

## EnVision FLEX, High pH (Dako Omnis)

Code GV800

The kit contains reagents sufficient for 600 tests. For Dako Omnis instruments.

Les réactifs contenus dans ce kit permettent d'effectuer 600 tests. Pour les appareils Dako Omnis.

Die in diesem Kit enthaltenen Reagenzien sind ausreichend für 600 Tests. Für Dako Omnis Geräte.

Optional reagents/ Réactifs en option/ Optionale Reagenzien:

Code	Product name/ Nom du produit/ Produktname	Tests
GV804	EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Dako Omnis)	225
GV805	EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Dako Omnis)	225
GC807	Wash Buffer (20x) (Dako Omnis)	
GC808	Hematoxylin (Dako Omnis)	600
GV809	EnVision FLEX+ Rabbit LINKER (Dako Omnis)	75
GV821	EnVision FLEX+ Mouse LINKER (Dako Omnis)	75
GV825	EnVision FLEX DAB+ Substrate Chromogen System (Dako Omnis)	150

Other options/ Autres options/ Weitere Optionen:

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

# Contents/ Table des matières/ Inhalt

Page/ Page/ Seite

## *ENGLISH*

Intended Use .....	4
Summary and Explanation.....	4
Reagents .....	5
A. Materials provided .....	5
B. Materials required but not provided .....	5
C. Optional reagents .....	6
Precautions.....	7
Storage .....	8
Reagent Preparation.....	9
Specimen Collection and Preparation .....	9
Procedure .....	10
Staining procedure .....	10
Quality Control .....	11
Interpretation of Results.....	12
Limitations .....	12
Explanation of symbols.....	31

## *FRANÇAIS*

Utilisation prévue .....	13
Résumé et explication .....	13
Réactifs.....	14
A. Matériel fourni .....	14
B. Matériels requis mais non fournis .....	14
C. Réactifs en option.....	15
Précautions d'emploi .....	16
Conservation .....	18
Préparation des réactifs.....	18
Prélèvement et préparation des échantillons.....	19
Procédure .....	19
Procédure de coloration .....	20
Contrôle qualité .....	21
Interprétation des résultats .....	21
Limites .....	21
Explication des symboles .....	31

## **DEUTSCH**

Verwendungszweck.....	22
Zusammenfassung und Erklärung.....	22
Reagenzien .....	23
A. Mitgelieferte Materialien .....	23
B. Zusätzlich benötigte Reagenzien und Zubehör (außerhalb des Lieferumfangs).....	23
C. Optionale Reagenzien.....	24
Vorsichtsmaßnahmen.....	25
Lagerung .....	27
Vorbereitung der Reagenzien.....	27
Entnahme und Vorbereitung der Probe.....	28
Verfahren.....	28
Färbeverfahren .....	28
Qualitätskontrolle.....	30
Auswertung der Ergebnisse.....	30
Einschränkungen.....	30
Erläuterung der Symbole.....	31

## **ENGLISH**

### **Intended Use**

For in vitro diagnostic use.

EnVision FLEX, High pH (Dako Omnis) visualization system is intended for use in immunohistochemistry together with Dako Omnis instruments. The system detects primary mouse and rabbit antibodies and the reaction is visualized by EnVision FLEX DAB+ Chromogen. If used with EnVision FLEX+ Rabbit LINKER (Code GV809) or EnVision FLEX+ Mouse LINKER (Code GV821) signal amplification of primary rabbit antibodies or primary mouse antibodies, respectively, can be achieved. The EnVision FLEX reagents are intended for use on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections.

### **Summary and Explanation**

EnVision FLEX visualization system is a flexible system giving optimal staining on Dako Omnis instruments, when using the protocol recommended in this package insert.

Prior to staining formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections are subjected to onboard deparaffinization and hydration followed by heat-induced epitope retrieval (HIER) using the target retrieval reagent specified in the package insert for the primary antibody. This kit includes EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (DM848). Alternatively, EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code GV804) or EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Code GV805) is recommended. Some primary antibodies require enzymatic pre-treatment of tissue for optimal staining instead of HIER.

Endogenous peroxidase should be blocked with EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (DM841) included in the kit. Due to an effective washing procedure and the presence of stabilizing proteins in the Dako reagents, extra blocking steps to reduce non-specific background staining are unnecessary.

Wash Buffer (20x) (GC807) available as optional reagent is recommended.

Primary antibodies are not provided with the kit. We recommend the use of Dako FLEX Ready-to-Use Primary Antibodies or Dako concentrated Primary Antibodies (see respective package inserts for guidelines).

EnVision FLEX+ Rabbit LINKER (Code GV809) may be applied for an optional signal amplification of rabbit primary antibodies. For signal amplification when using mouse primary antibodies, EnVision FLEX+ Mouse LINKER (Code GV821) may be applied. As a guideline: EnVision FLEX+ Rabbit LINKER provides 2-3 fold signal amplification and EnVision FLEX+ Mouse LINKER provides 4-5 fold signal amplification.

Dako EnVision FLEX /HRP reagent (DM842) in the kit consists of a dextran backbone to which a large number of horseradish peroxidase (HRP) molecules and secondary antibody molecules have been coupled. A unique chemistry is used for the coupling reaction, which permits the binding of up to 100 HRP molecules and up to 20 antibody molecules per backbone.

The substrate system in the kit consists of two components: EnVision FLEX DAB+ Chromogen (DM847), a concentrated diaminobenzidine (DAB) solution, and EnVision FLEX Substrate Buffer (DM843) containing hydrogen peroxide. Before use EnVision FLEX DAB+ Chromogen must be diluted in EnVision FLEX Substrate Buffer. The substrate system produces a crisp brown end product at the site of the target antigen. Timely mixing of chromogen and buffer is automatically performed onboard Dako Omnis.

Hematoxylin (Code GC808) is recommended for counterstaining. The reagent provides a clear blue, nuclear staining.

The stained tissue sections should be mounted with organic-solvent-based mounting medium.

## Reagents

### A. Materials provided

DM841

EnVision FLEX  
PEROXIDASE-BLOCKING  
REAGENT  
(Dako Omnis)

**EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (Dako Omnis)**

8 x 22.5 mL, ready-to-use

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

DM842

EnVision FLEX  
/HRP  
(Dako Omnis)

**EnVision FLEX /HRP (Dako Omnis)**

8 x 22.5 mL, ready-to-use

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

DM847

EnVision FLEX  
DAB+ CHROMOGEN  
(Dako Omnis)

**EnVision FLEX DAB+ Chromogen (Dako Omnis)**

8 x 1 mL

3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride in organic solvent.

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

DM843

EnVision FLEX  
SUBSTRATE BUFFER  
(Dako Omnis)

**EnVision FLEX Substrate Buffer (Dako Omnis)**

16 x 26 mL

Buffered solution containing hydrogen peroxide and preservative.

DM848

EnVision FLEX  
TARGET RETRIEVAL SOLUTION  
HIGH pH (50x)  
(Dako Omnis)

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

9 x 68 mL, 50x concentrated

Tris/EDTA buffer, pH 9

### B. Materials required but not provided

Antibody diluent, e.g. Dako Antibody Diluent (Code S0809)

Clarify Clearing Agent (Code GC810)

Dako FLEX Ready-to-Use Primary Antibodies or suitably diluted concentrated primary rabbit or mouse antibodies from Dako

Dako Omnis instrument

Dako Omnis instrumentation utensils

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

FLEX Universal Negative Control, Rabbit, Ready-to-Use (Code GA600), FLEX Universal Negative Control, Mouse, Ready-to-Use (Code GA750), or suitable negative control reagent for the primary antibody

Hematoxylin (Dako Omnis) (Code GC808) or suitable hematoxylin reagent for counterstaining

Microscope slides, e.g. Dako FLEX IHC Microscope Slides (Code K8020)

Mounting medium (organic-solvent-based) and coverslips

Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) (Code GC807)

0.3 M Sulfuric Acid (Code GC203)

### C. Optional reagents

**GV804**  
DM848

EnVision FLEX  
TARGET RETRIEVAL SOLUTION  
HIGH pH (50x)  
(Dako Omnis)

**EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Dako Omnis)**  
3 x 68 mL, 50x concentrated  
Tris/EDTA buffer, pH 9

**GV805**  
DM849

EnVision FLEX  
TARGET RETRIEVAL SOLUTION  
LOW pH (50x)  
(Dako Omnis)

**EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Dako Omnis)**  
3 x 68 mL, 50x concentrated  
Citrate buffer, pH 6.1

**GC807**  
DM851

WASH BUFFER (20x)  
(Dako Omnis)

**Wash Buffer (20x) (Dako Omnis)**  
20 x 175 mL, 20x concentrated  
Tris-buffered saline solution containing Tween 20, pH 7.6 ( $\pm 0.1$ ).

**GC808**  
DM846

HEMATOXYLIN  
(Dako Omnis)

**Hematoxylin (Dako Omnis)**  
8 x 22.5 mL, ready-to-use  
Aqueous solution of hematoxylin.

**GV809**  
DM845

EnVision FLEX+  
RABBIT LINKER  
(Dako Omnis)

**EnVision FLEX+ Rabbit LINKER (Dako Omnis)**  
1 x 22.5 mL, ready-to-use  
Buffered solution containing stabilizing protein and an antimicrobial agent.

