

**Dako**  
**EnVision+ System-HRP (AEC)**  
 For Use with Mouse Primary Antibodies

Codice n. K4004 15 mL  
 Codice n. K4005 110 mL

**Uso previsto**  
 Per uso diagnostico in vitro.

Le seguenti istruzioni sono relative al sistema **Dako EnVision+ System- HRP (AEC)** (Dako EnVision+ System, HRP).

Il presente kit è destinato all'uso con anticorpi primari di topo forniti dall'utente per l'identificazione qualitativa, mediante microscopia ottica, degli antigeni nei tessuti normali e patologici inclusi in paraffina, nelle sezioni al criostato di tessuti o nelle preparazioni cellulari. Si prevede l'utilizzo di tessuti trattati con numerosi fissativi tra i quali l'etanolio, il B-5, il fissativo di Bouin, la formalina zincata e la formalina neutra tamponata.

Fare riferimento alle "Istruzioni generali per la colorazione immunostochimica" o alle "Istruzioni" per il Sistema di determinazione delle procedure IHC in relazione a: (1) Principio della procedura, (2) Materiale necessario, ma non fornito, (3) Conservazione, (4) Preparazione del campione, (5) Procedura di colorazione, (6) Controllo qualità, (7) Eventuali problemi e risoluzione, (8) Interpretazione della colorazione, (9) Limitazioni.

**Sommario e spiegazione**

EnVision+ System, HRP è una tecnica di colorazione immunostochimica a due stadi. Il sistema si basa su un polimero marcato con HRP e coniugato con anticorpi secondari. Il polimero marcato non contiene avidina o biotina. Pertanto, la colorazione non specifica derivante da attività avidina-biotina endogena nel fegato, nel rene, nei tessuti linfatici e nelle sezioni al criostato viene eliminata o ridotta in modo considerevole. Tutti i reagenti di EnVision+ System, HRP con substrato AEC+ sono pronti per l'uso. Si tratta di un sistema con un metodo altamente sensibile grazie al quale le diluizioni ottimali dell'anticorpo primario sono fino a 20 volte maggiori di quelle utilizzate per la tecnica PAP tradizionale e assai più numerose di quelle utilizzate per i metodi tradizionali ABC o LSAB. Questo protocollo offre un sistema amplificato di generazione di segnali per la determinazione degli antigeni presenti in basse concentrazioni o per anticorpi primari di basso titolo.

Gli anticorpi primari prodotti nel topo reagiscono bene con il polimero marcato. L'interpretazione di una eventuale colorazione positiva, o la sua assenza, dovrà essere accompagnata da studi morfologici e istologici, con relativi controlli.

**Principio della procedura**

Inibire qualsiasi attività di perossidasi endogena incubando i campioni con Dako Peroxidase Block per cinque minuti. Il campione sarà successivamente incubato con un anticorpo primario di topo adeguatamente diluito e caratterizzato; a ciò faranno seguito due incubazioni sequenziali di 30 minuti l'una con il polimero marcato.

*È opportuno far presente che per gli anticorpi che richiedono una digestione enzimatica o lo smarcheramento, potrebbe essere necessario aumentare di 5-10 minuti i tempi di incubazione dell'anticorpo primario e del polimero marcato.* Per portare a termine la colorazione si richiede un'incubazione di 5-30 minuti con substrato-cromogeno 3-ammino-9-etilcarbazolo (AEC)+ che porta alla formazione di un precipitato di colore rosso nel sito antigenico. (L'AEC è potenzialmente cancerogeno, vedere la sezione Precauzioni).

**Reagente fornito**

Codice n. K4004: Il kit contiene i seguenti materiali, sufficienti per 150 sezioni di tessuto, con impiego di 100 µL per sezione:

Flacone n.	Quantità	Descrizione
1	1x15 mL	<b>Bloccante della perossidasi</b> <b>PEROXIDASE BLOCK</b> Perossido di idrogeno al 0,03% contenente azide sodica.
2	1x15 mL	<b>Polimero marcato</b> <b>LABELLED POLYMER-HRP</b> <b>ANTI-MOUSE</b> Polimero di perossidasi coniugato con anti-immunoglobuline murine di capra, fornito in tampone Tris-HCl contenente proteina stabilizzata ed un agente antimicrobico.
3	1x15 mL	<b>Substrato-cromogeno AEC+</b> <b>AEC+</b> <b>SUBSTRATE CHROMOGEN</b> 3-ammino-9-etilcarbazolo contenente perossido di idrogeno, stabilizzanti, enhancer e un agente antimicrobico. Conservare a 2-8 °C.

