



## HISTOSONDA CITOMEGALOVIRUS (CMV)

Referencia: CBM-0018-R5

Ensayo para 5 reacciones individuales en un único vial. 65µl por reacción

Clasificación del producto:  
\*Países miembros de la Unión Europea  
\*Para Uso Exclusivo en Investigación\* RUO

### INTRODUCCIÓN

El CMV pertenece al grupo de los  $\beta$ - Herpes virus y afecta globalmente a toda la población mundial. La primoinfección suele ser un proceso flu-like aunque casos con mayor severidad y clínica similar a la mononucleosis son reconocidos.

Al igual que otros herpes virus, el CMV después de la primoinfección acompaña al huésped de por vida en forma de infección latente.

En pacientes inmunodeprimidos se puede producir reactivación de la infección ocasionando graves lesiones en multitud de órganos que incluyen pulmón, riñón, sistema nervioso central, retina, aparato gastrointestinal, endotelios y células sanguíneas.

Pacientes con colitis ulcerosa pueden estar infectados con el CMV y las pautas de tratamiento pueden ser modificados por esta situación.

Después de la infección el CMV empieza primero a transcribir los llamados genes precoces. De entre ellos uno conocido como  $\beta$  2.7 (2.7 Kbases) es el más abundantemente transcrito y se acumula durante toda la infección llegando a dar cuenta de hasta el 20% de todos los mRNA transcritos por el virus.

De esta forma el gen  $\beta$  2.7 es un candidato ideal para la identificación de CMV.

CENBIMO ha fabricado una HISTOSONDA CMV consistente en un DNA monocatenario con una longitud de 288 nucleótidos con secuencia complementaria al mRNA del gen  $\beta$  2.7 del CMV. Este DNA ha sido marcado con Digoxigenina.

La hibridación "in situ" presente a numerosas ventajas sobre la inmunohistoquímica al obviar la inespecificidad de los anticuerpos.

### FINALIDAD PREVISTA

Para Uso Exclusivo en Investigación  
La Histosonda Citomegalovirus está indicado para la detección de células infectadas por el CMV. Esta detección se lleva a cabo mediante hibridación in situ en secciones histológicas fijadas en formol e incluidas en parafina.

### ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

La Histosonda Citomegalovirus ha sido diseñada para su utilización como producto sanitario de Diagnóstico In Vitro, para uso profesional y debe ser manipulado por personal cualificado y debidamente entrenado. Para la obtención de unos resultados adecuados, deben seguirse fielmente las instrucciones de este manual. Cualquier cambio en las temperaturas o tiempos indicados, o en cualquier otro paso del proceso, puede dar lugar a resultados erróneos. Este producto contiene azida sódica ( $\text{NaN}_3$ ) como conservante en su composición. A las concentraciones en las que está presente (<0,1%) no está clasificado como peligroso. Una vez desechado el producto, deje correr abundante cantidad de agua para evitar acumulaciones de azidas metálicas en las cañerías.

### COMPONENTES

1 tubo con la cantidad necesaria de la Histosonda Citomegalovirus para 5 reacciones individuales. La Histosonda Citomegalovirus consiste en un segmento de ADN de una sola cadena de 288 nucleótidos, complementaria al mRNA del gen  $\beta$  2.7 del CMV. El DNA de la sonda contiene nucleótidos que han sido marcados con Digoxigenina.

### CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

El producto se almacenará a temperatura 3-7°C hasta la fecha de caducidad indicada en su etiqueta. No

utilizar el producto después de la fecha de caducidad indicada en su etiqueta.

### MUESTRAS

Cortes histológicos de tejidos fijados en formol e incluidos en parafina de 4-6 micrómetros de espesor.

### INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Las muestras en las que se observe expresión del Citomegalovirus deberán mostrar una coloración marrón en el núcleo o en el citoplasma celular o en ambos que contrastará sobre el fondo azul-violeta que confiere la tinción con hematoxilina. El facultativo valorará los resultados en base a su experiencia a partir de la visualización de las señales observadas en la muestra. Se recomienda el uso de controles positivos para verificar el correcto desarrollo de la técnica.

