

## INSTRUCTIONS

02-2023

### **N**-Histofine® Simple Stain MAX PO (M)

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

Store at 2-8°C

|                   |                               |                |
|-------------------|-------------------------------|----------------|
| Reagents supplied | 17ml x 1 bottle (170 tests)   | Code : 414131F |
|                   | 17ml x 3 bottles (500 tests)  | Code : 414132F |
|                   | 17ml x 9 bottles (1500 tests) | Code : 414134F |

### 1. INTRODUCTION

NICHIREI BIOSCIENCES developed a unique immunohistochemical staining system called **Universal Immuno-enzyme Polymer (UIP)** method. This is NICHIREI BIOSCIENCES's original technique. **N**-Histofine® Simple Stain MAX PO (M), this provides both high sensitivity and time saving in immunohistochemical applications.

### 2. DESCRIPTION

Liquid. Ready to use.

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

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

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

### 3. INTENDED USE

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

The product forms an antigen/antibody/Universal Immuno-peroxidase Polymer complex by reacting with a primary antibody bound to an antigen on a tissue section. The result provides a physiological or pathological state.

For In-vitro Diagnostic Use. For manual staining. Staining results are qualitative. For formalin-fixed paraffin-embedded human tissue sections. For professional users.

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

### 4. PRINCIPLE

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

### 5. PRECAUTIONS

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

- skin or eye contact occurs, wash thoroughly with water.
6. Organic reagents are flammable. Do not use near open flame.
7. Never pipette reagents by mouth and avoid their contact with skin, mucous membranes and clothes.
8. Avoid microbial contamination of reagents as incorrect result may occur.
9. Avoid splashing of reagents or generation of aerosols.
10. As a chromogen, DAB solution should be handled with care for it contains carcinogen.
11. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.
12. Any serious incident that has occurred in relation to **N**-Histofine® Simple Stain MAX PO (M) shall be reported to the manufacturer and the competent authority of the Member State in which the user and/or the patient is established.

### 6. STAINING PROCEDURES

□ Reagents and Materials required but not provided

- Xylene
- 95% ethanol
- 100% ethanol
- Phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.6±0.2)
  - NaCl 7.5 g
  - K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.50 g
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.20 g
  - distilled water 1L
- 3% solution of hydrogen peroxide in absolute methanol (Add 1 part of 30% hydrogen peroxide to 9 parts of absolute methanol)
- Mouse primary antibody
- Negative control reagent
- Chromogen/substrate reagent
- Counter staining solution
- Distilled water
- Humidified chamber for slide incubation
- Light microscope
- Cover slips
- Mounting media
- Timer
- Staining racks or Coplin jars
- Absorbent wipes
- Adhesive for tissue section (0.02% poly-L-lysine, silane or the like)

□ Specimen preparation

[Paraffin-embedded tissue sections]

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

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

□ Section preparation

[Paraffin embedded tissue sections]

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

#### [Control slides]

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

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

#### □ Deparaffinization and Rehydration

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

#### □ Staining Procedures

1. Quenching of endogenous peroxidase
  - (1) Wipe areas around the sections on the slides carefully to remove excess solution.
  - (2) Immerse them in 3% solution of hydrogen peroxide in absolute methanol for 10-15 minutes at room temperature (15 - 25°C).
  - (3) Rinse them in fresh PBS for 3 times, each of 5 minutes duration.
2. Addition and reaction of the primary antibody
  - (1) Wipe areas around the sections on the slides carefully.
  - (2) Apply 2 drops (100µl) of primary antibody to specimen slide, positive control slide and negative control slide respectively so as to provide a complete cover of the sections.
  - (3) To the reagent control slide, apply two drops of negative control reagent (normal serum) in place of primary antibody.
  - (4) Incubate them at room temperature or 4°C. (Follow the instructions for incubation time data designated in the package insert of primary antibody)
  - (5) Rinse them in fresh PBS for 3 times, each of 5 minutes duration.
3. Addition and reaction of **N**-Histofine® Simple Stain MAX PO (M) (Universal Immuno-peroxidase Polymer, Anti-Mouse).
  - (1) Wipe areas around the sections on the slides carefully.
  - (2) Apply 2 drops (100µl) of Simple Stain MAX PO (M) to each slide so as to provide a complete cover of the sections. Incubate at room temperature (15 - 25°C) for 30 minutes.
  - (3) Rinse them in fresh PBS for 3 times, each of 5 minutes duration.
4. Addition and reaction of chromogen/substrate reagent
  - (1) Wipe areas around the sections on the slides carefully.
  - (2) Apply 2 drops (100µl) of the chromogen/substrate reagent to each slide so as to provide a complete cover of the sections. Incubate at room temperature (15 - 25°C) for 5-20 minutes.
  - (3) Rinse them in distilled water for 3 times, each of 5 minutes duration.
5. Counter-staining
  - (1) Immerse them in the counterstain solution.
  - (2) Wash them well with tap water.
6. Mounting

In case of alcohol soluble substrates like AEC, the tissue sections are mounted with water-based mounting media without further treatment. In case of alcohol insoluble substrates like DAB, they are mounted with permanent mounting media after washing with water, dehydrated in graded series of alcohol and cleared in xylene.

#### □ Interpretation of results

##### Microscopic observation

The slides are examined under a light microscope for a positive reaction.

It is necessary to make comparison with three types of the control slides for interpreting staining results.

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

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

## 7. STORAGE & SHELF LIFE

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

## 8. GENERAL LIMITATION

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

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

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

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

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

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

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

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













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

## 9. TROUBLE SHOOTING

| table 1  |  |   |
|--|--|---|
| Problem  | Possible cause   | Solution  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>○ No staining or only weak staining results on the positive control slide and the unknown specimen slide</li> </ul> | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Drying-out of specimens during staining prior to addition of the reagents.</li> <li>2. The embedding agent is not suitable, or paraffin is not thoroughly removed from paraffin-embedded sections.</li> <li>3. Any trace amount of sodium azide present in the buffer inactivates the peroxidase, making the staining impossible.</li> <li>4. Inadequate incubation of the enzyme and antibody.</li> </ol>   | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Use the Humidified chamber not to allow the tissue to dry out.</li> <li>2. Select a suitable embedding agent or remove paraffin thoroughly from sections embedded.               <ol style="list-style-type: none"> <li>2. Change xylene or ethanol as the case may be.</li> <li>3. Use sodium azide free buffer solution.</li> <li>3. Change buffer solution.</li> </ol> </li> <li>4. Change stale chromogen/substrate reagent.</li> <li>4. Blot off excess solution thoroughly at each stage.</li> <li>4. Provide sufficient time for reaction with antibody. In particular, primary antibody should be incubated for the time period specified in the insert.</li> </ol> |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>○ The unknown specimen slide is not stained while the positive control slide is stained.</li> </ul>                 | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Antigen is denatured or masked during fixing or embedding process.</li> <li>2. Antigen is decomposed by autolysis.</li> <li>3. Less antigen is present in the sections.</li> </ol>   | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Some antigens are sensitive to fixation or embedding. So use less potent fixative and decrease the fixing time.</li> <li>1. The pretreatment is required for some tissues, in order to reveal the antigen, such as Antigen Recovery, Heat-Induced Epitope Retrieval (HIER) or trypsin treatment.</li> <li>2. Use tissues obtained by biopsy or surgery, whenever possible.</li> <li>3. Prolong the incubation time.</li> </ol>  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>○ The backgrounds are intensively stained in all the slides.</li> </ul>   | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Endogenous enzyme activity was not completely blocked.</li> <li>2. Non -specific binding compositions are found.</li> <li>3. Autolysis results in excessive antigens isolated in histological solutions.</li> <li>4. Insufficient removal of paraffin.</li> <li>5. Insufficient washing of antibody.</li> <li>6. A high room temperature accelerates enzyme reactions.</li> <li>7. Drying-out of specimens during staining after of the reagents.</li> </ol> | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ensure that the procedure for quenching of endogenous peroxidase is right.</li> <li>2. Before adding primary antibody, treat with 10% normal goat serum.</li> <li>3. Obtain fresh tissues whenever available.</li> <li>4. Change xylene or ethanol as the case may be.</li> <li>5. Ensure thorough washing of antibody.</li> <li>6. Keep room temperature at 15 to 25°C</li> <li>6. Shorten reaction time.</li> <li>7. Never allow the tissue to dry out.</li> </ol>  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>○ During the reaction, tissue sections come off from the slides.</li> </ul>   | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Some antigens require heat induced antigen retrieval procedure or prolonged reaction time with primary antibody, which may render the sections easily come off.</li> </ol>   | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Mount tissue sections on slides coated with an adhesive such as 0.02% poly-L-lysine or silane.</li> </ol>   |

## 10. REFERENCE

- (1) Mokry, et al. Versatility of immunohistochemical reactions: comprehensive survey of detection systems. Acta medica 1996 Apr 39:129-40
- (2) Kaji S, et al. BCAS1-positive immature oligodendrocytes are affected by the  $\alpha$ -synuclein-induced pathology of multiple system atrophy. Acta Neuropathol Commun. 2020 Jul 29;8(1):120.
- (3) Kobayashi S, et al. Image analysis of the nuclear characteristics of emerlin protein and the correlation with nuclear grooves and intranuclear cytoplasmic inclusions in lung adenocarcinoma. Oncol Rep. 2019 Jan;41(1):133-142.
- (4) Kudo I, et al. Particular gene upregulation and p53 heterogeneous expression in TP53-mutated maxillary carcinoma. Oncol Lett. 2017 Oct;14(4):4633-4640.
- (5) Shimura T, et al. MIB-1 labeling index, Ki-67, is an indicator of invasive intraductal papillary mucinous neoplasm. Mol Clin Oncol. 2016 Aug;5(2):317-322.
- (6) Ishiwata T, et al. Enhanced expression of fibroblast growth factor receptor 2 IIIc promotes human pancreatic cancer cell proliferation. Am J Pathol. 2012 May;180(5):1928-41.
- (7) Tsuji S, et al. Secretion of intelectin-1 from malignant pleural mesothelioma into pleural effusion. Br J Cancer. 2010 Aug 10;103(4):517-23.
- (8) Tanioka Y, et al. Matrix metalloproteinase-7 and matrix metalloproteinase-9 are associated with unfavourable prognosis in superficial oesophageal cancer. Br J Cancer. 2003 Dec 1;89(11):2116-21.

|  |   |   |
|--|---|---|
|  Catalog/Code Number                |  Temperature Limitations             |  In Vitro Diagnostic Medical Device                  |
|  Manufacturer                       |  Batch Code                          |  Contains Sufficient for (N) Tests                   |
|  Use By                             |  Consult Instructions for Use        |  Authorized Representative in the European Community |
|  CE-mark, code of the notified body |  For IVD Performance Evaluation only |  Sample  |



**NICHIREI BIOSCIENCES INC.**  
6-19-20, Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-8402, JAPAN  
Phone:81-3-3248-2208, Facsimile:81-3-3248-2243



MedEnvoy Global B.V.  
Prinses Margrietplantsoen 33-Suite 123  
2595 AM The Hague  
The Netherlands

## FICHE TECHNIQUE

02-2023

### **N**-Histofine® Simple Stain MAX PO (M)

**Polymère Universel d'Immuno-peroxydase Anti-Souris**

**N**-Histofine® Réactif de coloration Immuno-histochimique

Conserver entre 2 et 8°C

Réactifs fournis - 1 flacon de 17ml (170 tests) Code : 414131F  
 - 3 flacons de 17ml (500 tests) Code : 414132F  
 - 9 flacons de 17ml (1500 tests) Code : 414134F

### 1. PRESENTATION DU PRODUIT

NICHIREI BIOSCIENCES a développé un système unique de coloration immuno-histochimique appelé méthode de **Polymère Universel d'Immuno-enzyme (UIP)**. Il s'agit de la technique originale de NICHIREI BIOSCIENCES's **N**-Histofine® Simple Stain MAX PO (M) qui offre deux avantages significatifs :

- un taux de sensibilité élevé
- un gain de temps notoire dans le cadre de la réalisation pratique de tests immuno-histochimiques.

### 2. DESCRIPTION

Liquide. Prêt à l'emploi.

