BioGenex
49026 Milmont Drive,
Fremont, CA 94538
Tel : +1 (800) 421-4149,
Fax: +1 (510) 824-1490,
support@biogenex.com

EC REP
Emergo Europe,
Molenstraat 15
NL-2513 BH The Hague,
The Netherlands
Tel: (+31) 70-345-8570
Fax: (+31) 70-346-7299

SUBSTRATE PACKS

Doc. No. 932-HK092E-4 Rev. No. J
Release Date: 06-October, 2011

ENGLISH

Intended Use
Substrate packs are intended for in vitro diagnostic use as chromogens for detection of specific antigen-antibody reactions in immunohistochemistry (IHC) and in situ hybridization (ISH).

Summary and Explanation
BioGenex provides several substrate pack options both for manual and automated systems for in situ detection using alkaline phospahatase and peroxidase enzymes. The kits are designed to reduce substrate incubation times and minimize exposure to chemical hazards. These substrate packs allow microscopic visualization of different cellular components depending on the marker used either by in situ hybridization (ISH) or immunohistochemistry (IHC).

Principles of the Procedure
The demonstration of targets of interest in tissues and cells by immunostaining is a two-step process involving first, the binding of a primary antibody to the antigen of interest, and second, the detection and visualization of bound antibody by one of a variety of enzyme based chromogenic systems. The type of chromogenic substrate depends upon the type of enzyme used, e.g. AEC and DAB can be used with Horseradish Peroxidase; Fast Red can be used with Alkaline Phosphatase; Levamisole can be used with alkaline phosphatase substrate in the place of peroxide block to block endogenous phosphatase staining. In situ hybridization involves binding of specific nucleic acid probe that is labeled with an hapten. The label is subsequently detected using a primary antibody to the label followed by detection and visualization as above.
DAB (diaminobenzidine) substrate offers the greatest sensitivity of all the Horseradish Peroxidase colorimetric chromogens. The insoluble, permanent brown precipitate has a high-contrast in photographs. In addition, the sensitivity can be enhanced by carrying out the reaction in the presence of nickel or cobalt chloride and/or by examining slides by reflection interference microscopy (10-100x sensitivity).
AEC (aminoethyl carbazole) is a colorimetric substrate for Horseradish Peroxidase. The bright brick-red reaction product is insoluble in water, but soluble in alcohol and xylene. The AEC substrate is suitable for immunohistochemistry (IHC), in situ hybridization (ISH), and membrane blotting applications. For IHC and ISH, the AEC substrate is compatible with aqueous mounting media.
Fast Red (4-chloro-2-methyl-benzenediazonium salt) is a substrate for Alkaline Phosphatase and offers high sensitivity for light microscopic observations. The bright red dye precipitate produces maximal contrast with blue counterstains and reproduces well by color photomicrography. The reaction product is insoluble in water, but soluble in organic solvents like alcohol and xylene.The dye precipitate is inherently fluorescent and sections can be examined by fluorescence microscopy, which results in a 5x increase in signal-to-noise ratio. Fluorescence emission of Fast Red precipitate is 540-590nm with a peak at 562nm. Excitation max is observed at 550nm. Visualization by fluorescence microscopy can be performed with the rhodamine, fluorescein or AMCA filter systems. The fluorescence is very stable and is not subject to photobleaching.

New Fuchsin
New Fuchsin, also known as Magenta III, produces an intense red/fuschia precipitate in the presence of alkaline phoshatase. It is not soluble in xylenes and alcohols, therefore it may be permanently mounted.

Reagents Provided

Catalog No.	Substrate Packs	Format
HK092-5KE	AEC SUBSTRATE PACK KIT	250 slides
HK129-5KE	AEC SUBSTRATE PACK KIT, CONC	2500 slides
HK130-5KE	LIQUID DAB SUBSTRATE PACK KIT	250 slides
HK542-XAK	2- COMPONENT DAB PACK	1000 slides
HK153-5KE	LIQUID DAB SUBSTRATE PACK KIT	2000 slides
HK182-5KE	FAST RED SUBSTRATE PACK KIT	500 slides
HK183-5KE	NEW FUCHSIN SUBSTRATE PACK KIT	400 slides

Reagents Required but Not Supplied
All reagents required for IHC and ISH are not provided. See antibody and detection kit datasheet for complete set of reagents required for immunohistochemistry (IHC) or in situ hybridization (ISH) procedures.

Storage and Handling
Store all reagents at 2-8°C. Do not use after expiration dates as indicated on the reagent labels.

Precautions
HK092-5KE, HK129-5KE, HK542-XAKE: Rep 2;R61. Xn;R20/21. Xi;R36 = May cause harm to the unborn child.Harmful by inhalation and in contact with skin.Irritating to eyes. S25 S26 S38 S45 S53 S36/37/39 S60 P11 = Avoid contact with eyes.In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.In case of insufficient ventilation, wear suitable respiratory equipment.In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show the label where possible).Avoid exposure - obtain special instructions before use.Wear suitable protective clothing, gloves and eye/face protection.This material and its container must be disposed of as hazardous waste.

HK183-5KE: T;R23-25. C;R35. Xi;R37 = Toxic by inhalation.Toxic in contact with skin.Causes severe burns.Irritating to respiratory system. S26 S38 S45 S24/25 S36/37/39 S60 = In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.In case of insufficient ventilation, wear suitable respiratory equipment.In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show the label where possible).Avoid contact with skin and eyes.Wear suitable protective clothing, gloves and eye/face protection.This material and its container must be disposed of as hazardous waste.

Staining Protocol
Refer to detection system manual for relevant staining protocols.

Preparation of Substrates and Chromogens
For Horseradish Peroxidase Kits:
AEC Kits: Prepare substrate solution by adding 1 drop of chromogen (AEC) to 1 vial (2.5 ml) of substrate and mix well. Each 2.5 ml of working solution is sufficient for up to 20 slides. This solution remains stable at room temperature (20-26°C) up to 5 hours.
DAB Kits: (HK130-5KE, HK153-5KE) Add 2 drops of Liquid DAB Chromogen to one vial of 2.5 ml ready-to-use Substrate Buffer. Then add 1 drop of Hydrogen Peroxide (H2O2) Substrate solution, cap the vial, and mix. This solution remains stable at room temperature (20-26°C) up to 6 hours.
DAB Kits: (HK542-XAKE) Add 1 drop (~38ul) of Liquid DAB Chromogen to 1 ml ready-to-use Substrate Buffer. This solution remains stable at room temperature (20-26°C) up to 6 hours.
For Alkaline Phosphatase Kits: Add 1 tablet of Fast Red chromogen to 1 vial (5 ml) of substrate (naphthol phosphate). Shake well until dissolved. This solution remains stable at room temperature (20-26°C) up to 8 hours. Optional: levamisole (not included) may be added to the Fast Red chromogen to reduce background staining. It serves as an inhibitor of endogenous alkaline phosphatase in most tissues.
For New Fuchsin Kits: Combine 50 µl (1drop) of New Fuchsin Chromogen Solution and 50µl (1 drop) of New Fuchsin Activator Solution in the bottom of the mixing vial. This is a critical step for successful color development. Mix reagents thoroughly by repeated gentle pipetting. Empty contents of one vial of Tris Buffer into Chromogen-Activator mixture prepared above and mix well. Add 400 µl (8 drops) of Substrate Solution to the solution prepared above, and mix well. NOTE: If endogenous alkaline phosphatase is suspected, add levamisole (HK113-5K) at a concentration of 0.6 mg/ml to the Substrate at this time to inhibit the alkaline phosphatase activity. Prepare fresh substrate immediately prior to use.

