

Dako
LSAB2 System-HRP

English

Code K0672 15 mL
Code K0673 15 mL
Code K0675 110 mL

Intended use
For In Vitro Diagnostic Use.

These instructions apply to the Universal Dako Labelled Streptavidin-Biotin2 System, Horseradish Peroxidase (LSAB2 System, HRP). This system is intended for use with primary antibodies from **rabbit** or **mouse** supplied by the user for the qualitative identification of antigens by light microscopy and immunohistochemistry in paraffin-embedded tissues, cryostat tissues and cell preparations to aid in the diagnoses of pathological disorders. Tissues processed in a variety of fixatives including ethanol, B-5, Bouin's, zinc formalin, and neutral buffered formalin may be used.

Refer to Dako's *General Instructions for Immunohistochemical Staining* or the detection system instructions of IHC procedures for: 1) Principle of Procedure, 2) Materials Required, Not Supplied, 3) Storage, 4) Specimen Preparation, 5) Staining Procedure, 6) Quality Control, 7) Troubleshooting, 8) Interpretation of Staining, 9) General Limitations.

Summary and explanation

The LSAB2 System, HRP is based on a modified labelled avidin-biotin (LAB) technique in which a biotinylated secondary antibody forms a complex with peroxidase-conjugated streptavidin molecules.¹ In comparison to the ABC method, the LAB/LSAB method has been reported to be four to eight times more sensitive.² Giorno, et al,² attribute the increased sensitivity to the smaller size of the enzyme-labelled (strept)avidin complex of the LAB/LSAB method when compared to the avidin-biotin enzyme complex of the ABC method. The clinical interpretation of any positive staining or its absence should be complemented by morphological and histological studies with proper controls. Evaluations should be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified individual.

Principles of procedure

The LSAB2 System, HRP is a sensitive and versatile IHC procedure which permits the simultaneous processing of numerous specimens with rabbit or mouse primary antibodies in less than one hour. Endogenous peroxidase activity is quenched by incubating the specimen for 5 minutes with 3% hydrogen peroxide. The specimen is then incubated with an appropriately characterized and diluted rabbit or mouse primary antibody, followed by sequential 10-minute incubations with a biotinylated link antibody (containing anti-rabbit and anti-mouse immunoglobulins) and peroxidase-labelled streptavidin. Staining is completed after an incubation with the Substrate Chromogen (AEC or DAB). For AEC in K0672, this is a 10-minute incubation with 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) Substrate-Chromogen which results in a red-colored precipitate at the antigen site. For DAB in K0673, this is a 5–10 minute incubation with 3-3'-diaminobenzidine (DAB) Substrate-Chromogen which results in a brown-colored precipitate at the antigen site.

Reagents provided

Code K0672

The following materials, sufficient for 150 tissue sections, based on 100 µL per section, are included in this kit:

<i>Quantity</i>	<i>Description</i>
1x15 mL	Peroxidase Block <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">PEROXIDASE BLOCK</div> 3% hydrogen peroxide in water.
1x15 mL	Link Antibody <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BIOTINYLATED LINK</div> Biotin labelled affinity isolated goat anti-rabbit and goat anti-mouse immunoglobulins in phosphate buffered saline (PBS), containing stabilizing protein and 0.015 mol/L sodium azide.
1x15 mL	Streptavidin-HRP <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">STREPTAVIDIN-HRP</div> Streptavidin conjugated to horseradish peroxidase in PBS containing stabilizing protein and anti-microbial agents.
1x15 mL	AEC Substrate Chromogen <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEC SUBSTRATE CHROMOGEN READY-TO-USE</div> AEC in N,N-dimethylformamide (DMF) and acetate buffer, pH 5.0, containing hydrogen peroxide, stabilizers, enhancers and an anti-microbial agent. Keep at 2–8 °C.

Code K0673

The following materials, sufficient for 150 tissue sections, based on 100 µL per section, are included in this kit:

<i>Quantity</i>	<i>Description</i>
1x15 mL	Peroxidase Block PEROXIDASE BLOCK 3% hydrogen peroxide in water.
1x15 mL	Biotinylated Link BIOTINYLATED LINK Biotin labelled affinity isolated goat anti-rabbit and goat anti-mouse immunoglobulins in phosphate buffered saline (PBS), containing stabilizing protein and 0.015 mol/L sodium azide.
1x15 mL	Streptavidin-HRP STREPTAVIDIN-HRP Streptavidin conjugated to horseradish peroxidase in PBS containing stabilizing protein and anti-microbial agents.
1x18 mL	Substrate DAB SUBSTRATE BUFFER Imidazole-HCl buffer pH 7.5 containing hydrogen peroxide and an anti-microbial agent.
1x1 mL	DAB Chromogen DAB CHROMOGEN 3,3'-diaminobenzidine in chromogen solution.
<i>Accessories</i>	
1	Calibrated test tube
1	Plastic Pasteur pipette

Code K0675(11)

The following materials, sufficient for 1100 tissue sections, based on 100 µL per section, are included in this kit:

<i>Quantity</i>	<i>Description</i>
1x110 mL	Biotinylated Link BIOTINYLATED LINK Biotin labelled affinity isolated goat anti-rabbit and goat anti-mouse immunoglobulins in phosphate buffered saline (PBS), containing stabilizing protein and 0.015 mol/L sodium azide.
1x110 mL	Streptavidin-HRP STREPTAVIDIN-HRP Streptavidin conjugated to horseradish peroxidase in PBS containing stabilizing protein and anti-microbial agents.

Code K0675(89)

The following materials, packaged for use with the Dako Autostainer (code S3400), are included in this kit:

<i>Quantity</i>	<i>Description</i>
10x11 mL	Biotinylated Link BIOTINYLATED LINK Biotin labelled affinity isolated goat anti-rabbit and goat anti-mouse immunoglobulins in phosphate buffered saline (PBS), containing stabilizing protein and 0.015 mol/L sodium azide.
10x11 mL	Streptavidin-HRP STREPTAVIDIN-HRP Streptavidin conjugated to horseradish peroxidase in PBS containing stabilizing protein and anti-microbial agents.

Materials required, but not supplied

Absorbent wipes
Antibodies: N-Series ready-to-use or concentrated antibodies diluted in Antibody Diluent (code S0809 or S3022)
Antibody Diluent (code S0809 or S3022)
Control tissues, positive and negative
Counterstain; aqueous based, such as Lillie's Modified Mayer's Hematoxylin (code S3309)
Coverslips
Distilled water
Drying oven, capable of maintaining 60 °C or less.
Ethanol, absolute and 95%
Light microscope (20x–800x)
Mounting media, such as Faramount (code S3025) or Glycergel (code C0563)
Negative control reagents
Slides, poly-L-lysine coated or Silanized Slides (code S3003)
Staining jars or baths
Timer (capable of 2–10 minute intervals)
Wash bottles
Wash buffer solution
Xylene, toluene or xylene substitutes

For the K0675 LSAB2 System (110 mL), the following reagents are required in addition to the above list:

Hydrogen peroxide, 3% solution or Peroxidase Block (code S2001)
Substrate-Chromogen solution such as AEC Substrate-Chromogen (code K3464, 110 mL, ready-to-use) or Liquid DAB (code K3466)

Optional materials, not supplied*Buffers:*

Wash buffer (code S3006) for automated and manual use
Phosphate buffered saline (code S3024)
Tris-buffered saline (code S3001 or S1968)

Proteolytic Enzymes:

Pepsin (code S3002)
Proteinase K (code S3004 or S3020)
Proteolytic Enzyme, RTU (code S3007)

Others:

Positive Control Slides (available from Dako)
Target Retrieval Solution (code S1699 or S1700)
Target Retrieval Solution, High pH (code S3307 or S3308)
Target Retrieval Solution, pH 9 (code S2367 or S2368)
Humidity Chamber
Ammonium hydroxide, 15 mol/L diluted to 0.037 mol/L

Precautions**Product Specific**

1. For professional users.
2. This product contains Sodium azide (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.^{3,4}
3. The AEC and DAB Substrate-Chromogens are sensitive to contamination from a variety of oxidizing agents such as metals, bacteria, dust and commonly used laboratory glassware. To avoid contamination and premature expiration, avoid exposing the AEC or DAB solutions to any potential source of contamination and never pipette directly from the bottle. Pour out required amount into a clean container and pipette from it. Do not return excess AEC or DAB solution to the primary storage container.
4. The reagents provided are optimally diluted. Further dilution may result in loss of antigen staining. Any such change must be validated by the user. Differences in tissue processing and technical procedures in the user's laboratory may produce significant variability in results necessitating regular performance of in-house controls.
5. Do not substitute reagents from other lot numbers or from kits of other manufacturers.
6. Incubation times or temperatures other than those specified may give erroneous results; any such changes must be validated by the user.
7. Enzymes and chromogens may be affected adversely if exposed to excessive light levels. Do not store kit components or perform staining in strong light, such as direct sunlight.

General

1. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.
2. Minimize microbial contamination of reagents or incorrect results may occur.
3. Avoid splashing of reagents or generation of aerosols.
4. 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 procedure, the dangerous properties of the product and the necessary safety instructions.
5. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin. Unused reagents should be disposed of according to local, State, and Federal regulations.
6. Safety Data Sheet available for professional users on request.

Risk and Safety statements

K0672 - AEC Substrate Chromogen Ready-to-Use: 1-<10% N,N-Dimethylformamide / Hazard Symbol: Toxic

- R61 May cause harm to the unborn child.
S35 This material and its container must be disposed of in a safe way.
S45 In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (*show the label where possible*).
S53 Avoid exposure – obtain special instructions before use.
Restricted to professional users.

K0673 - DAB Chromogen: 1-5% Biphenyl-3,3',4,4'-tetrayltetraammonium tetrachloride / Hazard Symbol: Harmful

- R40 Limited evidence of a carcinogenic effect.
R43 May cause sensitization by skin contact.
R68 Possible risk of irreversible effects.
S35 This material and its container must be disposed of in a safe way.
S36/37 Wear suitable protective clothing and gloves.

Storage

Reagents of the LSAB2 System, HRP are to be stored at 2–8 °C. Do not freeze. Do not use after the expiration date printed on reagent vials and kit label. If reagents are stored under any conditions other than those specified, they must be validated by the user.⁵

The AEC and DAB Substrate-Chromogen solutions are unstable at temperatures greater than 8 °C. Use and store the AEC and DAB Substrate-Chromogen solutions at the recommended 2–8 °C temperature range. These solutions may be used immediately after removal from the refrigerator. After use, return to 2–8 °C storage as soon as possible.

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

Reagent preparation

It is convenient to prepare the following reagents prior to staining.

Wash Buffer Solution

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

Store unused buffer at 2–8 °C. Discard buffer if cloudy in appearance. Distilled water may be used for rinsing the hydrogen peroxide, substrate-chromogen solution, and counterstain.

Primary Antibody

A wide range of N-Series Ready-to-use Primary Antibodies and Negative Control Reagents are available for use with LSAB2 Systems. Concentrated antibodies are also available from Dako; however, optimal dilutions must be determined experimentally by the user. Dilutions should be prepared using Antibody Diluent (code S0809) which contains 0.05 mol/L Tris-HCl buffer, pH 7.2–7.6, and 1% bovine serum albumin (BSA). The BSA acts as a protein block and eliminates the need for a separate incubation with protein block reagent. Antibody Diluent with Background Reducing Components (code S3022) is also suitable for use as a diluent. Diluent without protein carrier is not recommended.

For most primary antibodies used with the LSAB2 Systems, an incubation of 10 minutes is sufficient.

Negative Control Reagent

Ideally, a negative control reagent contains antibody which exhibits no specific reactivity with human tissues (non-human reactive) in the same matrix/solution as the primary antibody. The non-human reactive antibody should be the same subclass and animal species as the primary antibody, diluted to the same immunoglobulin or protein concentration as the diluted primary antibody using the same diluent. Depending on the type of primary antibody/antiserum used, normal/non-immune serum from the same species as the primary at a protein concentration equivalent to the diluted primary in the same diluent may be suitable for use. The incubation period for the negative control reagent should correspond to that of the primary antibody/antiserum.