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

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

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

### 3. APPLICATIONS

**N**-Histofine® Simple Stain MAX PO (M) a été conçu dans le but de mettre en évidence des antigènes, contenus dans des coupes de tissus ou dans des cellules, qui vont réagir avec un anticorps primaire de lapin prêt à l'emploi par méthode immuno-histochimique. Le produit forme un complexe antigène/anticorps/polymère d'immuno-peroxydase universelle en réagissant avec un anticorps primaire lié à un antigène sur une coupe de tissu. Le résultat fournit un état physiologique ou pathologique. Pour utilisation Diagnostique In vitro. Pour une coloration manuelle. Les résultats de la coloration sont qualitatifs. Pour les coupes de tissus humains fixés au formol et inclus en paraffine. A usage professionnel exclusivement.

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

### 4. PRINCIPE

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

### 5. PRECAUTIONS D'EMPLOI

1. Lire soigneusement ce mode d'emploi avant de réaliser ce test.

**N**-Histofine® est la marque déposée de : NICHIREI BIOSCIENCES'. Nous contacter pour obtenir la liste des pays où le produit est enregistré.

TS-41413F-CE-F-v02

2. Ne pas utiliser le réactif au delà de sa date de péremption.
3. A usage professionnel exclusivement.
4. Avant et après fixation, manipuler les échantillons ainsi que toutes autres substances auxquelles ils sont exposés avec toutes les précautions s'appliquant aux matières présentant un danger de contamination biologique.
5. Le fixateur à base de formol est sévèrement allergisant et présente un grave danger en cas d'inhalation ou d'ingestion. Porter un masque de protection. **En cas d'ingestion, provoquer des vomissements. En cas de contact avec la peau ou les yeux, rincer abondamment avec de l'eau.**
6. Les réactifs organiques sont inflammables. Ne pas les utiliser en présence d'une flamme ouverte.
7. Ne jamais pipeter les réactifs à la bouche, éviter tout contact avec la peau, les muqueuses et les vêtements.
8. Eviter toutes contaminations microbiennes des réactifs, car celles-ci peuvent être la cause de faux négatifs ou faux positifs
9. Eviter de faire gicler les réactifs ou de générer des vapeurs.
10. La solution chromogène DAB doit être manipulée avec précaution car elle contient des éléments cancérogènes
11. Eliminer les réactifs non utilisés selon les dispositions légales locales, départementales et nationales.
12. Tout incident grave survenu en rapport avec **N**-Histofine® Simple Stain MAX PO (M) doit être signalé au fabricant et à l'autorité compétente de l'Etat membre dans lequel l'utilisateur et/ou le patient est établi.

### 6. METHODES DE COLORATION

#### □ Réactifs et Matériel nécessaire non fournis

- Xylène
- Ethanol à 95%
- Ethanol à 100%
- Tampon Phosphate (PBS)  
(pH 7.6±0.2)  
NaCl 7.75 g  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.50 g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.20 g  
Eau distillée qsp 1L
- Solution d'eau oxygénée à 3% dans du méthanol absolu.  
(ajouter 1 volume d'eau oxygénée à 30% , à 9 volumes de méthanol absolu.)
- Anticorps primaire de souris
- Réactif contrôle Négatif
- Réactif substrat/ Chromogène
- Solution de contre-coloration.
- Eau distillée
- Chambre Humide pour l'incubation des lames
- Microscope éclairant
- Lamelles
- Milieu de montage
- Minuteur
- Bacs à colorant ou jarres de Coplin
- Papier Absorbant
- Adhésif pour coupe de tissus  
(0.02% poly-L-lysine, silane ou identique)

#### □ I -Préparation de l'échantillon

##### Coupes de tissus dans la Paraffine

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

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

#### □ II- Préparation des coupes de tissus

##### Coupes de tissus dans la paraffine

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

### **C-Lames de Contrôle**

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

#### • Lame **contrôle positif**

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

#### • Lame **contrôle négatif**

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

#### • Lame **contrôle réactif**

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

### □ Déparaffinage and Réhydratation

#### 1. **Traitement au xylène.**

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

#### 2. **Traitement à l'éthanol**

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

#### 3. **Lavage**

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

### □ Méthodes de Coloration

#### 1. **Extinction de la peroxydase endogène**

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

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

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

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

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

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

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

#### 5. **Contre Coloration**

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

### 6. **Montage**

**N**-Histofine® est la marque déposée de : NICHIREI BIOSCIENCES®. Nous contacter pour obtenir la liste des pays où le produit est enregistré.

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

### □ **Interprétation des résultats**

#### Observation au Microscope

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

- Lame Contrôle Positif  
On observe une Coloration Positive
- Lame Contrôle Négatif  
On observe aucune coloration Positive
- Lame Contrôle Réactif  
Si cette lame présente une coloration, il s'agit probablement d'une réaction non spécifique provenant d'une liaison de protéine non spécifique.

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

### 7. **STOCKAGE & PEREMPTION**

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

### 8. **LIMITES D'UTILISATION**

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

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

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

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

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

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

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

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

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













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

## 9. RESOLUTIONS DES PROBLEMES

| tableau 1  |  |   |
|--|--|---|
| Problème   | Cause Probable   | Solution  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Pas de coloration ou une coloration très faible sur la lame contrôle positif ainsi que sur la lame échantillon inconnu</li> </ul> | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Durant la coloration, les échantillons se sont desséchés avant l'addition des réactifs.</li> <li>2. Soit, l'agent d'inclusion n'est pas conforme, soit, lorsqu'il s'agit de coupes incluses dans la paraffine, la paraffine n'a pas été totalement éliminée des coupes.</li> <li>3. Toute présence d'azide de sodium dans le tampon, même à l'état de trace, rend la peroxydase inactive. Dans ce cas de figure, toute coloration est impossible.</li> <li>4. Incubation enzyme- anticorps non conforme</li> </ol>   | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Utiliser la chambre humide pour éviter le dessèchement des coupes de tissus.</li> <li>2. Changer l'agent d'inclusion, ou s'assurer que toute la paraffine a été soigneusement éliminée des sections incluses.</li> <li>2. Changer le xylène ou l'éthanol suivant le cas.</li> <li>3. Utiliser un tampon ne contenant pas d'azide de sodium.</li> <li>3. Changer de tampon.</li> <li>4. Changer le réactif substrat / chromogène.</li> <li>4. A chaque étape, absorber soigneusement l'excédent de liquide sur la lame.</li> <li>4. Le temps d'incubation avec l'anticorps doit être suffisamment long. En particulier, l'anticorps primaire devrait être incubé suivant les indications de temps spécifiées sur le mode d'emploi du produit.</li> </ol> |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>○ La lame échantillon inconnu n'est pas colorée alors que le contrôle positif est coloré.</li> </ul>                                | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. L'Antigène a été dénaturé ou masqué durant l'étape de fixation ou durant l'inclusion dans la paraffine.</li> <li>2. L'Antigène est décomposé par autolyse.</li> <li>3. Une quantité inférieure d'antigène est présente dans les coupes.</li> </ol>   | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Certains antigènes sont sensibles à la fixation ou l'inclusion. Pour y remédier, utiliser un fixatif moins puissant et diminuer le temps de fixation.</li> <li>1. Dans certains tissus, pour révéler l'antigène, un prétraitement est nécessaire, par exemple le test de régénération d'antigène, l'extraction d'épitope par la chaleur (HIER), ou un traitement à la trypsine.</li> <li>2. Dans la mesure du possible, utiliser des coupes de tissus obtenues par biopsies ou chirurgie.</li> <li>3. Prolonger le temps d'incubation.</li> </ol>   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Coloration intense de l'arrière plan sur toutes les lames.</li> </ul>   | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. L'activité enzymatique endogène n'a pas été bloquée complètement.</li> <li>2. Présence de composés de liaisons non spécifiques.</li> <li>3. Par suite d'autolyse, un excès d'antigène est isolé dans les solutions histologiques.</li> <li>4. La paraffine n'a pas été totalement éliminée des coupes de tissus.</li> <li>5. Le lavage de l'anticorps est insuffisant.</li> <li>6. Une température ambiante élevée accélère les réactions enzymatiques.</li> <li>7. Dessèchement des échantillons durant la coloration après addition des réactifs.</li> </ol> | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. S'assurer que la méthode d'extinction de la peroxydase endogène est correcte.</li> <li>2. Avant d'ajouter l'anticorps primaire, traiter avec un sérum normal de chèvre à 10%.</li> <li>3. Dans la mesure du possible, travailler sur des tissus fraîchement prélevés.</li> <li>4. Changer le xylène ou l'éthanol suivant le cas.</li> <li>5. S'assurer de laver soigneusement l'anticorps.</li> <li>6. Réaliser le test à une température ambiante comprise entre 15 et 25°C</li> <li>6. Diminuer le temps de réaction.</li> <li>7. Ne jamais laisser les coupes de tissus s'assécher.</li> </ol>   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Pendant la réaction, les coupes de tissus se détachent de la lame.</li> </ul>   | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Certains antigènes nécessitent un processus d'extraction d'antigène par la chaleur ou un temps de réaction supérieur avec l'anticorps primaire ce qui peut être la cause du décollement des coupes de leurs lames.</li> </ol>  | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Monter les coupes de tissus sur des lames recouvertes avec un adhésif tel que la poly-L-lysine à 0.02% ou le silane.</li> </ol>   |

## 10. BIBLIOGRAPHIE

- (1) Mokry, et al. Versatility of immunohistochemical reactions: comprehensive survey of detection systems. Acta medica 1996 Apr 39:129-40
- (2) Kaji S, et al. BCAS1-positive immature oligodendrocytes are affected by the  $\alpha$ -synuclein-induced pathology of multiple system atrophy. Acta Neuropathol Commun. 2020 Jul 29;8(1):120.
- (3) Kobayashi S, et al. Image analysis of the nuclear characteristics of emerin protein and the correlation with nuclear grooves and intranuclear cytoplasmic inclusions in lung adenocarcinoma. Oncol Rep. 2019 Jan;41(1):133-142.
- (4) Kudo I, et al. Particular gene upregulation and p53 heterogeneous expression in TP53-mutated maxillary carcinoma. Oncol Lett. 2017 Oct;14(4):4633-4640.
- (5) Shimura T, et al. MIB-1 labeling index, Ki-67, is an indicator of invasive intraductal papillary mucinous neoplasm. Mol Clin Oncol. 2016 Aug;5(2):317-322.
- (6) Ishiwata T, et al. Enhanced expression of fibroblast growth factor receptor 2 IIIc promotes human pancreatic cancer cell proliferation. Am J Pathol. 2012 May;180(5):1928-41.
- (7) Tsuji S, et al. Secretion of intelectin-1 from malignant pleural mesothelioma into pleural effusion. Br J Cancer. 2010 Aug 10;103(4):517-23.
- (8) Tanioka Y, et al. Matrix metalloproteinase-7 and matrix metalloproteinase-9 are associated with unfavourable prognosis in superficial oesophageal cancer. Br J Cancer. 2003 Dec 1;89(11):2116-21.

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



**NICHIREI BIOSCIENCES INC.**  
6-19-20, Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-8402, JAPAN  
Phone:81-3-3248-2208, Facsimile:81-3-3248-2243



MedEnvoy Global B.V.  
Prinses Margrietplantsoen 33-Suite 123  
2595 AM The Hague  
The Netherlands



# GEBRAUCHSANLEITUNG

02-2023

## **N**-Histofine® Simple Stain MAX PO (M)

**Universelles Immun-Peroxidase Polymer, Anti-Maus**

**N**-Histofine® Immunhistochemisches Färbereagenz

Lagerung bei 2-8°C

Beinhaltete Reagenzien

|                  |              |                      |
|------------------|--------------|----------------------|
| 17ml x 1 Flasche | (170 Tests)  | Katalog-Nr.: 414131F |
| 17ml x 3 Flasche | (500 Tests)  | Katalog-Nr.: 414132F |
| 17ml x 9 Flasche | (1500 Tests) | Katalog-Nr.: 414134F |

### 1. EINLEITUNG

NICHIREI BIOSCIENCES hat ein einzigartiges immunhistochemisches Färbesystem mit den Namen Universelles Immun-Enzym Polymer (UIP) entwickelt und patentiert. **N**-Histofine® Simple Stain MAX PO (M) bietet zugleich eine hohe Sensitivität und spart Zeit bei immunhistochemischen Applikationen.