Procedure for application of substrate solution:
Refer to the antibody and detection kit datasheets for complete staining protocols and washing steps. User should follow BioGenex recommendations and validate any other conditions.

Substrate	BioGenex Recommendations
DAB	5-10 minutes at room temperature
AEC	5-10 minutes at room temperature
Fast Red	15-20 minutes at room temperature
New Fuchsin	15-40 minutes at room temperature

One may choose to monitor the positive control slide (the desired antibody versus the known positive tissue) under the microscope until acceptable color intensity has been reached. Rinse well with deionized water or rinse buffer.

Quality Control
Refer to the appropriate detection system package inserts for guidance on general quality control procedures.

Trouble shooting
Refer to the troubleshooting section in the package inserts of BioGenex Super Sensitive Detection Systems (or other equivalent detection systems) for remedial actions on detection system related issues, or contact BioGenex Technical Service Department at (925) 275-0550 to report unusual staining.

Expected Results
Staining using the IHC and ISH systems should result in deposition of colored chromogen pigment at the site of specific interaction with minimal to no non-specific background.
For AEC Kits: AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) forms a brick red end product.
For DAB Kits: DAB (3,3'-diaminobenzidine) forms a brownish end product.
For Alkaline Phosphatase Kits: Naphthol Phosphate/Fast Red forms an intense red color.
For New Fuchsin Kits: New Fuchsin produces an intense red/fuschia precipitate.

Limitations of the procedure
Super Sensitive™ Detection kits demonstrate antigens that survive tissue fixation, embedding and sectioning. Correct treatment of tissues prior to fixation and embedding, while less critical for BioGenex Super Sensitive™ Reagents, is still important for obtaining optimal results. Inconsistent results may be due to variation in fixation and embedding methods employed by different laboratories, as well as from inherent variations in tissue. The results from immunostaining must be correlated with other laboratory findings and the relevant controls. An internal tissue processing control (e.g. vimentin) may be used to reveal errors in tissue processing. Use of BioGenex Antigen Retrieval pretreatment technique may permit recovery of antigenicity in formalin-fixed tissue. Please call BioGenex for more information on these products and their use in the standardization of immunostaining results.
The clinical interpretation of any positive staining or its absence should be evaluated within the context of clinical presentation, morphology and other histopathological criteria. The clinical interpretation of any positive staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper positive and negative internal and external controls as well as other diagnostic tests. It is the responsibility of a qualified pathologist who is familiar with the proper use of IHC antibodies, reagents and methods to interpret the stained preparation. Staining is to be performed in a certified licensed laboratory under the supervision of a pathologist who is responsible for reviewing the stained slides and assuring the adequacy of positive and negative controls.
Tissues from persons infected with hepatitis B virus and containing hepatitis B surface antigen (HBsAg) may exhibit nonspecific staining with horseradish peroxidase. (Omata, et al. 1980)
Normal/ non-immune sera from the same animal source as secondary antisera used in blocking steps may cause false-negative or false-positive results due to autoantibodies or natural antibodies.
False-positive results may be seen due to non-immunological binding of proteins or substrate reaction products. They may also be caused by pseudoperoxidase activity (erythrocytes), endogenous peroxidase activity (cytochrome C), or endogenous biotin (e.g., liver, breast, brain, kidney) depending on the type of immunostain used. (Nadji & Morales, 1983)

Performance Characteristics
BioGenex has conducted studies to evaluate the performance of all its substrate packs using several BioGenex IHC and ISH assays. BioGenex substrate packs have shown reproducible and consistent results when used within a single run, between runs, between lots and wherever applicable between manual and automated runs. The products have been determined to be stable for the periods specified on the labels either by standard real time or accelerated testing methods. BioGenex ensures product quality through 100% quality control for all products released and through surveillance programs.

ITALIANO, ITALIAN

Uso previsto
Le unità di substrato sono destinate all'uso diagnostico in vitro come cromogeni per il rilevamento di reazioni specifiche antigeni-anticorpi nell'ambito dell'immunoistochimica (ICH) e dell'ibridizzazione in situ (ISH).

Riassunto e spiegazione
BioGenex fornisce parecchie opzioni di unità di substrati per sistemi sia manuali che automatizzati per il rilevamento in situ utilizzando enzimi di fosfatasi alcalina e di perossidasi. I kit sono progettati per ridurre i tempi di incubazione del substrato e per minimizzare l'esposizione a pericoli chimici. Queste unità di substrato consentono la visualizzazione al microscopio di diverse componenti cellulari a seconda del marker utilizzato o con l'ibridizzazione in situ (ISH) o con l'immunoistochimica (IHC).

Principi della procedura
La dimostrazione degli obiettivi mirati in tessuti e cellule mediante immunocolorazione è un processo in due fasi: la prima è il legame tra un anticorpo primario e l'antigene d'interesse e la seconda è il rilevamento e la visualizzazione dell'antigene legato ad opera di uno tra tanti sistemi cromogenici a base di enzimi. Il tipo di substrato cromogenico dipende dal tipo di enzima utilizzato, ad esempio con Horseradish Peroxidase (perossidasi di radici di rafano) si possono utilizzare AEC e DAB; con Alkaline Phosphatase (fosfatasi alcalina) si può utilizzare il Fast Red; il Levamisole può essere utilizzato con substrato di fosfatasi alcalina in luogo del blocco di perossidasi per bloccare la colorazione della fosfatasi endogena. L'ibridizzazione in situ comporta il legame di una specifica sonda di acido nucleico marcata con un aptene. Il label è rilevato successivamente utilizzando un anticorpo primario per il label e seguito da rilevamento e visualizzazione come descritto in precedenza.
Il substrato di DAB (diaminobenzidina) offre la massima sensibilità fra tutti i cromogeni utilizzati per le tecniche colorimetriche basate sulla Horseradish Peroxidase. Il precipitato permanente di colore marrone, insolubile, rivela un contrasto elevato nelle fotografie. Inoltre, è possibile accrescere la sensibilità eseguendo la reazione in presenza di nichel o di cloruro di cobalto e/o esaminando i vetrini mediante microscopio a interferenza (sensibilità di 10-100x).
L'AEC (aminoetil carbazolo) è un substrato colorimetrico per la Horseradish Peroxidase. Il prodotto di questa reazione color rosso brillante è insolubile in acqua, ma solubile in alcool e xilene. Il substrato di AEC è adatto ad applicazioni di immunoistochimica (IHC), ibridizzazione in situ (ISH) e blotting su membrana. Per IHC e ISH, il substrato di AEC è compatibile con mezzi di montaggio acquosi.
Il Fast Red (cloruro di benzene diazonio) è un substrato per la Alkaline Phosphatase e offre un'elevata sensibilità per le osservazioni al microscopio luminoso. Il precipitato color rosso brillante produce il massimo contrasto con le colorazioni blu e si riproduce bene con la fotomicrografia a colori. Il prodotto di reazione è insolubile in acqua, ma solubile in solventi organici quali alcool e xilene. Il precipitato secco è quindi opportunamente fluorescente e le sezioni di tessuto possono essere esaminate con microscopio a fluorescenza, comportando un incremento di 5x nel rapporto segnale/rumore. L'emissione a fluorescenza del precipitato di Fast Red è di 540-590 nm con un picco a 562 nm. L'eccitazione massima è osservata a 550 nm. La visualizzazione con microscopio a fluorescenza può essere eseguita con i sistemi che utilizzano rodamina, fluorosceina o filtri AMCA. La fluorescenza è molto stabile e non è soggetta a fotodecadimento.