**Codice n. K4005:** il kit contiene i seguenti materiali, sufficienti per 1100 sezioni di tessuto, con impiego di 100 µL per sezione.

<i>Flacone n.</i>	<i>Quantità</i>	<i>Descrizione</i>
1	1x110 mL	<b>Bloccante della perossidasi</b> <b>PEROXIDASE BLOCK</b> Perossido di idrogeno al 0,03% contenente azide sodica.
2	1x110 mL	<b>Polimero marcato</b> <b>LABELLED POLYMER-HRP</b> <b>ANTI-MOUSE</b> Polimero marcato con perossidasi coniugato con anti-immunoglobuline murine di capra, fornito in tampone Tris-HCl contenente proteina stabilizzata ed un agente antimicrobico.
3	1x110 mL	<b>Substrato-cromogeno AEC+</b> <b>AEC+</b> <b>SUBSTRATE CHROMOGEN</b> 3-ammino-9-etilcarbazoio contenente perossido di idrogeno, stabilizzanti, enhancer e un agente antimicrobico. Conservare a 2-8 °C.

**Materiale necessario, ma non fornito**

Salviettine assorbenti

Tessuto di controllo, positivo e negativo

Controcolorazione; acquosa, per esempio ematossilina di Mayer, oppure Ematossilina di Mayer modificata di Lillie (codice n. S3309)

Coprioggetti

Acqua distillata Etanolo, assoluto e al 95%

Microscopio ottico (20x-800x)

Mezzi di montaggio, quali GlycerGel™ Mounting Medium (codice n. C0563), oppure Faramount, Aqueous Mounting medium, pronto per l'uso (codice n. S3025), o mezzo di montaggio permanente non acquoso, come ad esempio Ultramont (codice n. S1964)

Anticorpi primari e reagente di controllo negativo

Vetrini, rivestiti di poli-L-lisina, oppure vetrini silanizzati (codice n. S3003)

Vaschette o bagni per la colorazione

Contaminuti (per intervalli di 3-40 minuti)

Bocchette di lavaggio

Soluzione per tampone di lavaggio

Xilene, toluene o derivati dello xilene

**Materiale facoltativo necessario, ma non fornito**

Diossido di ammonio, 15 mol/L diluito a 0,037 mol/L

PAP Pen (codice n. S2002)

**Precauzioni**

1. Per uso professionale.
2. Il prodotto contiene azide sodica (NaN<sub>3</sub>), una sostanza chimica altamente tossica allo stato puro. Alle concentrazioni indicate, il prodotto non è classificato come pericoloso, ma l'accumulo di azide sodica potrebbe reagire con le tubature in piombo e in rame formando ossidi metallici altamente esplosivi. Per lo smaltimento, è consigliabile sciacquare abbondantemente con acqua per evitare l'accumulo di azidi metalliche nelle tubature.
3. Il Substrato-Cromogeno AEC+ è sensibile alla contaminazione da numerosi agenti ossidanti, come quelli di metalli, batteri, polvere e occhiali di laboratorio comunemente usati. Per evitare contaminazioni e scadenze anticipate, non esporre la soluzione AEC+ a possibili fonti di contaminazione e non pipettare mai direttamente dalla bottiglia. Versare la quantità necessaria all'interno di un contenitore pulito e pipettare da esso. Non reinserire la soluzione AEC+ in eccesso nel contenitore iniziale.
4. Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza indicata per il metodo di conservazione prescritto. Se i reagenti sono conservati in condizioni diverse da quelle specificate nel foglietto illustrativo, l'utente dovrà verificarne le condizioni (14).
5. Non scambiare tra loro reagenti provenienti da lotti differenti o da kit di altri fabbricanti.
6. Gli enzimi e i substrati-cromogeni possono essere alterati se esposti a livelli eccessivi di luce. Non conservare i componenti del kit né procedere alla colorazione in condizioni di luce intensa, come per esempio con luce solare diretta.
7. Rispettare i tempi o le temperature di incubazione per evitare risultati errati; ogni eventuale modifica dovrà essere validata dall'utente.
8. Utilizzare le procedure di manipolazione indicate per i prodotti derivati da fonti biologiche.
9. Indossare protezioni individuali idonee per evitare il contatto con gli occhi e con la pelle.
10. Le soluzioni non utilizzate devono essere smaltite in base alle normative locali vigenti.
11. Schede di sicurezza sono disponibili su richiesta degli operatori specializzati.