### LIMITACIONES DEL ENSAYO

Histosonda Citomegalovirus ha sido optimizado para detectar la expresión del mRNA del gen  $\beta$  2.7 de Citomegalovirus en tejidos fijados en formol e incluidos en parafina. No se recomienda la utilización de otro tipo de muestras o de técnicas de preparación. El funcionamiento del producto ha sido validado utilizando los protocolos indicados en el presente manual de instrucciones. La utilización de otros procedimientos o las modificaciones de los protocolos recomendados, pueden conducir a resultados erróneos. Los resultados de este ensayo deben ser evaluados por el facultativo en combinación con el resto de datos clínicos del paciente de los que se disponga. Para la obtención de unos resultados óptimos y reproducibles es muy importante ajustarse rigurosamente a las condiciones de tiempos y temperaturas indicadas en el procedimiento.

### BIBLIOGRAFIA

- 1) The most abundantly transcribed human cytomegalovirus gene ( $\beta$ 2.7) is not essential for growth in vitro. Brian P. McSharry, 1 Peter Tomasec, 1 M. Lynne Neale 2 and Gavin W. G. Wilkinson 1
- 2) Localization of the human cytomegalovirus 2.7-Kb major early beta-gene transcripts by in situ hybridization in permissive and nonpermissive infections. TC Wu, WA Lee, MC Pizzorno, WC Au, YJ Chan, RH Hruban, GM Hutchins and GS Hayward

### INSTRUCCIONES DE USO

Para la utilización de la Histosonda Citomegalovirus marcada con Digoxigenina.

### PRINCIPIO DEL MÉTODO

La Hibridación In Situ Cromogénica (CISH), es una técnica utilizada para determinar la presencia de una secuencia de ADN o ARN, o estudiar la expresión de un gen así como la evaluación simultánea de la morfología del tejido mediante el uso de microscopía de campo claro. La sonda marcada, de secuencia conocida, se hibrida con su diana en el tejido problema. Esta unión se detecta mediante un proceso inmunohistoquímico. Las histosondas, cuya diana es el RNA mensajero, están destinadas a hacer visibles los genes que se expresan detectando la expresión génica.

### Protocolo de HistoSonda

**Para mayor información incluyendo Preguntas más Frecuentes y Apoyo Técnico por favor solicite el Manual Técnico completo de HistoSonda en la siguiente dirección de correo: [techserv@cenbimo.com](mailto:techserv@cenbimo.com).**

**Accesorios necesarios para el desarrollo del protocolo pero no suministrados con el producto:** Proteínasa K, Anticuerpo Anti-Digoxina, polímero comercial anti-ratón HRP, solución de Diaminobenzidina (DAB).

Antes de comenzar, precaliente la cámara húmeda a 62°C.

#### 1a. Desparafinación

1. Caliente los portaobjetos a 62°C durante 10mins utilizando una placa caliente o un incubador.
2. Introduzca los portaobjetos en el siguiente orden en:
  - a. Xileno: 10 mins
  - b. Xileno: 5mins
  - c. Alcohol absoluto (etanol o isopropanol): 1min X 2 veces
  - d. Alcohol 96%: 1min X 3 veces

- e. Metanol con 0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  o 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  solo : 5mins
3. Lave enérgicamente los portaobjetos con agua (destilada o corriente), manténgalos en agua 1min.

#### 1b. Inhibición de uniones inespecíficas de DNA (opcional)

Por lo general este paso no es necesario, a menos que el tejido que vaya a hibridar contenga una gran cantidad de leucocitos polimorfonucleares eosinófilos (generalmente médula ósea y tejidos gástricos).

1. Introducir los portaobjetos en agua destilada hirviendo durante 30 segundos e inmediatamente transfíralos a agua destilada a temperatura ambiente.