### 2. BESCHREIBUNG

Flüssig, Gebrauchsfertig.

**N**-Histofine® Simple Stain MAX PO (M) (Universelles Immun-Peroxidase Polymer, Anti-Maus) besteht aus einem Polymer aus Aminosäuren, welches mit Peroxidase und Ziege Anti-Maus Ig, reduziert zu F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten, konjugiert ist. Es wird in MOPS (3-Morpholinpropansulfonsäure) Puffer (pH 6,5) gelagert, welches einen Stabilisator und einen antibakteriellen Zusatz enthält.

Die IgG-Fraktion wird aus immunisierten Ziegenserum aufgereinigt und enzymatisch zu F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten reduziert. Diese antigen- spezifischen F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente werden mit dem Antigen affinitäts- gereinigt. Mit Humanserumprotein wird eine Festphasenabsorption durchgeführt. Die zu F(ab)-reduzierten F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente werden an das peroxidase markierte Aminosäurepolymer konjugiert. Dieses System enthält weder Biotin noch Streptavidin und vermeidet so die durch traditionelle Biotin basierte Detektionssysteme entstehenden Hintergrund- reaktionen.

### 3. VERWENDUNGSZWECK

**N**-Histofine® Simple Stain MAX PO (M) wurde zur Durchführung immunhistochemischer Tests entwickelt. Das System weist auf humanen Geweben und Zellen Mausprimärantikörper nach, die vom Anwender zum Erkennen von Antigenen eingesetzt werden. Das Produkt bildet einen Antigen/Antikörper/Universal Immuno-Peroxidase Polymer-Komplex durch Reaktion mit einem an ein Antigen gebundenen primären Antikörper auf einem Gewebeschnitt. Das Ergebnis liefert einen physiologischen oder pathologischen Zustand.

Zur In-vitro-Diagnostik. Für manuelle Färbung. Die Färberegebnisse sind qualitativ. Für formalinfixierte, in Paraffin eingebettete menschliche Gewebeschnitte. Für professionelle Anwender.

Die Interpretation der Ergebnisse sollte stets im Zusammenhang mit dem klinischen Bild der Patienten und weiteren diagnostischen Parametern durch einen qualifizierten Pathologen erfolgen.

### 4. TESTPRINZIP

Der Antigen/Antikörper/Universelle Immun-Peroxidase Polymerkomplex kann hergestellt werden, in dem das Reagenz mit einem Mausprimärantikörper reagiert, der an ein Antigen auf einem Gewebeschnitt gebunden ist. Die enzymatische Aktivität dieses Komplexes resultiert in einem farbigen Niederschlag, der die Stelle des nachzuweisenden Antigens färbt.

### 5. VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Vor Verwendung des Reagenzes bitte die Gebrauchsanweisung lesen.
2. Verfallene Reagenzien dürfen nicht mehr benutzt werden.
3. Nur für professionelle Anwender.
4. Das Reagenz enthält Material tierischen Ursprungs. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass auf Grund der Herstellungsverfahren auch Spuren von Material menschlichen Ursprungs enthalten sind. Wie alle Produkte biologischen Ursprungs muss auch dieses entsprechend gehandhabt werden.
5. Einatmen oder Verschlucken des hochallergischen Formaldehyds ist gesundheitsschädlich. Schutzmaske tragen. Bei Verschlucken Erbrechen induzieren. Bei Haut- oder Augenkontakt gut mit Wasser auswaschen.
6. Organische Reagenzien sind entzündlich, bitte nicht in der Nähe einer offenen Flamme verwenden.
7. Die Reagenzien nie mit dem Mund pipettieren und den Kontakt mit Haut, Schleimhäuten und Kleidung vermeiden.
8. Mikrobielle Kontamination der Reagenzien vermeiden, weil diese die Ergebnisse verfälschen könnten.
9. Das Verspritzen von Reagenzien oder das Entstehen von Aerosolen ist zu vermeiden.
10. Die chromogene DAB-Lösung sollte mit Vorsicht behandelt werden, weil sie Karzinogene enthält. Nicht verwendete DAB- Lösung sollte entsprechend den Vorschriften entsorgt werden.
11. Die national verbindlichen Arbeitsvorschriften sind zu beachten.
12. Jeder schwerwiegende Zwischenfall, der im Zusammenhang mit **N**-Histofine® Simple Stain MAX PO (M) aufgetreten ist, ist dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaats, in dem der Anwender und/oder der Patient niedergelassen ist, zu melden.

### 6. FÄRBEVERFAHREN

Erforderliches aber nicht mitgeliefertes Material und Reagenzien

- Xylol
- 95% Ethanol
- 100% Ethanol
- PBS (pH 7,6±0,2)  

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| NaCl                            | 7,75 g |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 1,50 g |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 0,20 g |

 destilliertes Wasser 1 l
- 3% Wasserstoffperoxid in absoluten Methanol (1 Teil 30% Wasserstoffperoxid mit 9 Teilen absoluten Methanol vermengen)
- Mausprimärantikörper
- Negativkontrolle
- Chromogen/Substrat
- Gegenfärbemittel
- Destilliertes Wasser
- Feuchte Kammer für die Inkubation der Objektträger
- Lichtmikroskop
- Deckgläschen
- Eindeckmedium
- Stoppuhr
- Färbestelle oder Küvetten
- Absorbierende Tücher
- Beschichtete Objektträger (beschichtet mit 0,02% Poly-L-Lysin, Silan o.ä.)

□ Probenvorbereitung

(Paraffineingebettete Gewebeschnitte)

Um Fixationsartefakte oder eine Denaturierung des Antigens durch zu hoch konzentriertes Fixativ, zu kurze oder zu lange Fixation der Probe zu vermeiden und die Gewebemorphologie und Antigenaktivität zu erhalten, sollten die Gewebe möglichst frisch und möglichst kleine Gewebestücke ca. 1 x 1 x 0,5 cm verwendet werden. Die empfohlenen Fixative:

| Fixativ                                | Fixationszeit   |
|--|-----------------|
| 10% Formalin oder gepuffertes Formalin | 24 - 48 Stunden |
| 20% Formalin                           | 12 - 24 Stunden |

□ Schnittpräparation

(Paraffineingebettete Gewebeschnitte)

Die Schnittdicke sollte zwischen 3 und 6 µm liegen. Wenn eine enzymatische Vorbehandlung oder andere Antigenmaskierung durchgeführt werden soll, sollte der Glasobjektträger vor Aufziehen der Schnitte mit einem Adhäsiv beschichtet werden (z.B. 0,02% Poly-L-Lysin oder Silan).

#### (Kontrollschnitte)

Eine positive Kontrolle, eine negative Kontrolle und eine Reagenzienkontrolle werden benötigt und sollten auf dieselbe Weise wie die unbekannte Probe prozessiert werden, um die Färberegebnisse richtig zu interpretieren.

- Positiver Kontrollobjektträger  
Eine Probe, die das Zielantigen enthält und genauso wie die unbekannte Probe behandelt wird.
- Negativer Kontrollobjektträger  
Eine Probe, die das Zielantigen nicht enthält und genauso wie die unbekannte Probe behandelt wird.
- Reagenzien-Kontrollobjektträger  
Eine Kontrollprobe wird benutzt und auf dieselbe Art und Weise wie die unbekannte Probe behandelt. Der Primärantikörper wird durch ein negatives Kontrollreagenz ersetzt.

#### □ Entparaffinierung und Dehydrierung

1. Behandlung mit Xylol
  - (1) Die Schnitte in Xylol tauchen, nach 3 Minuten herausnehmen und das überschüssige Xylol abschütteln.
  - (2) Zweimal wiederholen von Schritt 1.(1) mit frischem Xylol.
2. Behandlung mit Ethanol
  - (1) Die Schnitte in 100% Ethanol tauchen, nach 3 Minuten herausnehmen und das überschüssige Ethanol abschütteln.
  - (2) Einmal wiederholen von Schritt 2.(1) mit frischen 100 % Ethanol.
  - (3) Dann zweimal mit 95% Ethanol auf dieselbe Art, wie oben beschrieben, behandeln.
3. Waschen  
Nach Abschütteln des überschüssigen Ethanols, die Schnitte für 5 Minuten in PBS tauchen.

#### □ Färbeprozedur

1. Blockieren endogener Peroxidase
  - (1) Überschüssigen Waschpuffer um die Schnitte mit einem saugfähigen Tuch entfernen.
  - (2) Die Schnitte in 3% Wasserstoffperoxid/Methanol für 10-15 Minuten bei Raumtemperatur tauchen. (15 - 25°C)
  - (3) Mit frischem PBS dreimal je 5 Minuten waschen.
2. Zugabe und Reaktion mit Primärantikörper
  - (1) Überschüssigen Waschpuffer um die Schnitte mit einem saugfähigen Tuch entfernen.
  - (2) Zwei Tropfen (100 µl) des Primärantikörpers auf die unbekannte Probe, den positiven Kontrollobjektträger und die negative Kontrolle geben, so dass die Schnitte komplett bedeckt sind.
  - (3) Auf den Reagenzienkontrollobjektträger zwei Tropfen des negativen Kontrollreagenzes anstelle des Primärantikörpers geben.
  - (4) Inkubieren bei Raumtemperatur oder 4 °C, gemäß den Anleitungen der Packungsbeilagen des Primärantikörpers.
  - (5) In frischem PBS dreimal für 5 Minuten waschen.
3. Zugabe und Reaktion von **M**-Histofine® Simple Stain MAX PO (M) (Universelles Immun-Peroxidase Polymer, Anti-Maus).
  - (1) Überschüssigen Waschpuffer um die Schnitte mit einem saugfähigen Tuch entfernen.
  - (2) Zwei Tropfen (100 µl) von Simple Stain MAX PO (M) auf jeden Schnitt geben, so dass die Schnitte komplett bedeckt sind. Bei Raumtemperatur (15 - 25°C) für 30 Minuten inkubieren.
  - (3) In frischem PBS dreimal für je 5 Minuten waschen.
4. Zugabe und Reaktion des Chromogen-/Substrat-Reagenzes
  - (1) Überschüssigen Waschpuffer um die Schnitte mit einem saugfähigen Tuch entfernen.
  - (2) Zwei Tropfen des Chromogen-/Substrat-Reagenzes (100 µl) auf jeden Schnitt geben, so dass die Schnitte komplett bedeckt sind. Bei Raumtemperatur (15 - 25°C) für 5 - 20 Minuten inkubieren.
  - (3) Spülen in destilliertem Wasser dreimal je 5 Minuten.
5. Gegenfärbung
  - (1) Eintauchen der Schnitte in die Gegenfärbelösung.
  - (2) Mit Leitungswasser waschen.
6. Eindecken  
Bei Benutzung von alkohollöslichen Substraten wie AEC sollten die Schnitte mit einem Eindeckmittel auf wässriger Basis ohne weitere Behandlung eingedeckt werden. Bei alkoholunlöslichen Substraten wie DAB sollten sie permanent eingedeckt werden. Dafür ist eine Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit anschließendem Xylolbad notwendig.

#### □ Interpretation der Ergebnisse

##### Mikroskopische Beobachtung

- Die Schnitte werden unter ein Lichtmikroskop nach einer positiven Reaktion untersucht.
- Positiver Kontrollobjektträger  
Positive Färbung wird beobachtet.
  - Negativer Kontrollobjektträger  
Positive Färbung wird nicht beobachtet.
  - Reagenzien-Kontrollobjektträger  
Eine Färbung des Schnittes kann durch eine unspezifische Proteinbindung verursacht werden.

Die Spezifität und Sensitivität der Antigendetektion ist abhängig von dem spezifischen Primärantikörper.

## 7. LAGERUNG & HALTBARKEIT

Bei 2 - 8 °C zu lagern. Nach Herstellung ist das Reagenz 18 Monate stabil.