**Informazioni su rischi e sicurezza**

**K4004 Peroxidase Block**

R22 Nocivo se ingerito.

**K4005 Peroxidase Block**

R22 Nocivo se ingerito.

### Preparazione del reagente

È opportuno preparare i seguenti reagenti prima della colorazione:

**Soluzione per tampone di lavaggio** Per la determinazione IHC manuale o automatica si raccomanda l'uso del tampone di lavaggio TBST, Soluzione salina di tampone tris con Tween, 0,05 mol/L (codice n. S3006). TBS, Soluzione salina di tampone Tris, 0,05 mol/L (codice n. S1968) e PBS, Soluzione salina a tampone fosfato, 0,02 mol/L (codice n. S3024) sono considerate soluzioni altrettanto adatte per la colorazione manuale. Si sconsiglia l'uso di soluzioni per tamponi di lavaggio contenenti azide sodica. L'azide sodica blocca la perossidasi (HRP), dando origine ad una colorazione negativa. Conservare il tampone inutilizzato a 2-8 °C. Eliminare il tampone se appare torbido.

Utilizzare acqua distillata per dilavare il bloccante della perossidasi, il substrato e la controcolorazione.

**Anticorpo primario** Gli anticorpi NP-Series "Plus" ottimizzati, pronti per l'uso, sono raccomandati per l'utilizzo con i sistemi di ricerca Dako "Plus" ad alta sensibilità. Sono disponibili, inoltre, anticorpi concentrati Dako. L'utente finale dovrà eseguire l'ottimizzazione degli anticorpi concentrati. La preparazione delle diluizioni dovrà avvenire con diluente per anticorpi Antibody Diluent (codice n. S0809), o con diluente con tampone Tris HC1, 0,05 mol/L contenente albumina di siero bovino (BSA) al 1%. Gli anticorpi Dako N-Series, pronti per l'uso, non sono ottimizzati per l'utilizzo con i sistemi di ricerca Dako "Plus". Per la maggior parte degli anticorpi usati in questo kit è sufficiente un tempo di incubazione di 30 minuti.

**Reagente di controllo negativo** Durante l'utilizzo degli anticorpi Dako NP-Series "Plus", pronti per l'uso, si raccomanda il reagente di controllo negativo Universal Negative Control(s)+. Questi controlli sono ottimizzati per l'uso con anticorpi NP-Series "Plus", pronti per l'uso, di topo (codice n. NP015) e di coniglio (codice n. NP001).

In teoria, il reagente di controllo negativo contiene un anticorpo che non evidenzia alcuna reattività specifica con i tessuti umani o con il siero normale/non immune presenti nella stessa matrice/soluzione dell'anticorpo primario diluito. Il reagente di controllo negativo dovrà appartenere alla stessa sottoclasse e specie animale dell'anticorpo primario, diluito alla stessa concentrazione di immunoglobulina e di proteina dell'anticorpo primario diluito, utilizzando lo stesso diluente. Il periodo di incubazione per il reagente di controllo negativo dovrà essere quello utilizzato per l'anticorpo primario.

Per ulteriori informazioni sui controlli positivi e negativi fare riferimento alle "Istruzioni generali per la colorazione immunocitochimica".

**Controcolorazione** Il prodotto finale colorato della reazione di colorazione è solubile in alcoli e dovrà essere utilizzato soltanto con controcoloranti acquosi, come l'Ematossilina di Mayer oppure Ematossilina di Mayer modificata di Lillie (codice n. S3309). Successivamente alla controcolorazione con ematossilina, sciacquare con acqua distillata, quindi immergere i vetrini con i tessuti in un bagno ammoniacale 0,037 mol/L o in un agente colorante blu simile. L'ammoniaca 0,037 mol/L viene preparata mescolando 2,5 mL di idrossido di ammonio 15 mol/L (concentrato) con acqua ad un volume di 1 l.