When using Dako N-Series ready-to-use antibodies, Universal Negative Control(s) is recommended as a negative control reagent. These controls are optimized for use with either mouse (code N1698) or rabbit (code N1699) N-Series ready-to-use antibodies.

Substrate-Chromogen Solution

The K0672 LSAB2 System contains ready-to-use AEC, which is ready to apply to tissue or cell specimens. The K0673 LSAB2 System contains DAB which is prepared as follows: Add 1 drop (or 20 µL) of the DAB Chromogen per mL of Substrate Buffer. Use the provided graduated test tube to measure the amount of Substrate Buffer needed. Mix well and apply solution using the provided transfer pipette. After use, rinse graduated test tube and pipette thoroughly with distilled water. Unused working DAB solution is stable for up to 2 weeks if stored at 2–8 °C. If precipitate forms, mix well before using. Ready-to-use AEC Substrate-Chromogen Solution (code K3464, 110 mL) or Liquid DAB (code K3466) is recommended for use with the LSAB2 System, HRP, 110 mL (code K0675). Please follow the instructions provided with each substrate-chromogen system for substrate-chromogen preparation.

Counterstain

DAB chromogen yields an alcohol insoluble end-product and can be used with an alcohol-based hematoxylin. When AEC Substrate-chromogen is used, the colored end-product of the staining reaction is alcohol soluble and should only be used with aqueous-based counterstains such as Mayer's Hematoxylin. Follow counterstaining of hematoxylin with a thorough rinse in distilled water, then immerse tissue slides into a bath of 0.037 mol/L ammonia water. 0.037 mol/L ammonia water is prepared by mixing 2.5 mL of 15 mol/L (concentrated) ammonium hydroxide with 1 liter of water. Unused 0.037 mol/L ammonia water may be stored at room temperature (20–25 °C) in a tightly capped bottle for up to 12 months. Consult manufacturers' guidelines for alternative counterstaining procedures.

Mounting Media

Faramount Aqueous Mounting Medium, ready-to-use (code S3025) or Glycergel Mounting Medium (code C0563) is recommended for aqueous mounting. Liquefy Glycergel by warming to approximately 40 ±5 °C prior to use.

Specimen preparation

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

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

Staining procedure

Procedural Notes

The user should read these instructions carefully and become familiar with the system contents prior to use.

The reagents and instructions supplied in this system have been designed for optimal performance. Further dilution of the system reagents or alteration of incubation times or temperatures may give erroneous results.

All system reagents except AEC Substrate-Chromogen should be equilibrated to room temperature (20–25 °C) prior to immunostaining. Likewise, all incubations should be performed at room temperature. The AEC Substrate-Chromogen may be used immediately after removal from cold storage and does not have to be at room temperature prior to use. Return to 2–8 °C for storage after use. Storage at temperatures above 8 °C adversely affects the stability of the AEC Substrate-Chromogen.

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

If the staining protocol must be interrupted, slides may be kept in a buffer bath following incubation of the link antibody (Step 3) for up to one hour at room temperature (20–25 °C) without affecting staining performance.

The sensitivity of the LSAB2 System, HRP can be further increased by lengthening the incubation times of Steps 2, 3 and 4 to 30 ±5 minutes each.

Staining Protocol

STEP 1 PEROXIDASE BLOCK

Tap off excess liquid. Using a lintless tissue (such as a Kimwipe or gauze pad), carefully wipe around the specimen to remove any remaining liquid and to keep reagents within the prescribed area.

Apply enough Peroxidase Block to cover specimen.

Incubate 5 (±1) minutes.

Rinse gently with distilled water or buffer solution from a wash bottle (do not focus flow directly on tissue) and place in fresh buffer bath.

STEP 2 PRIMARY ANTIBODY OR NEGATIVE CONTROL REAGENT

Tap off excess liquid and wipe slides as before.

Apply enough Primary Antibody or Negative Control Reagent to cover specimen.

Incubate 10 (±1) minutes unless otherwise specified.

Rinse gently with buffer solution from a wash bottle (do not focus flow directly on tissue) and place in fresh buffer bath.

STEP 3 BIOTINYLATED LINK

Immediately tap off excess buffer and wipe slides as before.

Apply enough YELLOW drops from Link Antibody to cover specimen.

Incubate 10 (±1) minutes.

Rinse slides as in Step 2.

If the staining protocol must be interrupted, slides may be kept in a buffer bath following incubation of the link antibody (Step 3) for up to one hour at room temperature (20–25 °C) without affecting staining performance.

STEP 4 STREPTAVIDIN-HRP

Wipe slides as before.

Apply enough RED drops of the Streptavidin reagent to cover specimen.

Incubate 10 (±1) minutes.

Rinse slide as before

STEP 5 SUBSTRATE-CHROMOGEN SOLUTION

Remove AEC or DAB Substrate-Chromogen solutions from 2–8 °C storage. For DAB preparation, refer to Reagent Preparation Section.

Wipe slide as before.

Apply enough of the AEC or DAB Substrate-Chromogen solution to cover specimen. Return the AEC or DAB Substrate-Chromogen to refrigerated storage.

Incubate for 10 (±1) minutes for AEC and 5–10 minutes for DAB.

Rinse gently with distilled water from a wash bottle (do not focus flow directly on tissue). Collect AEC or DAB Substrate-Chromogen waste in a hazardous materials container for proper disposal.

STEP 6 HEMATOXYLIN COUNTERSTAIN (OPTIONAL)

Immerse slides in a bath of hematoxylin. Incubate for two to five (2–5) minutes, depending on the strength of hematoxylin used.

Rinse gently in a distilled water bath.

Dip slides 10 times into a bath of 0.037 mol/L ammonia water (optional).

Rinse slides in a bath of distilled or deionized water for two to five (2–5) minutes.

STEP 7 MOUNTING

Specimens may be mounted and coverslipped with an aqueous-based mounting medium such as Faramount (code S3025) or Glycergel (code C0563).

Note: The AEC reaction product is soluble in organic solvents and is therefore not compatible with toluene- or xylene-based, permanent mounting media.

Note: DAB may be mounted with any permanent mounting media.

Note: Slides may be read when convenient. However, some fading may occur if slides are exposed to strong light over a period of one week. To minimize fading, store slides in the dark at room temperature (20–25 °C).

Quality control

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

Consult the quality control guidelines of the College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry and references 6–8 for additional information. Refer to the package insert of each primary antibody used for details regarding sensitivity and immunoreactivity.

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

Staining interpretation

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

General limitations

Refer to the "General Instructions for Immunohistochemical Staining" for general limitations.

Product specific limitations

Dako provides LSAB2 System reagents at optimal dilution for use following the provided instructions for IHC on paraffin-embedded tissue sections, cryostats and blood smears. Any deviation from recommended test procedures may invalidate declared expected results; appropriate controls must be employed and documented. Users who deviate from recommended test procedures must accept responsibility for interpretation of patient results under these circumstances.

Endogenous avidin-binding activity (EABA) has been noted in frozen sections of liver (entire hepatic nodule) and kidney (tubular epithelium), as well as in frozen and formalin-fixed lymphoid tissues (paracortical histiocytes).^{9–12} EABA can be suppressed by sequential 20-minute incubations, first with 0.1% avidin and then with 0.01% biotin in 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.2–7.6, prior to staining or use Biotin Blocking System (code X0590).

Endogenous peroxidase or pseudoperoxidase activity can be found in hemoproteins such as hemoglobin, myoglobin, cytochrome and catalase as well as in eosinophils.^{13,14} In formalin-fixed tissue this activity can be inhibited by incubating specimens with 3% hydrogen peroxide for five minutes prior to application of the primary antibody. Blood and bone marrow smears and frozen tissues can be treated with Peroxidase Blocking Reagent (code S2001). However, this procedure does not abolish the reddish-brown pigment of hemoproteins. Alternatively, a solution of methanol-hydrogen peroxide can be used. Some antigens may become denatured with this procedure.

Reagents may demonstrate unexpected reactions in previously untested tissues. The possibility of unexpected reactions in tested tissue groups cannot be completely eliminated due to biological variability of antigen expression in neoplasms, or other pathological tissues.⁸ Contact Dako Technical Support with documented unexpected reactions.

Tissues from persons infected with hepatitis B virus and containing hepatitis B surface antigen (HBsAg) may exhibit nonspecific staining with horseradish peroxidase.¹⁵

Troubleshooting

<i>Problem</i>	<i>Probable Cause</i>	<i>Suggested Action</i>
1. No staining of any slides.	1a. Reagents not used in proper order.	1a. Review application of reagents.
	1b. Sodium azide in buffer bath.	1b. Use fresh, azide-free buffer.
	1c. Substrate-chromogen reagent mixed incorrectly.	1c. Make a fresh substrate-chromogen solution according to kit protocol.
2. Weak staining of all slides.	2a. Sections retain too much solution after wash bath.	2a. Gently tap off excess solution before wiping around section.
	2b. Slides not incubated long enough with reagents.	2b. Review recommended incubation times.
	2c. Incompatible counterstain or mounting media that dissolves reaction product.	2c. For AEC immunostained slides, use only aqueous-based counterstains and mounting media.
3. Excessive background staining in all slides, including control negative slides.	3a. Specimens contain high endogenous peroxidase activity.	3a. Incubate slides with fresh hydrogen peroxide.
	3b. Paraffin incompletely removed.	3b. Use fresh xylene or toluene baths.
	3c. Slides not properly rinsed.	3c. Use fresh solutions in buffer baths and wash baths.
	3d. Faster than normal substrate reaction due to excessive room temperature.	3d. Use shorter incubation time with substrate-chromogen solution.
	3e. Sections dried during staining procedure.	3e. Use humidity chamber. Wipe only three to four slides at a time before applying reagent.
	3f. Nonspecific binding of reagents to tissue section.	3f. Use Dako antibody diluents or add 1% BSA to the antibody diluent. Alternatively, 0.05 mol/L Tris containing 0.3 mol/L NaCl and 0.1% Tween 20, pH 7.2-7.6 (code S3306) may be used as a wash buffer. The incubation of a separate protein block reagent (code X0909) prior to the application of the primary antibody may also be necessary.
	3g. Primary antibody too concentrated.	3g. Use higher dilution of the primary antibody.
4. Tissue sections detaching from slides.	4a. Use of incorrect slides.	4a. Use poly-L-lysine slides for most staining. For primary antibodies that require target retrieval techniques, use Silanized Slides.
5. Excessively strong specific staining.	5a. Primary antibody too concentrated.	5a. Do serial dilutions of primary antibody to determine optimum dilution.
	5b. Incubation for primary antibody, biotinylated link or streptavidin-HRP too long.	5b. Determine the appropriate staining protocol for the antibody, i.e. length of primary antibody incubation, biotinylated link and streptavidin-HRP length of incubation.

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

Additional information on staining techniques and specimen preparation can be found in *Immunohistochemical Staining Methods*¹⁰ (available from Dako), *Atlas of Immunohistology*⁶ and *Immunoperoxidase Techniques, A Practical Approach to Tumor Diagnosis*.¹⁷

Français

Réf. K0672 15 mL

Réf. K0673 15 mL

Réf. K0675 110 mL

Utilisation prévue

Pour utilisation diagnostique in vitro.

Ces instructions s'appliquent au Universal Dako Labelled Streptavidin-Biotin2 System, Horseradish Peroxidase (LSAB2 System, HRP). Ce système est conçu pour être utilisé avec des anticorps primaires de **souris** ou de **lapin** (fournis par l'utilisateur) dans l'identification qualitative des antigènes par microscopie optique et par immunohistochimie dans différents tissus inclus en paraffine, tissus cryostat et préparations cellulaires afin d'aider au diagnostic des troubles pathologiques. Les tissus peuvent être traités à l'aide de divers fixateurs : éthanol, B-5, liquide de Bouin, zinc-formol et formol neutre tamponné.

Se référer aux *Instructions générales de coloration immunohistochimique* de Dako ou aux instructions du système de détection relatives aux procédures IHC pour plus d'informations concernant les points suivants : 1) Principe de procédure, 2) Matériels requis mais non fournis, 3) Conservation, 4) Préparation des échantillons, 5) Procédure de coloration, 6) Contrôle qualité, 7) Dépannage, 8) Interprétation de la coloration, 9) Limites générales.