New Fuchsin
Il New Fuchsin, conosciuto anche con il nome di Magenta III, produce un intenso precipitato rosso/fucsia in presenza di fosfatasi alcalina. Non è solubile in xileni e alcool, pertanto non può essere preparato in modo permanente.

Reagenti forniti

N. di catalogo	nità di substrato	Formato
HK092-5KE	AEC SUBSTRATE PACK KIT	250 slides
HK129-5KE	AEC SUBSTRATE PACK KIT, CONC	2500 slides
HK130-5KE	LIQUID DAB SUBSTRATE PACK KIT	250 slides
HK542-XAK	2- COMPONENT DAB PACK	1000 slides
HK153-5KE	LIQUID DAB SUBSTRATE PACK KIT	2000 slides
HK182-5KE	FAST RED SUBSTRATE PACK KIT	500 slides
HK183-5KE	NEW FUCHSIN SUBSTRATE PACK KIT	400 slides

Reagenti necessari, ma non forniti
Tutti i reagenti richiesti per IHC e ISH non sono forniti. Consultare le schede tecniche degli anticorpi e dei kit di rivelazione per conoscere la serie completa dei reagenti necessari per le procedure di immunoistochimica (IHC) o di ibridizzazione in situ (ISH).

Conservazione e manipolazione
Conservare tutti i reagenti a 2-8 °C. Non utilizzare dopo la data di scadenza impressa sull'etichetta dei diversi reagenti.

Precauzioni
HK092-5KE, HK129-5KE, HK542-XAKE: Rep 2;R61. Xn;R20/21. Xi;R36 = Può danneggiare i bambini non ancora nati.Nocivo per inalazione e contatto con la pelle.Irritante per gli occhi.
S25 S26 S38 S45 S53 S36/37/39 S60 P11 = Evitare il contatto con gli occhi.In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare un medico.In caso di ventilazione insufficiente, usare un apparecchio respiratorio adatto.In caso di incidente o di malessere consultare immediatamente il medico (se possibile, mostrargli l'etichetta).Evitare l'esposizione - procurarsi speciali istruzioni prima dell'uso.Usare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi/la faccia.Questo materiale e il suo contenitore devono essere smaltiti come rifiuti pericolosi.

HK183-5KE: T;R23-25. C;R35. Xi;R37 = Tossico per inalazione.Tossico a contatto con la pelle.Provoca gravi ustioni.Irritante per le vie respiratorie.
S26 S38 S45 S24/25 S36/37/39 S60 = In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare un medico.In caso di ventilazione insufficiente, usare un apparecchio respiratorio adatto.In caso di incidente o di malessere consultare immediatamente il medico (se possibile, mostrargli l'etichetta).Evitare il contatto con gli occhi e con la pelle.Usare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi/la faccia.Questo materiale e il suo contenitore devono essere smaltiti come rifiuti pericolosi.

Protocollo di colorazione
Fare riferimento al manuale del sistema manuale riguardante i protocolli di colorazione.

Preparazione di substrati e cromogeni
Per i kit di Horseradish Peroxidase
Kit AEC: Preparare la soluzione per il substrato aggiungendo 1 goccia di cromogeno (AEC) in 1 fiala (2,5 ml) di substrato e mescolare bene. Ogni soluzione di lavoro da 2,5 ml è sufficiente per 20 vetrini. Questa soluzione resta stabile a temperatura ambiente (20-26 °C) fino a 5 ore oppure per una settimana se tenuta refrigerata a 4 °C.
Kit DAB: (HK130-5KE, HK153-5KE) Aggiungere 2 gocce di Liquid DAB Chromogen a una fiala da 2,5 ml di Substrate Buffer pronto per l'uso. Aggiungere quindi 1 goccia di soluzione di Hydrogen Peroxide (H2O2) Substrate, chiudere la fiala e miscelare. Questa soluzione resta stabile a temperatura ambiente (20-26 °C) fino a 6 ore.
DAB Kits: (HK542-XAKE) Una goccia (1 goccia ~38µl) di DAB chromogen (HK124) viene mescolata con 1 ml di Substrate Buffer (HK520). Questa soluzione resta stabile a temperatura ambiente (20-26 °C) fino a 6 ore.
Per i kit di Alkaline Phosphatase Aggiungere 1 tavoletta di Fast Red Chromogen a 1 fiala (5 ml) di substrato (fosfato naftolo). Scuotere bene fino a scioglimento. Questa soluzione resta stabile a temperatura ambiente (20-26 °C) fino a 8 ore. Opzionale: il Levamisole (non incluso) può essere aggiunto al Fast Red Chromogen per ridurre la colorazione di fondo. Serve da inibitore competitivo di fosfatasi alcalina endogena nella maggior parte dei tessuti.

Per kit di New Fuchsin
Unire 50 µl (1 goccia) di New Fuchsin Chromogen Solution e 50µl (1 goccia) di New Fuchsin Activator Solution nel fondo della fiala da miscelazione. Si tratta di una fase importante per l'opportuno sviluppo del colore. Miscelare a fondo i reagenti con ripetuti pipettamenti. Versare il contenuto di una fiala di Tris Buffer nella miscela di Chromogen-Activator preparata in precedenza e mescolare bene. Aggiungere 400 µl (8 gocce) di Substrate Solution alla soluzione preparata in precedenza e mescolare bene. NOTA: se si sospetta una fosfatasi aggiungere Levamisole (HK113-5K) al substrato a una concentrazione di 0,6 mg/ml in questo momento al fine di inibire l'attività della fosfatasi alcalina. Preparare il substrato fresco immediatamente prima dell'uso.

Procedura per l'applicazione della soluzione substrato
Consultare le schede tecniche degli anticorpi e dei kit di rivelazione per conoscere nei dettagli i protocolli di colorazione e le fasi di lavaggio. L'utilizzatore è tenuto a seguire le raccomandazioni fornite da BioGenex e a convalidare qualsiasi altra condizione applicata.

Substrato	Raccomandazioni BioGenex
DAB	5-10 minuti a temperatura ambiente
AEC	5-10 minuti a temperatura ambiente
Fast Red	15-20 minuti a temperatura ambiente
New Fuchsin	15-40 minuti a temperatura ambiente

Si può scegliere di monitorare al microscopio il vetrino di controllo positivo (l'anticorpo desiderato vs il tessuto riconosciuto positivo) fino al raggiungimento dell'intensità desiderata di colore. Risciacquare bene con acqua deionizzata o soluzione tampone di risciacquo.