## 8. GRENZEN DES VERFAHRENS

- (1) Die Reagenzien sollten vor Benutzung auf Raumtemperatur (15 - 25°C) gebracht werden.
- (2) Um eine Denaturierung der Antigene auszuschließen, sollten die Gewebe während des Verfahrens nicht über 58 °C gebracht werden.
- (3) Die Schnitte dürfen nicht austrocknen.
- (4) Die optimale Konzentration und Inkubationszeit der Primärantikörper sollte von jedem Labor selbst bestimmt werden. In einigen Fällen müssen Primärantikörper stärker verdünnt werden, um eine Überfärbung zu vermeiden.
- (5) Wenn die Schnitte wenig endogene Peroxidase, wenig Erythrozyten und Granulozyten enthalten, kann auf das Blockieren der endogenen Peroxidase verzichtet werden.
- (6) Die Gewebefärbung ist abhängig von der Behandlung und Prozessierung des Gewebes vor der Färbung. Nicht ausreichende Fixierung, Einfrieren und Auftauen, Waschen, Eintrocknen, Erhitzung oder auch das Schneiden kann Artefakte oder falsch-negative Ergebnisse hervorbringen.
- (7) Suboptimale Ergebnisse können durch alte oder ungepufferte Fixative verursacht werden oder wenn die Gewebe während des Einbettens oder während des Aufziehens der Schnitte übermäßig erhitzt werden.
- (8) Falsch-positive Ergebnisse können durch unspezifisches Binden von Proteinen entstehen. Obwohl **M**-Histofine® Simple Stain MAX PO (M) keine Blockierungsreagenzien benötigt, kann in einigen Fällen die Benutzung eines proteinhaltigen Blockierungsreagenzes vor Inkubation mit dem Primärantikörper sinnvoll sei, um Hintergrund zu reduzieren.
- (9) **M**-Histofine® Simple Stain MAX PO (M) wurde für die In-vitro-Diagnostik entwickelt. NICHIREI BIOSCIENCES INC., NICHIREI BIOSCIENCES Verkaufsagenten und Vertreter übernehmen keine Verantwortung für **M**-Histofine® Simple Stain MAX PO (M), wenn dieses Reagenz dort benutzt wurde, wo lokale Regeln oder Patente verletzt werden. Weder NICHIREI BIOSCIENCES noch die Verkaufsagenten können verantwortlich für eine Patentverletzung gemacht werden, die durch unsachgemäßen Gebrauch des Produktes auftreten.













## 9. TROUBLE SHOOTING

table 1

| Problem  | Möglicher Grund   | Lösung   |
|--|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Keine Färbung oder nur schwache Färbegergebnisse auf dem positiven Kontrollobjektträger und der Patientenprobe</li> </ul> | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Austrocknen der Proben vor der Zugabe des Färbereagenzes.</li> <li>2. Das Eindeckmedium ist nicht geeignet. Die Schnitte sind nicht genügend entparaffiniert.</li> <li>3. Jegliches Vorhandensein von Natriumazid im Puffer inaktiviert die Peroxidase und macht eine Färbung unmöglich.</li> <li>4. Substrat fehlerhaft. Unzureichende Inkubation mit Polymer oder Antikörper.</li> </ol>  | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Die Schnitte dürfen nie austrocknen.</li> <li>2. Auswahl eines geeigneten Einbettmediums oder Entfernung des Paraffins aus den eingebetteten Schnitten.</li> <li>2. Xylol oder Ethanol austauschen.</li> <li>3. Natriumazid-freie Puffer verwenden.</li> <li>3. Die Pufferlösung austauschen.</li> <li>4. Ein anderes Substrat verwenden.</li> <li>4. Überschüssige Puffer sorgfältig vor jedem Schritt entfernen.</li> <li>4. Primärantikörperinkubationszeit verlängern.</li> </ol>                |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Die unbekannte Probe ist nicht gut gefärbt, aber die positive Kontrollprobe</li> </ul>                                    | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Das Antigen kann während der Fixation oder während des Einbettprozesses denaturiert oder maskiert worden sein.</li> <li>2. Das Antigen wird durch Autolyse zerstört.</li> <li>3. In den unbekannt Schnitten ist weniger Antigen.</li> </ol>   | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Einige Antigene sind empfindlich gegenüber Fixierung oder Einbettung. Ein schwächeres Fixativ benutzen oder die Fixierungszeit verkürzen.</li> <li>1. Änderung der Antigendemaskierung (Hitzevorbehandlung, Enzym (Trypsin etc.) - verdau)</li> <li>2. Wenn irgend möglich, Gewebe aus Biopsien oder von Operationen verwenden.</li> <li>3. Verlängerung der Inkubationszeit.</li> </ol>   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Hoher Hintergrund auf allen Schnitten</li> </ul>  | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Die endogene Enzymaktivität wurde nicht vollständig blockiert.</li> <li>2. Unspezifische Bindung.</li> <li>3. Durch Autolyse entstehen überschüssige isolierte Antigene in den histologischen Lösungen.</li> <li>4. Ungenügende Entfernung von Paraffin.</li> <li>5. Ungenügendes Waschen.</li> <li>6. Eine hohe Raumtemperatur kann die Enzymreaktionen beschleunigen.</li> <li>7. Austrocknen der Proben nach der Polymerzugabe.</li> </ol> | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Die Durchführung der Blockierung der endogenen Peroxidase kontrollieren.</li> <li>2. Unspezifische Bindungen vor Zugabe des Primärantikörpers mit 10 % normalem Ziegen Serum blockieren.</li> <li>3. Wenn möglich, frisches gut fixiertes Gewebe nutzen.</li> <li>4. Xylol oder Ethanol austauschen.</li> <li>5. Waschschritte kontrollieren.</li> <li>6. Die Raumtemperatur zwischen 15-25°C halten oder die Reaktionszeit verkürzen.</li> <li>7. Niemals das Gewebe austrocknen lassen.</li> </ol> |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Schnitte lösen sich von den Objektträgern während der Reaktion .</li> </ul>   | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Einige Antigene benötigen eine Hitzedemaskierung oder eine verlängerte Reaktion mit dem Primärantikörper, was dazu führt, dass sich die Schnitte leicht ablösen.</li> </ol>   | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Die Schnitte auf beschichtete Objektträger mit einem Adhäsiv wie 0,02 % Poly-L-Lysin oder Silan-beschichtete Objektträger bringen.</li> </ol>  |

## 10. REFERENZEN

- (1) Mokry, et al. Versatility of immunohistochemical reactions: comprehensive survey of detection systems. Acta medica 1996 Apr 39:129-40
- (2) Kaji S, et al. BCAS1-positive immature oligodendrocytes are affected by the  $\alpha$ -synuclein-induced pathology of multiple system atrophy. Acta Neuropathol Commun. 2020 Jul 29;8(1):120.
- (3) Kobayashi S, et al. Image analysis of the nuclear characteristics of emerin protein and the correlation with nuclear grooves and intranuclear cytoplasmic inclusions in lung adenocarcinoma. Oncol Rep. 2019 Jan;41(1):133-142.
- (4) Kudo I, et al. Particular gene upregulation and p53 heterogeneous expression in TP53-mutated maxillary carcinoma. Oncol Lett. 2017 Oct;14(4):4633-4640.
- (5) Shimura T, et al. MIB-1 labeling index, Ki-67, is an indicator of invasive intraductal papillary mucinous neoplasm. Mol Clin Oncol. 2016 Aug;5(2):317-322.
- (6) Ishiwata T, et al. Enhanced expression of fibroblast growth factor receptor 2 IIIc promotes human pancreatic cancer cell proliferation. Am J Pathol. 2012 May;180(5):1928-41.
- (7) Tsuji S, et al. Secretion of intelectin-1 from malignant pleural mesothelioma into pleural effusion. Br J Cancer. 2010 Aug 10;103(4):517-23.
- (8) Tanioka Y, et al. Matrix metalloproteinase-7 and matrix metalloproteinase-9 are associated with unfavourable prognosis in superficial oesophageal cancer. Br J Cancer. 2003 Dec 1;89(11):2116-21.

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



**NICHIREI BIOSCIENCES INC.**  
6-19-20, Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-8402, JAPAN  
Phone:81-3-3248-2208, Facsimile:81-3-3248-2243



MedEnvoy Global B.V.  
Prinses Margrietplantsoen 33-Suite 123  
2595 AM The Hague  
The Netherlands

## ISTRUZIONI D'USO

02-2023

### **N**-Histofine® Simple Stain MAX PO (M)

Universal Immuno-peroxidase Polymer, Anti-Mouse

**N**-Histofine® Immunohistochemical staining reagent

Conservare a 2-8°C

|                  |                                |                  |
|------------------|--------------------------------|------------------|
| Reagenti forniti | 1 flacone da 17ml (170 tests)  | Codice : 414131F |
|                  | 3 flaconi da 17ml (500 tests)  | Codice : 414132F |
|                  | 9 flaconi da 17ml (1500 tests) | Codice : 414134F |

### 1. INTRODUZIONE

NICHIREI BIOSCIENCES ha sviluppato un innovativo sistema di rivelazione immunoistochimica, il metodo **Universal Immuno-enzyme Polymer (UIP)**. **N**-Histofine® Simple Stain MAX PO (M) consente di ottenere un'alta sensibilità in tempi ridotti.

### 2. DESCRIZIONE

Liquido. Pronto all'uso.

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

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

### 3. USO PREVISTO

**N**-Histofine® Simple Stain MAX PO (M) è destinato all'utilizzo in immunoistochimica, per rilevare antigeni che reagiscono con un anticorpo primario di topo su cellule e tessuti umani. Il prodotto forma un complesso antigene/anticorpo/polimero di immuno-perossidasi universale reagendo con un anticorpo primario legato a un antigene su una sezione di tessuto. Il risultato fornisce uno stato fisiologico o patologico.

Per uso diagnostico in vitro. Per la colorazione manuale. I risultati della colorazione sono qualitativi. Per sezioni di tessuto umano fissate in paraffina in formalina. Per operatori specializzati.

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

### 4. PRINCIPIO

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

### 5. PRECAUZIONI

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

7. Non utilizzare la bocca per pipettare i reagenti ed evitare il contatto con pelle, mucose e vestiti.
8. Evitare contaminazioni microbiche dei reagenti, possono generare risultati alterati.
9. Evitare spargimento dei reagenti o generazione di aerosols.
10. Il cromogeno DAB deve essere maneggiato con cura poiché contiene un agente carcinogeno.
11. Lo smaltimento deve essere effettuato in accordo con la regolazione vigente.
12. Qualsiasi incidente grave verificatosi in relazione a **N**-Histofine® Simple Stain MAX PO (M) deve essere segnalato al produttore e all'autorità competente dello Stato membro in cui è stabilito l'utente e/o il paziente.

### 6. PROCEDURA DI COLORAZIONE

Reagenti e materiali richiesti ma non forniti

- Xilolo
- Etanolo 95%
- Etanolo 100%
- Tampone salino fosfato (PBS) (pH 7.6±0.2)
  - NaCl 7.75 g
  - K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.50 g
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.20 g
  - Acqua distillata 1L
- Soluzione al 3% di perossido d'idrogeno in metanolo (Aggiungere 1 parte di perossido d'idrogeno a 9 parti di metanolo assoluto)
- Anticorpo primario di topo
  - Reagente di controllo negativo
  - Cromogeno/substrato
  - Soluzione per controcolorazione
  - Acqua distillata
  - Camera umida per incubazione dei vetrini
  - Microscopio
  - Vetrini coprioggetto
  - Montante
  - Timer
  - Staining racks o Coplin jars
  - Carta assorbente
  - Adesivo per sezioni tissutali (0.02% poly-L-lysine, silano o analoghi)

Preparazione dei campioni

[Sezioni incluse in paraffina]

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

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

Preparazione delle sezioni

[Sezioni incluse in paraffina]

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

#### [Vetrini di controllo]

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

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

#### □ Sparaffinatura e reidratazione

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

#### □ Colorazione

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

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

#### □ Interpretazione dei risultati

#### Osservazione al microscopio

- I vetrini sono esaminati al microscopio luce confrontando i risultati con i 3 tipi di controlli.
- Vetrino di controllo positivo  
Si osserva colorazione positiva.
  - Vetrino di controllo negativo  
Non si osserva colorazione positiva
  - Vetrino con reagente di controllo  
In caso di colorazione positiva, questa è probabilmente dovuta ad una reazione aspecifica.