**GV821**  
DM844

EnVision FLEX+  
MOUSE LINKER  
(Dako Omnis)

**EnVision FLEX+ Mouse LINKER (Dako Omnis)**  
1 x 22.5 mL, ready-to-use  
Buffered solution containing stabilizing protein and an antimicrobial agent.

**GV825**  
DM847 +  
DM843

**EnVision FLEX DAB+ Substrate Chromogen System (Dako Omnis)**

EnVision FLEX  
DAB+ CHROMOGEN  
(Dako Omnis)

**EnVision FLEX DAB+ Chromogen (Dako Omnis)**  
2 x 1 mL  
3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride in organic solvent.  
The color of this reagent may vary from strong violet to colorless without having any influence on the performance of the kit.

EnVision FLEX  
SUBSTRATE BUFFER  
(Dako Omnis)

**EnVision FLEX Substrate Buffer (Dako Omnis)**  
4 x 26 mL  
Buffered solution containing hydrogen peroxide and preservative.

## Precautions

1. For invitro diagnostic use.
2. For professional users.
3. EnVision FLEX /HRP contains material of animal origin and it cannot be excluded that trace amounts of human material could be present due to manufacturing procedures. As with any product derived from biological sources, proper handling should be used.
4. Do not expose EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent, EnVision FLEX /HRP, EnVision FLEX Substrate Buffer, EnVision FLEX DAB+ Chromogen or EnVision FLEX Substrate Working Solution to strong light.
5. For EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent and EnVision FLEX /HRP, a safety data sheet is available for professional users on request.
6. EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) contains 5-10% trometamol, 1-5% nonylphenol, ethoxylated, and 1-5% acetic acid, (Ethylenedinitrilo)tetra acetic acid (EDTA) disodium salt, dihydrate..

EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) is labeled:



### Warning

H315	Causes skin irritation
H319	Causes serious eye irritation.
H411	Toxic to aquatic life with long lasting effects.
P280	Wear eye or face protection.
P273	Avoid release to the environment.
P264	Wash hands thoroughly after handling.
P302 + P352 + P362+P364	IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water. Take off contaminated clothing and wash it before reuse.
P332 + P313	If skin irritation occurs: Get medical attention.
P305 + P351+ P338	IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
P337 + P313	If eye irritation persists: Get medical attention.
P501	Dispose of contents and container in accordance with all local, regional, national and international regulations.

7. EnVision FLEX Substrate Buffer contains <1 % Imidazol and is labeled:



### Danger

H360	May damage the unborn child.
P201	Obtain special instructions before use.
P202	Do not handle until all safety precautions have been read and understood.
P280	Wear protective gloves. Wear eye or face protection. Wear protective clothing.
P308/P313	IF exposed or concerned: Get medical attention.
P405	Store locked up.
P501	Dispose of contents and containers in accordance with all local, regional, national and international requirements.

8. EnVision FLEX DAB+ Chromogen contains < 10 % 3,3-Diaminobenzidine tetrahydrochloride, and is labeled:



**Danger**

H319	Causes serious eye irritation
H350	May cause cancer.
H341	Suspected of causing genetic defects.
P201	Obtain special instructions before use.
P202	Do not handle until all safety precautions have been read and understood.
P280	Wear protective gloves. Wear eye or face protection. Wear protective clothing.
P264	Wash hands thoroughly after handling
P308 + P313	IF exposed or concerned: Get medical attention.
P305 + P351 + P338	IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
P337 + P313	If eye irritation persists: Get medical attention
P405	Store locked up.
P501	Dispose of contents and container in accordance with all local, regional, national and international regulations.

9. EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent contains sodium azide (NaN<sub>3</sub>), 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.
10. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.
11. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.

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

## Storage

Store EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) at 2-8 °C. Store EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent, EnVision FLEX /HRP, EnVision FLEX DAB+ Chromogen and EnVision FLEX Substrate Buffer in the dark at 2-8 °C. During storage the cap should be closed.

Onboard stability of EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent, EnVision FLEX /HRP, EnVision FLEX DAB+ Chromogen and EnVision FLEX Substrate Buffer is 75 hours. Onboard stability of diluted EnVision FLEX™ Target Retrieval Solution, High pH and Low pH is 7 days. Remaining onboard stability is tracked by the Dako Omnis software.

Do not use after expiration date stamped on the vials. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the product is suspected, contact Dako Technical Support.

## Reagent Preparation

### A.1 EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (DM848, Code GV804) or EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (DM849, Code GV805)

Prepare a working solution by diluting the EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) or Low pH (50x) concentrate 1:50 in distilled or deionized water. The following procedure is recommended:

1. Fill a Dako Omnis bulk bottle to the fill line with distilled or deionized water (3.325 L). Ensure to place the bulk bottle on a horizontal surface before filling.
2. Empty one 68 mL EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) or Low pH (50x) (Dako Omnis) concentrate bottle into the bulk bottle.
3. Transfer the detachable label from the concentrate bottle and attach it to the bulk bottle.
4. Fasten the lid and gently invert the bulk bottle 2-3 times.

Unused diluted solution may be stored at 2-8 °C for one month. The diluted solution can be used within 7 days when stored onboard the Dako Omnis instrument. Discard solution if cloudy in appearance.

### A.2 Wash Buffer (20x) (DM851, Code GC807)

Prepare a working solution by diluting the Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) concentrate 1:20 in Dako Omnis bulk bottle using distilled or deionized water. To minimize foaming the following procedure is recommended:

1. Fill a Dako Omnis bulk bottle to the fill line with distilled or deionized water (3.325 L). Ensure to place the bulk bottle on a horizontal surface before filling.
2. Empty one 175 mL Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) concentrate bottle into the bulk bottle.
3. Transfer the detachable label from the concentrate bottle and attach it to the bulk bottle.
4. Fasten the lid. Mix by gentle inversion of the bulk bottle in a vertical direction 4-5 times to ensure proper mixing.

Unused diluted solution may be stored at 2-8 °C for one month. The diluted solution can be used within 7 days when stored onboard the Dako Omnis instrument. Remaining onboard stability is tracked by the Dako Omnis software. Discard solution if cloudy in appearance.

### A.3 EnVision FLEX Substrate Working Solution

The DAB-containing EnVision FLEX Substrate Working Solution is prepared onboard the Dako Omnis instrument. The automated process mixes one part of EnVision FLEX DAB+ Chromogen (DM847) with 50 parts of EnVision FLEX Substrate Buffer (DM843). Substrate Working Solution will always be prepared for one rack (containing 1-5 slides) at a time. The volumes supplied are sufficient for loading of 200 racks.

## Specimen Collection and Preparation

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

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

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

The specimens should be mounted on microscope slides. For greater adherence of tissue sections to glass slides, the use of FLEX IHC Microscope Slides (Code K8020) is recommended.

The sections should be mounted on the slides as flat and wrinkle-free as possible. Too many wrinkles will have an impact on the staining results.

**NOTE:** The microscope slides must have a width suitable for the Dako Omnis instrument. Please refer to Dako Omnis Basic User Guide for definition of usable microscope slides.

Paraffin sections should be mounted from a pre-heated water bath containing distilled or deionized water. The water bath should contain no additives (such as gelatin, poly-L-lysine etc.). Sections should be dried

by heating, generally at a temperature not above 60 °C for up to 60 minutes. To ensure proper adherence of sections to slides it is important to drain the water from beneath the sections prior to the oven drying process.

## Procedure

EnVision FLEX visualization system has been developed for use on the Dako Omnis instrument in combination with Dako primary antibodies.

The automated procedure on Dako Omnis includes deparaffinization of tissue sections, heat-induced epitope retrieval, immunohistochemical staining and counterstaining of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. The protocol steps for the automated procedures can be displayed, printed and edited according to the Dako Omnis Basic and Advanced User Guides.

The pretreatment procedure and staining protocol depends on the the antibody. Please refer to the package insert for the individual Dako primary antibody.

Before running protocols on your Dako Omnis instrument, please read carefully the Dako Omnis Basic User Guide. Please refer to Dako Omnis Basic User Guide for detailed instructions on preparing the instrument for staining and Dako Omnis Advanced User Guide for detailed instructions on protocols.

The EnVision FLEX protocol is pre-programmed in the Dako Omnis software. Please refer to Dako Omnis Basic User Guide for detailed instructions on preparing the instrument for staining and Dako Omnis Advanced User Guide for detailed instructions on protocols.

## Staining procedure

When using FLEX RTU Primary Antibodies for Dako Omnis the optimal staining protocol is programmed into the Dako Omnis software.

Please refer to the package insert for the individual FLEX RTU Primary Antibody or Dako concentrated Primary Antibody for optimal pre-treatment method and incubation times. For easy setup of new protocols, it is recommended to use one of the protocol templates described below.