Controllo qualità
Consultare il foglietto illustrativo del sistema di rivelazione utilizzato per istruzioni sulle procedure generali di controllo qualità.

Risoluzione dei problemi
Consultare la sezione "Risoluzione dei problemi" dei foglietti illustrativi dei BioGenex Super Sensitive Detection Systems (o di sistemi di rivelazione equivalenti) per azioni correttive su questioni relative ai sistemi di rivelazione, oppure rivolgersi all'assistenza tecnica BioGenex, al numero 800 421 4149 per riferire casi di colorazione inconsueta.

Risultati attesi
La colorazione con le tecniche di IHC e ISH dovrebbe avere come risultato il deposito del pigmento cromogeno nel sito di interazione specifica, con un fondo minimo o aspecifico.
Per i kit AEC: l'AEC (3-amino-9-etilcarbazolo) genera un prodotto finale rosso mattone.
Per i kit DAB: il DAB (3,3'-diaminobenzidina) genera un prodotto finale di colore bruno.
Per i kit di Alkaline Phosphatase: il fosfato naftolo/Fast Red produce un colore rosso intenso.
Per i kit di New Fuchsin: il New Fuchsin produce un precipitato di colore rosso/fucsia intenso.

Limiti della procedura
I kit Super Sensitive™ Detection servono per la dimostrazione di antigeni che sopravvivono alla fissazione, all'inclusione e al sezionamento del tessuto. Il trattamento corretto dei tessuti, prima della fissazione e dell'inclusione, sebbene sia meno determinante per i reagenti BioGenex Super Sensitive™, resta importante per ottenere risultati ottimali. Risultati incoerenti possono dipendere da variazioni nei metodi di fissazione e di inclusione adottati nei diversi laboratori, oltre che da variazioni insite nel tessuto. I risultati dell'immunocolorazione devono essere correlati ad altre risultanze di laboratorio e ai rispettivi controlli. È possibile utilizzare un controllo interno dell'elaborazione del tessuto (per esempio, la vimentina) per rivelare errori nell'elaborazione del tessuto. L'uso della tecnica di pretrattamento BioGenex Antigen Retrieval può consentire il recupero dell'antigenicità nel tessuto fissato in formalina. Rivolgersi a BioGenex per maggiori informazioni su questi prodotti e sul loro uso per standardizzare i risultati dell'immunocolorazione.
L'interpretazione clinica di una qualsiasi colorazione positiva, o della sua assenza, deve essere valutata nel contesto della presentazione clinica, della morfologia e di altri criteri istopatologici. L'interpretazione clinica di una qualsiasi colorazione positiva, o della sua assenza, dovrebbe essere completata con studi sulle alterazioni morfologiche utilizzando controlli interni ed esterni positivi e negativi, come pure altri esami diagnostici. È responsabilità di un patologo qualificato, che abbia familiarità con l'uso corretto di anticorpi, reagenti e metodi IHC, interpretare la preparazione colorata. La colorazione deve essere eseguita in un laboratorio autorizzato certificato, sotto la supervisione di un patologo che sia responsabile del riesame dei vetrini colorati e che garantisca l'idoneità dei controlli positivi e negativi.
I tessuti di pazienti infettati dal virus dell'epatite B, contenenti l'antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg), potrebbero mostrare una colorazione aspecifica con Horseradish Peroxidase (Omata, et al. 1980).
Sieri normali/non immuni della stessa fonte animale degli antisieri secondari utilizzati nelle fasi di blocco potrebbero causare risultati falsi negativi o falsi positivi, a causa degli auto-anticorpi o degli anticorpi naturali.
Si possono riscontrare risultati falsi positivi a causa di un legame non immunologico delle proteine o dei prodotti di reazione del substrato. Essi possono essere dovuti anche all'attività della pseudoperossidasi (eritrociti), all'attività della perossidasi endogena (citocromo C) o alla biotina endogena (ad esempio, fegato, seno, cervello, reni), in funzione del tipo di immunocolorazione utilizzata (Nadji & Morales, 1983).
Caratteristiche funzionali
BioGenex ha condotto diversi studi per valutare l'efficacia di tutte le sue unità di substrato, utilizzando diversi dosaggi di IHC e ISH BioGenex. Le unità di substrato Biogenex hanno dimostrato risultati riproducibili e coerenti, quando sono stati utilizzati nell'ambito di un singolo ciclo, tra più cicli e tra più lotti, nonché quando sono risultati applicabili tra cicli automatici e cicli manuali. Si è potuto determinare che tali prodotti rimangono stabili per i periodi indicati sulle relative etichette, sia secondo il tempo reale standard sia in base a metodi di test accelerati. BioGenex assicura la qualità del prodotto grazie a un controllo qualità al 100% su tutti i prodotti forniti e grazie a programmi di sorveglianza.

DEUTSCH, GERMAN

Verwendungszweck
Substrat-Packs dienen zur Verwendung in der In-vitro-Diagnostik als Chromogene zum Nachweis spezifischer Antigen-Antikörper-Reaktionen in der Immunohistochemie (IHC) und der In-situ-Hybridisierung (ISH).

Zusammenfassung und Erklärung
BioGenex bietet eine Reihe von Substrat-Pack-Optionen an, sowohl für manuelle als auch für automatische Systeme zum In-situ-Nachweis unter Verwendung von Alkaline-Phosphatase und Peroxidase-Enzymen. Die Kits sind auf reduzierte Substratinkubationszeiten hin entwickelt worden, sowie zur Verminderung der chemischen Risiken. Diese Substrat-Packs erlauben eine mikroskopische Visualisierung der unterschiedlichen Zellkomponenten, in Abhängigkeit vom verwendeten Marker bei der In-situ-Hybridisierung(ISH) oder Immunohistochemie (IHC).

Prinzipien des Verfahrens
Der Nachweis von Zielgebieten in Geweben und Zellen durch Immunohistochemie ist ein zweistufiges Verfahren, zu dem erstens die Bindung eines primären Antikörpers an das in Frage kommende Antigen und