La soluzione ammoniacale 0,037 mol/L inutilizzata può essere conservata a temperatura ambiente (20-25 °C) in un fiasco ben chiuso per un massimo di 12 mesi.

Per tecniche di controcolorazione alternative consultare le linee guida del fabbricante.

**Mezzi di Montaggio** Per il montaggio acquoso, si raccomanda l'uso di Glycergel Mounting Medium (codice n. C0563), oppure Faramount, Aqueous Mounting Medium, pronto per l'uso (codice n. S3025). Riscaldare Glycergel ad una temperatura di almeno 50 °C prima dell'uso. Potrà essere utilizzato anche un mezzo di montaggio permanente, non acquoso (Ultramount, codice n. S1964).

### Conservazione

I reagenti di EnVision+ System, HRP devono essere conservati a 2-8 °C. Non congelare. Non utilizzare dopo la data di scadenza riportata sulla fiala dei reagenti e sull'etichetta della confezione.

Qualsiasi alterazione nell'aspetto dei reagenti, come la precipitazione, potrebbe indicare l'instabilità o il deterioramento del prodotto. In questi casi, i reagenti non dovranno essere utilizzati.

La soluzione di substrato-cromogeno AEC+ è instabile a temperature superiori a 8 °C. Utilizzare e conservare la soluzione di substrato-cromogeno AEC+ all'intervallo di temperatura 2-8 °C raccomandato. È possibile utilizzare la soluzione immediatamente dopo averla estratta dal frigorifero. Riportare subito a 2-8 °C dopo l'uso.

Non esistono segni evidenti che indichino l'instabilità dei prodotti. Per questo motivo, è necessario eseguire gli opportuni controlli positivi e negativi contemporaneamente ai campioni del paziente. Se si dovesse osservare una colorazione inattesa non attribuibile a modifiche delle procedure di laboratorio e si sospetta un problema relativo al prodotto, contattare il Servizio Tecnico Dako.

### Preparazione del campione

#### Tessuto incluso in paraffina

Prima della colorazione immunocitochimica (IHC), i tessuti devono essere fissati e trattati. La fissazione impedisce l'autolisi e la putrefazione dei tessuti escissi, preserva l'antigenicità, aumenta l'indice di rifrazione dei costituenti tissutali ed accresce la resistenza degli elementi cellulari al trattamento dei tessuti. Il trattamento dei tessuti prevede la disidratazione, la rimozione degli agenti disidratanti, l'infiltrazione del mezzo di inclusione e l'inclusione e taglio dei tessuti. I fissativi più comuni per la preparazione IHC dei tessuti sono illustrati nelle Istruzioni generali per la colorazione immunocitochimica. Tali informazioni vanno intese soltanto come guida. Le procedure ottimali devono essere individuate e verificate dall'utente. (Per maggiori informazioni sulla fissazione e sul trattamento dei tessuti, fare riferimento alle sezioni 3 e 4.)

## Procedura di colorazione

### Note sulla procedura

Prima dell'uso, l'utente dovrà leggere attentamente le seguenti istruzioni e conoscere bene tutti i componenti del kit. Per motivi di praticità, le istruzioni sono state riassunte su un inserto laminato di plastica.

I reagenti e le istruzioni fornite in questo kit sono stati studiati per fornire risultati ottimali. Ulteriore diluizione dei reagenti o alterazioni di tempi e temperature di incubazione possono portare a risultati errati.

Il flacone 1 e il flacone 2 devono essere equilibrati a temperatura ambiente (20–25 °C) prima dell'imm unicolorazione. Preferibilmente, tutte le fasi di incubazione dovrebbero essere eseguite a temperatura ambiente. Per motivi di praticità è possibile utilizzare il substrato AEC+ immediatamente dopo la sua estrazione dal frigorifero e non è necessario portarlo a temperatura ambiente prima dell'uso. Riportare a 2–8 °C dopo l'uso. La conservazione ad una temperatura superiore a 8 °C può influire negativamente sulla stabilità del substrato-cromogeno AEC+.