¡ Importante: un tratamiento térmico excesivo puede provocar una tinción de fondo. Saque los portaobjetos de manera inmediata. !

#### 2. Desproteínización

1. Preparar una dilución de Proteínasa K comercial a una concentración de 0,033 mg/ml en PBS pH 7.4.
2. Retire el exceso de agua de cada portaobjetos con un pañuelo de papel.
3. Cubra el tejido con 200µl de la dilución de Proteínasa K e incube en una cámara húmeda exactamente 10mins a temperatura ambiente.
4. Lave enérgicamente con agua.
5. Introduzca los portaobjetos en PBS pH 7.4 durante 2mins.

¡ (Importante: si los cortes han sido tratados previamente con calor, use la Proteínasa K sólo durante 5 minutos, ya que este tratamiento sensibiliza mucho los tejidos para esta enzima. **Las médulas óseas requieren una desproteínización de 20 min a 55°C con Proteínasa K tras su tratamiento con calor** !)

#### 3. Incubación con la sonda

1. Retire el exceso de buffer del portaobjetos con un pañuelo de papel.
2. Añada 65µl de sonda al corte asegurándose de que todo el tejido queda cubierto y de que no quedan burbujas de aire.
3. Coloque los cristales en posición horizontal en una cámara húmeda y cierre bien.
4. Incube a 62°C durante 1 h.

#### 4. Lavado de la sonda

¡ La solución de la sonda es muy viscosa debido a su contenido en dextrano. Es **muy importante** lavar bien los cristales para asegurarse de que la solución de la sonda es completamente retirada. !

1. Lave la superficie del tejido vigorosamente con PBS pH 7.4 para retirar toda la sonda.
2. Agite en PBS pH 7.4 durante 5mins.

#### 5. Revelado de la sonda

Protocolo para el revelado manual de la sonda.

1. Retire el exceso de buffer de los cortes como anteriormente.
2. Cubra el tejido con 100 µl de anticuerpo Anti-Digoxina (no suministrado con este producto) en las condiciones de uso especificadas por el fabricante e incube en una cámara húmeda durante 30mins a temperatura ambiente.
3. Lave enérgicamente con PBS pH 7.4 y luego mantenga en agitación en PBS pH 7.4 durante 1min.
4. Retire el exceso de buffer de los cortes.
5. Ponga una gota de un polímero comercial HRP (no suministrado con este producto) que reconozca el anticuerpo primario utilizado sobre el tejido (suficiente para cubrir todo el tejido 50-100µl) e incube en una cámara húmeda siguiendo las instrucciones del fabricante.
6. Lave vigorosamente con PBS pH 7.4 y agite en PBS durante 1min.
7. Retire el exceso de buffer de los tejidos y aplique una dilución de Diaminobenzidina (DAB) comercial (no suministrada con este producto) siguiendo las instrucciones del fabricante.
8. Lave con agua.
9. Tiña los cortes brevemente (2-3secs) con hematoxilina Harris diluida al 50% en agua.
10. Lave con agua, deshidrate y haga el montaje de los cristales siguiendo los protocolos habituales del laboratorio.

Fecha de emisión: 23/082016



## HISTOSONDA CYTOMEGALOVIRUS (CMV)

Reference: CBM-0018-R5

Assay of one vial for 5 individual reactions. 65µl for reaction.

Product classification:  
\*EU countries  
"For Research Use Only" (RUO)

### INTRODUCTION

Cytomegalovirus belongs to the β-herpes virus family and globally affects the world population. Primary infection is often a flu-like process although there are known cases of greater severity that are clinically similar to mononucleosis.

Like other herpes viruses, after primary infection CMV persists in the host permanently as a latent infection.

Immunosuppression in patients can provoke reactivation of the virus giving rise to serious lesions in a multitude of organs such as the lungs, kidneys, central nervous system, gastrointestinal apparatus, endothelium and blood cells.