zweitens der Nachweis und die Visualisierung des gebundenen Antikörpers durch verschiedene Enzym-basierte Chromogensysteme gehören. Der Typ des chromogenen Substrats hängt vom Typ des verwendeten Enzyms ab; z.B. AEC und DAB können mit Horseradish Peroxidase verwendet werden; Fast Red kann mit Alkaline Phosphatase eingesetzt werden; Levamisole kann mit Alkaline Phosphatase Substrate anstelle von Peroxide Block verwendet werden, um die endogene Phosphatase-Färbung zu blockieren. Die In-situ-Hybridisierung impliziert eine Bindung der spezifischen Nukleinsäureprobe, die mit einem Hapten markiert ist. Die Markierung wird nachträglich nachgewiesen, indem ein primärer Antikörper bei der Markierung verwendet wird, gefolgt vom Nachweis und der Visualisierung, wie oben angegeben.
DAB (Diaminobenzidin) Substrate bietet die höchste Empfindlichkeit aller kolorimetrischen Horseradish Peroxidase-Chromogene. Das unlösliche, dauerhaft braune Präzipitat besitzt einen hohen Kontrast auf Fotografien. Darüber hinaus kann die Empfindlichkeit verstärkt werden, wenn die Reaktion in Anwesenheit von Nickel- oder Kobaltchlorid durchgeführt wird und/oder die Objektträger durch Reflexionsinterferenzmikroskopie untersucht werden (10ñ100fache Empfindlichkeit).
AEC (Aminoethyl-Carbazol) ist ein kolorimetrisches Substrat für Horseradish Peroxidase. Das leuchtend ziegelrote Reaktionsprodukt ist unlöslich in Wasser, jedoch löslich in Alkohol und Xylen. Das AEC Substrate eignet sich für Immunohistochemie (IHC), In-situ-Hybridisierung (ISH) und Membran-Blotting-Anwendungen. Für IHC und ISH ist AEC Substrate kompatibel mit wässrigen Fixiermedien.
Fast Red (4-Chloro-2-Methyl-Benzendiazoniumsalz) ist ein Substrat für Alkaline Phosphatase und bietet hohe Empfindlichkeit für lichtmikroskopische Untersuchungen. Das hellrote Farbstoffpräzipitat ergibt maximalen Kontrast mit blauen Gegenfärbungen und ist in Farb-Photomikrographien gut reproduzierbar. Das Reaktionsprodukt ist in Wasser nicht löslich, aber in organischen Lösungsmitteln wie Alkohol und Xylen löslich. Das Farbstoffpräzipitat ist inhärent fluoreszierend, und Schnitte können mit Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden, woraus eine fünffache Erhöhung des Signal-Rausch-Verhältnisses resultiert. Die Fluoreszenzemission von Fast Red-Präzipitat beträgt 540–590 nm mit einem Peak bei 562 nm. Die maximale Anregung liegt bei 550 nm Eine Visualisierung mit Hilfe der Fluoreszenz-Mikroskopie kann mit Rhodamin, Fluoreszein oder AMCA Filtersystemen durchgeführt werden. Die Fluoreszenz ist sehr stabil und wird nicht durch Fotobleichen beeinträchtigt.

New Fuchsin
New Fuchsin, auch unter dem Namen Magenta III bekannt, produziert ein Präzipitat von intensivem Rot/Fuchsia, im Beisein von Alkaline Phosphatase. Es ist in Xylenen oder Alkohol nicht löslich und kann dementsprechend permanent fixiert werden.

Mitgelieferte Reagenzien

Katalognr.	Substrat-Packs	Format
HK092-5KE	AEC SUBSTRATE PACK KIT	250 slides
HK129-5KE	AEC SUBSTRATE PACK KIT, CONC	2500 slides
HK130-5KE	LIQUID DAB SUBSTRATE PACK KIT	250 slides
HK542-XAK	2- COMPONENT DAB PACK	1000 slides
HK153-5KE	LIQUID DAB SUBSTRATE PACK KIT	2000 slides
HK182-5KE	FAST RED SUBSTRATE PACK KIT	500 slides
HK183-5KE	NEW FUCHSIN SUBSTRATE PACK KIT	400 slides

Benötigte Materialien (nicht im Lieferumfang)
Alle für IHC und ISH erforderlichen Reagenzien werden nicht mitgeliefert. In den Datenblättern der Antikörper und Nachweiskits sind die vollständigen Reagenzien angegeben, die für Verfahren der Immunohistochemie (IHC) oder In-situ-Hybridisierung (ISH) benötigt werden.

Lagerung und Handhabung
Alle Reagenzien bei 2–8 °C lagern. Nicht nach dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.

Vorsichtsmaßnahmen
HK092-5KE, HK129-5KE,HK542-XAKE: Rep 2;R61. Xn;R20/21. Xi;R36 = Kann das Kind im Mutterleib schädigen.Gesundheitsschädlich beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut.Reizt die Augen. S25 S26 S38 S45 S53 S36/37/39 S60 P11 = Berührung mit den Augen vermeiden.Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.Bei unzureichender Belüftung Atemschutzgerät anlegen.Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen).Exposition vermeiden - vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.Dieses Produkt und sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen.
HK183-5KE: T;R23-25. C;R35. Xi;R37 = Giftig beim Einatmen.Giftig bei Berührung mit der Haut.Verursacht schwere Verätzungen.Reizt die Atmungsorgane. S26 S38 S45 S24/25 S36/37/39 S60 = Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.Bei unzureichender Belüftung Atemschutzgerät anlegen.Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen).Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden.Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.Dieses Produkt und sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen.

Färbeprotokoll
Siehe Benutzerhandbuch des Nachweissystems für die jeweils relevanten Färbeprotokolle.

Vorbereitung von Substraten und Chromogenen
Für Horseradish Peroxidase Kits:
AEC Kits: Die Substratlösung durch Hinzufügen von 1 Tropfen Chromogen (AEC) in 1 Röhrchen (2,5 ml) Substrat präparieren und gründlich vermischen. 2,5 ml der Arbeitslösung sind ausreichend für bis zu 20 Objektträger. Die AEC-Arbeitslösung ist bis zu 5 Stunden stabil bei 20-26 °C.
DAB Kits: (HK130-5KE, HK153-5KE) 2 Tropfen Liquid DAB Chromogen in ein Röhrchen mit 2,5 ml gebrauchsfertigem Substrate Buffer geben. Dann 1 Tropfen Hydrogen Peroxide (H2O2) Substrate-Lösung hinzufügen, das Röhrchen verschließen und den Inhalt vermischen. Die Lösung bleibt bei Zimmertemperatur (20–26°C) bis zu 6 Stunden stabil.
DAB Kits: (HK542-XAKE) Ein Tropfen (1 Tropfen ~38 µl) DAB Chromogen (HK124) wird mit 1 ml Substratpuffer (HHK520) vermischt. Die Lösung bleibt bei Zimmertemperatur (20–26°C) bis zu 6 Stunden stabil.

Für Alkaline Phosphatase Kits:
1 Tablette Fast Red Chromogen in 1 Röhrchen (5 ml) Substrat (Naphtolphosphat) geben. Bis zur vollständigen Auflösung gut schütteln. Die Lösung bleibt bei Zimmertemperatur (20–26 °C) bis zu 8 Stunden stabil. Wahlweise: Levamisole (nicht im Lieferumfang) kann dem Fast Red-Chromogen beigefügt werden, um eine Hintergrundfärbung zu reduzieren. Es wirkt als Inhibitor der endogenen Alkaline Phosphatase in den meisten Geweben.

Für New Fuchsin Kits:
50 µl (1 Tropfen) der New Fuchsin Chromogen Solution und 50 µl (1 Tropfen) der New Fuchsin Activator Solution am Boden des Mischröhrchens vermischen. Dies ist ein kritischer Schritt für eine erfolgreiche Farbentwicklung. Die Reagenzien gründlich durch wiederholtes vorsichtiges Pipettieren vermischen. Den Inhalt eines Röhrchens Tris Buffer in die vorhin präparierte Chromogen-Activator-Mischung geben und gründlich vermischen. 400 µl (8 Tropfen) Substrate Solution zu der so erhaltenen Lösung hinzufügen und gründlich vermischen. HINWEIS: Beim Verdacht auf endogene Alkaline Phosphatase zu diesem Zeitpunkt Levamisole (HK113-5K) mit einer Konzentration von 0,6 mg/ml zum Substrat hinzugeben, um die Aktivität der Alkaline Phosphatase zu hemmen. Frisches Substrat unmittelbar vor seiner Verwendung präparieren.
Vorgehensweise beim Anwenden der Substratlösung:
Für vollständige Färbeprotokolle und Wasch-Schritte siehe Datenblätter der Antikörper und Nachweiskits. Der Anwender sollte die Empfehlungen von BioGenex befolgen und jegliche anderen Bedingungen bestätigen.