Non lasciare andare a secchezza le sezioni tissutali durante la procedura di colorazione. Le sezioni tissutali essiccate possono aumentare il fenomeno di colorazione non specifica. Coprire i vetrini esposti a correnti d'aria. In caso di prolungata incubazione, porre i tessuti in un ambiente umido.

È possibile aumentare ulteriormente la sensibilità del sistema EnVision+ System, HRP, prolungando i tempi di incubazione delle fasi 2 e 3 di 5–10 minuti.

### Protocollo di colorazione

#### FASE 1 BLOCCANTE DELLA PEROSSIDASI

Eliminare picchiettando il tampone in eccesso. Usando carta bibula (per esempio carta di tessuto assorbente), asciugare accuratamente il vetrino attorno al campione per rimuovere ogni eccesso di liquido e mantenere i reagenti all'interno dell'area prescritta.

Applicare una quantità sufficiente di bloccante della perossidasi dal flacone 1 per coprire il campione.

Incubare per 5 (±1) minuti.

Sciacquare delicatamente con acqua distillata o soluzione tamponata da una spruzzetta (fare attenzione a non dirigere il flusso direttamente sul tessuto) e porre in un bagno tampone fresco.

#### FASE 2 ANTICORPO PRIMARIO O REAGENTE DI CONTROLLO NEGATIVO

Eliminare picchiettando il tampone in eccesso e asciugare i vetrini come descritto precedentemente.

Applicare una quantità sufficiente di anticorpo primario o di reagente di controllo negativo ottimamente diluiti per coprire il campione.

Incubare per 30 (±1) minuti.

Sciacquare delicatamente con soluzione tamponata da una spruzzetta (fare attenzione a non dirigere il flusso direttamente sul tessuto) e porre in un bagno tampone fresco.

Se la procedura di colorazione deve essere interrotta, i vetrini possono essere mantenuti in un bagno tampone dopo l'incubazione con l'anticorpo primario (fase 2) sino ad un'ora a temperatura ambiente (20–25 °C) senza alterare il risultato della colorazione.

#### FASE 3 POLIMERO MARCATO CON PEROSSIDASI

Eliminare picchiettando il tampone in eccesso e asciugare i vetrini come descritto precedentemente.

Applicare una quantità di polimero marcato sufficiente a coprire il campione dal flacone 2.

Incubare per 30 (±1) minuti.

Sciacquare i vetrini come nella fase 2.

#### FASE 4 SUBSTRATO-CROMOGENO

Asciugare i vetrini come descritto precedentemente.

Applicare una quantità sufficiente di soluzione di substrato-cromogeno AEC+, pronta per l'uso, sufficiente a coprire il campione dal flacone 3.

Incubare per 5–30 minuti.

Sciacquare delicatamente con acqua distillata da una spruzzetta (fare attenzione a non dirigere il flusso direttamente sul tessuto). Raccogliere la soluzione di substrato-cromogeno da eliminare in un contenitore per materiali pericolosi e smaltire in modo corretto.

#### FASE 5 CONTROCOLORAZIONE CON EMATOSSILINA (facoltativa)

Immergere i vetrini in un bagno di ematossilina acquosa (codice n. S3309). La durata dell'incubazione dipende dalla concentrazione di ematossilina utilizzata.

Sciacquare delicatamente in un bagno ad acqua distillata.

Immergere i vetrini 10 volte in un bagno di ammoniaca 0,037 mol/L o in un agente colorante blu simile.

Sciacquare i vetrini in un bagno di acqua distillata o deionizzata per 2–5 minuti.

#### FASE 6 MONTAGGIO

I campioni possono essere successivamente montati con vetrino coprioggetto utilizzando un mezzo di montaggio acquoso, per esempio GlycerGel Mounting Medium (codice n. C0563) o Faramount (codice n. S3025), oppure il mezzo di montaggio permanente, non acquoso, Ultramount (codice n. S1964).

Nota: il prodotto di reazione di AEC è solubile in solventi organici, esso non è pertanto compatibile con i mezzi di montaggio permanenti a base di toluene o xilene.