Patients with ulcerative colitis can be infected by CMV and treatment guidelines modified by this situation.

After infection, CMV first begins to transcribe the so-called 'early' genes. Of these genes, one known as β2.7 (2.7 kbases) is the most abundantly transcribed and accumulates during the entire infection until it makes up 20% of all mRNA transcribed by the virus. Because of this, the gene β2.7 is an ideal candidate for CMV identification.

CENBIMO has fabricated HISTOSONDA CMV which consists of a single strand of DNA with a sequence length of 288 nucleotides. This sequence is complementary to CMV gene β2.7 mRNA. The probe DNA has been labeled with digoxigenin.

The technique of in situ hybridization presents numerous advantages over immunohistochemistry and unspecific results obtained when using antibodies can be avoided.

### INTENDED USE

For Research Use Only (RUO).

Histosonda Cytomegalovirus is intended for the detection of cells infected by CMV in any location found including: lymph node, central nervous system, retina, lung and intestine. This detection is carried out by in situ hybridization in paraffin-embedded, formalin-fixed histological sections.

### WARNINGS AND PRECAUTIONS

Histosonda Cytomegalovirus has been designed for In Vitro Diagnostic use only and must be manipulated by qualified and accordingly trained personnel.

In order to obtain the best results, the instructions contained in the manual must be followed. Any change to the indicated temperatures, times or any other step of the process can lead to poor results.

This product contains sodium azide as a preservative (NaN<sub>3</sub>). Sodium azide is below the threshold level of 0,1% (w/v) of the total, and therefore it is not considered to be a hazardous substance. Small quantities may be eliminated in the waste water system.

### COMPONENTS

1 tube the necessary amount of Histosonda Cytomegalovirus.

Histosonda Cytomegalovirus consists of a fragment of single stranded DNA of 288 nucleotides, complementary to CMV gene β2.7 mRNA. The probe DNA contains nucleotides that have been labeled with Digoxigenin.

### STORAGE CONDITIONS

Supplied reagents are stored at 3-7°C until expiration date. Do not use after expiration date.

### SAMPLES

Block sections of formalin fixed paraffin embedded tissues. Sections of 4-6 micrometers in width are sufficient to conduct the study.

### INTERPRETATION OF RESULTS

Samples in which Cytomegalovirus expression is observed will show a brownish color in the cell nucleus, cytoplasm or both, which will contrast over the blue-violet background given by hematoxylin staining. The pathologist will evaluate the results according to their experience, drawing conclusions from the staining of the sample in parallel with the staining observed in positive and negative controls.

### ASSAY LIMITATIONS

Histosonda Cytomegalovirus has been optimized to detect RNA expression in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. Its use is not recommended for other types of samples or preparation techniques.

The correct operation of this product has been validated using the protocols indicated in the instructions manual. The use of other procedures or the modification of the recommended protocols may lead to erroneous results.

The results from this assay must be evaluated by the pathologist in combination with the rest of available patient clinical data.

In order to obtain optimal and reproducible results it is important to rigorously maintain the time and temperature conditions indicated in the procedure.

### BIBLIOGRAPHY

- 1) The most abundantly transcribed human cytomegalovirus gene (β2.7) is no essential for growth in vitro. Brian P. McSharry, 1 Peter Tomasec, 1 M. Lynne Neale 2 and Gavin W. G. Wilkinson 1
- 2) Localization of the human cytomegalovirus 2.7-Kb major early beta-gene transcripts by in situ hybridization in permissive nonpermissive infections. TC Wu, WA Lee, MC Pizzorno, WC Au, YJ Chan, RH Hruban, GM Hutchins and GS Hayward

### PROCEDURE

For Digoxigenin- labeled probes

### BASIS OF THE METHOD

Chromogenic In Situ Hybridization (CISH) is a technique used to determine the presence of a DNA or RNA sequence or to study gene expression, as well as for the simultaneous evaluation of tissue morphology by white light microscopy. A labeled probe of known sequence hybridizes with its target in the tissue being studied. This hybridization is then detected by an immunohistochemical process.