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

## 7. CONSERVAZIONE E VALIDITA'

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

## 8. LIMITAZIONI GENERALI

- (1) Porre i reagenti a temperature ambiente (15 - 25°C) prima dell'utilizzo.
- (2) Per limitare la denaturazione degli antigeni, durante la processazione non esporre i tessuti a temperature superiori ai 58°C.
- (3) Non lasciare seccare i campioni durante la colorazione.
- (4) I tempi di incubazione e le concentrazioni ottimali di anticorpo primario devono essere determinati dall'utilizzatore. In alcuni casi, per evitare un eccesso di colorazione è opportuno diluire ulteriormente l'anticorpo primario.
- (5) Se la quantità di perossidasi endogena, di eritrociti e granulociti è molto bassa, è possibile omettere il passaggio di quenching
- (6) I risultati della colorazione sono strettamente correlati ai passaggi di fissazione e processazione precedenti, errori in queste fasi possono comportare artefatti o risultati falsi negativi.
- (7) I risultati possono essere non ottimali se si utilizzano fissativi non freschi o non tamponati o se i campioni vengono riscaldati eccessivamente durante l'inclusione o il montaggio sui vetrini.
- (8) A causa dei legami aspecifici con le proteine, è possibile ottenere risultati falsi-positivi. Sebbene **N**-Histofine® Simple Stain MAX PO (M) non richieda l'utilizzo di blocking, in alcuni casi l'applicazione di un reagente bloccante prima dell'incubazione con l'anticorpo primario può essere utile per ridurre il background.
- (9) **N**-Histofine® Simple Stain MAX PO (M) è per uso diagnostico in vitro. NICHIREI BIOSCIENCES INC., i suoi agenti di vendita e distributori non saranno responsabili di un eventuale uso improprio di **N**-Histofine® Simple Stain MAX PO (M).

## 9. PROBLEMI


table 1


| Problema  | Possibile causa  | Soluzione   |
|---|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Assenza di colorazione o segnale debole nei campioni e nel vetrino di controllo positivo.</li> </ul> | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. I campioni si sono asciugati durante i passaggi di colorazione.</li> <li>2. Inclusione non adeguata, oppure la paraffina non è stata completamente rimossa dalle sezioni.</li> <li>3. Tracce di sodio azide presenti nei tamponi possono inattivare la perossidasi, impedendo la colorazione.</li> <li>4. Inadeguata incubazione con l'enzima o l'anticorpo.</li> </ol>  | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Utilizzare una camera umida per prevenire l'essiccamento delle sezioni.</li> <li>2. Utilizzare un adeguato agente di inclusione o rimuovere completamente la paraffina dalle sezioni cambiando xilolo ed etanolo.</li> <li>3. Utilizzare tamponi privi di sodio azide. Cambiare il tampone di lavaggio.</li> <li>4. Utilizzare cromogeno/substrato freschi. Ad ogni passaggio, eliminare l'eccesso di soluzione. Incubare con l'anticorpo per il tempo necessario.</li> </ol>   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Il campione non è colorato, mentre il controllo positivo sì.</li> </ul>                              | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. L'antigene è denaturato o mascherato durante i processi di fissazione ed inclusione.</li> <li>2. L'antigene è decomposto per autolisi.</li> <li>3. Scarsa quantità di antigene nelle sezioni.</li> </ol>   | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Alcuni antigeni sono sensibili alla fissazione e all'inclusione. Utilizzare un fissativo meno concentrato e diminuire i tempi di fissazione. Per poter rilevare l'antigene, alcuni tessuti richiedono un pretrattamento es. recupero antigenico al calore (HIER) o trattamento con tripsina.</li> <li>2. Se possibile, utilizzare tessuti ottenuti da biopsia o intervento chirurgico.</li> <li>3. Prolungare i tempi di incubazione.</li> </ol>  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Eccesso di background in tutti i campioni</li> </ul>   | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. L'attività enzimatica endogena non è stata completamente bloccata.</li> <li>2. Legami aspecifici.</li> <li>3. Un eccesso di reattività può essere dovuto ad autolisi del campione.</li> <li>4. Insufficiente rimozione della paraffina.</li> <li>5. Insufficiente lavaggio dopo l'incubazione con l'anticorpo.</li> <li>6. Un'elevata temperatura ambientale accelera le reazioni enzimatiche.</li> <li>7. Asciugatura dei campioni durante la colorazione.</li> </ol> | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Assicurarsi che il quenching della Perossidasi sia effettuato correttamente.</li> <li>2. Prima di aggiungere l'anticorpo primario, trattare con siero normale di capra al 10%.</li> <li>3. Se possibile, utilizzare tessuti freschi.</li> <li>4. Cambiare lo xilolo o l'etanolo.</li> <li>5. Assicurarsi che i lavaggi siano sufficienti.</li> <li>6. Mantenere la temperatura ambientale tra i 15 e i 25°C. Abbreviare i tempi di reazione.</li> <li>7. Impedire l'asciugatura dei campioni durante la colorazione.</li> </ol> |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Distacco delle sezioni durante le reazioni.</li> </ul>   | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Alcuni antigeni richiedono recupero antigenico al calore o prolungate incubazioni con l'anticorpo primario, ciò può indurre il distacco della sezione.</li> </ol>  | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Montare le sezioni su vetrini rivestiti da un adesivo es. 0.02% poly-L-lysine o silano.</li> </ol>  |

## 10. BIBLIOGRAFIA

- (1) Mokry, et al. Versatility of immunohistochemical reactions: comprehensive survey of detection systems. Acta medica 1996 Apr 39:129-40
- (2) Kaji S, et al. BCAS1-positive immature oligodendrocytes are affected by the  $\alpha$ -synuclein-induced pathology of multiple system atrophy. Acta Neuropathol Commun. 2020 Jul 29;8(1):120.
- (3) Kobayashi S, et al. Image analysis of the nuclear characteristics of emerin protein and the correlation with nuclear grooves and intranuclear cytoplasmic inclusions in lung adenocarcinoma. Oncol Rep. 2019 Jan;41(1):133-142.
- (4) Kudo I, et al. Particular gene upregulation and p53 heterogeneous expression in TP53-mutated maxillary carcinoma. Oncol Lett. 2017 Oct;14(4):4633-4640.
- (5) Shimura T, et al. MIB-1 labeling index, Ki-67, is an indicator of invasive intraductal papillary mucinous neoplasm. Mol Clin Oncol. 2016 Aug;5(2):317-322.
- (6) Ishiwata T, et al. Enhanced expression of fibroblast growth factor receptor 2 IIIc promotes human pancreatic cancer cell proliferation. Am J Pathol. 2012 May;180(5):1928-41.
- (7) Tsuji S, et al. Secretion of intelectin-1 from malignant pleural mesothelioma into pleural effusion. Br J Cancer. 2010 Aug 10;103(4):517-23.
- (8) Tanioka Y, et al. Matrix metalloproteinase-7 and matrix metalloproteinase-9 are associated with unfavourable prognosis in superficial oesophageal cancer. Br J Cancer. 2003 Dec 1;89(11):2116-21.

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

 **NICHIREI BIOSCIENCES INC.**  
6-19-20, Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-8402, JAPAN  
Phone: 81-3-3248-2208, Facsimile: 81-3-3248-2243

 **MedEnvoy Global B.V.**  
Prinses Margrietplantsoen 33-Suite 123  
2595 AM The Hague  
The Netherlands



## INSTRUCCIONES

02-2023

### **N**-Histofine® Simple Stain MAX PO (M)

#### Polímero Universal de Inmuno-peroxidasa, Anti-ratón

**N**-Histofine® Reactivo para tinciones inmunohistoquímicas

Almacene el producto a 2-8°C

#### Reactivos suministrados

|                               |                  |
|-------------------------------|------------------|
| 17ml x 1 frasco (170 tests)   | Código : 414131F |
| 17ml x 3 frascos (500 tests)  | Código : 414132F |
| 17ml x 9 frascos (1500 tests) | Código : 414134F |

### 1. INTRODUCCIÓN

NICHIREI BIOSCIENCES ha desarrollado un sistema de tinción único llamado método **Universal Immuno-enzyme Polymer (UIP)**. Es una técnica original de NICHIREI BIOSCIENCES. **N**-Histofine® Simple Stain MAX PO (M), proporciona una alta sensibilidad y permite ahorrar tiempo en aplicaciones inmunohistoquímicas.

### 2. DESCRIPCIÓN

Líquido. Listo para su uso.

**N**-Histofine® Simple Stain MAX PO (M) (Polímero Universal de Inmuno-peroxidasa, Anti-ratón) es el polímero marcado que se prepara combinando polímeros de aminoácidos con peroxidasa e Ig antirratón de cabra de cabra que se reducen a Fab'. Se almacena en tampón MOPS (Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico) (pH 6.5) que contiene estabilizador y antibiótico.

La fracción de IgG purificada del suero caprino inmunizado se digiere para preparar F(ab')<sub>2</sub>. El F(ab')<sub>2</sub> específico del antígeno se purifica por afinidad con el antígeno. La absorción en fase sólida se realiza con proteína de suero humano. El polímero de aminoácidos marcado con peroxidasa se conjuga con el Fab' obtenido mediante la reducción del F(ab')<sub>2</sub>.

El sistema no contiene biotina ni estreptavidina, por lo que se evita por completo el fondo encontrado con el sistema de detección tradicional con biotina.

### 3. USO PREVISTO

**N**-Histofine® Simple Stain MAX PO (M) está diseñado para permitir pruebas inmunohistoquímicas, para revelar antígenos que reaccionan con un anticuerpo primario de ratón suministrado por el usuario en tejidos y células humanas. El producto forma un complejo antígeno/anticuerpo/polímero inmuno-peroxidasa universal al reaccionar con un anticuerpo primario unido a un antígeno en una sección de tejido. El resultado proporciona un estado fisiológico o patológico.

Para uso en diagnóstico in vitro. Para la tinción manual. Los resultados de la tinción son cualitativos. Para secciones de tejido humano fijadas con formalina e incluidas en parafina. Para uso profesional.

La interpretación debe realizarse en el contexto de la historia clínica del paciente y de otras pruebas diagnósticas por un patólogo cualificado.

### 4. PRINCIPIO

El complejo antígeno/anticuerpo/polímero inmuno-peroxidasa universal puede prepararse dejando que el reactivo reaccione con un anticuerpo primario de ratón unido al antígeno en una sección de tejido. La actividad enzimática de este complejo da lugar a un depósito coloreado, tiñendo así el punto del antígeno.

### 5. PRECAUCIONES

1. Antes de utilizar este reactivo, lea estas instrucciones.
2. No utilice los reactivos después de su fecha de caducidad.

**N**-Histofine® es una marca registrada de NICHIREI BIOSCIENCES. Los países de registro nos serán remitidos.

3. Para uso profesional.
4. Las muestras, antes y después de ser fijadas, y cualquier otro material expuesto a ellas, deben ser manipuladas como muestras peligrosas y con las precauciones adecuadas.
5. La inhalación o la ingestión del fijador altamente alérgico formaldehído es perjudicial. Lleve máscara protectora. En caso de ingestión, provocar el vómito. En caso de contacto con la piel o los ojos, lávese a fondo con agua.
6. Los reactivos orgánicos son inflamables. No utilizar cerca de una llama viva.
7. No pipetear nunca los reactivos con la boca y evitar su contacto con la piel, las mucosas y la ropa.
8. Evite la contaminación microbiana de reactivos ya que podría causar resultados incorrectos.
9. Evite las salpicaduras con reactivos o la generación de aerosoles.
10. Puesto que se trata de un cromógeno, la solución DAB debe ser manipulada cuidadosamente, ya que contiene carcinógeno.
11. La solución no utilizada debe eliminarse de acuerdo con la normativa local, estatal y federal.
12. Cualquier incidente grave que haya ocurrido en relación con **N**-Histofine® Simple Stain MAX PO (M) se comunicará al fabricante y a la autoridad competente del Estado miembro en el que esté establecido el usuario y/o el paciente.