*Nota: i vetrini possono essere letti quando ritenuto opportuno. Tuttavia, i vetrini potrebbero sbiadire se esposti ad eccessivi livelli di luce per un periodo superiore ad una settimana. Per ridurre la decolorazione, conservare i vetrini al buio a temperatura ambiente (20–25 °C).*

#### **Controllo qualità**

Eventuali modifiche al trattamento dei tessuti e alle procedure tecniche nel singolo laboratorio possono causare variazioni significative nei risultati, rendendo necessaria un'esecuzione regolare dei controlli interni in aggiunta alle procedure descritte. Per ulteriori informazioni fare riferimento alle linee guida per il controllo qualità del Programma di certificazione per l'immunoistochimica dell'Istituto patologici americani (CAP), nonché alle sezioni da 5 a 7. Per i dettagli sulla sensibilità e l'immunoreattività, consultare la scheda delle specifiche relativa ad ogni anticorpo primario utilizzato.

Per ulteriori informazioni sui controlli negativi e positivi, fare riferimento alle "Istruzioni generali sulla colorazione immunoistochimica".

#### **Interpretazione della colorazione**

Per le linee guida sull'interpretazione, consultare le "Istruzioni generali sulla colorazione immunoistochimica".

#### **Limitazioni**

La colorazione del tessuto dipende dalla manipolazione e dal trattamento corretto dei tessuti prima della colorazione. La fissazione incorretta, il congelamento, lo scongelamento, il lavaggio, l'essiccazione, il riscaldamento, la sezione o la contaminazione con altri tessuti o fluidi possono produrre artefatti, bloccare l'anticorpo o portare a risultati falsi negativi.

L'uso di fissativi vecchi o non tamponati, oppure l'esposizione dei tessuti a fonti eccessive di calore (superiori a 60 °C) durante il trattamento, può comportare una riduzione della sensibilità di colorazione.

La perossidasi endogena o l'attività pseudo-perossidasi possono essere riscontrate nelle emoproteine, quali l'emoglobina, la mioglobina, il citocromo e la catalasi, così come negli eosinofili.<sup>8,9</sup> Questa attività va inibita incubando i campioni con il bloccante della perossidasi, flacone 1, di EnVision+ System, HRP, per un periodo di cinque minuti, prima dell'applicazione dell'anticorpo primario. Anche gli strisci sanguigni e di midollo osseo, nonché i tessuti congelati, possono essere trattati con questo reagente. Tuttavia, questa procedura non elimina il pigmento rosso-marrone delle emoproteine. In alternativa, si può utilizzare una soluzione di perossido di metanolo-idrogeno. Con questa procedura, alcuni antigeni potrebbero venire denaturati.

I tessuti appartenenti a individui affetti dal virus dell'epatite B e contenenti l'antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg) possono presentare una colorazione non specifica con perossidasi di rafano.<sup>10</sup>

I sieri normali/non immuni provenienti dalla stessa fonte animale degli antisieri secondari utilizzati nelle fasi di bloccaggio, possono provocare risultati falsi negativi o falsi positivi dovuti agli auto-anticorpi o agli anticorpi naturali.

I reagenti forniti in questo kit sono stati diluiti in modo ottimale. Ulteriori diluizioni possono causare la perdita di colorazione antigenica.

#### **Eventuali problemi e risoluzione**

<i>Problema</i>	<i>Probabile causa</i>	<i>Azione consigliata</i>
1. Mancata colorazione dei vetrini.	1a. Reagenti non usati nell'ordine indicato. 1b. Azide sodica.	1a. Controllare l'applicazione dei reagenti. 1b. Usare tampone fresco senza azidi.
2. Colorazione debole dei vetrini.	2a. Le sezioni trattengono troppa soluzione dopo il bagno di lavaggio. 2b. Tempo di incubazione dei vetrini con gli anticorpi o con il substrato insufficiente.	2a. Eliminare picchiettando la soluzione in eccesso prima di asciugare la sezione. 2b. Controllare i tempi di incubazione indicati.
3. Eccessiva colorazione di sfondo in tutti i vetrini.	3a. I campioni contengono un'alta attività di perossidasi endogena. 3b. Paraffina rimossa in modo incompleto.  3c. Vetrini sciacquati in modo scorretto.  3d. Reazione del substrato più rapida del normale, dovuta, ad esempio, ad una temperatura eccessivamente alta.  3e. Essiccazione delle sezioni durante la procedura di colorazione.	3a. Aumentare il tempo di incubazione del bloccante della perossidasi, flacone 1. 3b. Usare bagni di xilene o toluene freschi. Se più di un vetrino viene colorato simultaneamente, il secondo bagno di xilene dovrà contenere xilene fresco. 3c. Usare soluzioni fresche nei bagni tamponati e nelle boccette di lavaggio. 3d. Ridurre il tempo di incubazione con la soluzione di substrato-cromogeno.  3e. Usare camera umida. Asciugare soltanto tre o quattro vetrini alla volta prima di applicare il reagente.