Résumé et explication

Le LSAB2 System, HRP est fondé sur une technique modifiée faisant appel à l'avidine-biotine marquée (LAB) dans laquelle un anticorps secondaire biotinylé forme un complexe avec des molécules de streptavidine conjuguées à de la peroxydase.¹ Par comparaison avec la méthode ABC, la méthode LAB/LSAB a été présentée comme 4 à 8 fois plus sensible.² Giorno, et al.² attribuent la sensibilité accrue à la taille inférieure du complexe de (strept)avidine marquée par l'enzyme de la méthode LAB/LSAB par rapport au complexe enzymatique avidine-biotine de la méthode ABC. L'interprétation clinique de toute coloration positive ou de son absence doit être associée à des études morphologiques et histologiques utilisant les contrôles adéquats. Les évaluations doivent tenir compte des antécédents cliniques du patient et d'autres tests diagnostiques réalisés par une personne qualifiée.

Principes de la procédure

Le LSAB2 System, HRP est une procédure IHC sensible et polyvalente qui permet le traitement simultané de nombreux échantillons avec des anticorps primaires de lapin ou de souris en moins d'une heure. L'activité endogène peroxydasique est inhibée en incubant l'échantillon pendant 5 minutes avec du peroxyde d'hydrogène à 3 %. L'échantillon subit alors une incubation avec un anticorps primaire de lapin ou de souris caractérisé et dilué de façon adéquate, puis des incubations de 10 minutes avec un anticorps de liaison biotinylé (contenant des immunoglobulines anti-lapin et anti-souris) et avec de la streptavidine marquée à la peroxydase. La coloration est terminée par une incubation avec le substrat chromogène (AEC ou DAB). Pour l'AEC dans le kit K0672, il s'agit d'une incubation de 10 minutes avec un substrat chromogène 3-amino-9-éthylcarbazole (AEC) qui donne un précipité de couleur rouge sur le site de l'antigène. Pour le DAB dans le kit K0673, il s'agit d'une incubation de 5 à 10 minutes avec un substrat chromogène 3-3'-diaminobenzidine (DAB) qui donne un précipité de couleur marron sur le site de l'antigène.

Réactifs fournis

Réf. K0672

Les matériels suivants, en quantité suffisante pour 150 coupes de tissu, sur la base de 100 µL par coupe, sont inclus dans ce kit :

Quantité	Description
1x15 mL	Agent de blocage de la peroxydase PEROXIDASE BLOCK Peroxyde d'hydrogène à 3 % dans de l'eau.
1x15 mL	Anticorps de liaison BIOTINYLATED LINK Immunoglobulines de chèvre anti-lapin et anti-souris marquées à la biotine, isolées par affinité, dans une solution saline de tampon phosphate (PBS), contenant une protéine stabilisante et de l'azide de sodium à 0,015 mol/L.
1x15 mL	Streptavidine-HRP STREPTAVIDIN-HRP Streptavidine conjuguée à de la peroxydase de raifort dans une PBS contenant une protéine stabilisante et des agents antimicrobiens.
1x15 mL	Substrat chromogène AEC AEC SUBSTRATE CHROMOGEN READY-TO-USE AEC dans du N,N-diméthylformamide (DMF) et un tampon d'acétate, de pH 5,0, contenant du peroxyde d'hydrogène, des stabilisants, des amplificateurs et un agent antimicrobien. Conserver entre 2 et 8 °C.

Réf. K0673

Les matériels suivants, en quantité suffisante pour 150 coupes de tissu, sur la base de 100 µL par coupe, sont inclus dans ce kit :

<i>Quantité</i>	<i>Description</i>
1x15 mL	Agent de blocage de la peroxydase PEROXIDASE BLOCK Peroxyde d'hydrogène à 3 % dans de l'eau.
1x15 mL	Agent de liaison biotinylé BIOTINYLATED LINK Immunoglobulines de chèvre anti-lapin et anti-souris marquées à la biotine, isolées par affinité, dans une solution saline de tampon phosphate (PBS), contenant une protéine stabilisante et de l'azide de sodium à 0,015 mol/L.
1x15 mL	Streptavidine-HRP STREPTAVIDIN-HRP Streptavidine conjuguée à de la peroxydase de raifort dans une PBS contenant une protéine stabilisante et des agents antimicrobiens.
1x18 mL	Substrat DAB SUBSTRATE BUFFER Tampon imidazole-HCl, de pH 7,5, contenant du peroxyde d'hydrogène et un agent antimicrobien.
1x1 mL	Chromogène DAB DAB CHROMOGEN 3,3'-diaminobenzidine dans une solution chromogène.
Accessoires	
1	Tube à essai étalonné
1	Pipette Pasteur en plastique

Réf. K0675(11)

Les matériels suivants, en quantité suffisante pour 1100 coupes de tissu, sur la base de 100 µL par coupe, sont inclus dans ce kit :

<i>Quantité</i>	<i>Description</i>
1x110 mL	Agent de liaison biotinylé BIOTINYLATED LINK Immunoglobulines de chèvre anti-lapin et anti-souris marquées à la biotine, isolées par affinité, dans une solution saline de tampon phosphate (PBS), contenant une protéine stabilisante et de l'azide de sodium à 0,015 mol/L.
1x110 mL	Streptavidine-HRP STREPTAVIDIN-HRP Streptavidine conjuguée à de la peroxydase de raifort dans une PBS contenant une protéine stabilisante et des agents antimicrobiens.

Réf. K0675(89)

Les matériels suivants, prêts à être utilisés avec le Dako Autostainer (réf. S3400), sont compris dans ce kit :

<i>Quantité</i>	<i>Description</i>
10x11 mL	Agent de liaison biotinylé BIOTINYLATED LINK Immunoglobulines de chèvre anti-lapin et anti-souris marquées à la biotine, isolées par affinité, dans une solution saline de tampon phosphate (PBS), contenant une protéine stabilisante et de l'azide de sodium à 0,015 mol/L.
10x11 mL	Streptavidine-HRP STREPTAVIDIN-HRP Streptavidine conjuguée à de la peroxydase de raifort dans une PBS contenant une protéine stabilisante et des agents antimicrobiens.

Matériels requis mais non fournis

Chiffons absorbants

Anticorps : anticorps N-Series prêts à l'emploi ou concentrés, dilués dans le Antibody Diluent (réf. S0809 ou S3022)

Antibody Diluent (réf. S0809 ou S3022)

Tissus de contrôle, positifs et négatifs

Contre-colorant, avec base aqueuse, de type Lillie's Modified Mayer's Hematoxylin (réf. S3309)

Lamelles de protection

Eau distillée

Étuve de séchage, capable de maintenir une température de 60 °C ou moins.

Éthanol, absolu et 95 %

Microscope optique (20x–800x)

Milieus de montage tels le Faramount (réf. S3025) ou le Glycergel (réf. C0563)

Réactifs de contrôle négatifs

Lames enduites de poly-L-lysine ou Silanized Slides (réf. S3003)

Cuves de coloration

Chronomètre (pouvant accepter des intervalles de 2 à 10 minutes)

Flacons de lavage

Solution de tampon de lavage

Xylène, toluène ou substituts de xylène

Pour le système LSAB2 K0675 (110 mL), les réactifs suivants sont nécessaires en plus de la liste ci-dessus :

Peroxyde d'hydrogène, solution à 3 % ou Peroxidase Block (réf. S2001)

Solution de substrat chromogène telle AEC Substrate-Chromogen (réf. K3464, 110 mL, prêt à l'emploi) ou Liquid DAB (réf. K3466)

Matériels facultatifs, non fournis

Tampons :

Wash buffer (réf. S3006) pour utilisation dans les procédures automatisées et manuelles

Phosphate buffered saline (réf. S3024)

Tris-buffered saline (réf. S3001 ou S1968)

Enzymes protéolytiques :

Pepsin (réf. S3002)

Proteinase K (réf. S3004 ou S3020)

Proteolytic Enzyme, RTU (réf. S3007)

Autres :

Lames de contrôle positives (disponibles auprès de Dako)

Target Retrieval Solution (réf. S1699 ou S1700)

Target Retrieval Solution, High pH (réf. S3307 ou S3308)

Target Retrieval Solution, pH 9 (réf. S2367 ou S2368)

Chambre d'humidité

Hydroxyde d'ammonium, 15 mol/L, dilué à 0,037 mol/L

Précautions

Spécifiques au produit

1. Pour utilisateurs professionnels.
2. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN_3), 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 explosifs. Lors de l'élimination, rincer abondamment à l'eau pour éviter toute accumulation d'azide métallique dans les canalisations.^{3,4}
3. Les substrats chromogènes AEC et DAB sont sensibles à la contamination de plusieurs agents oxydants tels que les métaux, les bactéries, la poussière et la verrerie de laboratoire couramment utilisée. Afin d'éviter toute contamination et expiration prématurée, ne pas exposer les solutions AEC ou DAB à la moindre source potentielle de contamination et ne jamais pipeter les produits directement dans les flacons. Verser la quantité nécessaire dans des récipients propres et pipeter les solutions dans ces récipients. Ne pas remettre la solution AEC ou DAB non utilisée dans les conteneurs d'origine.
4. Les réactifs fournis sont dilués de façon optimale. Une dilution supplémentaire peut entraîner une perte de coloration des antigènes. Tout changement de la sorte doit être validé par l'utilisateur. Des différences dans les procédures techniques et le traitement des tissus du laboratoire peuvent générer une variabilité significative des résultats, ce qui requiert des contrôles internes réguliers.
5. Ne pas utiliser de réactifs portant un autre numéro de lot ou provenant de kits d'autres fabricants.
6. Des temps ou des températures d'incubation autres que ceux indiqués peuvent produire des résultats erronés et doivent être validés par l'utilisateur.
7. Les enzymes et les chromogènes peuvent être endommagés s'ils sont exposés à une lumière excessive. Ne pas stocker les composants du kit ni effectuer de coloration sous une lumière vive, telle la lumière directe du soleil.

Générales

1. Comme avec tout produit d'origine biologique, des procédures de manipulation appropriées doivent être respectées.
2. Éviter toute contamination microbienne des réactifs sous peine d'obtenir des résultats incorrects.
3. Éviter les éclaboussures de réactifs ou la production d'aérosols.
4. En règle générale, il n'est pas permis aux personnes âgées de moins de 18 ans de manipuler ce produit. Les utilisateurs doivent être informés sur les bonnes procédures, les propriétés dangereuses du produit et les instructions de sécurité nécessaires.
5. Porter un vêtement de protection approprié pour éviter le contact avec les yeux et la peau. Les réactifs non utilisés doivent être éliminés conformément aux réglementations locales et nationales.
6. La Fiche technique de sécurité destinée aux utilisateurs professionnels est disponible sur demande.

Déclarations de risque et de sécurité

K0672 - Substrat chromogène AEC prêt à l'emploi : N,N-diméthylformamide à 1-<10 % / Symbole de danger : Toxique

- R61 Risque pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant.
- S35 Ne se débarrasser de ce produit et de son récipient qu'en prenant toutes précautions d'usage.
- S45 En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (si possible, lui montrer l'étiquette).
- S53 Éviter l'exposition – se procurer des instructions spéciales avant l'utilisation.
Réservé aux utilisateurs professionnels.

K0673 - Chromogène DAB : 1–5 % biphenyl-3,3',4,4'-tétrayltétraammonium tétrachlorure / Symbole de danger : Nocif

- R40 Effet cancérigène suspecté - preuves insuffisantes.
- R43 Peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau.
- R68 Possibilité d'effets irréversibles.
- S35 Ne se débarrasser de ce produit et de son récipient qu'en prenant toutes précautions d'usage.
- S36/37 Porter un vêtement de protection et des gants appropriés.

Conservation

Les réactifs du LSAB2 System, HRP doivent être conservés entre 2 et 8 °C. Ne pas congeler. Ne pas utiliser après la date de péremption imprimée sur l'étiquette des flacons de réactif et du kit. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles indiquées, celles-ci doivent être validées par l'utilisateur.⁵

Les solutions de substrat chromogène AEC et DAB sont instables à des températures supérieures à 8 °C. Utiliser et conserver les solutions de substrat chromogène AEC et DAB dans la plage de températures recommandée (2 à 8 °C). Ces solutions doivent être utilisées immédiatement après leur sortie du réfrigérateur. Après utilisation, les remettre entre 2 et 8 °C dès que possible pour les conserver.

