Angaben zur Verdünnung konzentrierter primärer Antikörper von Agilent.

Die Arbeitsschritte zur Färbung und die empfohlenen Inkubationszeiten sind in der Autostainer Link Software vorprogrammiert, ebenso wie die Protokolle für die Detektionssysteme:

FLEX und FLEX 2x5 DAB (FLEX Protokolle)

FLEX+ Maus und FLEX + Maus 2x5 DAB (FLEX + Maus (LINKER) Protokolle)

FLEX+ Kaninchen und FLEX+ Kaninchen 2x5 DAB (FLEX+ Kaninchen (LINKER) Protokolle)

Die zur Anwendung empfohlene Menge des Reagenz beträgt 1 x 200 µl oder 2 x 150 µl pro Objektträger. Wenn die Protokolle auf dem verwendeten Autostainer Link Gerät nicht verfügbar sind, wenden Sie sich an den Pathologie-Kundendienst von Agilent.

Optimale Inkubationszeiten für den primären Antikörper und EnVision FLEX/HRP hängen vom verwendeten primären Antikörper ab. Entsprechende Angaben bitte der Gebrauchsanweisung des jeweiligen primären Antikörpers entnehmen. Die Verifizierung des verwendeten Protokolls obliegt dem Anwender.

Nach Abschluss des Färbeverfahrens müssen die Proben fixiert werden. Es wird empfohlen, eine Dehydrierung, Reinigung und permanente Eindeckung durchzuführen, wenn Objektträger mit der 3-in-1-Probenvorbereitung behandelt wurden. Mit dem HIER-Verfahren behandelte Objektträger können mit einem wässrigen oder permanenten Eindeckmedium fixiert werden. Zum wässrigen Eindecken werden Eindeckmedien wie Glycergel Mounting Medium (Code-Nr. C0563) oder Faramount Aqueous Mounting Medium (Code-Nr. S3025) empfohlen. Die Schnitte dürfen vor dem Eindecken nicht austrocknen.

## **Qualitätskontrolle**

Bei jedem Färbedurchlauf sollte eine als positiv bekannte Kontrollprobe mitgeführt werden, um die Leistung aller verwendeten Reagenzien zu bestätigen. Wenn das Positivkontrollgewebe keine Färbung aufweist, muss die Markierung der Testproben für ungültig erklärt werden.

Zum Ausschluss einer unspezifischen Färbung sollte ferner stets ein Negativkontrollreagenz mitlaufen. Ist die unspezifische Färbung nicht eindeutig von der spezifischen Färbung zu unterscheiden, muss die Markierung der Testproben für ungültig erklärt werden.

Positiv- und Negativkontrollgewebe sowie Negativkontrollreagenzien sollten unter Anwendung desselben Protokolls und vorzugsweise auf demselben Objektträger gleichzeitig mit den Patientenproben mitgeführt werden, um die Validität des Färbeverfahrens sicherzustellen, einschließlich Reagenzien, Gewebeverarbeitung und Gerät.

## Auswertung der Färbung

Die Diaminobenzidin enthaltende Substrat-Arbeitslösung erzeugt am Ort des vom primären Antikörper erkannten Zielantigens ein braunes Endprodukt. Die Braunfärbung muss am erwarteten Ort des Zielantigens auf der Positivkontrolle vorhanden sein. Eine unspezifische Färbung stellt sich als eher diffuse Braunfärbung der mit dem Negativkontrollreagenz behandelten Objektträger dar. Zellkerne werden durch die Hämatoxylin-Gegenfärbung blau gefärbt.