### 6. PROCEDIMIENTOS DE TINCIÓN

□ Reactivos y materiales necesarios no suministrados

- Xileno
- Etanol 95%
- Etanol 100%
- Tampón fosfato salino (PBS) (pH 7.6±0.2)  
NaCl 7.75 g  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.50 g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.20 g  
Agua destilada 1L
- Solución de peróxido de hidrógeno al 3% en metanol absoluto (Añadir 1 parte de peróxido de hidrógeno al 30% a 9 partes de metanol absoluto)
- Anticuerpo primario de ratón
- Reactivo de control negativo
- Reactivo cromógeno/sustrato
- Solución de contratinción
- Agua destilada
- Cámara de humidificación para incubación en portaobjetos
- Microscopio óptico
- Portaobjetos
- Medios de montaje
- Temporizador
- Gradillas de tinción o botes Coplin
- Toallitas absorbentes
- Adhesivo para cortes de tejidos (poli-L-lisina 0,02%, silano o similar)

□ Preparación de la muestra

[Tejidos incluidos en parafina]

Los especímenes pueden sufrir desintegración histológica o desnaturalización antigénica cuando se someten a un fijador muy concentrado o a una fijación prolongada. Así, para obtener una fijación óptima, manteniendo la morfología del tejido y la actividad del antígeno, se deben utilizar tejidos lo más frescos posible y de pequeño tamaño (aproximadamente 1cm x 1cm x 0,5cm). Se recomiendan los fijadores que se muestran a continuación.

| Reactivo de fijación                | Tiempo de fijación |
|-------------------------------------|--------------------|
| Formol al 10% o formalina tamponada | 24-48 horas        |
| Formol al 20%                       | 12-24 horas        |

□ Preparación del corte

[Cortes de tejido incluidos en parafina]

Las secciones cortadas deben ser de 3-6 µm y se colocan en portaobjetos. Cuando se vayan a realizar otros tratamientos, como la recuperación de antígenos, la recuperación de epítomos inducidos por calor (HIER) o el tratamiento con tripsina, los portaobjetos de vidrio deben recubrirse con un adhesivo como la poli-L-lisina al 0,02% o el silano para las secciones de tejido.

[Portaobjetos de control]

Se necesitan un portaobjetos de control positivo, un portaobjetos de control negativo y un portaobjetos de control de reactivos, que se procesan de la misma manera que el portaobjetos de la muestra desconocida para interpretar los resultados de la tinción.

- Portaobjetos de control positivo  
Una muestra que contiene el antígeno diana y que se procesa de la misma manera que la muestra desconocida.
- Portaobjetos de control positivo  
Una muestra que no contenga el antígeno diana y que se procesa de la misma manera que la muestra desconocida.
- Portaobjetos de control de reactivos  
La muestra de control se utiliza y se procesa de la misma manera que la muestra de prueba, excepto que se utiliza el reactivo de control negativo en lugar del anticuerpo primario

□ Desparafinación y Rehidratación

1. Tratamiento con xileno
  - (1) Sumerge los portaobjetos en xileno. Después de 3 minutos, sacar y sacudir el exceso de xileno en los portaobjetos.
  - (2) Repetir 1.(1) dos veces utilizando xileno fresco.
2. Tratamiento con etanol
  - (1) Sumerge los portaobjetos en etanol al 100%. Después de 3 minutos, sacar y sacudir el exceso de etanol al 100% en los portaobjetos.
  - (2) Repetir 2.(1) una vez con etanol al 100% fresco.
  - (3) A continuación, trátelos dos veces con etanol al 95% de la misma manera que se ha descrito anteriormente.
3. Lavado  
Después de sacudir el exceso de etanol, sumerja los portaobjetos en PBS durante 5 minutos.

□ Procedimientos de Tinción

1. Extinción de la peroxidasa endógena
  - (1) Limpie cuidadosamente las áreas alrededor de las secciones en los portaobjetos para eliminar el exceso de solución.
  - (2) Sumergirlos en una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en metanol absoluto durante 10-15 minutos a temperatura ambiente (15 - 25°C).
  - (3) Aclararlas en PBS fresco 3 veces, cada una de ellas de 5 minutos de duración.
2. Adición y reacción del anticuerpo primario
  - (1) Limpie cuidadosamente las áreas alrededor de las secciones en los portaobjetos.
  - (2) Aplicar 2 gotas (100µl) de anticuerpo primario en el portaobjetos de la muestra, el portaobjetos de control positivo y el portaobjetos de control negativo, respectivamente, de manera que se cubra completamente el corte.
  - (3) En el portaobjetos de control de reactivos, aplicar dos gotas de reactivo de control negativo (suero normal) en lugar del anticuerpo primario.
  - (4) Incubarlas a temperatura ambiente o a 4°C. (Seguir las instrucciones de los datos de tiempo de incubación designados en el prospecto del anticuerpo primario)
  - (5) Aclararlas en PBS fresco 3 veces, cada una de ellas de 5 minutos de duración.
3. Incorporación y reacción de **N**-Histofine® Simple Stain MAX PO (M) (**Polímero Universal de Inmuno-peroxidasa, Anti-ratón**).
  - (1) Limpie cuidadosamente las áreas alrededor de las secciones en los portaobjetos.
  - (2) Aplique 2 gotas (100µl) de Simple Stain MAX PO (M) a cada portaobjetos de manera que se cubran completamente los cortes. Incubar a temperatura ambiente (15 - 25°C) durante 30 minutos.
  - (3) Aclararlas en PBS fresco 3 veces, cada una de ellas de 5 minutos de duración.
4. Incorporación y reacción del reactivo cromógeno/sustrato
  - (1) Limpie cuidadosamente las áreas alrededor de los cortes en los portaobjetos.
  - (2) Aplique 2 gotas (100µl) de Simple Stain MAX PO (M) a cada portaobjetos de manera que se cubran completamente los cortes. Incubar a temperatura ambiente (15 - 25°C) durante 5- 20 minutos.
  - (3) Aclararlas en agua destilada 3 veces, cada una de ellas de 5 minutos de duración.
5. Contratinción
  - (1) Sumergirlos en la solución de contratinción.
  - (2) Lavarlas bien con agua del grifo.
6. Montaje

En el caso de los sustratos solubles en alcohol, como el AEC, los cortes de tejido se montan con medios de montaje a base de agua sin más tratamiento. En el caso de sustratos insolubles en alcohol como el DAB,

se montan con medios de montaje permanentes después de lavarlos con agua, deshidratarlos en series graduadas de alcohol y aclararlos en xileno.

□ Interpretación de los resultados

Observación microscópica

Los portaobjetos se examinan con un microscopio de luz para detectar una reacción positiva. Es necesario hacer la comparación con tres tipos de portaobjetos de control para interpretar los resultados de la tinción.

- Portaobjetos de control positivo  
Se observa tinción positiva.
- Portaobjetos de control positivo  
No se observa tinción positiva.
- Portaobjetos de control de reactivos  
Si el portaobjetos está teñido, probablemente se deba a una reacción inespecífica por unión de proteínas no específicas.

La especificidad y la sensibilidad de la detección del antígeno dependen del anticuerpo primario específico utilizado.

## 7. ALMACENAMIENTO Y VIDA ÚTIL

Almacenar a 2-8°C. El reactivo es estable 18 meses tras su fabricación.

## 8. LIMITACIONES GENERALES

(1) Deje que estos reactivos alcancen la temperatura ambiente (15 - 25°C) antes de teñir.

(2) Para minimizar la desnaturalización de los antígenos, no exponga los tejidos a una temperatura superior a 58°C durante el procesamiento.

(3) No deje que los tejidos se sequen en cada paso de la tinción.

(4) La concentración y el tiempo de incubación óptimos de los anticuerpos primarios deben ser determinados por la investigación. En algunos casos, puede ser necesaria una dilución adicional de los anticuerpos primarios para evitar una tinción excesiva.

(5) Si las secciones contienen poca peroxidasa endógena, pocos eritrocitos y pocos granulocitos, se puede omitir el apagado de la peroxidasa endógena.

(6) La tinción de tejidos depende de la manipulación y el procesamiento del tejido antes de la tinción. Una fijación, congelación, descongelación, lavado, secado, calentamiento o corte inadecuados pueden producir artefactos o resultados falsos negativos.

(7) Los resultados no serán óptimos si se utilizan fijadores viejos o no tamponados, o si se calientan excesivamente durante la incrustación o durante la fijación de las secciones en los portaobjetos.

(8) Pueden observarse resultados falsos positivos debido a la unión inespecífica de las proteínas. Aunque **N**-Histofine® Simple Stain MAX PO (M) no requiere el uso de un reactivo de bloqueo por separado, en algunos casos la aplicación de un reactivo de bloqueo que contenga una proteína irrelevante, antes de la incubación con el anticuerpo primario, puede ser útil para reducir el fondo.

(9) **N**-Histofine® Simple Stain MAX PO (M) está diseñado para su uso en el diagnóstico in vitro. NICHIREI BIOSCIENCES INC., los agentes de ventas y los distribuidores de NICHIREI BIOSCIENCES no asumirán ninguna responsabilidad por **N**-Histofine® Simple Stain MAX PO (M) cuando se utilice de una manera que directa o indirectamente viole las regulaciones o patentes locales. Ni NICHIREI BIOSCIENCES ni sus agentes de ventas pueden ser considerados responsables de cualquier infracción de patente que pueda ocurrir como resultado del uso inadecuado del producto.













## 9. RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS


tabla 1


| Problema   | Posible causa  | Solución  |
|--|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>○ No hay tinción o la tinción es débil en el portaobjetos de control positivo y en el portaobjetos de la muestra desconocida</li> </ul> | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Secado de las muestras durante la tinción antes de añadir los reactivos.</li> <li>2. El agente de inclusión no es adecuado, o la parafina no se elimina completamente de los cortes incluidos en parafina.</li> <li>3. Cualquier traza de azida sódica presente en el tampón inactiva la peroxidasa, haciendo imposible la tinción.</li> <li>4. Incubación inadecuada de la enzima y el anticuerpo.</li> </ol>   | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Utilice la cámara de humidificación para no permitir que el tejido se seque.</li> <li>2. Seleccione un agente de inclusión adecuado o elimine completamente la parafina de las secciones incluidas.</li> <li>2. Cambie el xileno o el etanol según sea el caso.</li> <li>3. Utilice una solución tampón sin azida sódica.</li> <li>3. Cambiar la solución tampón.</li> <li>4. Cambie el reactivo cromógeno/sustrato caducado.</li> <li>4. Elimine bien el exceso de solución en cada paso.</li> <li>4. Proporcionar el tiempo suficiente para la reacción con el anticuerpo. En particular, el anticuerpo primario debe incubarse durante el período de tiempo especificado en el inserto.</li> </ol> |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>○ El portaobjetos de la muestra desconocida no se tiñe, mientras que el portaobjetos del control positivo sí se tiñe.</li> </ul>        | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. El antígeno se desnaturaliza o enmascara durante el proceso de fijación o incrustación.</li> <li>2. El antígeno se descompone por autólisis.</li> <li>3. Hay menos antígeno en las secciones.</li> </ol>   | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Algunos antígenos son sensibles a la fijación o incrustación. Por ello, utilice un fijador menos potente y disminuya el tiempo de fijación.</li> <li>1. El pretratamiento es necesario para algunos tejidos, con el fin de revelar el antígeno, como la recuperación del antígeno, la recuperación del epítipo inducido por calor (HIER) o el tratamiento con tripsina.</li> <li>2. Utilizar tejidos obtenidos por biopsia o cirugía, siempre que sea posible.</li> <li>3. Prolongar el tiempo de incubación.</li> </ol>  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Los fondos están intensamente teñidos en todos los portaobjetos.</li> </ul>   | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. La actividad enzimática endógena no estaba completamente bloqueada.</li> <li>2. Se encuentran composiciones de unión no específicas.</li> <li>3. La autólisis da lugar a un exceso de antígenos aislados en soluciones histológicas.</li> <li>4. Eliminación insuficiente de parafina.</li> <li>5. Lavado insuficiente del anticuerpo.</li> <li>6. Una temperatura ambiente elevada acelera las reacciones enzimáticas.</li> <li>7. Secado de las muestras durante la tinción después de los reactivos.</li> </ol> | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Asegúrese de que el procedimiento de apagado de la peroxidasa endógena es el correcto.</li> <li>2. Antes de añadir el anticuerpo primario, tratar con un 10% de suero normal de cabra.</li> <li>3. Obtención de tejidos frescos siempre que estén disponibles.</li> <li>4. Cambie el xileno o el etanol según sea el caso.</li> <li>5. Asegurar el lavado a fondo del anticuerpo.</li> <li>6. Mantener la temperatura ambiente entre 15 y 25°C</li> <li>6. Acortar el tiempo de reacción.</li> <li>7. Nunca dejar que el tejido se seque.</li> </ol>  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Durante la reacción, las secciones de tejido se desprenden de los portaobjetos.</li> </ul>  | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Algunos antígenos requieren un procedimiento de recuperación de antígenos inducido por calor o un tiempo de reacción prolongado con el anticuerpo primario, lo que puede hacer que las secciones se desprendan fácilmente.</li> </ol>  | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Montar las secciones de tejido en portaobjetos recubiertos con un adhesivo como la poli-L-lisina al 0,02% o el silano.</li> </ol>   |