Substrat	BioGenex Empfehlungen
DAB	5–10 Minuten, Zimmertemperatur
AEC	5–10 Minuten, Zimmertemperatur
Fast Red	15–20 Minuten, Zimmertemperatur
New Fuchsin	15-40 Minuten, Zimmertemperatur

Der positive Kontrollobjektträger (gewünschter Antikörper im Vergleich mit bekanntem positivem Gewebe) kann unter dem Mikrokop beobachtet werden, bis eine akzeptable Farbintensität erreicht wurde. Gründlich mit deionisiertem Wasser oder Puffer abspülen

Qualitätskontrolle
Siehe entsprechende Packungsbeilagen der Nachweissysteme zu Informationen über Richtlinien für allgemeine Verfahren zur Qualitätskontrolle.

Fehlerbehebung
Im Abschnitt Fehlerbehebung in den Packungsbeilagen der BioGenex Super Sensitive Detection Systems (oder anderer gleichwertiger Nachweissysteme) mögliche Abhilfemaßnahmen bei Problemen mit dem Nachweissystem nachlesen oder den Technischen Kundendienst von BioGenex unter +1 (925) 275-0550 verständigen, um ungewöhnliche Anfärbungen zu melden.

Erwartete Ergebnisse
Die Färbung mit IHC- und ISH-Systemen sollte zur Ablagerung eines farbigen Chromogenpigments an der Stelle der spezifischen Interaktion führen, mit minimalem bis keinem nichtspezifischen Hintergrund.
Für AEC Kits: AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) bildet ein ziegelrotes Endprodukt.
Für DAB Kits: DAB (3,3'-Diaminobenzidin) bildet ein bräunliches Endprodukt.
Für Alkaline Phosphatase Kits: Naphthol Phosphate/Fast Red bildet eine intensiv rote Farbe.
Für New Fuchsin Kits: New Fuchsin bildet ein Präzipitat von intensivem Rot/Fuchsia.

Einschränkungen des Verfahrens
Super Sensitive™ Detection Kits zeigen Antigene, die eine Fixierung, Einbettung und Schnittführung von Geweben überstehen. Zur Erzielung optimaler Ergebnisse ist eine korrekte Behandlung der Gewebe vor der Fixierung und der Einbettung immer noch wichtig, wenn auch bei den BioGenex Super Sensitive™ Reagents weniger entscheidend. Inkonsistente Ergebnisse können durch Abweichungen bei den Fixierungs- und Einbettungsmethoden bedingt sein, die von verschiedenen Laboren angewandt werden, und ebenso durch inhärente Variationen im Gewebe selbst. Die Ergebnisse der Immunfärbung müssen mit anderen Laborbefunden und den relevanten Kontrollen korreliert werden. Um Fehler bei der Gewebeverarbeitung aufzudecken, kann eine interne Gewebeverarbeitungskontrolle (z.B. Vimentin) verwendet werden. Die Anwendung der BioGenex Antigen Retrieval Vorbehandlungstechnik kann eine Wiederherstellung der Antigenität in Formalin-fixiertem Gewebe ermöglichen. Bitte BioGenex anrufen, wenn weitere Informationen über diese Produkte und ihre Verwendung bei der Standardisierung von Immunfärbungsergebnissen erwünscht sind.
Die klinische Interpretation jeder positiven Färbung oder ihres Fehlens sollte im Zusammenhang mit der klinischen Darstellung, Morphologie und anderen histopathologischen Kriterien erfolgen. Die klinische Interpretation jeder positiven Färbung oder ihres Fehlens sollte durch morphologische Untersuchungen unter Verwendung geeigneter positiver und negativer, interner und externer Kontrollen ebenso wie durch weitere diagnostische Tests ergänzt werden. Die Auswertung des gefärbten Präparats obliegt der Verantwortung eines qualifizierten Pathologen, der mit der korrekten Anwendung von IHC-Antikörpern, Reagenzien und Verfahren vertraut ist. Die Färbung muss in einem zertifizierten, lizenzierten Labor unter Aufsicht eines Pathologen durchgeführt werden, der für die Überprüfung der gefärbten Objektträger und Gewährleistung adäquater positiver und negativer Kontrollen verantwortlich ist.
Gewebe von Personen, die mit Hepatitis B Virus infiziert sind und Hepatitis B Oberflächenantigen (HBsAg) enthalten, können eine unspezifische Färbung mit Horseradish Peroxidase zeigen. (Omata, et al. 1980)
Normale/nicht immune Seren aus der gleichen tierischen Quelle wie die bei den Blockierungsschritten verwendeten sekundären Antikörper können durch Auto-Antikörper oder natürliche Antikörper falsch negative oder falsch positive Ergebnisse verursachen.
Falsch positive Ergebnisse können durch nicht-immunologische Bindung von Proteinen oder Substrat-Reaktionsprodukte auftreten. Sie können auch durch Pseudoperoxidase-Aktivität (Erythrozyten), endogene Peroxidase-Aktivität (Cytochrom C) oder endogenes Biotin (z.B. Leber, Brust, Gehirn, Niere) verursacht werden, abhängig vom Typ des verwendeten Immunfarbstoffs. (Nadji & Morales, 1983) .

Leistungsmerkmale
BioGenex hat Untersuchungen zur Beurteilung der Leistungsfähigkeit aller Substrat-Packs unter Verwendung verschiedener BioGenex IHC und ISH-Assays durchgeführt. BioGenex Substrat-Packs haben reproduzierbare und konsistente Ergebnisse gezeigt, bei Verwendung innerhalb eines einzigen Durchlaufs, bei verschiedenen Durchläufen, mit verschiedenen Chargen und, falls zutreffend, auch beim Vergleich zwischen manuellen und automatisierten Durchläufen. Die Produkte wurden für die auf den Etiketten angegebenen Zeiträume als stabil bestimmt, entweder mit Standard-Echtzeit- oder mit beschleunigten Testmethoden. BioGenex sichert die Produktqualität durch 100%ige Qualitätskontrolle für alle freigegebenen Produkte und durch Überwachungsprogramme.

ESPANOL, SPANISH

Uso previsto
Los packs de sustrato son para uso diagnóstico in vitro como cromógenos para la detección de las reacciones antígeno-anticuerpo específicas en inmunohistoquímica (IHC) e hibridación in situ (ISH).

Resumen y explicación
BioGenex proporciona varias opciones de pack de sustrato para sistemas manuales y automáticos para la detección in situ utilizando las enzimas fosfatasa alcalina y peroxidasa. Estos kits se han diseñado para reducir los tiempos de incubación de los sustratos y minimizar la exposición a productos químicos peligrosos. Estos packs de sustrato permiten la visualización microscopia de diferentes componentes celulares dependiendo del marcador utilizado en la hibridación in situ (ISH) o la inmunohistoquímica (IHC).