## Kreuzreaktivität von sekundären Antikörpern

Der im EnVision FLEX/HRP Detektionsreagenz verwendete Ziegen-Anti-Maus-Antikörper reagiert mit allen Maus-IgG-Subklassen, Maus-IgA und Maus-IgM. Kreuzreaktionen wie durch ELISA für den nichtkonjugierten Antikörper bestimmt: Humane, Kuh- und Kaninchen-Immunglobuline, unter 1%. Fötale Rinderserum, unter 0,1%. Kreuzreaktionen mit anderen Immunglobulinen betragen für gewöhnlich bei: Meerschweinchen etwa 8%, Schwein etwa 4%, und Ratte etwa 30%. Die Kreuzreaktion mit humanem Serum beträgt für gewöhnlich unter 0,1%.

Der im EnVision FLEX/HRP Detektionsreagenz verwendete Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper reagiert mit Kaninchen-Immunglobulinen aller Klassen. Kreuzreaktionen wie durch ELISA für den nichtkonjugierten Antikörper bestimmt: Humane, Ratten- und Maus-Immunglobuline, unter 1%. Rinder-Immunglobuline und fötales Rinderserum, unter 0,1%. Kreuzreaktionen mit anderen Immunglobulinen betragen für gewöhnlich bei: Meerschweinchen etwa 10% und Schwein etwa 1%. Die Kreuzreaktion mit humanem Serum beträgt für gewöhnlich unter 0,1%.

## Einschränkungen

1. Nur für die automatisierte Benutzung in Autostainer Geräten. Das Produkt wurde nicht für die Verwendung bei manuellen Färbeverfahren validiert.
2. Nur zur Benutzung mit formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten. Das Produkt wurde nicht für die Verwendung mit Gefrierschnitten oder Zellabstrichen validiert.
3. Änderungen des Arbeitsablaufes können Auswirkungen auf die Anzahl der im Kit mitgelieferten Tests haben.
























## Explanation of symbols / Explication des symboles / Erläuterung der Symbole

 REF	Catalogue number Référence du catalogue Artikelnummer		Temperature limitation Limites de température Temperaturbegrenzung	 LOT	Batch code Réf. du lot Chargenbezeichnung
 IVD	In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-vitro-Diagnostikum		Store in the dark Conserver dans l'obscurité Im Dunkeln aufbewahren		Use by Utiliser avant Verwendbar bis
	Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten		Contains sufficient for <n> tests Contenu suffisant pour <n> tests Ausreichend für <n> Prüfungen	 UDI	Unique device identification Identification unique du dispositif Eindeutiger Identifikator eines Medizinprodukts
	Caution Attention Vorsicht		Contains biological material of animal origin Contient une substance biologique d'origine animale Enthält biologisches Material tierischen Ursprungs		Manufacturer Fabricant Hersteller
 EC REP	Authorized representative in the European Community Représentant agréé dans la Communauté européenne Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft				
		GHS pictogram (consult precautions section) GHS pictogramme (consulter la section Précautions d'emploi) GHS-Piktogramm (siehe Abschnitt mit Vorsichtsmaßnahmen)			



Agilent Technologies Singapore (International) Pte Ltd.  
No. 1 Yishun Avenue 7  
Singapore, 768923  
Tel. +44 161 492 7050  
www.agilent.com

Revision / Révision / Revision [04]

Date of issue / Date de publication / Ausgabedatum: 2022.08

Changes since last revision	
Revision [04]	Revised precautions for EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) and EnVision FLEX Wash Buffer (20x) in accordance with Regulation (EC) No. 1272/2008 (CLP /GHS).
Revision [03]	Revised in accordance with EU IVD Regulation.

Modifications apportées depuis la dernière révision	
Révision [04]	Révision des précautions d'emploi pour EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) et EnVision FLEX Wash Buffer (20x) conformément au règlement (CE) n° 1272/2008 (CLP/SGH).
Révision [03]	Révision conforme au règlement sur le DIV de l'UE.

Änderungen seit letzter Revision	
Revision [04]	Überarbeitete Vorsichtsmaßnahmen für EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) und EnVision FLEX Wash Buffer (20x) gemäß Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 (CLP/GHS).
Revision [03]	Überarbeitet gemäß IVD-Verordnung der EU.