Il n'y a aucun signe évident indiquant l'instabilité de ces produits. Par conséquent, des contrôles positifs et négatifs doivent être testés en même temps que les échantillons de patient. Si une coloration inattendue est observée, qui ne peut être expliquée par un changement des procédures du laboratoire, et en cas de suspicion d'un problème lié au kit, contacter l'assistance technique de Dako.

Préparation des réactifs

Pour des raisons pratiques, il est recommandé de préparer les réactifs suivants avant la coloration.

Solution de tampon de lavage

TBST, 0,05 mol/L Tris Buffered Saline with Tween (réf. S3006) est le tampon de lavage recommandé pour la détection automatisée et manuelle par IHC. TBS, 0,05 mol/L Tris Buffered Saline (réf. S1968) et PBS, 0,02 mol/L Phosphate Buffered Saline (réf. S3024) sont également des solutions de tampon de lavage adaptées pour la coloration manuelle. Les solutions de tampon de lavage contenant de l'azide de sodium ne sont pas recommandées. L'azide de sodium inactive la peroxydase de raifort (HRP) et entraîne une coloration négative.

Conserver le tampon non utilisé entre 2 et 8 °C. Jeter le tampon s'il semble trouble. De l'eau distillée peut être utilisée pour rincer le peroxyde d'hydrogène, la solution substrat chromogène et le contre-colorant.

Anticorps primaire

Une large gamme d'anticorps primaires N-Series prêts à l'emploi et de réactifs de contrôle négatifs sont disponibles pour une utilisation avec les systèmes LSAB2. Dako propose également des anticorps concentrés mais les dilutions optimales doivent être déterminées de façon expérimentale par l'utilisateur. Les dilutions doivent être préparées à l'aide d'Antibody Diluent (réf. S0809) qui contient un tampon Tris-HCl à 0,05 mol/L, de pH 7,2–7,6 et de l'albumine sérique bovine à 1 %. L'albumine sérique bovine agit comme un agent de blocage des protéines et élimine le recours à une incubation séparée avec un agent de blocage des protéines. Antibody Diluent with Background Reducing Components (réf. S3022) est également adapté comme diluant. Un diluant sans protéine de transport n'est pas recommandé.

Pour la plupart des anticorps primaires utilisés avec les systèmes LSAB2, une incubation de 10 minutes suffit.

Réactif de contrôle négatif

Dans l'idéal, un réactif de contrôle négatif contient un anticorps qui ne présente pas de réactivité spécifique aux tissus humains dans la même matrice/solution que l'anticorps primaire dilué. L'anticorps non réactif aux tissus humains doit provenir de la même espèce et sous-espèce animale que l'anticorps primaire et être dilué à la même concentration en immunoglobulines ou protéines que l'anticorps primaire dilué, à l'aide du même diluant. En fonction du type d'anticorps/antisérum primaire utilisé, un sérum normal/non immun de la même espèce animale que l'anticorps primaire, à une concentration en protéines équivalente dans le même diluant, peut convenir. La période d'incubation du réactif de contrôle négatif doit correspondre à celle de l'anticorps/antisérum primaire.

Lors de l'utilisation d'anticorps N-Series prêts à l'emploi de Dako, un ou plusieurs réactif(s) de contrôle négatif(s) (Universal Negative Control) est recommandé. Ces contrôles sont optimisés pour une utilisation avec les anticorps N-Series prêts à l'emploi de souris (réf. N1698) ou de lapin (réf. N1699).

Solution de substrat chromogène

Le système LSAB2 K0672 contient une solution AEC prête à l'emploi, pour application sur les tissus ou les échantillons de cellules. Le système LSAB2 K0673 contient une solution DAB, à préparer de la façon suivante : Ajouter 1 goutte (ou 20 µL) de chromogène DAB par mL de tampon substrat. Utiliser le tube gradué fourni pour mesurer la quantité de tampon substrat nécessaire. Bien mélanger puis appliquer la solution à l'aide de la pipette de transfert fournie. Après utilisation, bien rincer le tube à essai gradué et la pipette avec de l'eau distillée. La solution DAB non utilisée reste stable pendant deux semaines maximum si elle est conservée entre 2 et 8 °C. Si un précipité se forme, bien mélanger avant utilisation. La solution prête à l'emploi AEC Substrate-Chromogène (réf. K3464, 110 mL) ou Liquid DAB (réf. K3466) est recommandée pour une utilisation avec le LSAB2 System, HRP, 110 mL (réf. K0675). Veuillez suivre les instructions fournies avec chaque système de substrat chromogène pour la préparation du substrat chromogène.

Contre-colorant

Le chromogène DAB génère un produit final insoluble dans l'alcool et peut être utilisé avec de l'hématoxyline à base d'alcool. En cas d'utilisation du substrat chromogène AEC, le produit final coloré de la réaction de coloration est soluble dans l'alcool et ne doit être utilisé qu'avec des contre-colorants à base aqueuse telles l'hématoxyline de Mayer. Après contre-coloration à l'hématoxyline, rincer abondamment à l'eau distillée, puis immerger les lames dans un bain d'ammoniaque à 0,037 mol/L. L'ammoniaque à 0,037 mol/L est préparée en mélangeant 2,5 mL d'hydroxyde d'ammonium à 15 mol/L (concentré) dans 1 litre d'eau. L'ammoniaque à 0,037 mol/L non utilisée peut être conservée à température ambiante (20–25 °C) dans un flacon fermé hermétiquement pendant 12 mois maximum. Consulter les instructions du fabricant pour connaître d'autres procédures de contre-coloration.

Milieu de montage

Le Faramount Aqueous Mounting Medium, prêt à l'emploi (réf. S3025) ou le Glycergel Mounting Medium (réf. C0563) sont recommandés pour le montage aqueux. Liquéfier le Glycergel en le chauffant à environ 40 °C (\pm 5 °C) avant utilisation.

Préparation des échantillons

Se référer aux *Instructions générales de coloration immunohistochimique* et/ou à la Fiche technique de l'anticorps.

Avant la coloration IHC, les tissus doivent être fixés et traités. Leur fixation évite l'autolyse et la putréfaction des tissus excisés, préserve l'antigénicité, améliore l'indice de réfraction des composants tissulaires et accroît la résistance des éléments cellulaires au traitement des tissus. Le traitement des tissus inclut la déshydratation, l'élimination des agents déshydratants, l'infiltration du milieu d'inclusion, l'inclusion et la coupe des tissus. Les fixateurs les plus courants pour la préparation IHC des tissus sont présentés dans les *Instructions générales de coloration immunohistochimique*. Il ne s'agit là que de conseils. Les procédures optimales doivent être déterminées et vérifiées par l'utilisateur.

Procédure de coloration

Remarques sur la procédure

L'utilisateur doit lire attentivement les présentes instructions et se familiariser avec le contenu du système avant utilisation.

Les réactifs fournis dans ce kit et les instructions correspondantes ont été conçus pour des performances optimales. Toute dilution supplémentaire des réactifs du kit, ainsi que toute modification des temps et températures d'incubation, peut produire des résultats erronés.

Tous les réactifs du système, excepté le substrat chromogène AEC, doivent être portés à température ambiante (20–25 °C) avant la coloration immunologique. De même, toutes les incubations doivent être effectuées à température ambiante. Le substrat chromogène AEC peut être utilisé dès sa sortie du réfrigérateur et n'a pas besoin d'être à température ambiante avant utilisation. Après utilisation, le replacer entre 2 et 8 °C pour conservation. La conservation à une température supérieure à 8 °C peut nuire à la stabilité du substrat chromogène AEC.

Ne pas laisser les lames sécher pendant la procédure de coloration. Les coupes de tissus séchées peuvent présenter une coloration non spécifique plus importante. Couvrir les lames exposées aux courants d'air. Si la durée d'incubation est prolongée, placer les tissus dans un environnement humide.

Si le protocole de coloration doit être interrompu, les lames peuvent être maintenues dans un bain de tampon après incubation de l'anticorps de liaison (étape 3) pendant une heure maximum à température ambiante (20–25 °C) sans que cela n'affecte les performances de la coloration.

La sensibilité du LSAB2 System, HRP peut être augmentée en portant la durée d'incubation des étapes 2 et 3 de 4 à 30 minutes (\pm 5 minutes) chacune.

Protocole de coloration

ÉTAPE 1 AGENT DE BLOCAGE DE LA PEROXYDASE

Tapoter pour enlever l'excès de liquide. Avec un tissu non pelucheux (ex. : Kimwipe ou gaze), essuyer avec précaution autour de l'échantillon pour enlever tout liquide restant et maintenir les réactifs dans la zone indiquée.

Appliquer suffisamment d'agent de blocage de la peroxydase pour recouvrir l'échantillon.

Incuber pendant 5 minutes (\pm 1 minute).

Rincer doucement à l'eau distillée ou avec une solution tampon contenue dans un flacon de lavage (ne pas diriger le jet directement sur les tissus) et placer dans un bain de tampon renouvelé.

ÉTAPE 2 ANTICORPS PRIMAIRE OU RÉACTIF DE CONTRÔLE NÉGATIF

Tapoter pour enlever l'excès de liquide et essuyer les lames comme décrit ci-avant.

Appliquer suffisamment d'anticorps primaire ou de réactif de contrôle négatif pour recouvrir l'échantillon.

Incuber pendant 10 minutes (\pm 1 minute) sauf mention contraire.

Rincer doucement avec une solution tampon contenue dans un flacon de lavage (ne pas diriger le jet directement sur les tissus) et placer dans un bain de tampon renouvelé.

ÉTAPE 3 AGENT DE LIAISON BIOTINYLÉ

Tapoter immédiatement pour enlever l'excès de tampon et essuyer les lames comme décrit ci-avant.

Appliquer suffisamment de gouttes JAUNES d'anticorps de liaison pour recouvrir l'échantillon.

Incuber pendant 10 minutes (\pm 1 minute).

Rincer les lames comme indiqué à l'étape 2.

Si le protocole de coloration doit être interrompu, les lames peuvent être maintenues dans un bain de tampon après incubation de l'anticorps de liaison (étape 3) pendant une heure maximum à température ambiante (20–25 °C) sans que cela n'affecte les performances de la coloration.

ÉTAPE 4 STREPTAVIDINE-HRP

Essuyer les lames comme décrit ci-avant.
Appliquer suffisamment de gouttes ROUGES de streptavidine pour recouvrir l'échantillon.
Incuber pendant 10 minutes (\pm 1 minute).
Rincer les lames comme indiqué ci-avant.

ÉTAPE 5 SOLUTION DE SUBSTRAT CHROMOGÈNE

Retirer les solutions de substrat chromogène AEC ou DAB du lieu de conservation compris entre 2 et 8 °C. Pour la préparation du DAB, se référer à la section Préparation des réactifs.
Essuyer les lames comme décrit ci-avant.
Appliquer suffisamment de solution de substrat chromogène AEC ou DAB pour recouvrir l'échantillon. Remettre la solution de substrat chromogène AEC ou DAB dans le réfrigérateur.
Incuber pendant 10 minutes (\pm 1 minute) pour la solution AEC et 5 à 10 minutes pour la solution DAB.
Rincer doucement avec de l'eau distillée contenue dans un flacon de lavage (ne pas diriger le jet directement sur les tissus).
Recueillir les déchets des solutions de substrat chromogène DAB ou AEC dans un conteneur pour déchets biologiques pour les éliminer de manière appropriée.

ÉTAPE 6 CONTRE-COLORATION À L'HÉMATOXYLINE (FACULTATIF)

Immerger les lames dans un bain d'hématoxyline. Incuber pendant 2 à 5 minutes, en fonction de la puissance de l'hématoxyline utilisée.
Rincer doucement dans un bain d'eau distillée.
Tremper les lames 10 fois dans un bain d'ammoniaque à 0,037 mol/L (facultatif).
Rincer les lames dans un bain d'eau distillée ou déionisée pendant 2 à 5 minutes.