From the Dako Omnis Workstation, chose one of three protocol templates containing the recommended staining steps and incubation times for the EnVision FLEX visualization system (refer to Table 2 for overview):

FLEX  
FLEX+ Mouse  
FLEX+ Rabbit

The protocol templates can be used for the generation of custom protocols for specific primary antibodies. The following protocol steps can be customized:

- Target retrieval reagent (for heat-induced epitope retrieval), temperature and incubation time
- Primary antibody and incubation time
- Labeled polymer incubation time (reduction only)
- Counterstain reagent and incubation time

The user must verify the applied protocol.

If the protocols are not available in the Dako Omnis system, please contact Dako Technical Services.

Table 2. Overview of EnVision FLEX/FLEX+ protocol templates.

Phase	Step	Reagent	Staining protocol template		
			FLEX	FLEX+ Mouse	FLEX+ Rabbit
Dewax	Dewax	Clearify Clearing Agent	yes	yes	yes
Target Retrieval	Target Retrieval	EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH or EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH or Custom reagent	97±2 °C* 30 min*	97±2 °C* 30 min*	97±2 °C* 30 min*
Staining	<i>Wash</i>	Wash Buffer (Dako Omnis)	wash	wash	wash
	Primary Antibody	20 min*	20 min*	20 min*	20 min*
	<i>Wash</i>	Wash Buffer (Dako Omnis)	wash	wash	wash
	Endogenous Enzyme Block	EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent	3 min	3 min	3 min
	<i>Wash</i>	Wash Buffer (Dako Omnis)	wash	wash	wash
	Secondary Reagent	EnVision FLEX+ Mouse or Rabbit LINKER	-	Mouse LINKER 10 min	Rabbit LINKER 10 min
	<i>Wash</i>	Wash Buffer (Dako Omnis)	-	wash	wash
	Labeled polymer	EnVision FLEX/HRP	20 min*	20 min*	20 min*
	<i>Wash</i>	Wash Buffer (Dako Omnis)	wash	wash	wash
	<i>Wash</i>	Wash Buffer (Dako Omnis)	wash	wash	wash
	Substrate Chromogen	EnVision FLEX Substrate Working Solution	5 min	5 min	5 min
	<i>Wash</i>	Wash Buffer (Dako Omnis)	wash	wash	wash
Counter-staining	Counterstain	Hematoxylin (Dako Omnis)*	3 min*	3 min*	3 min*
	<i>Wash</i>	Deionized Water	wash	wash	wash
	<i>Wash</i>	Wash Buffer (Dako Omnis)	wash	wash	wash

\* Customization is possible.

### Post-staining procedure

1. After completion of the run, remove the slide rack from the Unloading Station and transfer racks to fresh deionized water.
2. Dehydrate, clear, mount with permanent mounting media and coverslip the slides.

### Quality Control

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

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

## Interpretation of Results

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

## Limitations

1. For automated use on Dako Omnis instruments only. When performing staining using Dako concentrated primary antibodies, the optimal procedure must be determined and validated by the user.
2. For use on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections only. When using frozen sections or cell smears, the optimal procedure must be determined and verified by the user, unless specified in the Package Insert for the specific Dako Primary Antibody. Changes in the procedure may have impact on the number of tests provided with the kit.

# FRANÇAIS

## Utilisation prévue

Pour utilisation diagnostique in vitro.

Le système de visualisation EnVision FLEX, High pH (Dako Omnis) est destiné à une utilisation en immunohistochimie avec les instruments Dako Omnis. Le système détecte les anticorps primaires de souris et de lapin et la réaction est visualisée à l'aide du produit EnVision FLEX DAB+ Chromogen. Utilisé avec les produits EnVision FLEX+ Rabbit LINKER (réf. GV809) ou EnVision FLEX+ Mouse LINKER (réf. GV821), une amplification du signal des anticorps primaires de lapin ou de souris, respectivement, peut être obtenue. Les réactifs EnVision FLEX sont destinés à être utilisés sur des coupes de tissus fixées au formol et incluses en paraffine.

## Résumé et explication

Le système de visualisation EnVision FLEX est un système flexible qui permet d'obtenir une coloration optimale sur les instruments Dako Omnis, sous réserve de respecter le protocole recommandé dans la présente notice.

Avant de procéder à la coloration, les coupes de tissus fixées au formol et incluses en paraffine doivent être soumises à un déparaffinage et à une réhydratation sur l'appareil, puis à une procédure de restauration d'épitope induite par la chaleur (HIER) à l'aide du réactif de restauration des cibles indiqué dans la notice de l'anticorps primaire. Le kit inclut la solution EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (DM848). Il est également possible d'utiliser les solutions EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (réf. GV804) ou EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (réf. GV805). Certains anticorps primaires nécessitent un prétraitement enzymatique du tissu pour une coloration optimale au lieu d'une procédure HIER.

La peroxydase endogène doit être bloquée à l'aide du réactif d'inhibition de la peroxydase EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (DM841) inclus dans le kit. En raison d'une procédure de lavage efficace et de la présence de protéines stabilisantes dans les réactifs Dako, des étapes de blocage supplémentaires ne sont pas nécessaires pour réduire la coloration du bruit de fond non spécifique.

Le tampon de lavage Wash Buffer (20x) (GC807) disponible comme réactif en option est également recommandé.

Les anticorps primaires ne sont pas fournis dans le kit. L'utilisation des anticorps Dako FLEX Ready-to-Use Primary Antibodies ou des anticorps primaires concentrés Dako (pour obtenir des recommandations à ce sujet, consulter les notices respectives) est recommandée.

Le produit EnVision FLEX+ Rabbit LINKER (réf. GV809) peut être appliqué pour obtenir une amplification du signal des anticorps primaires de lapin (en option). Le produit EnVision FLEX+ Mouse LINKER (réf. GV821) peut être appliqué pour obtenir une amplification du signal lorsque des anticorps primaires de souris sont utilisés. En règle générale : le produit EnVision FLEX+ Rabbit LINKER fournit une amplification du signal de 2 à 3 fois et le produit EnVision FLEX+ Mouse LINKER fournit une amplification du signal de 4 à 5 fois.

Le réactif Dako EnVision FLEX /HRP (DM842) du kit se compose d'une chaîne de dextrane sur laquelle un grand nombre de molécules de peroxydase de raifort (HRP) et de molécules d'anticorps secondaires ont été couplées. Une seule réaction chimique est utilisée pour la réaction de couplage, ce qui permet la liaison de 100 molécules de HRP maximum et de 20 molécules d'anticorps maximum par chaîne.

Le système du substrat contenu dans le kit est formé de deux composants : le produit EnVision FLEX DAB+ Chromogen (DM847), une solution de diaminobenzidine (DAB) concentrée, et le tampon EnVision FLEX Substrate Buffer (DM843) contenant du peroxyde d'hydrogène. Avant utilisation, le produit EnVision FLEX DAB+ Chromogen doit être dilué dans le tampon EnVision FLEX Substrate Buffer. Le système du substrat forme un produit brun vif sur le site de l'antigène cible. Le mélange en temps opportun de la solution de chromogène et du tampon est automatiquement effectué sur l'appareil Dako Omnis.

Hematoxylin (réf. GC808) est recommandée pour la contre-coloration. Le réactif provoque une coloration nucléaire bleu clair.

Les coupes de tissus colorés doivent être montées avec un milieu de montage organique à base de solvant.

## Réactifs

### A. Matériel fourni

DM841

EnVision FLEX  
PEROXIDASE-BLOCKING  
REAGENT  
(Dako Omnis)

**EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (Dako Omnis)**

8 x 22,5 mL, prêt à l'emploi

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

DM842

EnVision FLEX  
/HRP  
(Dako Omnis)

**EnVision FLEX /HRP (Dako Omnis)**

8 x 22,5 mL, prêt à l'emploi

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

DM847

EnVision FLEX  
DAB+ CHROMOGEN  
(Dako Omnis)

**EnVision FLEX DAB+ Chromogen (Dako Omnis)**

8 x 1 mL

Tétrahydrochlorure de 3,3'-diaminobenzidine dans un solvant organique. La couleur de ce réactif peut varier de violet foncé à incolore, sans que cela ait une quelconque influence sur la performance du kit.