- |   |  |
|---|--|
| 3f. Legame non specifico dei reagenti alla sezione tissutale. | 3f. Applicare una soluzione bloccante contenente una proteina irrilevante. |
| 3g. Anticorpo troppo concentrato.                             | 3g. Applicare una diluizione maggiore dell'anticorpo.                      |

NOTA: se il problema non è attribuibile a una delle cause sopra descritte, oppure non si è in grado di risolverlo mediante l'azione correttiva consigliata, si prega di contattare il Servizio Tecnico Dako per ulteriore assistenza.

Per ulteriori informazioni sulle tecniche di colorazione e sulla preparazione dei campioni, consultare *Handbook -Immunochemical Staining Methods*<sup>4</sup> (disponibile presso Dako), *Atlas of Immunohistology*<sup>11</sup> e *Immunoperoxidase Techniques, A Practical Approach to Tumor Diagnosis*.<sup>12</sup>

#### Riferimenti bibliografici

- 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
- Center for Disease Control Manual Guide - Safety Management, No. CDC-22, Atlanta, GA. "Decontamination of laboratory sink drains to remove azide salts". April 30, 1976
- Kiernan JA. *Histological and histochemical methods: Theory and practice*. New York: Pergamon Press 1981; 81
- Naish SJ (ed). *Handbook-immunochemical staining methods*. Carpinteria: Dako 1989
- Elias JM, et al. Special report: Quality control in immunohistochemistry. *Amer J Clin Pathol* 1989; 92:836
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Internal quality control testing: principles and definitions; approved guideline*. Villanova, PA 1991; Order code C24-A-4
- Herman GE and Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: The new era of quality control. *Biotech & Histochem* 1991; 66:194
- Escribano LM, et al. Endogenous peroxidase activity in human cutaneous and adenoidal mast cells. *J Histochem Cytochem* 1987; 35:213
- Elias JM. *Immunohistopathology: A practical approach to diagnosis*. Chicago: Amer Soc of Clin Pathol Press 1990; 46
- Omata M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: A possible source of error in immunohistochemistry. *Amer J Pathol* 1980; 73:626
- Tubbs RR, et al. *Atlas of immunohistology*. Chicago: Amer Soc Clin Pathol Press 1986
- Nadji M and Morales AR. *Immunoperoxidase techniques, a practical approach to tumor diagnosis*. Chicago: Amer Soc Clin Pathol Press 1986

#### Riferimenti bibliografici aggiuntivi

Cartun RW. Immunohistochemistry of infectious diseases. *J Histochemol* 1995; 18(3):195

Heras A, et al. Enhanced labelled-polymer system for immunohistochemistry. XVth Eur Cong Pathol. Copenhagen, Denmark 1995; Sept 3-8

Bisgaard K and Pluzek K-P. Use of polymer conjugates in immunohistochemistry: A comparative study of a traditional staining method to a staining method utilizing polymer conjugates. Abstract. XXI Intl Cong Intl Acad Pathol and 12th World Cong Acad Environ Pathol. Budapest, Hungary 1996; Oct 20-25

Pileri SA, et al. EnVision Plus: A new powerful tool for diagnosis and research. Symposium. XXI Intl Cong Intl Acad Pathol and 12th World Cong Acad Environ Pathol. Budapest, Hungary 1996; Oct 20-25

Bisgaard K. EnVision Plus-Introduction to a new technology. Abstract. Dako Symposium. XXI Intl Cong Intl Acad Pathol. Budapest, Hungary 1996; Oct 20-25



PT0081 Rev A

REF	Numero di catalogo	Limiti di temperatura	IVD	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
Fabbricante	LOT	Codice del lotto	Σ	Contenuto sufficiente per "n" saggi
Utilizzare entro	Consultare le istruzioni per l'uso	EC REP	Rappresentante autorizzato per l'Unione Europea	

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 06/07