ÉTAPE 7 MONTAGE

Les échantillons peuvent être montés et recouverts en utilisant un milieu de montage aqueux de type Faramount (réf. S3025) ou Glycergel (réf. C0563).

Remarque : Le produit de la réaction AEC est soluble dans des solvants organiques et n'est donc pas compatible avec les milieux de montage permanents comportant du toluène ou du xylène.

Remarque : La solution DAB peut être montée avec n'importe quel milieu de montage permanent.

Remarque : Les lames peuvent être lues à tout moment. Cependant, une atténuation peut se produire si les lames sont exposées à une lumière vive pendant plus d'une semaine. Pour limiter cette atténuation, conserver les lames dans l'obscurité à température ambiante (20–25 °C).

Contrôle qualité

Les différences dans les procédures techniques et le traitement des tissus du laboratoire peuvent générer une variabilité significative des résultats, ce qui requiert des contrôles internes réguliers.

Consulter les consignes de contrôle qualité du Certification Program for Immunohistochemistry du College of American Pathologists (CAP) et les références 6 à 8 pour plus d'informations. Consulter la notice de chaque anticorps primaire utilisé pour plus de détails concernant la sensibilité et l'immunoréactivité.

Consulter les *Instructions générales de coloration immunohistochimique* pour plus d'informations sur les contrôles positifs et négatifs.

Interprétation de la coloration

Consulter les *Instructions générales de coloration immunohistochimique* pour les consignes d'interprétation.

Limites générales

Consulter les *Instructions générales de coloration immunohistochimique* pour les limites générales.

Limites spécifiques au produit

Dako fournit les réactifs du système LSAB2 à une dilution optimale pour une utilisation conforme aux instructions fournies pour l'IHC sur des coupes de tissus inclus en paraffine, des cryostats et des frottis sanguins. Toute modification par rapport aux procédures de test recommandées peut invalider les résultats attendus et obtenus ; les contrôles appropriés doivent donc être utilisés et notés. Les utilisateurs ne respectant pas les procédures de test recommandées doivent accepter la responsabilité de l'interprétation des résultats du patient.

Une activité endogène de liaison à l'avidine a été notée dans des coupes congelées de tissu hépatique (nodule hépatique entier) et rénal (épithélium tubulaire), ainsi que dans des tissus lymphoïdes congelés et fixés au formol (histiocytes paracorticaux).⁹⁻¹² Cette activité peut être éliminée par des incubations séquentielles de 20 minutes, d'abord dans de l'avidine à 0,1 % puis dans de la biotine à 0,01 % mélangée à un tampon Tris-HCl à 0,05 mol/L, de pH 7,2–7,6, avant la coloration ou l'utilisation du Biotin Blocking System (réf. X0590).

Une activité endogène peroxydasique ou pseudoperoxydasique peut se manifester dans les hémoprotéines comme l'hémoglobine, la myoglobine, le cytochrome et la catalase, ainsi que dans les éosinophiles.^{13,14} Dans les tissus fixés au formol, cette activité peut être inhibée en incubant les échantillons avec du peroxyde d'hydrogène à 3 % pendant 5 minutes avant application de l'anticorps primaire. Les frottis sanguins et médullaires, ainsi que les tissus congelés peuvent être traités à l'aide du réactif Peroxidase Blocking Reagent (réf. S2001). Cependant, cette procédure n'élimine pas le pigment rouge marron des hémoprotéines. Il est également possible d'utiliser une solution de méthanol-péroxyde d'hydrogène. Certains antigènes peuvent être dénaturés au cours de cette procédure.

Les réactifs peuvent présenter des réactions inattendues dans des tissus non testés précédemment. La possibilité de réactions inattendues dans les groupes de tissus préalablement testés ne peut pas être complètement écartée, du fait de la variabilité biologique de l'expression antigénique dans les néoplasmes ou autres tissus pathologiques.⁸ Contacter l'assistance technique Dako pour faire part de ces réactions inattendues.

Les tissus de patients infectés par le virus de l'hépatite B et porteurs de l'antigène de surface de l'hépatite B (HBsAg) peuvent présenter une coloration non spécifique avec la peroxydase de raifort.¹⁵

Dépannage

<i>Problème</i>	<i>Cause probable</i>	<i>Action recommandée</i>
1. Coloration d'aucune lame.	1a. Les réactifs n'ont pas été utilisés dans l'ordre. 1b. Azide de sodium dans un bain de tampon. 1c. Réactif de substrat chromogène mélangé de manière incorrecte.	1a. Revoir l'application des réactifs. 1b. Utiliser un nouveau tampon sans azide. 1c. Préparer une nouvelle solution de substrat chromogène selon le protocole du kit.
2. Coloration faible de toutes les lames.	2a. Les coupes conservent trop de solution après un bain de lavage. 2b. Les lames ne sont pas incubées assez longtemps avec les réactifs. 2c. Contre colorant ou milieu de montage incompatible qui dissout le produit de réaction.	2a. Tapoter doucement pour éliminer l'excès de solution avant d'essuyer autour des coupes. 2b. Revoir les temps d'incubation recommandés. 2c. Pour les lames colorées avec l'AEC, utiliser uniquement des contre-colorants et des milieux de montage aqueux.
3. Coloration de fond excessive dans toutes les lames, y compris les lames de contrôle négatives.	3a. Les échantillons présentent une forte activité peroxydasique endogène. 3b. La paraffine n'a pas été complètement enlevée. 3c. Les lames ne sont pas bien rincées. 3d. La réaction du substrat est plus rapide que la normale du fait d'une température ambiante trop élevée. 3e. Les coupes ont séché au cours de la procédure de coloration. 3f. Liaison non spécifique des réactifs aux coupes de tissus. 3g. Anticorps primaire trop concentré.	3a. Incuber les lames avec du peroxyde d'hydrogène renouvelé. 3b. Utiliser de nouveaux bains de xylène ou de toluène. 3c. Utiliser de nouvelles solutions dans les bains de tampon et les bains de lavage. 3d. Raccourcir le temps d'incubation avec la solution de substrat chromogène. 3e. Utiliser une chambre humide. Essuyer seulement trois à quatre lames en même temps avant d'appliquer le réactif. 3f. Utiliser les diluants d'anticorps Dako ou ajouter 1 % d'albumine sérique bovine au diluant d'anticorps. Une autre solution consiste à utiliser un tampon Tris à 0,05 mol/L contenant du NaCl à 0,3 mol/L et du Tween 20 à 0,1 %, de pH 7,2–7,6 (réf. S3306) comme tampon de lavage. L'incubation d'un réactif de blocage des protéines séparé (réf. X0909) avant l'application de l'anticorps primaire peut également être nécessaire. 3g. Utiliser une dilution plus élevée de l'anticorps primaire.
4. Les coupes tissulaires se détachent des lames.	4a. Utilisation de lames inadéquates.	4a. Utiliser des lames enduites de poly-L-lysine pour la plupart des colorations. Pour les anticorps primaires qui requièrent des techniques de restauration des cibles, utiliser des Silanized Slides.
5. Coloration spécifique trop forte.	5a. Anticorps primaire trop concentré.	5a. Effectuer des dilutions en série de l'anticorps primaire pour déterminer la dilution optimale.

- | | |
|---|---|
| 5b. Incubation trop longue pour l'anticorps primaire, l'agent de liaison biotinylé ou la streptavidine-HRP. | 5b. Déterminer le protocole de coloration approprié pour l'anticorps, c'est-à-dire la durée d'incubation de l'anticorps primaire, de l'agent de liaison biotinylé ou de la streptavidine-HRP. |
|---|---|

Remarque : Si le problème ne peut pas être attribué à l'une des causes mentionnées ci-avant, ou si l'action corrective échoue, appeler l'assistance technique de Dako pour obtenir de l'aide.

Pour plus d'informations sur les techniques de coloration et la préparation des échantillons, consulter les ouvrages *Immunohistochemical Staining Methods*¹⁰ (disponible auprès de Dako), *Atlas of Immunohistology*¹⁶ et *Immunoperoxidase Techniques, A Practical Approach to Tumor Diagnosis*¹⁷.

Deutsch

Code-Nr. K0672 15 mL

Code-Nr. K0673 15 mL

Code-Nr. K0675 110 mL

Zweckbestimmung

Zur In-vitro-Diagnostik.

Diese Anweisungen gelten für das Universal Dako Labelled Streptavidin-Biotin2 System, Horseradish Peroxidase (LSAB2 System, HRP). Dieses System dient zur qualitativen Identifizierung von Antigenen in paraffineingebetteten Geweben, Kryostatgeweben und Zellpräparaten durch Lichtmikroskopie und Immunhistochemie unter Verwendung vom Anwender bereitgestellter primärer **Maus-** bzw. **Kaninchen-** Antikörper bei der Diagnose von pathologischen Störungen. Es können Gewebe verwendet werden, die mit unterschiedlichen Fixiermitteln wie Ethanol, B-5, Bouin-Lösung, Zink-Formalin und neutralem gepuffertem Formalin behandelt wurden.

Folgende Angaben bitte den *Allgemeinen Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung* von Dako oder den Anweisungen des Detektionssystems für IHC-Verfahren entnehmen: 1) Verfahrensprinzip, 2) Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien, 3) Aufbewahrung, 4) Vorbereitung der Probe, 5) Färbeverfahren, 6) Qualitätskontrolle, 7) Fehlersuche und -behebung, 8) Auswertung der Färbung, 9) Allgemeine Einschränkungen.

Zusammenfassung und Erklärung

Das LSAB2 System, HRP verwendet ein modifiziertes Verfahren mit markiertem Avidin-Biotin (LAB), bei der ein biotinylierter sekundärer Antikörper einen Komplex mit Peroxidase-konjugierten Streptavidin-Molekülen bildet.¹ Im Vergleich zur ABC-Methode ist die LAB/LSAB Methode laut Berichten vier bis acht Mal empfindlicher.² Giorno, et al² führen die erhöhte Sensitivität auf die im Vergleich mit dem Avidin-Biotin-Enzymkomplex der ABC-Methode kleinere Größe des Enzym-markierten (Strept)avidin-Komplexes der LAB/LSAB-Methode zurück. Die klinische Auswertung vorhandener oder fehlender Färbungen sollte durch morphologische und histologische Untersuchungen mit entsprechenden Kontrollen ergänzt werden. Auswertungen müssen von einer qualifizierten Person unter Berücksichtigung der Krankengeschichte und anderer Diagnostiktests des Patienten vorgenommen werden.

Verfahrensprinzip

Das LSAB2 System, HRP ist ein empfindliches und vielseitiges IHC-Verfahren, das die simultane Verarbeitung einer großen Zahl von Proben mit primären Kaninchen- oder Maus-Antikörpern in weniger als einer Stunde ermöglicht. Die endogene Peroxidase-Aktivität wird durch Inkubation der Probe für 5 Minuten mit 3 % Wasserstoffperoxid unterdrückt. Danach wird die Probe mit einem entsprechend charakterisierten und verdünnten primären Kaninchen- oder Maus-Antikörper inkubiert, gefolgt von sequentiellen 10-minütigen Inkubationen mit einem biotinylierten Link-Antikörper (der Anti-Kaninchen- und Anti-Maus-Immunglobuline enthält) und Peroxidase-markiertem Streptavidin. Die Färbung wird nach Inkubation mit dem Substratchromogen (AEC oder DAB) erreicht. Bei AEC in K0672 wird die Färbung durch eine 10-minütige Inkubation mit 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) Substratchromogen abgeschlossen, was zu einem rotgefärbten Präzipitat an der Antigenstelle führt. Bei DAB in K0673 wird die Färbung durch eine 5- bis 10-minütige Inkubation mit 3-3'-Diaminobenzidin (DAB) Substratchromogen abgeschlossen, was zu einem braungefärbten Präzipitat an der Antigenstelle führt.

Mitgelieferte Reagenzien

Code-Nr. K0672

Die folgenden Materialien sind in diesem Kit enthalten und reichen für 150 Gewebeschnitte, berechnet für 100 µL pro Schnitt.

Menge
1 x 15 mL

Beschreibung
Peroxidase-Block

PEROXIDASE BLOCK

3 % Wasserstoffperoxid in Wasser.