DM843

EnVision FLEX  
SUBSTRATE BUFFER  
(Dako Omnis)

**EnVision FLEX Substrate Buffer (Dako Omnis)**

16 x 26 mL

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

DM848

EnVision FLEX  
TARGET RETRIEVAL SOLUTION  
HIGH pH (50x)  
(Dako Omnis)

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

9 x 68 mL, concentré à 50x

Tampon Tris/EDTA, pH 9

### B. Matériels requis mais non fournis

Diluant d'anticorps, par exemple, Dako Antibody Diluent (réf. S0809)

Agent d'élimination Clearify (réf. GC810)

Dako FLEX Ready-to-Use Primary Antibodies ou anticorps primaires de lapin ou de souris concentrés dilués de façon appropriée obtenus auprès de Dako

Instrument Dako Omnis

Ustensiles pour l'appareillage Dako Omnis

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

FLEX Universal Negative Control, Rabbit, Ready-to-Use (réf. GA600), FLEX Universal Negative Control, Mouse, Ready-to-Use (réf. GA750), ou un réactif de contrôle négatif approprié pour l'anticorps primaire

Hématoxyline (Dako Omnis) (réf. GC808) ou un réactif d'hématoxyline approprié pour la contre-coloration

Lames de microscope, par exemple, Dako FLEX IHC Microscope Slides (réf. K8020)

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

Wash Buffer (20x) (Dako Omnis), réf. GC807

Acide sulfurique 0,3 M (réf. GC203)

### C. Réactifs en option

**GV804**  
DM848

EnVision FLEX  
TARGET RETRIEVAL SOLUTION  
HIGH pH (50x)  
(Dako Omnis)

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

3 x 68 mL, concentré à 50x

Tampon Tris/EDTA, pH 9

**GV805**  
DM849

EnVision FLEX  
TARGET RETRIEVAL SOLUTION  
LOW pH (50x)  
(Dako Omnis)

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

3 x 68 mL, concentré à 50x

Tampon citrate, pH 6,1

**GC807**  
DM851

WASH BUFFER (20x)  
(Dako Omnis)

**Wash Buffer (20x) (Dako Omnis)**

20 x 175 mL, concentré à 20x

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

**GC808**  
DM846

HEMATOXYLIN  
(Dako Omnis)

**Hematoxylin (Dako Omnis)**

8 x 22,5 mL, prêt à l'emploi

Solution aqueuse d'hématoxyline.

**GV809**  
DM845

EnVision FLEX+  
RABBIT LINKER  
(Dako Omnis)

**EnVision FLEX+ Rabbit LINKER (Dako Omnis)**

1 x 22,5 mL, prêt à l'emploi

Solution tampon contenant des protéines stabilisantes et un agent antimicrobien.

**GV821**  
DM844

EnVision FLEX+  
MOUSE LINKER  
(Dako Omnis)

**EnVision FLEX+ Mouse LINKER (Dako Omnis)**

1 x 22,5 mL, prêt à l'emploi

Solution tampon contenant des protéines stabilisantes et un agent antimicrobien.

**GV825**  
DM847 +  
DM843

**EnVision FLEX DAB+ Substrate Chromogen System (Dako Omnis)**

EnVision FLEX  
DAB+ CHROMOGEN  
(Dako Omnis)

**EnVision FLEX DAB+ Chromogen (Dako Omnis)**

2 x 1 mL

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

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

## EnVision FLEX Substrate Buffer (Dako Omnis)

4 x 26 mL

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

### Précautions d'emploi

1. Pour utilisation diagnostique in vitro.
2. Pour utilisateurs professionnels.
3. Le produit EnVision FLEX /HRP contient des substances d'origine animale et on ne peut exclure le fait que des quantités infimes de substances humaines puissent être présentes en raison des procédures de fabrication. Comme avec tout produit d'origine biologique, respecter les procédures de manipulation appropriées.
4. Ne pas exposer les produits EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent, EnVision FLEX /HRP, EnVision FLEX Substrate Buffer, EnVision FLEX DAB+ Chromogen ou EnVision FLEX Substrate Working Solution à une lumière intense.
5. Une fiche de données de sécurité destinée aux utilisateurs professionnels est disponible sur demande pour les produits EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent et EnVision FLEX /HRP.
6. Le produit EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) contient 5 à 10% de trométamol, 1 à 5% d'éthoxylates de nonylphénol et 1 à 5% d'acide acétique, acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA), sel disodique dihydraté.

Le produit EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) porte les mentions suivantes :



#### Avertissement

H315	Provoque une irritation cutanée.
H319	Provoque une sévère irritation des yeux.
H411	Toxique pour les organismes aquatiques avec des effets néfastes à long terme.
P280	Porter un équipement de protection du visage ou des yeux.
P273	Éviter le rejet dans l'environnement.
P264	Se laver soigneusement les mains après manipulation.
P302 + P352 + P362 + P364	EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : Laver abondamment à l'eau et au savon. Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation.
P332 + P313	En cas d'irritation cutanée : Consulter un médecin.
P305 + P351 + P338	EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.
P337 + P313	Si l'irritation des yeux persiste : Consulter un médecin.
P501	Éliminer le contenu et le récipient conformément à l'ensemble des réglementations locales, régionales, nationales et internationales.

7. L'EnVision FLEX Substrate Buffer contient < 1% d'imidazole et porte les mentions suivantes :



**Danger**

H360	Peut nuire au fœtus.
P201	Se procurer les instructions avant utilisation.
P202	Ne pas manipuler avant d'avoir lu et compris toutes les précautions de sécurité.
P280	Porter des gants de protection. Porter un équipement de protection du visage ou des yeux. Porter un vêtement de protection.
P308/P313	EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée : Consulter un médecin.
P405	Garder sous clef.
P501	Éliminer le contenu et les récipients conformément à l'ensemble des directives locales, régionales, nationales et internationales.

8. Le produit EnVision FLEX DAB+ Chromogen contient moins de 10% de 3,3'-diaminobenzidine tétrachlorhydrate et porte les mentions suivantes :



**Danger**

H319	Provoque une sévère irritation des yeux.
H350	Peut provoquer le cancer.
H341	Susceptible d'induire des anomalies génétiques.
P201	Se procurer les instructions avant utilisation.
P202	Ne pas manipuler avant d'avoir lu et compris toutes les précautions de sécurité.
P280	Porter des gants de protection. Porter un équipement de protection du visage ou des yeux. Porter un vêtement de protection.
P264	Se laver soigneusement les mains après manipulation.
P308 + P313	EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée : Consulter un médecin.
P305 + P351 + P338	EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.
P337 + P313	Si l'irritation des yeux persiste : Consulter un médecin.
P405	Garder sous clef.
P501	Éliminer le contenu et le récipient conformément à l'ensemble des réglementations locales, régionales, nationales et internationales.

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

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

11. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales, nationales et européennes.

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

## Conservation

Conserver le produit EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) entre 2 et 8 °C. Conserver les produits EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent, EnVision FLEX /HRP, EnVision FLEX DAB+ Chromogen et EnVision FLEX Substrate Buffer à l'abri de la lumière entre 2 et 8 °C. Pendant la conservation, le bouchon doit être fermé.

La stabilité sur l'appareil des produits EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent, EnVision FLEX/HRP, EnVision FLEX DAB+ Chromogen et EnVision FLEX Substrate Buffer est de 75 heures. La stabilité sur l'appareil des solutions diluées EnVision FLEX™ Target Retrieval Solution, High pH et EnVision FLEX™ Target Retrieval Solution, Low pH est de 7 jours. La stabilité restante sur l'appareil est suivie par le logiciel Dako Omnis.

Ne pas utiliser après la date de péremption imprimée sur les flacons. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles indiquées, celles-ci doivent être validées par l'utilisateur. Si une coloration inattendue est observée, qui ne peut être expliquée par des différences dans les procédures du laboratoire et qu'un problème lié au produit est suspecté, contacter l'assistance technique de Dako.

## Préparation des réactifs

### A.1 Solution EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (DM848, réf. GV804) ou EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (DM849, réf. GV805)

Préparer une solution de travail en diluant la solution de restauration des cibles EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) ou EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) concentrée au 1/50ème dans de l'eau distillée ou déionisée. La procédure suivante est recommandée :

1. Remplissez une bouteille de liquide de rinçage en gros volume Dako Omnis d'eau distillée ou déionisée jusqu'à la limite de remplissage (3,325 L). Veillez à bien placer la bouteille de liquide sur une surface horizontale avant le remplissage.
2. Videz un flacon de 68 mL de concentré d'EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) ou d'EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Dako Omnis) dans la bouteille de liquide de rinçage en gros volume.
3. Retirez l'étiquette détachable du flacon de concentré pour l'apposer sur la bouteille.
4. Fermez le couvercle et retournez délicatement la bouteille de liquide de rinçage en gros volume deux à trois fois.

La solution diluée restante peut être conservée entre 2 et 8 °C pendant un mois. Une fois chargée sur l'instrument Dako Omnis, la solution diluée peut être utilisée pendant sept jours. Jetez la solution si elle a un aspect trouble.

### A.2 Tampon Wash Buffer (20x) (DM851, réf. GC807)

Préparez une solution de travail en diluant le tampon concentré Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) au 1/20ème dans une bouteille de liquide de rinçage en gros volume Dako Omnis en utilisant de l'eau distillée ou déionisée. La procédure suivante est recommandée pour éviter la formation de mousse :

1. Remplissez une bouteille de liquide de rinçage en gros volume Dako Omnis d'eau distillée ou déionisée jusqu'à la limite de remplissage (3,325 L). Veillez à bien placer la bouteille de liquide sur une surface horizontale avant le remplissage.
2. Videz un flacon de 175 mL de tampon concentré Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) dans la bouteille de liquide de rinçage en gros volume.
3. Retirez l'étiquette détachable du flacon de concentré pour l'apposer sur la bouteille.
4. Fermez le couvercle. Mélangez la bouteille de liquide de rinçage en la retournant délicatement dans le sens vertical entre 4 et 5 fois pour garantir un mélange adéquat.