Principios del procedimiento
La demostración de las dianas de interés en tejidos y células mediante inmunotinción es un proceso de dos pasos en el que ocurre, en primer lugar, la unión de un anticuerpo primario al antígeno de interés y, en segundo lugar, la detección y visualización del anticuerpo unido mediante uno de los diferentes sistemas cromógenos enzimáticos. El tipo de sustrato cromógeno utilizado depende del tipo de enzima usada; por ejemplo, se puede usar AEC y DAB con Horseradish Peroxidase y Fast Red se puede usar con Alkaline Phosphatase; Levamisole se puede usar con el Alkaline Phosphatase substrate en lugar del Peroxide Block para bloquear la tinción de la fosfatasa endógena. La hibridación in situ implica la unión de la sonda específica de ácido nucleico marcada con un hapteno. El marcador se detecta posteriormente mediante un anticuerpo primario unido al marcador y, a continuación, se detecta y visualiza de la manera antes descrita.
El sustrato DAB (diaminobenzidina) ofrece la mayor sensibilidad de todos los cromógenos colorimétricos de Horseradish Peroxidase. El precipitado permanente e insoluble marrón ofrece un alto contraste en las fotografías. Además, la sensibilidad se puede potenciar desarrollando la reacción en presencia de níquel o cobalto, o examinando los portaobjetos por microscopia de interferencia por reflexión (sensibilidad 10x – 100x).
AEC (aminoetilcarbazol) es un sustrato colorimétrico para Horseradish Peroxidase. El producto de reacción de color rojo ladrillo brillante es insoluble en agua pero soluble en alcohol y xileno. El sustrato AEC es adecuado para las aplicaciones de inmunohistoquímica (IHC), hibridación *in situ* (ISH) y transferencia de membrana. Para IHC y ISH, el sustrato AEC es compatible con los medios de preparación acuosos.
Fast Red (sal 4-cloro-2-metil-bencenodiazonio) es un sustrato para la Alkaline Phosphatase y ofrece una alta sensibilidad para las observaciones al microscopio óptico. El precipitado del colorante rojo brillante produce un contraste máximo con las contratinciones azules y se reproduce adecuadamente mediante fotomicrografía en color. El producto de reacción es insoluble en agua, pero soluble en disolventes orgánicos como alcohol y xileno. El precipitado colorante es fluorescente por sí mismo y los cortes se pueden examinar al microscopio de fluorescencia, lo que da lugar a un aumento 5x de la relación señal-ruido. La emisión de fluorescencia del precipitado de Fast Red es de entre 540 y 590 nm con un máximo de 562 nm. La excitación máxima se observa a 550 nm. La visualización mediante microscopio de fluorescencia se puede realizar con los sistemas de filtrado con rodamina, fluoresceína o sistemas de filtro AMCA. La fluorescencia es muy estable y no sufre fotodecoloración.

New Fuchsin
La New Fuchsin, también conocida como Magenta III, produce un precipitado de color rojo/fucsia intenso en presencia de fosfatasa alcalina. No es soluble en xilenos ni alcoholes, por lo que se debe preparar con un medio permanente.

Reactivos suministrados

N° de referencia	Packs de sustrato	Formato
HK092-5KE	AEC SUBSTRATE PACK KIT	250 slides
HK129-5KE	AEC SUBSTRATE PACK KIT, CONC	2500 slides
HK130-5KE	LIQUID DAB SUBSTRATE PACK KIT	250 slides
HK542-XAK	2- COMPONENT DAB PACK	1000 slides
HK153-5KE	LIQUID DAB SUBSTRATE PACK KIT	2000 slides
HK182-5KE	FAST RED SUBSTRATE PACK KIT	500 slides
HK183-5KE	NEW FUCHSIN SUBSTRATE PACK KIT	400 slides

Reactivos necesarios pero no suministrados
No se suministran todos los reactivos requeridos para la IHC y ISH. Consultar en las hojas de datos del kit del anticuerpo y de la detección el juego completo de reactivos necesarios para la inmunohistoquímica (IHC) o la hibridación *in situ* (ISH).

Almacenamiento y manipulación
Almacenar todos los reactivos a 2-8 ºC. No usar después de las fechas de caducidad que se indican en las etiquetas de los reactivos.

Precauciones
HK092-5KE, HK129-5KE, HK542-XAKE: Rep 2;R61. Xn;R20/21. Xi;R36 = Riesgo durante el embarazo de efectos adversos para el feto.Nocivo por inhalación y en contacto con la piel.Irrita los ojos. S25 S26 S38 S45 S53 S36/37/39 S60 P11 = Evítese el contacto con los ojos.En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico.En caso de ventilación insuficiente, úsese equipo respiratorio adecuado.En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico (si es posible, muéstresele la etiqueta).Evítese la exposición - recábense instrucciones especiales antes del uso.Úsense indumentaria y guantes adecuados y protección para los ojos/la cara.Elimínense el producto y su recipiente como residuos peligrosos.
HK183-5KE: T;R23-25. C;R35. Xi;R37 = Tóxico por inhalación.Tóxico en contacto con la piel.Provoca quemaduras graves.Irrita las vías respiratorias. S26 S38 S45 S24/25 S36/37/39 S60 = En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico.En caso de ventilación insuficiente, úsese equipo respiratorio adecuado.En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico (si es posible, muéstresele la etiqueta).Evítese el contacto con los ojos y la piel.Úsense indumentaria y guantes adecuados y protección para los ojos/la cara.Elimínense el producto y su recipiente como residuos peligrosos.

Protocolo de tinción
Consultar en los manuales del sistema de detección los protocolos de tinción pertinentes.
Preparación de sustratos y cromógenos
Para los kits de Horseradish Peroxidase:
Kits de AEC: Preparar la solución de sustrato añadiendo 1 gota de cromógeno (AEC) a 1 vial (2,5 ml) de sustrato y mezclar bien. 2,5 ml de solución de trabajo son suficientes para 20 portaobjetos. Esta solución permanece estable a temperatura ambiente (20-26 °C) hasta 5 horas.
Kits de DAB:(HK130-5KE, HK153-5KE) Añadir 2 gotas de Liquid DAB Chromogen a un vial de 2,5 ml de Substrate Buffer listo para usar. Añadir a continuación 1 gota de solución de Hydrogen Peroxide (H_2O_2) Substrate, cerrar el vial y mezclar. La solución de trabajo se mantiene estable a temperatura ambiente (20-26 °C) hasta 6 horas.
DAB Kits: (HK542-XAKE) Una gota (1 gota ~ 38 µl) de DAB Chromogen (HK124) se mezcla con 1 ml de Substrate Buffer (HHK520). La solución de trabajo se mantiene estable a temperatura ambiente (20-26 °C) hasta 6 horas.