1 x 15 mL

Link-Antikörper

BIOTINYLATED LINK

Biotinylierte Ziegen-Anti-Maus- und Ziegen-Anti-Kaninchen-Immunglobuline in phosphatgepuffertter Kochsalzlösung (PBS) mit einem stabilisierenden Protein und 0,015 mol/L Natriumazid.

- 1 x 15 mL **Streptavidin-HRP**
STREPTAVIDIN-HRP
 Mit Meerrettichperoxidase konjugiertes Streptavidin in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) mit einem stabilisierenden Protein und antimikrobiellen Wirkstoffen.
- 1 x 15 mL **AEC Substratchromogen**
AEC SUBSTRATE CHROMOGEN READY-TO-USE
 AEC in N,N-Dimethylformamid (DMF) und Azetatpuffer, pH 5,0, mit Wasserstoffperoxid, Stabilisatoren, Verstärker und einem antimikrobiellen Wirkstoff. Bei 2–8 °C aufbewahren.

Code-Nr. K0673

Die folgenden Materialien sind in diesem Kit enthalten und reichen für 150 Gewebeschnitte, berechnet für 100 µL pro Schnitt.

<i>Menge</i>	<i>Beschreibung</i>
1 x 15 mL	Peroxidase-Block PEROXIDASE BLOCK 3 % Wasserstoffperoxid in Wasser.
1 x 15 mL	Biotinylierter Link BIOTINYLATED LINK Biotinylierte Ziegen-Anti-Maus- und Ziegen-Anti-Kaninchen-Immunglobuline in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) mit einem stabilisierenden Protein und 0,015 mol/L Natriumazid.
1 x 15 mL	Streptavidin-HRP STREPTAVIDIN-HRP Mit Meerrettichperoxidase konjugiertes Streptavidin in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) mit einem stabilisierenden Protein und antimikrobiellen Wirkstoffen.
1 x 18 mL	Substrat DAB SUBSTRATE BUFFER Imidazol-HCl-Puffer pH 7,5, enthält Wasserstoffperoxid und einen antimikrobiellen Wirkstoff.
1 x 1 mL	DAB-Chromogen DAB CHROMOGEN 3,3'-Diaminobenzidin in Chromogenlösung.
<i>Zubehör</i>	
1	Kalibriertes Teströhrchen
1	Pasteur-Pipette aus Plastik

Code-Nr. K0675(11)

Die folgenden Materialien sind in diesem Kit enthalten und reichen für 1100 Gewebeschnitte, berechnet für 100 µL pro Schnitt.

<i>Menge</i>	<i>Beschreibung</i>
1 x 110 mL	Biotinylierter Link BIOTINYLATED LINK Biotinylierte Ziegen-Anti-Maus- und Ziegen-Anti-Kaninchen-Immunglobuline in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) mit einem stabilisierenden Protein und 0,015 mol/L Natriumazid.
1 x 110 mL	Streptavidin-HRP STREPTAVIDIN-HRP Mit Meerrettichperoxidase konjugiertes Streptavidin in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) mit einem stabilisierenden Protein und antimikrobiellen Wirkstoffen.

Code-Nr. K0675(89)

Dieses Kit enthält folgende Materialien zur Verwendung mit dem Dako Autostainer (Code-Nr. S3400):

<i>Menge</i>	<i>Beschreibung</i>
10 x 11 mL	Biotinylierter Link

BIOTINYLATED LINK

Biotinylierte Ziegen-Anti-Maus- und Ziegen-Anti-Kaninchen-Immunglobuline in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) mit einem stabilisierenden Protein und 0,015 mol/L Natriumazid.

10 x 11 mL	Streptavidin-HRP
------------	-------------------------

STREPTAVIDIN-HRP

Mit Meerrettichperoxidase konjugiertes Streptavidin in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) mit einem stabilisierenden Protein und antimikrobiellen Wirkstoffen.

Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien

Absorbierende Tücher

Antikörper: Gebrauchsfertige oder konzentrierte Antikörper der N-Serie in Antibody Diluent (Code-Nr. S0809 oder S3022) verdünnt

Antibody Diluent (Code-Nr. S0809 oder S3022)

Kontrollgewebe, positiv und negativ

Gegenfärbemittel; wässrig, wie Lillie's Modified Mayer's Hematoxylin (Code-Nr. S3309)

Deckgläser

Destilliertes Wasser

Trockenofen, der imstande ist, eine Temperatur von 60 °C oder weniger aufrechtzuerhalten.

Ethanol, absolut und 95 %

Lichtmikroskop (20–800fache Vergrößerung)

Fixiermittel, z.B. Faramount (Code-Nr. S3025) oder Glycergel (Code-Nr. C0563)

Negative Kontrollreagenzien

Objektträger, Poly-L-Lysin beschichtet oder Silanized Slides (Code-Nr. S3003)

Färbeschalen oder Bäder

Zeitmesser (muss Intervalle von 2–10 Minuten anzeigen können)

Waschflaschen

Waschpufferlösung

Xylol, Toluol oder Xylolersatz

Für das K0675 LSAB2 System (110 mL) sind zusätzlich zu obiger Liste die folgenden Reagenzien erforderlich:

Wasserstoffperoxid, 3 % Lösung oder Peroxidase Block (Code-Nr. S2001)

Substratchromogen-Lösung wie AEC Substrate-Chromogen (Code-Nr. K3464, 110 mL, gebrauchsfertig) oder Liquid DAB (Code-Nr. K3466)

Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien (optional)

Puffer:

Wash buffer (Code-Nr. S3006) für die automatische oder manuelle Verwendung

Phosphate buffered saline (Code-Nr. S3024)

Tris-buffered saline (Code-Nr. S3001 oder S1968)

Proteolytische Enzyme:

Pepsin (Code-Nr. S3002)

Proteinase K (Code-Nr. S3004 oder S3020)

Proteolytic Enzyme, RTU (Code-Nr. S3007)

Weitere Materialien:

Positivkontrollobjektträger (erhältlich von Dako)

Target Retrieval Solution (Code-Nr. S1699 oder S1700)

Target Retrieval Solution, High pH (Code-Nr. S3307 oder S3308)

Target Retrieval Solution, pH 9 (Code-Nr. S2367 oder S2368)

Feuchtigkeitskammer

Ammoniumhydroxid, 15 mol/L, verdünnt auf 0,037 mol/L

Vorsichtsmaßnahmen

Produktspezifisch

1. Zur klinischen Anwendung.
2. Dieses Produkt enthält Natriumazid (NaN₃), eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. Ansammlungen von Natriumazid können auch in Konzentrationen, die nicht als gefährlich klassifiziert sind, mit Blei- und Kupferabflussrohren reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Nach der Entsorgung stets mit viel Wasser nachspülen, um Ansammlungen von Metallaziden in den Leitungen vorzubeugen.^{3,4}
3. AEC- und DAB-Substratchromogene reagieren empfindlich auf Verunreinigungen durch verschiedene oxidierende Mittel wie Metalle, Bakterien, Staub und gewöhnliche Laborreagenzgläser. Um Verunreinigungen und einen frühzeitigen Verfall zu vermeiden, muss Kontakt der AEC- oder DAB-Lösungen mit möglichen Verunreinigungsquellen vermieden werden und es darf nie direkt aus der Flasche pipettiert werden. Erforderliche Menge in sauberen Behälter gießen und daraus pipettieren. Überschüssige AEC- oder DAB-Lösung nicht in Aufbewahrungsbehälter zurückgießen.
4. Die mitgelieferten Reagenzien sind optimal verdünnt. Weitere Verdünnung kann zu einer geringeren Antigenfärbung führen. Jegliche Veränderungen müssen vom Benutzer validiert werden. Da Unterschiede bei der Gewebeverarbeitung und technischen Verfahren im Labor des Anwenders zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen führen können, müssen regelmäßige Leistungskontrollen vor Ort durchgeführt werden.
5. Keine Reagenzien aus anderen Chargen oder aus Kits anderer Hersteller verwenden.
6. Andere als die angegebenen Inkubationszeiten und -temperaturen können zu fehlerhaften Ergebnissen führen; solche Abänderungen müssen vom Anwender validiert werden.
7. Zu starke Lichteinstrahlung kann für Enzyme und Chromogene schädlich sein. Kit-Komponenten nicht bei starker Lichteinwirkung lagern und Färbungen nicht bei hellem Licht, wie z.B. direktem Sonnenlicht, vornehmen.

Allgemein

1. Wie alle Produkte biologischen Ursprungs müssen auch diese entsprechend gehandhabt werden.
2. Mikrobielle Verunreinigung der Reagenzien vermeiden, da diese zu inkorrekten Ergebnissen führt.
3. Verspritzen der Reagenzien oder die Bildung von Aerosolen vermeiden.
4. Personen unter 18 Jahren dürfen mit diesem Produkt grundsätzlich nicht arbeiten. Alle Anwender müssen sorgfältig in das richtige Arbeitsverfahren, die gefährlichen Eigenschaften des Produkts und die notwendigen Sicherheitsmaßnahmen eingewiesen werden.
5. Entsprechende Schutzkleidung tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden. Nicht verwendete Reagenzien sind entsprechend örtlichen, staatlichen und bundesstaatlichen Richtlinien zu entsorgen.
6. Auf Anfrage ist für Fachpersonal ein Sicherheitsdatenblatt erhältlich.

Risiko- und Sicherheitsangaben

K0672 – AEC Substratchromogen gebrauchsfertig: 1-<10 % N,N-Dimethylformamid / Gefahrensymbol: Giftig

- R61 Kann zu Schäden beim ungeborenen Kind führen.
S35 Abfälle und Behälter müssen auf sichere Weise entsorgt werden.
S45 Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (*wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen*).
S53 Exposition vermeiden – vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
Nur für Fachpersonal bestimmt.

K0673 – DAB-Chromogen: 1–5 % Biphenyl-3,3',4,4'-Tetrayltetraammonium-Tetrachlorid / Gefahrensymbol: Gesundheitsschädlich

- R40 Krebsereggende Wirkung nicht auszuschließen.
R43 Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich.
R68 Irreversibler Schaden möglich.
S35 Abfälle und Behälter müssen auf sichere Weise entsorgt werden.
S36/37 Entsprechende Schutzkleidung und Handschuhe tragen.

Lagerung

Reagenzien des LSAB2 System, HRP bei 2–8 °C aufbewahren. Nicht einfrieren. Nicht nach Ablauf des auf den Reagenzgläsern oder Kit-Etiketten aufgedruckten Verfallsdatums verwenden. Falls die Reagenzien unter anderen als den angegebenen Bedingungen aufbewahrt werden, müssen sie vom Benutzer validiert werden.⁵

Bei Temperaturen von über 8 °C sind die AEC- und DAB-Substratchromogenlösungen instabil. AEC- und DAB-Substratchromogenlösungen im empfohlenen Temperaturbereich von 2–8 °C aufbewahren. Diese Lösungen müssen sofort nach Entnahme aus dem Kühlschrank verwendet werden. Nach Verwendung so schnell wie möglich in den Kühlschrank (2–8 °C) zurückstellen.

Es gibt keine offensichtlichen Anzeichen für eine eventuelle Produktinstabilität. Positiv- und Negativkontrollen sollten daher zum gleichen Zeitpunkt wie die Patientenproben getestet werden. Falls es zu einer unerwarteten Färbung kommt, die sich nicht aus Unterschieden bei Laborverfahren erklären lässt und auf ein Problem mit dem Kit hindeutet, muss der technische Kundendienst von Dako verständigt werden

Vorbereitung der Reagenzien

Es wird empfohlen, die folgenden Reagenzien vor der Färbung anzusetzen.

Waschpufferlösung

TBST, 0,05 mol/L Tris Buffered Saline with Tween (Code-Nr. S3006) ist der empfohlene Waschpuffer für den automatischen und manuellen IHC-Nachweis. TBS, 0,05 mol/L Tris Buffered Saline (Code-Nr. S1968) und PBS, 0,02 mol/L Phosphate Buffered Saline (Code-Nr. S3024) eignen sich ebenfalls als Waschpufferlösungen für manuelles Färben. Waschpufferlösungen mit Natriumazid werden nicht empfohlen. Natriumazid inaktiviert die Meerrettichperoxidase (HRP) und führt zu einer negativen Färbung.