La solution diluée restante peut être conservée entre 2 et 8 °C pendant un mois. Une fois chargée sur l'instrument Dako Omnis, la solution diluée peut être utilisée pendant sept jours. La stabilité restante sur l'appareil est suivie par le logiciel Dako Omnis. Jetez la solution si elle a un aspect trouble.

### A.3 EnVision FLEX Substrate Working Solution

La solution EnVision FLEX Substrate Working Solution contenant de la DAB est préparée sur l'instrument Dako Omnis. Le processus automatisé mélange un volume de produit EnVision FLEX DAB+ Chromogen (DM847) avec 50 volumes du produit EnVision FLEX Substrate Buffer (DM843). La solution de travail de substrat doit toujours être préparée pour un portoir (contenant 1 à 5 lames) à la fois. Les quantités fournies sont suffisantes pour le chargement de 200 portoirs.

## Prélèvement et préparation des échantillons

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

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

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

Les échantillons doivent être montés sur des lames de microscope. Pour une meilleure adhérence des coupes de tissu sur les lames de verre, il est recommandé d'utiliser les lames FLEX IHC Microscope Slides (réf. K8020).

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

**REMARQUE :** les lames de microscope doivent posséder une largeur adaptée à l'instrument Dako Omnis. Se reporter au Guide d'utilisation de base de Dako Omnis pour obtenir les indications sur les lames de microscope adaptées.

Les coupes en paraffine doivent être montées depuis un bain préchauffé contenant de l'eau distillée ou déionisée. Le bain-marie ne doit contenir aucun additif (tel que de la gélatine, de la poly-L-lysine, etc.). Les coupes doivent être séchées en les chauffant, en général à une température ne dépassant pas 60 °C pendant 60 minutes maximum. Pour garantir une bonne adhérence des coupes aux lames, il est important d'égoutter l'eau se trouvant sous les coupes avant de passer à la procédure de séchage dans une étuve.

## Procédure

Le système de visualisation EnVision FLEX a été développé pour être utilisé sur l'instrument Dako Omnis en association avec les anticorps primaires Dako.

La procédure automatisée sur l'instrument Dako Omnis inclut le déparaffinage des coupes de tissus, la restauration d'épitope induite par la chaleur, la coloration immunohistochimique et la contre-coloration des coupes de tissus fixées au formol et incluses en paraffine. Les étapes des protocoles pour les procédures automatisées peuvent être affichées, imprimées et modifiées comme indiqué dans le Guide d'utilisation de base et le Guide d'utilisation avancée du Dako Omnis.

La procédure de prétraitement et le protocole de coloration dépendent de l'anticorps utilisé. Veuillez vous reporter à la notice de chaque anticorps primaire Dako.

Avant d'exécuter des protocoles sur votre instrument Dako Omnis, veuillez lire attentivement le Guide d'utilisation de base du Dako Omnis. Veuillez vous reporter au Guide d'utilisation de base du Dako Omnis pour des instructions détaillées sur la préparation de l'instrument avant la coloration et au Guide d'utilisation avancée du Dako Omnis pour des instructions détaillées sur les protocoles.

Le protocole EnVision FLEX est préprogrammé dans le logiciel Dako Omnis. Veuillez vous reporter au Guide d'utilisation de base du Dako Omnis pour des instructions détaillées sur la préparation de l'instrument avant la coloration et au Guide d'utilisation avancée du Dako Omnis pour des instructions détaillées sur les protocoles.

## Procédure de coloration

Lors de l'utilisation d'anticorps primaires FLEX, prêts à l'emploi, pour le système Dako Omnis, le protocole de coloration optimal est programmé dans le logiciel Dako Omnis.

Veillez vous reporter à la notice de l'anticorps primaire FLEX, prêt à l'emploi, ou de l'anticorps primaire concentré Dako pour obtenir des informations sur la méthode de prétraitement et les durées d'incubation optimales. Pour configurer facilement de nouveaux protocoles, il est recommandé d'utiliser l'un des modèles de protocole décrits ci-dessous.

Depuis la station de travail Dako Omnis, choisissez l'un des trois modèles de protocole contenant les étapes de coloration et les durées d'incubation recommandées pour le système de visualisation EnVision FLEX (consulter le tableau 2 pour obtenir une vue globale) :

FLEX  
FLEX+ Mouse  
FLEX+ Rabbit

Les modèles de protocole peuvent être utilisés pour la génération de protocoles personnalisés pour chaque anticorps primaire. Les étapes de protocole suivantes peuvent être personnalisées :

- Réactif de restauration des cibles (pour une restauration d'épitope induite par la chaleur), température et durée d'incubation
- Anticorps primaire et durée d'incubation
- Durée d'incubation du polymère marqué (réduction uniquement)
- Réactif de contre-coloration et durée d'incubation

L'utilisateur doit vérifier le protocole appliqué.

Si les protocoles ne sont pas disponibles sur le système Dako Omnis, contacter le service technique de Dako.

Tableau 2. Présentation des modèles de protocole EnVision FLEX/FLEX+.

Phase	Étape	Réactif	Modèle de protocole de coloration		
			FLEX	FLEX+ Mouse	FLEX+ Rabbit
Déparaffinage	Déparaffinage	Agent d'élimination Clearify	oui	oui	oui
	Restauration des cibles	EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH ou EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH ou Réactif personnalisé	97 ± 2 °C* 30 min*	97 ± 2 °C* 30 min*	97 ± 2 °C* 30 min*
Coloration	<i>Lavage</i>	Wash Buffer (Dako Omnis)	lavage	lavage	lavage
	Anticorps primaire	20 min*	20 min*	20 min*	20 min*
	<i>Lavage</i>	Wash Buffer (Dako Omnis)	lavage	lavage	lavage
	Blocage enzymatique endogène	EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent	3 min	3 min	3 min
	<i>Lavage</i>	Wash Buffer (Dako Omnis)	lavage	lavage	lavage
	Réactif secondaire	EnVision FLEX+ Mouse ou Rabbit LINKER	-	Mouse LINKER 10 min	Rabbit LINKER 10 min
	<i>Lavage</i>	Wash Buffer (Dako Omnis)	-	lavage	lavage
Polymère marqué	EnVision FLEX/HRP	20 min*	20 min*	20 min*	

	<i>Lavage</i>	Wash Buffer (Dako Omnis)	lavage	lavage	lavage
	<i>Lavage</i>	Wash Buffer (Dako Omnis)	lavage	lavage	lavage
	Substrat chromogène	EnVision FLEX Substrate Working Solution	5 min	5 min	5 min
	<i>Lavage</i>	Wash Buffer (Dako Omnis)	lavage	lavage	lavage
Contre-coloration	Contre-coloration	Hématoxyline (Dako Omnis)*	3 min*	3 min*	3 min*
	<i>Lavage</i>	Eau déionisée	lavage	lavage	lavage
	<i>Lavage</i>	Wash Buffer (Dako Omnis)	lavage	lavage	lavage

\* Personnalisation possible.

### Procédure de post-coloration

1. Après la fin du cycle, retirez le portoir à lames de l'Unloading Station (Station de déchargement) et transférez les portoirs dans de l'eau déminéralisée propre.
2. Déshydratez, nettoyez et montez avec un milieu de montage permanent, et mettez en place des lamelles de protection sur les lames.

### Contrôle qualité

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

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

### Interprétation des résultats

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

### Limites

1. Pour une utilisation automatisée sur les instruments Dako Omnis uniquement. Lors de la procédure de coloration avec des anticorps primaires concentrés Dako, la procédure optimale doit être déterminée et validée par l'utilisateur.
2. Réservé à une utilisation sur des coupes de tissus fixées au formol et incluses en paraffine uniquement. Lors de l'utilisation de coupes congelées ou de frottis cellulaires, la procédure optimale doit être déterminée et vérifiée par l'utilisateur à moins qu'elle soit spécifiée dans la notice de l'anticorps primaire spécifique de Dako. Des modifications apportées à la procédure peuvent avoir une influence sur le nombre de tests que le kit permet d'effectuer.

# **DEUTSCH**

## **Verwendungszweck**

Zur In-vitro-Diagnostik.

Das Detektionssystem EnVision FLEX, High pH (Dako Omnis) ist zur Verwendung in der Immunhistochemie in Verbindung mit Dako Omnis Geräten bestimmt. Das System weist primäre Maus- und Kaninchen-Antikörper nach und zeigt die Reaktion durch EnVision FLEX DAB+ Chromogen an. Durch Verwendung von EnVision FLEX+ Rabbit LINKER (Code-Nr. GV809) bzw. EnVision FLEX+ Mouse LINKER (Code-Nr. GV821) können die Signale der primären Maus- bzw. Kaninchenantikörper verstärkt werden. Die EnVision FLEX Reagenzien sind zur Verwendung auf formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten vorgesehen.

## **Zusammenfassung und Erklärung**

Das Detektionssystem EnVision FLEX ist ein flexibles System, das bei Verwendung des in dieser Packungsbeilage angegebenen Protokolls optimale Färbeargebnisse auf Dako Omnis Geräten liefert.