The Histosondas targets are messenger RNA and they are therefore designed to detect and visualise gene expression.

### HistoSonda Protocol

#### Needed accessories for this protocol and not provided with the product

Proteinase K, Anti-Digoxin Antibody, polimero comercial anti-mouse HRP comercial polymer, Diaminobenzidine (DAB) solution.

For further important details including FAQs and Troubleshooting please ask for the complete **HistoSonda Technical Manual at the email address: techserv@cenbimo.com**

Before starting pre-heat the humid chamber to 62°C.

#### 1a. Deparaffinization

1. Heat slides at 62°C for 10mins using a hot plate or incubator.
2. Immerse slides in:
  - a. Xylene: 10 mins
  - b. Xylene: 5mins
  - c. Absolute alcohol (ethanol or isopropanol): 1min X 2
  - d. Alcohol 96%: 1min X 3
  - e. Methanol containing 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> only: 5mins
3. Wash well with distilled water, leave standing in water.

#### 1b. Inhibition of unspecific DNA binding (optional)

Generally this step is not necessary unless the tissue to be hybridized contains a great quantity of polymorphonuclear eosinophil leukocytes (generally **bone marrow and gastric tissues**).

1. Place slides in boiling distilled water for **30 seconds** and immediately transfer to distilled water at room temp.

**! Important:** excess heat treatment will result in background staining. Remove slides immediately. !

#### 2. Deproteinization

1. Prepare a dilution of any commercial Proteinase K at a work concentration of 0,033 mg/ml in PBS pH 7.4.
2. Remove excess water from individual slides with tissue paper.
3. Cover tissue sections with the 200µl of Proteinase K and incubate in a humid chamber for exactly 10mins at room temp.
4. Wash well with water.
5. Transfer to PBS pH 7.4 for 2mins.

**! (Important:** if the slides have been boiled only use Proteinase K for 5 minutes as the heat treatment will have significantly sensitized the tissue sections. **Bone marrows require a Proteinase K digestion of 20min at 55°C after heat treatment!**)

#### 3. Incubation with the probe

1. Remove excess buffer from sections as described previously.
2. Add 65µl of probe to the tissue section ensuring the entire section is completely covered and avoiding air bubbles.
3. Place the slides in a horizontal position in a humid chamber and close well.
4. Incubate at 62°C for 1hr.

#### 4. Washing the probe

**! The probe solution is very viscous due to large quantities of dextran. It is very important to wash the slides well to ensure the probe solution is completely removed!**

1. Wash the surface of the section vigorously with PBS pH 7.4 to remove the probe.
2. Agitate in PBS for 5mins.

#### 5. Revealing the probe

Protocol for manual revealing of the probe.

1. Remove excess buffer from sections as before.
2. Cover sections with 100µl of Anti-Digoxin (not provided with this product) following manufacturer's instructions and incubate in a humid chamber for 30mins at room temp.
3. Wash vigorously with PBS, pH 7.4 agitate in PBS for 1min.
4. Remove excess buffer from sections.
5. Drop commercial HRP polymer (not provided with this product) that binds the primary antibody used before over the sections (enough to cover the tissue 50-100µl) and incubate in a humid chamber following the manufacturer's instructions.
6. Wash vigorously with PBS, agitate in PBS 1min.
7. Remove excess buffer from sections and apply commercial Diaminobenzidine (DAB) (not provided with this product) following the manufacturer's instructions.
8. Wash with water.
9. Counter stain the sections briefly (2-3secs) with Harris hematoxylin diluted 50% in water.
10. Wash with water, dehydrate and cover slip following normal laboratory protocols.

Emission date: 23/08/2016



**Manufacturer: CENBIMO S.L.**  
**C/Doctor Iglesias Otero s/n**  
**27004-Lugo, Spain**