Nicht verwendeten Puffer bei 2–8 °C aufbewahren. Getrübten Puffer verwerfen. Wasserstoffperoxid, Substratchromogen und Gegenfärbemittel können mit destilliertem Wasser gespült werden.

Primärer Antikörper

Für die Verwendung mit LSAB2-Systemen sind eine Vielzahl von gebrauchsfertigen primären Antikörpern der N-Serie und Negativkontrollreagenzien erhältlich. Konzentrierte Antikörper sind ebenfalls von Dako erhältlich, die optimale Verdünnung muss jedoch vom Benutzer experimentell bestimmt werden. Verdünnungen sollten mit Antibody Diluent (Code-Nr. S0809), der 0,05 mol/L Tris-HCl-Puffer, pH 7,2–7,6 und 1 % Rinderserum-Albumin (BSA) enthält, zubereitet werden. Das BSA agiert als Proteinblock und eliminiert die Notwendigkeit einer separaten Inkubation mit Protein-Block-Reagenz. Antibody Diluent with Background Reducing Components (Code-Nr. S3022) ist ebenfalls als Verdünnungsmittel geeignet. Verdünnungen ohne Proteinträger sind nicht zu empfehlen.

Bei den meisten mit LSAB2-Systemen verwendeten primären Antikörpern ist eine Inkubation von 10 Minuten ausreichend.

Negatives Kontrollreagenz

Ein negatives Kontrollreagenz enthält im Idealfall einen Antikörper, der keine spezifische Reaktivität mit menschlichen Geweben aufweist (nicht-reaktiv mit Humangewebe) in der gleichen Grundsubstanz/Lösung wie der primäre Antikörper. Bei dem mit Humangewebe nicht-reaktiven Antikörper sollte es sich um dieselbe Subklasse handeln und er sollte derselben Tierart entstammen wie der primäre Antikörper. Er ist mit derselben Grundsubstanz/Lösung auf dieselbe Immunglobulin- oder Proteinkonzentration wie der verdünnte primäre Antikörper zu verdünnen. Geeignet ist je nach Typ des verwendeten primären Antikörpers/Antiserums normales/nichtimmunes Serum desselben tierischen Ursprungs wie der primäre Antikörper in einer dem verdünnten primären Antikörper äquivalenten Proteinkonzentration in der gleichen Grundsubstanz/Lösung. Die Inkubationszeit für das negative Kontrollreagenz sollte mit der für den primären Antikörper/das primäre Antiserum übereinstimmen.

Bei Verwendung der gebrauchsfertigen Dako Antikörper der Serie N wird (werden) Universal Negative Control(s) als Negativkontrollen empfohlen. Diese Kontrollen sind für gebrauchsfertige Maus-Antikörper (Code-Nr. N1698) oder Kaninchen-Antikörper (Code-Nr. N1699) der N-Serie optimiert.

Substratchromogenlösung

Das K0672 LSAB2 System enthält gebrauchsfertiges AEC, das sofort auf Gewebe oder Zellproben aufgetragen werden kann. Das K0673 LSAB2 System enthält DAB, das wie folgt zubereitet wird: 1 Tropfen (oder 20 µL) DAB-Chromogen pro mL Substrat-Puffer zugeben. Mit dem mitgelieferten Messröhrchen die erforderliche Substrat-Puffermenge abmessen. Gut mischen und Lösung mit der mitgelieferten Transferpipette auftragen. Nach der Verwendung des Messröhrchen und die Pipette gründlich mit destilliertem Wasser spülen. Nicht verwendete DAB-Arbeitslösung ist bis zu zwei Wochen stabil, wenn sie bei 2–8 °C aufbewahrt wird. Bei Präzipitatbildung vor Verwendung gut durchmischen. Ready-to-use AEC Substrate-Chromogen Solution (Code-Nr. K3464, 110 mL) oder Liquid DAB (Code-Nr. K3466) wird für das LSAB2-System, HRP, 110 mL (Code-Nr. K0675) empfohlen. Für die Substratchromogen-Präparation sind die mit dem Substratchromogen-System gelieferten Anweisungen zu befolgen.

Gegenfärbung

DAB-Chromogen ergibt ein nicht alkohollösliches Endprodukt und kann mit Hematoxylin auf Alkoholbasis verwendet werden. Wenn AEC Substratchromogen verwendet wird, ist das gefärbte Endprodukt der Färbereaktion alkohollöslich und sollte nur mit wässrigen Gegenfarbstoffen wie Mayer-Hämatoxylin verwendet werden. Objektträger nach der Gegenfärbung mit Hämatoxylin gründlich in destilliertem Wasser spülen, dann in ein Bad mit 0,037 mol/L Ammoniakwasser tauchen. 0,037 mol/L Ammoniakwasser wird durch Mischen von 2,5 mL konzentriertem (15 mol/L) Ammoniumhydroxid mit 1 Liter Wasser zubereitet. Nicht verwendetes 0,037 mol/L Ammoniakwasser kann bei Raumtemperatur (20–25 °C) in einer gut verschlossenen Flasche bis zu 12 Monate aufbewahrt werden. Für alternative Färbeverfahren die Herstellerrichtlinien zu Rate ziehen.

Fixiermittel

Zur wässrigen Fixierung werden Fixiermittel wie Faramount Aqueous Mounting Medium, gebrauchsfertig (Code-Nr. S3025) oder Glycergel Mounting Medium (Code-Nr. C0563) empfohlen. Glycergel vor Gebrauch durch Erwärmen auf ungefähr 40 (± 5) °C verflüssigen.

Vorbereitung der Probe

Siehe *Allgemeine Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung* und/oder Datenblatt des Antikörpers.

Vor der IHC-Färbung muss das Gewebe fixiert und verarbeitet werden. Eine Fixierung schützt vor Autolyse und Zerfall des exzidierten Gewebes, erhält die Antigenität, verstärkt den Refraktionsindex der Gewebeteile und steigert die Resistenz der Zellelemente gegen Gewebeverarbeitung. Zur Gewebeverarbeitung gehört Dehydrierung, Abscheidung von Dehydrierungsmitteln, Infiltration des Einbettungsmediums, Einbetten und Schneiden des Gewebes. Die am häufigsten verwendeten Fixiermittel für IHC-Gewebepräparate sind in den *Allgemeinen Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung* aufgeführt. Diese Angaben sind nur Richtlinien. Optimale Verfahren müssen vom Anwender selbst ermittelt und verifiziert werden.

Färbeverfahren

Hinweise

Vor der Verwendung sollte der Anwender diese Anweisungen sorgfältig durchlesen und sich mit dem Inhalt des Systems vertraut machen.

Die in diesem System enthaltenen Anweisungen und Reagenzien wurden für eine optimale Leistung konzipiert. Weitere Verdünnungen der System-Reagenzien oder Abänderungen der Inkubationszeiten können zu fehlerhaften Ergebnissen führen.

Vor Beginn der Immunfärbung alle Reagenzien, außer AEC-Substratchromogen, auf Raumtemperatur (20–25 °C) bringen. Alle Inkubationen sollten ebenfalls bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Der Einfachheit halber kann das AEC-Substratchromogen gleich nach Entnahme aus dem Kühlschrank verwendet werden und muss vor der Verwendung nicht auf Raumtemperatur gebracht werden. Nach Verwendung wieder im Kühlschrank auf 2–8 °C abkühlen lassen. Durch Aufbewahrung des AEC-Substratchromogens bei Temperaturen von über 8 °C wird die Stabilität beeinträchtigt.

Gewebeschnitte dürfen während der Färbung nicht austrocknen. Trockene Gewebeschnitte können unspezifische Färbungen aufweisen. Dem Luftzug ausgesetzte Objektträger abdecken. Falls längere Inkubationszeiten erforderlich sind, die Gewebe in eine feuchte Umgebung stellen.

Falls das Färbeverfahren unterbrochen werden muss, können Objektträger nach der Inkubation des primären Link-Antikörpers (Schritt 3) bis zu einer Stunde bei Raumtemperatur (20–25 °C) in einem Pufferbad belassen werden, ohne dass die Färbung beeinträchtigt wird.

Die Sensitivität des LSAB2 System, HRP kann weiter gesteigert werden, indem die Inkubationszeiten der Schritte 2, 3 und 4 jeweils um 30 (±5) Minuten verlängert werden.

Färbeprotokoll

SCHRITT 1 PEROXIDASE-BLOCK

Überschüssige Flüssigkeit abklopfen. Mit einem flusenfreien Tuch (z.B. Kimwipe oder Gaze) sorgfältig den Bereich um die Probe herum abtupfen, um restliche Flüssigkeit zu entfernen und um das Reagenz an der vorgesehenen Stelle zu behalten.

Genügend Peroxidase-Block zugeben, um die Probe zu bedecken.

5 (±1) Minuten inkubieren.

Mit destilliertem Wasser oder Pufferlösung aus einer Waschflasche (Strahl nicht direkt auf das Gewebe richten) gründlich spülen und in ein frisches Pufferbad legen.

SCHRITT 2 PRIMÄRER ANTIKÖRPER ODER NEGATIVKONTROLLE

Überschüssige Flüssigkeit abklopfen und Objektträger wie zuvor abwischen.

Ausreichend primären Antikörper bzw. negatives Kontrollreagenz zugeben, um die Proben zu bedecken.

10 (±1) Minuten inkubieren, wenn nicht anders angegeben.

Mit Pufferlösung aus einer Waschflasche (Strahl nicht direkt auf das Gewebe richten) vorsichtig spülen und in ein frisches Pufferbad legen.

SCHRITT 3 BIOTINYLIERTER LINK

Überschüssigen Puffer sofort abklopfen und Objektträger wie zuvor abwischen.

Genügend GELBE Tropfen vom Link-Antikörper dazugeben, um die Probe zu bedecken.

10 (±1) Minuten inkubieren.

Objektträger wie in Schritt 2 spülen.

Falls das Färbeverfahren unterbrochen werden muss, können Objektträger nach der Inkubation des primären Link-Antikörpers (Schritt 3) bis zu einer Stunde bei Raumtemperatur (20–25 °C) in einem Pufferbad belassen werden, ohne dass die Färbung beeinträchtigt wird.

SCHRITT 4 STREPTAVIDIN-HRP

Objektträger wie zuvor abwischen.

Genügend ROTE Tropfen Streptavidin-Reagenz dazugeben, um die Probe zu bedecken.

10 (±1) Minuten inkubieren.

Objektträger wie zuvor abspülen.

SCHRITT 5 SUBSTRATCHROMOGENLÖSUNG

AEC- oder DAB-Substratchromogenlösungen aus dem Kühlschrank (2–8 °C) entnehmen. Für die DAB Zubereitung siehe den Abschnitt Vorbereitung der Reagenzien.

Objektträger wie zuvor abwischen.

Eine ausreichende Menge der AEC- oder DAB-Substratchromogenlösung zugeben, um die Probe zu bedecken. Das AEC- oder DAB-Substratchromogen wieder im Kühlschrank lagern.

AEC 10 (±1) Minuten und DAB 5–10 Minuten inkubieren.

Mit destilliertem Wasser aus einer Waschflasche (Strahl nicht direkt auf das Gewebe richten) gründlich spülen.

Abfallprodukte der AEC- oder DAB-Substratchromogenlösung in einem Sondermüllbehälter auffangen und entsprechend entsorgen.

SCHRITT 6 GEGENFÄRBUNG MIT HÄMATOXYLIN (OPTIONAL)

Objektträger in ein Hämatoxylin-Bad eintauchen. Je nach Stärke des benutzten Hämatoxylins 2–5 Minuten inkubieren.

Vorsichtig in einem Bad mit destilliertem Wasser spülen.

Objektträger zehnmal in ein Bad mit 0,037 mol/L Ammoniakwasser tauchen (optional).

Objektträger 2–5 Minuten in einem Bad mit destilliertem oder entionisiertem Wasser spülen.

SCHRITT 7 FIXIERUNG

Proben können mit einem wässrigen Fixiermittel wie Faramount (Code-Nr. S3025) oder Glycergel (Code-Nr. C0563) fixiert und eingedeckt werden.