## 10. REFERENCIAS

- (1) Mokry, et al. Versatility of immunohistochemical reactions: comprehensive survey of detection systems. Acta medica 1996 Apr 39:129-40
- (2) Kaji S, et al. BCAS1-positive immature oligodendrocytes are affected by the  $\alpha$ -synuclein-induced pathology of multiple system atrophy. Acta Neuropathol Commun. 2020 Jul 29;8(1):120.
- (3) Kobayashi S, et al. Image analysis of the nuclear characteristics of emerin protein and the correlation with nuclear grooves and intranuclear cytoplasmic inclusions in lung adenocarcinoma. Oncol Rep. 2019 Jan;41(1):133-142.
- (4) Kudo I, et al. Particular gene upregulation and p53 heterogeneous expression in TP53-mutated maxillary carcinoma. Oncol Lett. 2017 Oct;14(4):4633-4640.
- (5) Shimura T, et al. MIB-1 labeling index, Ki-67, is an indicator of invasive intraductal papillary mucinous neoplasm. Mol Clin Oncol. 2016 Aug;5(2):317-322.
- (6) Ishiwata T, et al. Enhanced expression of fibroblast growth factor receptor 2 IIIc promotes human pancreatic cancer cell proliferation. Am J Pathol. 2012 May;180(5):1928-41.
- (7) Tsuji S, et al. Secretion of intelectin-1 from malignant pleural mesothelioma into pleural effusion. Br J Cancer. 2010 Aug 10;103(4):517-23.
- (8) Tanioka Y, et al. Matrix metalloproteinase-7 and matrix metalloproteinase-9 are associated with unfavourable prognosis in superficial oesophageal cancer. Br J Cancer. 2003 Dec 1;89(11):2116-21.

|  |  |   |
|--|--|---|
|  Número de catálogo/código                 |  Límites de temperatura                     |  Dispositivo médico para diagnóstico in vitro  |
|  Fabricante                               |  Código de lote                             |  Contiene cantidad suficiente para <n> pruebas |
|  Fecha de caducidad                       |  Consulte las instrucciones de uso          |  Representante autorizado en la Unión Europea  |
|  Marca CE, código del organismo notificado |  Solo para evaluación de rendimiento de IVD |  Muestra                                       |

 **NICHIREI BIOSCIENCES INC.**  
6-19-20, Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-8402, JAPAN  
Phone:81-3-3248-2208, Facsimile:81-3-3248-2243

 MedEnvoy Global B.V.  
Prinses Margrietplantsoen 33-Suite 123  
2595 AM The Hague  
The Netherlands

## NÁVOD K POUŽITÍ

02-2023

### **N**-Histofine® Simple Stain MAX PO (M)

**Univerzální imunoperoxidázový polymer, anti-myší**

**N**-Histofine® Imunohistochemické barvicí činidlo

Skladujte při teplotě 2-8 °C

|                |                                 |               |
|----------------|---------------------------------|---------------|
| Dodaná činidla | 17 ml x 1 lahvička (170 testů)  | Kód : 414131F |
|                | 17 ml x 3 lahvičky (500 testů)  | Kód : 414132F |
|                | 17 ml x 9 lahviček (1500 testů) | Kód : 414134F |

### 1. ÚVOD

Společnost NICHIREI BIOSCIENCES vyvinula unikátní imunohistochemický barvicí systém nazvaný **univerzální imunoenzymová polymerová metoda (UIP)**. Jedná se o originální techniku společnosti NICHIREI BIOSCIENCES. **N**-Histofine® Simple Stain MAX PO (M) poskytuje vysokou citlivost i časovou úsporu při imunohistochemických aplikacích.

### 2. POPIS

Tekutina. Připraveno k použití.

**N**-Histofine® Simple Stain MAX PO (M) (univerzální imunoperoxidázový polymer proti myším Ig) je značený polymer připravený kombinací polymerů aminokyselin s peroxidázou a kozími anti - myším Ig, které jsou redukovány na Fab'. Uchovává se v pufru MOPS (kyselina 3-morfolinopropansulfonová) (pH 6,5) obsahujícím stabilizátor a antibakteriální činidlo.

Frakce IgG purifikovaná ze séra imunizovaných koz se štěpí pro přípravu F(ab')<sup>2</sup>. Antigen-specifický F(ab')<sup>2</sup> se afinitně purifikuje pomocí antigenu. Absorpce na pevné fázi se provádí s proteinem lidského séra. Polymer aminokyselin značený peroxidázou se konjuguje s Fab' získaným redukcí F(ab')<sup>2</sup>.

Systém neobsahuje biotin ani streptavidin, takže se zcela vyhýbá barvení pozadí, které se vyskytuje u tradičních detekčních systémů na bázi biotinu.

### 3. URČENÉ POUŽITÍ

**N**-Histofine® Simple Stain MAX PO (M) je navržen tak, aby umožnil imunohistochemické testy k odhalení antigenů, které reagují s primární myší protilátkou dodanou uživatelem na lidských tkáních a buňkách.

Produkt vytváří antigen/protilátka/univerzální imunoperoxidáza Polymerový komplex reakcí s primární protilátkou navázanou na antigen na tkáňovém řezu. Výsledek vyjadřuje fyziologický nebo patologický stav.

Pro diagnostické použití in vitro. Pro ruční barvení. Výsledky barvení jsou kvalitativní. Pro formalínem fixované parafinové řezy lidské tkáně.

Pro profesionální uživatele.

Interpretaci musí provést kvalifikovaný patolog v kontextu s klinickou anamnézou pacienta a dalších diagnostických testů.

### 4. PRINCIP

Komplex antigen / protilátka / univerzální imunoperoxidáza polymer lze připravit tak, že se činidlo nechá reagovat s myší primární protilátkou navázanou na antigen na tkáňovém řezu. Enzymatická aktivita tohoto komplexu vede k barevnému depozitu, a tím k obarvení místa s antigenem.

### 5. UPOZORNĚNÍ

1. Před použitím tohoto činidla si přečtěte tento návod k použití. .
2. Nepoužívejte činidla po uplynutí doby použitelnosti.
3. Pro profesionální uživatele.
4. Se vzorky před a po fixaci a se všemi ostatními materiály, které jsou s nimi v kontaktu , by se mělo zacházet jako s biologicky nebezpečnými materiály za dodržení příslušných bezpečnostních opatření.
5. Vdechnutí nebo požití vysoce alergického fixačního formaldehydu je škodlivé. Používejte ochrannou masku. Při požití může vyvolat zvracení. Při zasažení kůže nebo očí důkladně omyjte vodou.
6. Organická činidla jsou hořlavá. Nepoužívejte je v blízkosti otevřeného ohně.
7. Nikdy nepipetujte činidla ústy a zabraňte jejich kontaktu s kůží, sliznicemi a oblečením.
8. Zabraňte mikrobiální kontaminaci činidel, protože může dojít k nesprávnému výsledku.
9. Zabraňte rozstříknutí činidel nebo vzniku aerosolů.
10. S roztokem DAB jako s chromogenem je třeba zacházet opatrně, protože obsahuje karcinogen. .
11. Nepoužitý roztok by měl být zlikvidován v souladu s místními, státními a federálními předpisy.
12. Jakýkoli závažný incident, ke kterému došlo v souvislosti s **N**-Histofine® Simple Stain MAX PO(M), musí být nahlášen výrobcí a příslušnému orgánu členského státu, ve kterém je uživatel a/nebo pacient uzaven.

### 6. POSTUPY BARVENÍ

□ Požadované, ale nedodané reagenty a materiály

- Xylen
- 95% ethanol
- 100% etanol
- Fosfátový pufovaný roztok (PBS) (pH 7,6 ± 0,2)
 

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| NaCl                            | 7,75 g |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 1,50 g |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 0,20 g |
| destilovaná voda                | 1L     |
- 3% roztok peroxidu vodíku v absolutním methanolu (Přidejte 1 díl 30% peroxidu vodíku k 9 dílům methanolu). absolutní metanol)
- Myší primární protilátka
- Negativní kontrolní činidlo
- Chromogen/substrátové činidlo
- Roztok na barvení
- Destilovaná voda
- Zvlhčovaná komora pro inkubaci sklíček
- Světelný mikroskop
- Krycí sklíčka
- Montážní média
- Stopky
- Stojany na barvení nebo sklenice Coplin
- Absorpční ubrousky
- Lepidlo pro tkáňový řez (0,02 % poly-L-lysinu, silanu nebo podobných látek)

□ Příprava řezů

[Parafinové řezy tkání]

Vzorky mohou podléhat histologické dezintegraci nebo antigenní denaturaci, pokud jsou vystaveny vysoce koncentrovanému fixačnímu činidlu nebo dlouhodobé fixaci. Proto by se pro dosažení optimální fixace, zachování morfologie tkáně a antigenní aktivity měly používat co nejčerstvější tkáňe malých rozměrů (přibližně 1 cm x 1 cm x 0,5 cm). Doporučují se níže uvedené fixační prostředky.

| Fixační činidlo                     | Doba fixace |
|-------------------------------------|-------------|
| 10% formalín nebo pufovaný formalín | 24-48 hodin |
| 20% formalín                        | 12-24 hodin |

□ Příprava řezů

[Parafinové řezy tkání]

Řezy by měly mít velikost 3-6 µm a měly by být umístěny na sklíčka. Pokud je třeba provést další úpravy, jako je regenerace antigenu, tepelně indukované zpětné odhalení epitopů (HIER) nebo úprava trypsinem, měla by být sklíčka potažena lepidlem, jako je 0,02% poly-L-lysin nebo silan pro tkáňové řezy.

#### [Kontrolní sklíčka ]

K interpretaci výsledků barvení je zapotřebí pozitivní kontrolní sklíčko, negativní kontrolní sklíčko a kontrolní sklíčko s činidlem, které se zpracovávají stejným způsobem jako sklíčko s neznámým vzorkem.

- **Pozitivní kontrolní sklíčko**  
Vzorek obsahující cílový antigen, který se zpracovává stejným způsobem jako neznámý vzorek.
- **Negativní kontrolní sklíčko**  
Vzorek neobsahující cílový antigen, který se zpracovává stejným způsobem jako neznámý vzorek.
- **Kontrolní sklíčko s reagentii**  
Kontrolní vzorek se používá a zpracovává stejným způsobem jako testovaný vzorek s tím rozdílem, že místo primární protilátky se použije negativní kontrolní činidlo.

#### □ deparafinizace a rehydratace

1. Ošetření xylenem
  - (1) Ponořte sklíčka do xylenu. Po 3 minutách vyjměte a setřepajte přebytečný xylene ze sklíček.
  - (2) Opakujte dvakrát bod 1.1 s použitím čerstvého xylenu.
2. Ošetření etanolem
  - (1) Ponořte sklíčka do 100% etanolu. Po 3 minutách vyjměte a setřeste přebytečný 100% etanol ze sklíček.
  - (2) Opakujte bod 2.(1) jednou s čerstvým 100% ethanolem.
  - (3) Poté je dvakrát ošetřete 95% etanolem stejným způsobem, jak je popsáno výše.
3. Praní  
Po vytřepání přebytečného etanolu ponořte sklíčka na 5 minut do PBS.