Vor der Färbung müssen die formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitte im Gerät selbst einer Entparaffinierung und Rehydrierung unterzogen werden, gefolgt von hitzeinduzierter Epitopdemaskierung (HIER) mit dem in der Packungsbeilage des primären Antikörpers angegebenen Demaskierungs-Reagenz. Dieses Kit enthält EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (DM848). Alternativ kann EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code-Nr. GV804) oder EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Code-Nr. GV805) eingesetzt werden. Bei einigen primären Antikörpern sind die Färbeargebnisse besser, wenn anstelle des HIER-Verfahrens eine Gewebepreparierung mit Enzymen vorgenommen wird.

Endogene Peroxidase sollte mit dem im Kit enthaltenen EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (DM841) blockiert werden. Das wirkungsvolle Waschverfahren und die in den Dako-Reagenzien vorhandenen Stabilisationsproteine machen weitere Blockierungsschritte zur Verminderung einer unspezifischen Hintergrundfärbung überflüssig.

Empfohlen wird der Wash Buffer (20x) (GC807), der als optionales Reagenz erhältlich ist.

Primäre Antikörper gehören nicht zum Lieferumfang. Wir empfehlen die Verwendung von Dako FLEX Ready-to-Use Primary Antibodies bzw. Dako Concentrated Primary Antibodies (Richtlinien finden Sie in der jeweiligen Packungsbeilage).

EnVision FLEX+ Rabbit LINKER (Code-Nr. GV809) kann wahlweise zur Verstärkung des Signals von primären Kaninchen-Antikörpern eingesetzt werden. Bei der Verwendung von primären Maus-Antikörpern kann zur Verstärkung des Signals EnVision FLEX+ Mouse LINKER (Code-Nr. GV821) eingesetzt werden. Im Allgemeinen gilt: EnVision FLEX+ Rabbit LINKER liefert zwei- bis dreifache Signalverstärkung, EnVision FLEX+ Mouse LINKER vier- bis fünffache Signalverstärkung.

Dako EnVision FLEX/HRP Reagent (DM842) im Kit besteht aus einem Dextran-Backbone, an den zahlreiche Meerrettichperoxidase (HRP)-Moleküle und Moleküle sekundärer Antikörper gekoppelt sind. Die Kupplungsreaktion besteht aus einer einzigartigen chemischen Reaktion, die es ermöglicht, pro Backbone bis zu 100 HRP-Moleküle und bis zu 20 Antikörper-Moleküle zu binden.

Das Substratsystem im Kit besteht aus zwei Komponenten: EnVision FLEX DAB+ Chromogen (DM847), einer konzentrierten Diaminobenzidinlösung (DAB-Lösung) und dem wasserstoffperoxidhaltigen EnVision FLEX Substrate Buffer (DM843). Vor der Anwendung muss EnVision FLEX DAB+ Chromogen mit EnVision FLEX Substrate Buffer verdünnt werden. Das Substratsystem führt zu einem kontrastreichen braunen Endprodukt am Ort des Zielantigens. Chromogen und Substrat-Puffer werden zeitnah automatisch im Dako Omnis Gerät gemischt.

Zur Gegenfärbung wird Hematoxylin (Code-Nr. GC808) empfohlen. Dieses Reagenz ruft eine deutliche nukleare Blaufärbung hervor.

Zum Eindecken der gefärbten Gewebeschnitte eignen sich Eindeckmedien auf Basis organischer Lösungsmittel.

# Reagenzien

## A. Mitgelieferte Materialien

DM841

EnVision FLEX  
PEROXIDASE-BLOCKING  
REAGENT  
(Dako Omnis)

### EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (Dako Omnis)

8 x 22.5 mL, gebrauchsfertig

Phosphatpuffer mit Wasserstoffperoxid, 15 mmol/L NaN<sub>3</sub> und Detergens.

DM842

EnVision FLEX  
/HRP  
(Dako Omnis)

### EnVision FLEX/HRP (Dako Omnis)

8 x 22.5 mL, gebrauchsfertig

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

DM847

EnVision FLEX  
DAB+ CHROMOGEN  
(Dako Omnis)

### EnVision FLEX DAB+ Chromogen (Dako Omnis)

8 x 1 mL

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

DM843

EnVision FLEX  
SUBSTRATE BUFFER  
(Dako Omnis)

### EnVision FLEX Substrate Buffer (Dako Omnis)

16 x 26 mL

Gepufferte Lösung mit Wasserstoffperoxid und Konservierungsmittel.

DM848

EnVision FLEX  
TARGET RETRIEVAL SOLUTION  
HIGH pH (50x)  
(Dako Omnis)

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

9 x 68 mL (50x)

Tris/EDTA-Puffer, pH 9

## B. Zusätzlich benötigte Reagenzien und Zubehör (außerhalb des Lieferumfangs)

Antikörper Verdünnungsmittel, z. B. Dako Antibody Diluent (Code-Nr. S0809)

Clarify Clearing Agent (Code-Nr. GC810)

Gebrauchsfertige Dako FLEX Primary Antibodies oder entsprechend verdünnte konzentrierte primäre Kaninchen- bzw. Mausantikörper von Dako

Dako Omnis Gerät

Zubehör für Dako Omnis Geräte

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

FLEX Universal Negative Control, Rabbit, Ready-to-Use (Code-Nr. GA600), FLEX Universal Negative Control, Mouse, Ready-to-Use (Code-Nr. GA750) oder ein anderes geeignetes Negativkontrollreagenz für den primären Antikörper

Hematoxylin (Dako Omnis) (Code-Nr. GC808) oder ein geeignetes Hämatoxylin-Reagenz für die Gegenfärbung

Objektträger, z. B. Dako FLEX IHC Microscope Slides (Code-Nr. K8020)

Eindeckmedium (auf Basis organischer Lösungsmittel) und Deckgläser

Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) (Code-Nr. GC807)

0.3 M Sulfuric Acid (Code-Nr. GC203)

### C. Optionale Reagenzien

**GV804**  
DM848

EnVision FLEX  
TARGET RETRIEVAL SOLUTION  
HIGH pH (50x)  
(Dako Omnis)

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

3 x 68 mL (50x)

Tris/EDTA-Puffer, pH 9

**GV805**  
DM849

EnVision FLEX  
TARGET RETRIEVAL SOLUTION  
LOW pH (50x)  
(Dako Omnis)

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

3 x 68 mL (50x)

Zitratpuffer, pH 6.1

**GC807**  
DM851

WASH BUFFER (20x)  
(Dako Omnis)

**Wash Buffer (20x) (Dako Omnis)**

20 x 175 mL (20x)

Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20, pH 7.6 (±0.1).

**GC808**  
DM846

HEMATOXYLIN  
(Dako Omnis)

**Hematoxylin (Dako Omnis)**

8 x 22.5 mL, gebrauchsfertig

Wässrige Hämatoxylinlösung.

**GV809**  
DM845

EnVision FLEX+  
RABBIT LINKER  
(Dako Omnis)

**EnVision FLEX+ Rabbit LINKER (Dako Omnis)**

1 x 22.5 mL, gebrauchsfertig

Gepufferte Lösung mit Stabilisatorprotein und einem antimikrobiellen Wirkstoff.

**GV821**  
DM844

EnVision FLEX+  
MOUSE LINKER  
(Dako Omnis)

**EnVision FLEX+ Mouse LINKER (Dako Omnis)**

1 x 22.5 mL, gebrauchsfertig

Gepufferte Lösung mit Stabilisatorprotein und einem antimikrobiellen Wirkstoff.

**GV825**  
DM847 +  
DM843

**EnVision FLEX DAB+ Substrate Chromogen System (Dako Omnis)**

EnVision FLEX  
DAB+ CHROMOGEN  
(Dako Omnis)

**EnVision FLEX DAB+ Chromogen (Dako Omnis)**

2 x 1 mL

3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid in einem organischen Lösungsmittel.

Farbschwankungen bei diesem Reagenz (kräftig violett bis farblos) haben

keinerlei Einfluss auf die Leistung des Kits.

EnVision FLEX  
SUBSTRATE BUFFER  
(Dako Omnis)

**EnVision FLEX Substrate Buffer (Dako Omnis)**

4 x 26 mL

Gepufferte Lösung mit Wasserstoffperoxid und Konservierungsmittel.

## Vorsichtsmaßnahmen

1. Zur In-vitro-Diagnostik.
2. Für Fachpersonal.
3. EnVision FLEX/HRP enthält Material tierischen Ursprungs; es kann nicht ausgeschlossen werden, dass aufgrund der Herstellungsverfahren auch Spuren von Material menschlichen Ursprungs enthalten sind. Wie alle Produkte biologischen Ursprungs muss auch dieses entsprechend gehandhabt werden.
4. EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent, EnVision FLEX/HRP, EnVision FLEX Substrate Buffer, EnVision FLEX DAB+ Chromogen und EnVision FLEX Substrate Working Solution keinem starken Lichteinfall aussetzen.
5. Für EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent und EnVision FLEX/HRP steht auf Anfrage für Fachpersonal ein Sicherheitsdatenblatt zur Verfügung.
6. EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) enthält 5-10% Trometamol, 1-5% Nonylphenol, ethoxyliert, und 1-5% Essigsäure, Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA) Dinatriumsalz-Dihydrat.

EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) ist wie folgt gekennzeichnet:



### Warnung

H315	Verursacht Hautreizungen.
H319	Verursacht schwere Augenreizung.
H411	Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
P280	Augen- oder Gesichtsschutz tragen.
P273	Freisetzung in die Umwelt vermeiden.
P264	Nach Gebrauch Hände gründlich waschen.
P302 + P352 + P362 + P364	BEI HAUTKONTAKT: Mit viel Wasser und Seife waschen. Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.
P332 + P313	Bei Hautreizung: Ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P305 + P351 + P338	BEI AUGENKONTAKT: Vorsichtig mehrere Minuten lang mit Wasser spülen. Gegebenenfalls Kontaktlinsen herausnehmen. Spülung fortsetzen.
P337 + P313	Bei anhaltender Augenreizung: Ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P501	Inhalt und Behälter gemäß lokalen, regionalen, nationalen und internationalen Vorschriften der Entsorgung zuführen.

7. EnVision FLEX Substrate Buffer enthält < 1% Imidazol und ist wie folgt gekennzeichnet:



### Gefahr

H360	Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
P201	Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
P202	Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.
P280	Schutzhandschuhe tragen. Augen- oder Gesichtsschutz tragen. Schutzkleidung tragen.
P308/P313	BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P405	Unter Verschluss aufbewahren.
P501	Inhalt und Behälter gemäß lokalen, regionalen, nationalen und internationalen Anforderungen der Entsorgung zuführen.

8. EnVision FLEX DAB+ Chromogen enthält < 10% 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid und ist wie folgt gekennzeichnet:



**Gefahr**

- |                    |  |
|--------------------|--|
| H319               | Verursacht schwere Augenreizung.   |
| H350               | Kann Krebs erzeugen.   |
| H341               | Kann vermutlich genetische Defekte verursachen.  |
| P201               | Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.   |
| P202               | Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.   |
| P280               | Schutzhandschuhe tragen. Augen- oder Gesichtsschutz tragen. Schutzkleidung tragen.   |
| P264               | Nach Gebrauch Hände gründlich waschen.   |
| P308 + P313        | BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztliche Hilfe hinzuziehen.  |
| P305 + P351 + P338 | BEI AUGENKONTAKT: Vorsichtig mehrere Minuten lang mit Wasser spülen.<br>Gegebenenfalls Kontaktlinsen herausnehmen. Spülung fortsetzen. |
| P337 + P313        | Bei anhaltender Augenreizung: Ärztliche Hilfe hinzuziehen.   |
| P405               | Unter Verschluss aufbewahren.  |
| P501               | Inhalt und Behälter gemäß lokalen, regionalen, nationalen und internationalen Vorschriften der Entsorgung zuführen.                    |
9. EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent enthält Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ), eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. Bei den in diesem Produkt verwendeten Konzentrationen kann Natriumazid, obwohl nicht als gefährlich klassifiziert, mit in Wasserleitungen vorhandenem Blei oder Kupfer reagieren und zur Bildung von hochexplosiven Metallazid-Anreicherungen führen. Nach der Entsorgung muss mit reichlich Wasser nachgespült werden, um Metallazid-Anreicherung zu vermeiden.
10. Geeignete Schutzkleidung tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.
11. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, staatlichen und EU-rechtlichen Richtlinien zu entsorgen.

In der Regel ist es Personen unter 18 Jahren nicht gestattet, mit diesem Produkt zu arbeiten.

Alle Anwender müssen sorgfältig in das richtige Arbeitsverfahren, die gefährlichen Eigenschaften des Produkts und die notwendigen Sicherheitsmaßnahmen eingewiesen werden. Zusätzliche Informationen bitte dem Sicherheitsdatenblatt (SDS) entnehmen.

## Lagerung

EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) bei 2-8 °C lagern. EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent, EnVision FLEX/HRP, EnVision FLEX DAB+ Chromogen und EnVision FLEX Substrate Buffer im Dunkeln bei 2-8 °C lagern. Während der Lagerung ist der Deckel geschlossen zu halten.

Die Stabilität im Gerät von EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent, EnVision FLEX/HRP, EnVision FLEX DAB+ Chromogen und EnVision FLEX Substrate Buffer beträgt 75 Stunden. Die Stabilität im Gerät von verdünnter EnVision FLEX™ Target Retrieval Solution, High pH und Low pH beträgt 7 Tage. Die verbleibende Stabilität im Gerät wird von der Dako Omnis Software protokolliert.

Nach Ablauf des auf den Behältern aufgedruckten Verfallsdatums nicht mehr verwenden. Werden die Reagenzien unter anderen als den angegebenen Bedingungen aufbewahrt, müssen diese Bedingungen vom Benutzer überprüft werden. Wenn eine unerwartete Anfärbung beobachtet wird, die durch Abweichungen in den Labormethoden nicht erklärt werden kann, und falls Verdacht auf ein Problem mit dem Produkt besteht, ist bitte Kontakt mit dem technischen Kundendienst von Dako aufzunehmen.

## Vorbereitung der Reagenzien

### A.1 EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (DM848, Code-Nr. GV804) oder EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (DM849, Code-Nr. GV805)

Eine Arbeitslösung durch Verdünnen der konzentrierten EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) oder Low pH (50x) mit destilliertem oder entionisiertem Wasser im Verhältnis 1:50 herstellen. Das folgende Verfahren wird empfohlen:

1. Eine Dako Omnis Spülflasche bis zur Fülllinie mit destilliertem oder entionisiertem Wasser füllen (3.325 L). Dabei muss die Spülflasche auf eine gerade Oberfläche gestellt werden, bevor sie gefüllt wird.
2. Den Inhalt einer 68 mL-Flasche EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) oder Low pH (50x) (Dako Omnis) Konzentrat in die Spülflasche geben.
3. Das abnehmbare Etikett von der Konzentratflasche auf die Spülflasche kleben.
4. Den Deckel festdrehen und die Spülflasche vorsichtig 2 bis 3 Mal umdrehen.

Unverbrauchte verdünnte Lösung kann bei 2-8 °C einen Monat lang aufbewahrt werden. Die verdünnte Lösung ist 7 Tage lang verwendbar, wenn sie im Dako Omnis Gerät aufbewahrt wird. Angesetzte Lösung mit getrübbtem Aussehen muss entsorgt werden.

### A.2 Wash Buffer (20x) (DM851, Code-Nr. GC807)

Eine Arbeitslösung durch Verdünnen des konzentrierten Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) mit destilliertem oder entionisiertem Wasser im Verhältnis 1:20 in der Dako Omnis Spülflasche herstellen. Das folgende Verfahren kann verwendet werden, um Schäumen zu minimieren:

1. Eine Dako Omnis Spülflasche bis zur Fülllinie mit destilliertem oder entionisiertem Wasser füllen (3.325 L). Dabei muss die Spülflasche auf eine gerade Oberfläche gestellt werden, bevor sie gefüllt wird.
2. Den Inhalt einer 175-mL-Flasche mit konzentriertem Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) in die Spülflasche geben.
3. Das abnehmbare Etikett von der Konzentratflasche auf die Spülflasche kleben.
4. Den Deckel festdrehen. Durch behutsames 4-5-maliges vertikales Umdrehen der Spülflasche den Inhalt gut durchmischen.

Unverbrauchte verdünnte Lösung kann bei 2-8 °C einen Monat lang aufbewahrt werden. Die verdünnte Lösung ist 7 Tage lang verwendbar, wenn sie im Dako Omnis Gerät aufbewahrt wird. Die verbleibende Stabilität im Gerät wird von der Dako Omnis Software protokolliert. Angesetzte Lösung mit getrübbtem Aussehen muss entsorgt werden.

### A.3 EnVision FLEX Substrate Working Solution

Die DAB-haltige EnVision FLEX Substrate Working Solution wird im Dako Omnis Gerät vorbereitet. Es werden automatisch 1 Teil EnVision FLEX DAB+ Chromogen (DM847) mit 50 Teilen EnVision FLEX Substrate Buffer (DM843) gemischt. Pro Vorgang wird Substrate Working Solution für einen Objektträgerhalter (mit 1-5 Objektträgern) zubereitet. Die zur Verfügung stehenden Mengen sind ausreichend für das Laden von 200 Objektträgerhaltern.

## Entnahme und Vorbereitung der Probe

Als Proben kommen formalinfixierte, paraffineingebettete Gewebeschnitte in Betracht.

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

Die optimale Dicke paraffineingebetteter Schnitte beträgt 4 µm.

Die Proben auf Mikroskop-Objektträgern fixieren. Für eine bessere Haftung der Gewebeschnitte an den Glas-Objektträgern werden FLEX IHC Microscope Slides (Code-Nr. K8020) empfohlen.

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

**HINWEIS:** Die Breite der Objektträger muss zum Dako Omnis Gerät passen. Angaben zu geeigneten Mikroskop-Objektträgern bitte dem Dako Omnis Benutzerhandbuch Basiswissen entnehmen.