Hinweis: Das AEC-Reaktionsprodukt ist in organischen Lösungsmitteln löslich und ist deshalb mit permanenten Fixiermitteln auf Toluol- oder Xylolbasis nicht kompatibel.

Hinweis: DAB kann mit einem beliebigen permanenten Fixiermittel fixiert werden.

Hinweis: Objektträger können zu einem beliebigen Zeitpunkt abgelesen werden. Es kann jedoch zu einem Verblässen kommen, wenn die Objektträger mehr als eine Woche lang starker Lichteinwirkung ausgesetzt sind. Objektträger im Dunkeln bei Raumtemperatur (20–25 °C) aufbewahren, um Verblässe zu vermeiden.

Qualitätskontrolle

Da Unterschiede bei der Gewebeerarbeitung und technischen Verfahren im Labor des Anwenders zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen führen können, müssen regelmäßige Leistungskontrollen vor Ort durchgeführt werden.

Weitere Informationen siehe Richtlinien zur Qualitätskontrolle des College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry und Literaturhinweise 6–8. Weitere Angaben zu Sensitivität und Immunreaktivität sind dem Sicherheitsdatenblatt jedes verwendeten primären Antikörpers zu entnehmen.

Weitere Informationen über Positiv- und Negativkontrollen bitte den *Allgemeinen Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung* entnehmen.

Auswertung der Färbung

Richtlinien zur Auswertung siehe *Allgemeine Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung*.

Allgemeine Beschränkungen

Allgemeine Beschränkungen siehe *Allgemeine Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung*.

Produktspezifische Beschränkungen

Dako liefert die LSAB2 System-Reagenzien in einer optimalen Verdünnung zur Verwendung gemäß den beiliegenden Anweisungen für IHC auf paraffineingebetteten Gewebeschnitten, Kryostatschnitten und Blutabstrichen. Abweichungen von den empfohlenen Testverfahren können deklarierte erwartete Ergebnisse ungültig machen; entsprechende Kontrollen sind vorzunehmen und zu dokumentieren. Anwender, die andere als die empfohlenen Testverfahren verwenden, sind für die Auswertung der hierbei gewonnenen Patientenergebnisse verantwortlich.

Endogene Avidin-bindende Aktivität (EABA) wurde bei gefrorenen Leber- (vollständiger Leberknoten) und Nierenschnitten (Tubulusepithelzellen) sowie bei gefrorenen und formalinfixierten Lymphgeweben (parakortikale Histiocyten) festgestellt.⁹⁻¹² EABA kann vor der Färbung durch aufeinander folgende 20-minütige Inkubationen unterdrückt werden, zunächst mit 0,1 % Avidin, und anschließend mit 0,01 % Biotin in 0,05 M Tris-HCl Puffer, pH 7,2–7,6, alternativ kann Biotin Blocking System (Code-Nr. X0590) benutzt werden.

In Hämoproteinen wie Hämoglobin, Myoglobin, Cytochrom und Katalase sowie in eosinophilen Zellen kann Endogene-Peroxidase-Aktivität oder Pseudoperoxidase-Aktivität auftreten.^{13,14} In formalinfixiertem Gewebe kann diese Aktivität durch Inkubation der Proben (fünf Minuten mit 3 % Wasserstoffperoxid) vor Zugabe des primären Antikörpers vermieden werden. Blut- und Knochenmarkabstriche und gefrorene Gewebeschnitte können mit Peroxidase Blocking Reagent (Code-Nr. S2001) behandelt werden. Dieses Verfahren hebt jedoch die rot-braune Pigmentierung der Hämoproteine nicht auf. Als Alternative kann eine Methanol-Wasserstoffperoxidlösung verwendet werden. Einige Antigene können bei diesem Verfahren denaturiert werden.

Reagenzien können bei zuvor nicht getesteten Geweben unerwartete Reaktionen zeigen. Selbst bei getesteten Gewebegruppen kann aufgrund von biologischen Unterschieden bei der Antigen-Expression in Neoplasmen oder anderen pathologischen Geweben die Möglichkeit unerwarteter Reaktionen nicht völlig ausgeschlossen werden.⁸ Bitte dokumentierte unerwartete Reaktionen dem technischen Kundendienst von Dako mitteilen.

Gewebe von mit dem Hepatitis-B-Virus infizierten Personen und Gewebe mit Hepatitis-B-Virus-Oberflächenantigen (HBsAg) können mit Meerrettichperoxidase eine unspezifische Färbung aufweisen.¹⁵

Fehlerbehebung

<i>Problem</i>	<i>Mögliche Ursache</i>	<i>Empfohlene Maßnahme</i>
1. Keine Färbung der Objektträger.	1a. Reagenzien in falscher Reihenfolge verwendet. 1b. Natriumazid im Pufferbad. 1c. Substratchromogen Reagenz nicht korrekt gemischt.	1a. Reagenzienverwendung überprüfen. 1b. Frischen azidfreien Puffer verwenden. 1c. Gemäß Kit-Protokoll eine frische Substratchromogenlösung zubereiten.
2. Schwache Färbung aller Objektträger.	2a. Schnitte enthalten nach dem Waschbad zu viel Lösung. 2b. Objektträger nicht lange genug mit Reagenzien inkubiert. 2c. Inkompatibles Gegenfärbungs- oder Fixiermittel, welches das Reaktionsprodukt auflöst.	2a. Überschüssige Lösung sorgfältig abschütten, bevor um den Schnitt herum abgewischt wird. 2b. Empfohlene Inkubationszeiten überprüfen. 2c. Für AEC Objektträger mit Immunfärbung nur Gegenfärbemittel und Fixiermittel auf Wasserbasis verwenden.
3. Zu starke Hintergrundfärbung aller Objektträger, inkl. Objektträger für Negativkontrollen	3a. Proben weisen hohe Endogene-Peroxidase-Aktivität auf. 3b. Paraffin nicht vollständig entfernt.	3a. Objektträger mit frischem Wasserstoffperoxid inkubieren. 3b. Bäder mit frischem Xylol oder Toluol verwenden.

	3c. Objektträger nicht ordnungsgemäß gespült.	3c. In Puffer-Bädern und Waschflaschen frische Lösungen verwenden.
	3d. Schnellere als normale Substratreaktion wegen zu hoher Raumtemperatur	3d. Kürzere Inkubationszeit für Substratchromogenlösung verwenden
	3e. Schnitte sind während der Färbung ausgetrocknet.	3e. Feuchtkammer verwenden. Nur drei bis vier Objektträger auf einmal abwischen, bevor das Reagenz zugegeben wird.
	3f. Unspezifische Bindung der Reagenzien an Gewebeschnitte.	3f. Dako Antikörperverdünnungsmittel verwenden oder dem Antikörperverdünnungsmittel 1 % BSA hinzufügen. Alternativ kann 0,05 mol/L Tris, das 0,3 mol/L NaCl und 0,1 % Tween 20, pH 7,2–7,6 (Code-Nr. S3306) enthält, als Waschpuffer verwendet werden. Eventuell kann auch die Inkubation eines separaten Proteinblock-Reagenzes (Code-Nr. X0909) vor der Anwendung des primären Antikörpers erforderlich sein.
	3g. Zu stark konzentrierter primärer Antikörper.	3g. Höhere Verdünnung des primären Antikörpers verwenden.
4.	Gewebeschnitte lösen sich vom Objektträger ab.	4a. Verwendung ungeeigneter Objektträger
		4a. Für die meisten Färbeverfahren mit Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger verwenden. Für primäre Antikörper, die Demaskierungstechniken erfordern, Silanized Slides verwenden.
5.	Zu starke spezifische Färbung.	5a. Zu stark konzentrierter primärer Antikörper.
		5a. Serielle Verdünnungen des primären Antikörpers durchführen, um die optimale Verdünnung herauszufinden.
	5b. Inkubation für primären Antikörper, biotinylierten Link oder Streptavidin-HRP zu lang.	5b. Geeignetes Färbeprotokoll für den Antikörper festlegen (Inkubationsdauer für den primären Antikörper, den biotinylierten Link und Streptavidin-HRP).

Hinweis: Falls das Problem keiner der oben genannten Ursachen zugewiesen werden kann oder wenn die vorgeschlagene Maßnahme das Problem nicht behebt, bitte den technischen Kundendienst von Dako verständigen.

Weitere Informationen zu Färbetechniken und Probenvorbereitung sind in den folgenden Werken enthalten: *Immunohistochemical Staining Methods*¹⁰ (erhältlich von Dako), *Atlas of Immunohistology*¹⁶ und *Immunoperoxidase Techniques, A Practical Approach to Tumor Diagnosis*.¹⁷

References/ Bibliographie/ Literaturangaben

- Guesdon JL, Ternynck T, Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J Histochem Cytochem* 1979;27(8):1131-9
- Giorno R. A comparison of two immunoperoxidase staining methods based on the avidin-biotin interaction. *Diag Immunol* 1984;2(3):161-6
- Center for Disease Control Manual Guide – Safety Management, No. CDC-22. Decontamination of laboratory sink drains to remove azide salts. Atlanta, Georgia. April 30, 1976
- Department of Health, Education and Welfare, National Institute for Occupational Safety and Health, Rockville, MD. "Procedures for the decontamination of plumbing systems containing copper and/or lead azides." DHHS (NIOSH) Publ. No. 78-127, Current 13. August 16, 1976
- Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final rule, 57FR7163. February 18, 1992
- Elias JM, Gown AM, Nakamura RM, Wilbur DC, Herman GE, Jaffe S, Battifora H, Brigati DJ. Quality control in immunohistochemistry. Report of a workshop sponsored by the Biological Stain Commission. *Amer J Clin Pathol* 1989;92(6):836-43
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Internal quality control testing: Principles and definitions; approved guideline. Villanova, PA. 1991; 4: Order code C24-A
- Herman GE, Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: The new era of quality control. *Biotech & Histochem* 1991;66(4):194-9
- Kiernan JA. *Histological and histochemical methods: Theory and practice*. New York: Pergamon Press 1981:81
- Key M (ed). *Immunohistochemical Staining Methods*. 4th Edition. Dako 2006
- Wood GS, Warnke R. Suppression of endogenous avidin-binding activity in tissues and its relevance to biotin-avidin detection systems. *J Histochem Cytochem* 1981;29(10):1196-204
- Banerjee D, Pettit S. Endogenous avidin-binding activity in human lymphoid tissue. *J Clin Pathol* 1984;37(2):223-5
- Escribano LM, Gabriel LC, Villa E, Navarro JL. Endogenous peroxidase activity in human cutaneous and adenoidal mast cells. *J Histochem Cytochem* 1987;35(2):213-20
- Elias JM. *Immunohistopathology: A practical approach to diagnosis*. Chicago: American Society of Clinical Pathologists Press 1990; 46
- Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: A possible source of error in immunohistochemistry. *Am J Pathol* 1980;73(5):626-32
- Tubbs RR, et al. *Atlas of immunohistology*. Chicago: ASCP Press 1986 (105444-004)

17. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase techniques, A practical approach to tumor diagnosis. Chicago: ASCP Press 1986












Toxic
Toxique
Giftig

PT0058 Rev A



Harmful
Nocif
Gesundheitsschädlich

PT0061 Rev A

 <p>Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer</p>	 <p>Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich</p>	 <p>In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-vitro-Diagnostikum</p>
 <p>Manufacturer Fabricant Hersteller</p>	 <p>Batch code Code du lot Chargenbezeichnung</p>	 <p>Contains sufficient for <N> tests Contenu suffisant pour <n> tests Inhalt ausreichend für „n“ Ansätze</p>
 <p>Use by Utiliser jusque Verwendbar bis</p>	 <p>Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten</p>	 <p>Authorized representative in the European Community Représentant Autorisé dans la Communauté Européenne Autorisierter Repräsentant in der EU</p>

PT0020/ Rev C



Dako North America, Inc.
6392 Via Real
Carpinteria, California 93013 USA

Tel 805 566 6655
Fax 805 566 6688
Technical Support 800 424 0021
Customer Service 800 235 5763

EC REP

Dako Denmark A/S
Produktionsvej 42
DK-2600 Glostrup Denmark

Tel +45 4485 9500
Fax +45 4485 9595
www.dako.com

Edition 05/07
Édition 05/07
Ausgabe 05/07