#### □ Postupy barvení

1. Inaktivace endogenní peroxidázy
  - (1) Pečlivě otřete okolí řezů na sklíčkách, abyste odstranili přebytečný roztok.
  - (2) Ponořte je na 10 až 15 minut do 3% roztoku peroxidu vodíku v absolutním metanolu při pokojové teplotě (15 - 25 °C).
  - (3) Opláchněte je v čerstvém PBS třikrát, vždy po dobu 5 minut.
2. Přidání a reakce primární protilátky
  - (1) Pečlivě otřete místa kolem řezů na sklíčkách.
  - (2) Naneste 2 kapky (100  $\mu$ l) primární protilátky na podložní sklíčko vzorku, pozitivní kontrolní sklíčko a negativní kontrolní sklíčko tak, aby byly řezy zcela pokryty.
  - (3) Na kontrolní sklíčko s činidlem naneste místo primární protilátky dvě kapky negativního kontrolního činidla (normální sérum).
  - (4) Inkubujte je při pokojové teplotě nebo při 4 °C. (Postupujte podle pokynů pro údaje o době inkubace uvedené v příbalovém letáku primární protilátky).
  - (5) Třikrát je propláchněte v čerstvém PBS, vždy po dobu 5 minut.
3. Přidání a reakce **N**-Histofine® Simple Stain MAX PO (M) (univerzální imunoperoxidázový polymer, anti-myší).
  - (1) Pečlivě otřete oblasti kolem řezů na sklíčkách.
  - (2) Na každé sklíčko naneste 2 kapky (100  $\mu$ l) přípravku Simple Stain MAX PO (M) tak, aby byly řezy zcela pokryty. Inkubujte při pokojové teplotě (15 - 25 °C) po dobu 30 minut.
  - (3) Opláchněte je v čerstvém PBS třikrát, vždy po dobu 5 minut.
4. Přidání a reakce chromogen/substrátového činidla
  - (1) Pečlivě otřete místa kolem řezů na sklíčkách.
  - (2) Na každé sklíčko naneste 2 kapky (100  $\mu$ l) chromogen/substrátového činidla tak, aby byly řezy zcela pokryty. Inkubujte při pokojové teplotě (15-25 °C) po dobu 5-20 minut.
  - (3) Třikrát je propláchněte v destilované vodě, vždy po dobu 5 minut.
5. Protibarvení
  - (1) Sklíčka ponořte do protibarvicího roztoku..
  - (2) Dobře je omyjte vodou z vodovodu.
6. Montáž  
V případě substrátů rozpustných v alkoholu, jako je AEC, se tkáňové řezy bez dalšího ošetření upevňují pomocí montážního média na vodní bázi. V případě substrátů nerozpustných v alkoholu, jako je DAB, se po promytí vodou, dehydrataci v odstupňovaných sériích alkoholu a vyčištění v xylenu montují s trvalým montážním médiem.

#### □ Interpretace výsledků

##### Mikroskopické vyšetření

Sklíčka se vyšetří světelným mikroskopem, zda je reakce pozitivní. Pro interpretaci výsledků barvení je nutné provést srovnání se třemi typy kontrolních sklíček.

- **Pozitivní kontrolní sklíčko**  
Je pozorováno pozitivní barvení.
- **Negativní kontrolní sklíčko**  
Pozitivní barvení není pozorováno.
- **Kontrolní sklíčko s reagentii**  
Pokud je sklíčko obarvené, je to pravděpodobně způsobeno nespecifickou vazbou bílkovin.

Specifita a citlivost detekce antigenu závisí na použité specifické primární protilátce.

## 7. SKLADOVÁNÍ A TRVANLIVOST

Skladujte při teplotě 2-8 °C. Činidlo je stabilní 18 měsíců po výrobě.

## 8. OBECNÉ OMEZENÍ

(1) Před barvením nechte tato činidla dosáhnout pokojové teploty (15 - 25 °C).

(2) Abyste minimalizovali denaturaci antigenů, nevystavujte tkáň během zpracování teplotě vyšší než 58 °C.

(3) V každém kroku barvení nenechte tkáň vyschnout.

(4) Optimální koncentrace a doba inkubace primárních protilátek by měla být stanovena na základě ověření. V některých případech může být nutné další ředění primárních protilátek, aby se zabránilo nadměrnému barvení.

(5) Pokud řezy obsahují málo endogenní peroxidázy, málo erytrocytů a málo granulocytů, lze inaktivaci endogenní peroxidázy vynechat.

(6) Barvení tkáň závisí na manipulaci a zpracování tkáň před barvením. Nesprávná fixace, zmrazení, rozmrazení, promytí, vysušení, zahřátí nebo provedení řezu může vést k artefaktům nebo falešně negativním výsledkům.

(7) Výsledky nebudou optimální, pokud budou použita stará nebo nepufrovaná fixativa nebo pokud budou při zalévání nebo při upevňování řezů na preparáty nadměrně zahřívána.

(8) Falešně pozitivní výsledky mohou být způsobeny nespecifickou vazbou proteinů. Ačkoli **N**-Histofine® Simple Stain MAX PO (M) nevyžaduje samostatné použití blokujícího činidla, v některých případech může být pro snížení pozadí užitečná aplikace blokujícího činidla obsahujícího irelevantní protein před inkubací s primární protilátkou.

(9) **N**-Histofine® Simple Stain MAX PO (M) je určen pro diagnostiku in vitro. NICHIREI BIOSCIENCES INC., obchodní zástupci a distributoři společnosti NICHIREI BIOSCIENCES nenesou žádnou odpovědnost za **N**-Histofine® Simple Stain MAX PO (M) při použití, které přímo nebo nepřímo porušuje místní předpisy nebo patenty. Společnost NICHIREI BIOSCIENCES ani její obchodní zástupci nenesou odpovědnost za porušení patentů, ke kterému může dojít v důsledku nesprávného použití výrobku.













## 9. ODSTRAŇOVÁNÍ PROBLÉMŮ

tabulka 1

| Problém  | Možná příčina  | Řešení  |
|--|--|---|
| ○ Na pozitivním kontrolním sklíčku a na sklíčku s neznámým vzorkem není žádné barvení nebo je jen slabé. | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Vysušení vzorků během barvení před přidáním činidel.</li> <li>2. Prostředek pro zalévání není vhodný nebo parafin není z parafinových řezů důkladně odstraněn.</li> <li>3. Jakékoli stopové množství azidu sodného přítomného v pufru inaktivuje peroxidázu, což znemožňuje barvení.</li> <li>4. Nedostatečná inkubace enzymu a protilátky.</li> </ol>   | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Použijte zvlhčovací komoru, aby nedošlo k vyschnutí tkáně.</li> <li>2. Zvolte vhodné zalévací činidlo nebo důkladně odstraňte parafin ze zalitých řezů.</li> <li>2. Vyměňte xylen, případně etanol.</li> <li>3. Použijte pufrovací roztok bez azidu sodného.</li> <li>3. Vyměňte pufrovací roztok.</li> <li>4. Vyměňte zastaralý chromogen/substrátové činidlo.</li> <li>4. V každé fázi důkladně odstraňte přebytečný roztok.</li> <li>4. Poskytněte dostatečný čas na reakci s protilátkou. Zejména primární protilátka by měla být inkubována po dobu uvedenou v příbalové informaci.</li> </ol> |
| ○ S klíčko s neznámým vzorkem se neobarví, zatímco pozitivní kontrolní sklíčko se obarví.                | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Antigen je denaturován nebo maskován během procesu fixace nebo zalévání.</li> <li>2. Antigen se rozkládá autolýzou.</li> <li>3. V řezech je přítomno méně antigenu.</li> </ol>   | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Některé antigeny jsou citlivé na fixaci nebo zalití . Použijte proto méně silné fixační činidlo a zkraťte dobu fixace.</li> <li>1. Pro odhalení antigenu je u některých tkání nutná předběžná úprava, jako je například regenerace antigenu, tepelně indukované zpětné odhalení epitopů (HIER) nebo ošetření trypsinem.</li> <li>2. Používejte tkáně získané biopsií nebo chirurgickým zákrokem, kdykoli je to možné.</li> <li>3. Prodlužte inkubační dobu.</li> </ol>  |
| ○ Pozadí jsou na všech diapozitivech intenzivně zbarvená.  | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Endogenní enzymová aktivita nebyla zcela zablokována.</li> <li>2. Zjistí se nespecifické vazebné složení.</li> <li>3. Autolýza vede k nadměrnému množství antigenů izolovaných v histologických roztocích.</li> <li>4. Nedostatečné odstranění parafinu.</li> <li>5. Nedostatečné promytí protilátky.</li> <li>6. Vysoká pokojová teplota urychluje enzymové reakce.</li> <li>7. Vysychání vzorků během barvení po použití činidel.</li> </ol> | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ujistěte se, že postup pro inaktivaci endogenní peroxidázy je správný.</li> <li>2. Před přidáním primární protilátky ošetřete 10% normálním kozím sérem.</li> <li>3. Získejte čerstvé tkáně, kdykoli jsou k dispozici.</li> <li>4. Vyměňte xylen nebo případně etanol.</li> <li>5. Zajistěte důkladné promytí protilátek.</li> <li>6. Udržujte pokojovou teplotu 15 až 25 °C</li> <li>6. Zkrácení reakční doby.</li> <li>7. Nikdy nenechte tkáň vyschnout.</li> </ol>   |
| ○ Během reakce se ze sklíček oddělují části tkáně.   | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Některé antigeny vyžadují tepelně indukovaný postup zpětného získání antigenu nebo prodlouženou dobu reakce s primární protilátkou, což může způsobit, že se řezy snadno odloupnou.</li> </ol>   | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Montujte tkáňové řezy na sklíčka potažená adhezivem, například 0,02% poly-L-lysinem nebo silanem.</li> </ol>  |

## 10. REFERENCE

- (1) Mokřý, et al. Versatility of immunohistochemical reactions: comprehensive survey of detection systems. Acta medica 1996 Apr 39:129-40
- (2) Kaji S, et al. BCAS1-positive immature oligodendrocytes are affected by the  $\alpha$ -synuclein-induced pathology of multiple system atrophy. Acta Neuropathol Commun. 2020 Jul 29;8(1):120.
- (3) Kobayashi S, et al. Image analysis of the nuclear characteristics of emerin protein and the correlation with nuclear grooves and intranuclear cytoplasmic inclusions in lung adenocarcinoma. Oncol Rep. 2019 Jan;41(1):133-142.
- (4) Kudo I, et al. Particular gene upregulation and p53 heterogeneous expression in TP53-mutated maxillary carcinoma. Oncol Lett. 2017 Oct;14(4):4633-4640.
- (5) Shimura T, et al. MIB-1 labeling index, Ki-67, is an indicator of invasive intraductal papillary mucinous neoplasm. Mol Clin Oncol. 2016 Aug;5(2):317-322.
- (6) Ishiwata T, et al. Enhanced expression of fibroblast growth factor receptor 2 IIIc promotes human pancreatic cancer cell proliferation. Am J Pathol. 2012 May;180(5):1928-41.
- (7) Tsuji S, et al. Secretion of intelectin-1 from malignant pleural mesothelioma into pleural effusion. Br J Cancer. 2010 Aug 10;103(4):517-23.
- (8) Tanioka Y, et al. Matrix metalloproteinase-7 and matrix metalloproteinase-9 are associated with unfavourable prognosis in superficial oesophageal cancer. Br J Cancer. 2003 Dec 1;89(11):2116-21.

|   |  |  |
|---|--|--|
|  <b>REF</b> Katologové číslo         |  Omezení teploty                              |  <b>IVD</b> Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro     |
|  Výrobce                             |  <b>LOT</b> Šarže                             |  Obsah postačuje pro <N> testů                                |
|  Použit do data                      |  Návod k použití                              |  <b>EC REP</b> Zplnomocněný zástupce v Evropském společenství |
|  Označení CE, kód notifikované osoby |  Pouze pro hodnocení funkční způsobilosti IVD |  <b>SAMPLE</b> Vzorek   |



**NICHIREI BIOSCIENCES INC.**  
6-19-20, Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-8402, JAPAN  
Phone:81-3-3248-2208, Facsimile:81-3-3248-2243



MedEnvoy Global B.V.  
Prinses Margrietplantsoen 33-Suite 123  
2595 AM The Hague  
The Netherlands