Para kits de Alkaline Phosphatase:
Añadir 1 tableta de Fast Red chromogen a un vial (5 ml) de sustrato (naftol fosfatasa). Agitar bien hasta que se haya disuelto. La solución de trabajo se mantiene estable a temperatura ambiente (20-26 °C) hasta 8 horas.
Opcional: se puede añadir Levamisole (no suministrada) al Fast Red chromogen para reducir la tinción del fondo. Funciona como un inhibidor de la Alkaline Phosphatase endógena en la mayoría de los tejidos.

Para kits de New Fuchsin:
Combinar 50 µl (1 gota) de New Fuchsin Chromogen Solution y 50 µl (1 gota) de New Fuchsin Activator Solution en el fondo del frasco de mezcla. Este paso es vital para el desarrollo correcto del color. Mezclar bien los reactivos pipeteando suavemente varias veces. Verter un vial de Tris Buffer en la mezcla Chromogen-Activator preparada anteriormente y mezclar bien. Añadir 400 µl (8 gotas) de Substrate Solution a la solución preparada anteriormente y mezclar bien. NOTA: Si se sospecha la presencia de fosfatasa alcalina endógena, añadir Levamisole (HK113-5K) a una concentración de 0,6 mg/ml al Substrate en este momento para inhibir la actividad de la Alkaline Phosphatase. Preparar el sustrato inmediatamente antes de su uso.

Procedimiento para la aplicación de la solución de sustrato:
Consultar los protocolos completos de tinción y los pasos de lavado en las hojas de datos del kit del anticuerpo y de la detección. El usuario debe seguir las recomendaciones de BioGenex y validar cualquier otra condición que se utilice.

Sustrato	Recomendaciones de BioGenex
DAB	5-10 minutos a temperatura ambiente.
AEC	5-10 minutos a temperatura ambiente.
Fast Red	15-20 minutos a temperatura ambiente.
New Fuchsin	15-40 minutos a temperatura ambiente.

Se puede examinar el portaobjetos con el control positivo (el anticuerpo deseado frente al tejido positivo conocido) al microscopio hasta que se obtenga una intensidad de color aceptable. Aclarar abundantemente con agua desionizada o tampón de aclarado.

Control de calidad
Consultar las normas sobre los procedimientos generales de control de calidad en las hojas de datos apropiados del sistema de detección.

Resolución de problemas
Consultar en la sección Resolución de problemas, en las hojas de datos de los BioGenex Super Sensitive Detection Systems™ (Sistemas de Detección Super Sensitive de BioGenex) (u otros sistemas de detección equivalentes), las acciones a emprender sobre aspectos relacionados con el sistema de detección, o ponerse en contacto con el Departamento de Servicio Técnico de BioGenex, al teléfono (925) 275-0550, para comunicar una tinción fuera de lo común.

Resultados esperados
La tinción con IHC y ISH debe dar lugar al depósito de un pigmento cromógeno coloreado en el lugar de la interacción específica con un fondo mínimo o inespecífico.
Para los kits de AEC: AEC (3-amino-9-etilcarbazol) forma un producto final rojo ladrillo.
Para los kits de DAB: DAB (3,3'-diaminobenzidina) forma un producto final pardusco.
Para los kits de Alkaline Phosphatase: Naftol fosfato/Fast Red forma un color rojo intenso.
Para los kits de New Fuchsin: New Fuchsin produce un precipitado rojo/fucsia intenso.

Limitaciones del procedimiento
Los kits Super Sensitive™ Detection ponen de manifiesto los antígenos que sobreviven a la fijación, embebido y corte del tejido. El tratamiento correcto de los tejidos antes de la fijación y el embebido, aunque es menos crítico para los BioGenex Super Sensitive™ Reagents, también es importante para obtener resultados óptimos. Los resultados incoherentes pueden deberse a variaciones de los métodos de fijación y embebido utilizados por cada laboratorio, así como a las variaciones propias de cada tejido. Los resultados de la inmunotinción deben ser relacionados con otros resultados del laboratorio y los controles correspondientes. Se puede usar un control interno de procesado del tejido (como vimectina) para revelar los errores en dicho procesado. El uso del pretratamiento BioGenex Antigen Retrieval puede permitir la recuperación de la antigenicidad en el tejido fijado con formol. Solicite a BioGenex más información sobre estos productos y su uso en la normalización de los resultados de la tinción inmune.
La interpretación clínica de cualquier tinción positiva o su ausencia debe evaluarse en el contexto de la presentación clínica, la morfología y otros criterios histopatológicos. La interpretación clínica de cualquier tinción positiva o su ausencia se debe complementar con estudios morfológicos utilizando los controles positivos y negativos internos y externos adecuados, así como otras pruebas diagnósticas. La interpretación de la preparación teñida es responsabilidad de anatomopatólogos cualificados que estén familiarizados con el uso adecuado de los anticuerpos, reactivos y métodos de IHC. La tinción se debe realizar en un laboratorio aprobado y certificado bajo la supervisión de un anatomopatólogo que sea responsable de revisar los portaobjetos teñidos y garantizar la adecuación de los controles positivos y negativos.
Los tejidos de personas infectadas por el virus de la hepatitis B y que contengan el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) pueden mostrar una tinción inespecífica con Horseradish Peroxidase. (Omata, et al. 1980)
El suero normal o no inmunizado de la misma fuente animal usado como antisuero secundario en los pasos de bloqueo puede provocar resultados falso negativos o positivos debido a autoanticuerpos o anticuerpos naturales.
Se pueden ver resultados falso positivos debido a la unión no inmunológica de proteínas o productos de reacción del sustrato. También pueden deberse a la actividad pseudoperoxidasa (eritrocitos), la actividad peroxidasa endógena (citocromo C) o a la biotina endógena (por ejemplo, en hígado, mama, cerebro o riñón) según el tipo de inmunotinción usada. (Nadji y Morales, 1983)

Características de funcionamiento
BioGenex ha realizado estudios para evaluar el funcionamiento de todos los packs de sustrato usando varios procedimientos de IHC y ISH de BioGenex. Los packs de sustrato de BioGenex han mostrado resultados reproducibles y coherentes cuando se usan en un solo procedimiento, entre procedimientos, entre lotes, y siempre que proceda entre los procedimientos manuales y automatizados. Se ha determinado que los productos son estables durante los períodos que se especifican en las etiquetas, ya sea por métodos de tiempo real estándar o en condiciones aceleradas. BioGenex garantiza la calidad del producto mediante un control de calidad al 100% de todos los productos comercializados y mediante programas de seguimiento.

Bibliography

Sheehan DC and Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
Kiernan JA. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. New York: Pergamon Press 1981.
Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Lab Med 1983; 14:767-770.
Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen. A possible source of error in immuno histochemistry. Am J Clin Pathol 1980 ;73(5):626-632.

EC REP Representative in the European Community; Mandatario nella Comunità Europea; Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft; Representante autorizado en la Comunidad Europea
IVD In Vitro Diagnostic Medical Device; Dispositivo medico-diagnostico in vitro; In Vitro Diagnostikum; Producto sanitario para diagnóstico in vitro
Cons ult Instructions for use; Consultare le istruzioni per l'uso; Gebrauchsanweisung beachten; Consulte las instrucciones de uso
Temperature Limitation; Limiti di temperatura; Zulässiger Temperaturbereich ; Limite de temperatura
Manufacturer; Fabbricante ;Hersteller; Fabricante