Paraffinschnitte sollten aus einem vorgewärmten Wasserbad mit destilliertem oder deionisiertem Wasser heraus fixiert werden. Dieses Wasserbad darf keine Zusätze enthalten (wie z. B. Gelatine, Poly-L-Lysin usw.). Die Schnitte werden bis zu 60 Minuten lang unter Wärme getrocknet, gewöhnlich bei einer Temperatur von höchstens 60 °C. Damit die Schnitte gut auf den Objektträgern haften, muss vor dem Trockenprozess im Ofen alles Wasser unter den Schnitten entfernt worden sein.

## Verfahren

Das Detektionssystem EnVision FLEX wurde für die Verwendung im Dako Omnis Gerät mit primären Antikörpern von Dako entwickelt.

Das automatisierte Verfahren des Dako Omnis umfasst die Entparaffinierung von Gewebeschnitten, die hitzeinduzierte Epitopdemaskierung sowie die immunhistochemische Färbung und Gegenfärbung von formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten. Die Protokollschritte für die automatisierten Verfahren können gemäß dem Dako Omnis Benutzerhandbuch Basiswissen und dem Ausführlichen Benutzerhandbuch angezeigt, ausgedruckt und bearbeitet werden.

Vorbehandlungsverfahren und Färbeprotokoll hängen vom Antikörper ab. Angaben bitte der Packungsbeilage des jeweiligen primären Antikörpers von Dako entnehmen.

Lesen Sie vor dem Ausführen von Protokollen auf dem Dako Omnis Gerät das Benutzerhandbuch Basiswissen für Dako Omnis sorgfältig durch. Im Benutzerhandbuch Basiswissen für Dako Omnis finden Sie detaillierte Anweisungen zur Vorbereitung des Geräts zwecks Färben. Im Ausführlichen Benutzerhandbuch für Dako Omnis finden Sie detaillierte Anweisungen zu Protokollen.

Das EnVision FLEX Protokoll ist in der Dako Omnis Software vorprogrammiert. Im Benutzerhandbuch Basiswissen für Dako Omnis finden Sie detaillierte Anweisungen zur Vorbereitung des Geräts zwecks Färben. Im Ausführlichen Benutzerhandbuch für Dako Omnis finden Sie detaillierte Anweisungen zu Protokollen.

## Färbeverfahren

Bei Verwendung von FLEX RTU Primary Antibodies für Dako Omnis wird das optimale Färbeprotokoll in der Dako Omnis Software programmiert.

Angaben zu optimaler Vorbehandlung und Inkubationszeiten bitte der Packungsbeilage des jeweiligen FLEX RTU Primary Antibody oder konzentrierten Primary Antibody von Dako entnehmen. Es wird empfohlen, zum einfachen Erstellen neuer Protokolle eine der unten beschriebenen Protokollvorlagen zu verwenden.

Wählen Sie in der Dako Omnis Arbeitsstation eine von drei Protokollvorlagen mit den empfohlenen Färbeschritten und Inkubationszeiten für das EnVision FLEX Detektionssystem (Übersicht siehe Tabelle 2):

FLEX  
 FLEX+ Mouse  
 FLEX+ Rabbit

Mit den Protokollvorlagen können für die spezifischen primären Antikörper benutzerdefinierte Protokolle erstellt werden. Die folgenden Protokollschritte können angepasst werden:

- Demaskierungs-Reagenz (für hitzeinduzierte Epitopdemaskierung), Temperatur und Inkubationszeit
- primärer Antikörper und Inkubationszeit
- Inkubationszeit für markiertes Polymer (nur Reduktion)
- Reagenz für Gegenfärbung und Inkubationszeit

Die Verifizierung des verwendeten Protokolls obliegt dem Anwender.

Wenn die Protokolle im Dako Omnis System nicht verfügbar sind, wenden Sie sich an den technischen Kundendienst von Dako.

Tabelle 2. Übersicht über die EnVision FLEX/Flex+ Protokollvorlagen.

Phase	Schritt	Reagenz	Vorlage Färbeprotokoll		
			FLEX	FLEX+ Mouse	FLEX+ Rabbit
Wachsentfernung	Wachsentfernung	Clarify Clearing Agent	Ja	Ja	Ja
	Demaskierung	EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH oder EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH oder anwenderspezifisches Reagenz*	97±2 °C* 30 Min.	97±2 °C* 30 Min.	97±2 °C* 30 Min.
Färbung	<i>Waschung</i>	Wash Buffer (Dako Omnis)	Waschung	Waschung	Waschung
	Primärantikörper	20 Min.*	20 Min.*	20 Min.*	20 Min.*
	<i>Waschung</i>	Wash Buffer (Dako Omnis)	Waschung	Waschung	Waschung
	Endogener Enzymblock	EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent	3 Min.	3 Min.	3 Min.
	<i>Waschung</i>	Wash Buffer (Dako Omnis)	Waschung	Waschung	Waschung
	Sekundäres Reagenz	EnVision FLEX+ Mouse oder Rabbit LINKER	-	Mouse LINKER 10 min	Rabbit LINKER 10 min
	<i>Waschung</i>	Wash Buffer (Dako Omnis)	-	Waschung	Waschung
	Markiertes Polymer	EnVision FLEX/HRP	20 Min.*	20 Min.*	20 Min.*
	<i>Waschung</i>	Wash Buffer (Dako Omnis)	Waschung	Waschung	Waschung
	<i>Waschung</i>	Wash Buffer (Dako Omnis)	Waschung	Waschung	Waschung
	Substratchromogen	EnVision FLEX Substrate Working Solution	5 Min.	5 Min.	5 Min.
	<i>Waschung</i>	Wash Buffer (Dako Omnis)	Waschung	Waschung	Waschung

Gegenfärbung	Gegenfärbung	Hematoxylin (Dako Omnis)*	3 Min.*	3 Min.*	3 Min.*
	<i>Waschung</i>	Entionisiertes Wasser	Waschung	Waschung	Waschung
	<i>Waschung</i>	Wash Buffer (Dako Omnis)	Waschung	Waschung	Waschung

\* Anwenderspezifische Anpassung möglich.

### Nach dem Färbeverfahren

1. Nach beendetem Durchlauf Objektträgerhalter aus der Entladestation entnehmen und in frisches, entionisiertes Wasser transferieren.
2. Dehydrieren, klären, mit permanenten Eindeckmedien eindecken und Objektträger mit Deckglas versehen.

### Qualitätskontrolle

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

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













### Auswertung der Ergebnisse

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

### Einschränkungen

1. Nur für die automatisierte Benutzung in Dako Omnis Geräten. Wenn Färbeverfahren mit konzentrierten primären Antikörpern von Dako durchgeführt werden, muss das optimale Verfahren vom Anwender bestimmt und validiert werden.
2. Nur zur Benutzung mit formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten. Bei der Benutzung gefrorener Gewebeschnitte oder Zellabstriche muss der optimale Arbeitsablauf vom Benutzer ermittelt und festgelegt werden, solange dieser nicht in der Packungsbeilage für den spezifischen Dako Primary Antibody beschrieben ist. Änderungen des Arbeitsablaufes können Auswirkungen auf die Anzahl der im Kit mitgelieferten Tests haben.

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

 <p>Catalogue number Référence du catalogue Katalognummer</p>	 <p>Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich</p>	 <p>Batch code Code du lot Chargenbezeichnung</p>	 <p>GHS hazard pictogram (consult precautions section) Pictogrammes de danger SGH (voir la section Précautions d'emploi) GHS-Gefahrenpiktogramm (siehe Abschnitt mit Vorsichtsmaßnahmen)</p>
 <p>In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-vitro-Diagnostikum</p>	 <p>Store in the dark Conserver dans l'obscurité Im Dunkeln aufbewahren</p>	 <p>Use by Utiliser avant Verwendbar bis</p>	 <p>GHS hazard pictogram (consult precautions section) Pictogrammes de danger SGH (voir la section Précautions d'emploi) GHS-Gefahrenpiktogramm (siehe Abschnitt mit Vorsichtsmaßnahmen)</p>
 <p>Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten</p>	 <p>Contains sufficient for &lt;n&gt; tests Contenu suffisant pour &lt;n&gt; tests Inhalt ausreichend für &lt;n&gt; Tests</p>	 <p>Manufacturer Fabricant Hersteller</p>	 <p>GHS hazard pictogram (consult precautions section) Pictogrammes de danger SGH (voir la section Précautions d'emploi) GHS-Gefahrenpiktogramm (siehe Abschnitt mit Vorsichtsmaßnahmen)</p>

Revision / Révision / Revision 2019.12

The Dako EnVision Systems are covered by U.S. Patent 5,543,332.

Les systèmes Dako EnVision sont couverts par le brevet américain 5,543,332 et le brevet européen 594,772.

Die Dako EnVision Systeme sind durch folgende Patente geschützt: US-Patent 5,543,332 und Europäisches Patent 594,772.



Dako Denmark ApS  
Produktionsvej 42  
DK-2600 Glostrup  
Denmark

Tel. +45 44 85 95 00  
Fax +45 44 85 95 95

Manufactured by Dako North America, Inc. for  
Dako Denmark ApS  
Fabriqué par Dako North America, Inc. pour  
Dako Denmark ApS  
Hersteller: Dako North America, Inc. für  
Dako Denmark ApS

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)