



HISTOSONDAS CADENAS PESADAS DE LAS INMUNOGLOBULINAS

(DELTA O EPSILON)

Referencias:

Histosonda Cadena Pesada Delta CBM-0007-R5
Histosonda Cadena Pesada Epsilon CBM-0008-R5

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

Clasificación del producto:

*Países miembros de la Unión Europea
Para Utilización en el Diagnóstico In Vitro

INTRODUCCIÓN

Los linfocitos B competentes inmunológicamente se desarrollan desde una célula madre linfóide hasta adquirir un receptor constituido por una única molécula de inmunoglobulina específica para un antígeno determinado. Estas moléculas de inmunoglobulina están formadas por dos cadenas pesadas idénticas y por dos cadenas ligeras idénticas (kappa o lambda).

En los humanos el gen de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas se sitúa en la región telomérica del brazo largo del cromosoma 14 y se expande en una longitud de aproximadamente 1.400.000 pares de bases. Las zonas de este gen que codifican para las regiones constantes de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas forman un continuo situado a 3' del gen con el siguiente orden de 5' a 3': Cµ, Cδ, Cγ3 Cγ1, Cα1, Cγ2, Cγ4, Cε y Cα2.

En la especie humana en los tejidos linfoides normales o reactivos las células productoras de inmunoglobulinas se suelen mostrar en proporciones similares a la distribución sérica de inmunoglobulinas siendo más abundantes las células productoras de IgG, a continuación las células IgA y por último las células IgM, con la excepción de la lámina propia del intestino en donde la inmunoglobulina más abundante es la IgA. Muy pocas células plasmáticas productoras de IgD se observan en los tejidos linfoides con la excepción de las amígdalas nasofaríngeas en donde éstas pueden ser muy abundantes.

En los tumores de linfocitos B, por regla general, únicamente existe un clon que prolifera observándose por lo tanto una única cadena pesada. La detección de monoclonalidad es una de las herramientas más importantes para diferenciar tumores linfoides B de procesos reactivos. La técnica de hibridación in situ supone una ventaja importante frente a la inmunohistoquímica ya que carece virtualmente de fondo y permite una visualización limpia y nítida de la preparación histológica.

FINALIDAD PREVISTA

Para su uso en diagnóstico in Vitro, las Histosondas Cadenas Pesadas de las Inmunoglobulinas son útiles para el estudio de monoclonalidad en los tumores linfoides, en los Síndromes linfoproliferativos, en los mielomas y para el estudio de los síndromes de inmunodeficiencia en donde las células plasmáticas específicas de cadena están ausentes o disminuidas (Por ejemplo, se supone que uno de cada 350 europeos aproximadamente padecen déficit selectivo de IgA).

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Las Histosondas Cadenas Pesadas de las Inmunoglobulinas han sido diseñadas para su utilización en el diagnóstico in vitro para uso profesional, y debe ser manipulado por personal cualificado y debidamente entrenado.

Para la obtención de unos resultados adecuados, debe seguirse fielmente las instrucciones del 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 (NaN₃) 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 para 5 reacciones individuales de la Histosonda Delta o Epsilon, según se indica en la etiqueta. Las Histosondas Cadenas Pesadas de las Inmunoglobulinas consisten en un segmento de ADN de una sola cadena que varía en unas longitudes de 557 a 601 nucleótidos, complementaria al RNA expresado. Estas sondas han sido marcadas con Digoxigenina.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

Los reactivos suministrados se almacenan 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 de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas deberán mostrar una coloración marrón en el citoplasma celular 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, en paralelo con las señales observadas en las muestras de control positivo y control negativo.

LIMITACIONES DEL ENSAYO

Las Histosondas Cadenas Pesadas de las Inmunoglobulinas han sido optimizadas para detectar la expresión de su RNA 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 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.

BIBLIOGRAFÍA

1. Peter J. Delves And Ivan M. Roitt: Immunoglobulin genes. In *ENCYCLOPEDIA OF IMMUNOLOGY*. Pag 1323. Second Edition, ACADEMIC PRESS LIMITED (1998).
2. Cunningham-Rundles C, Bodian C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. *Clin Immunol* 1999;92:34-48
3. Clark JA, Callicot PA, Brenner NA. Selective IgA deficiency in blood donors. *Am J Clin Pathol* 1983; 80:210-213.
4. Notarangelo LD, Duse M, Ugazio AG. Immunodeficiency with hyper IgM (HIM). *Immunodef Rev* 1992;3:101-121

INSTRUCCIONES DE USO

Para la utilización de las sondas marcadas 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.

Accesorios necesarios para el desarrollo del protocolo pero no suministrados con el producto:

Proteína K, Anticuerpo Anti-Digoxigenina, 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% H₂O₂ o 3% H₂O₂ solo : 5mins

3. Lave enérgicamente los portaobjetos con agua destilada, 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 Proteína 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 Proteínasa K e incube en una cámara húmeda exactamente 10mins a temperatura ambiente.
4. Lave enérgicamente con agua destilada.
5. Introduzca los portaobjetos en PBS pH 7.4 durante 2mins.

¡ (Importante: si los cortes han sido tratados previamente con calor en microondas, use la Proteínasa K sólo durante 5 minutos, ya que este tratamiento sensibiliza mucho los tejidos para esta enzima. **Las médulas óseas requieren una digestión 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 las grandes cantidades de dextrano que contiene. 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 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 Anti-Digoxigenina (no suministrado con este producto) e incube en una cámara húmeda durante 30mins a temperatura ambiente.
3. Lave enérgicamente con PBS pH 7.4 y agite en PBS 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, agite en PBS durante 1min.
7. Retire el exceso de buffer de los tejidos y aplique una dilución de Diaminobenzidina (DAB) (no suministrada con este producto) comercial siguiendo las instrucciones del fabricante.
8. Lave con agua destilada.
9. Tiña los cortes brevemente (2-3secs) con hematoxilina Harris diluida al 50% en agua destilada.
10. Lave con agua destilada, deshidrate y haga el montaje de los cristales siguiendo los protocolos habituales del laboratorio.

Fecha de emisión: 23/08/2016



HISTOSONDAS OF THE IMMUNOGLOBULIN HEAVY CHAINS

(DELTA OR EPSILON)

References:

Histosonda Delta Heavy Chain CBM-0007-R5
Histosonda Epsilon Heavy Chain CBM-0008-R5

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

Product classification:
*EU countries
For In Vitro Diagnostics

INTRODUCTION

Competent B lymphocytes immunologically develop from a lymphoid stem cell until they acquire a receptor constituted of a single immunoglobulin molecule specific for a determined antigen. These immunoglobulin molecules are formed by 2 identical heavy chains and 2 identical light chains (kappa or lambda).

In humans the immunoglobulin heavy chains gene is located in the telomeric region of the long arm of chromosome 14 and spans a length of approximately 1400000 base pairs. The zones of this gene that code for the immunoglobulin heavy chain constant regions form a continuum situated at the 3' end of the gene and are ordered in the direction 5' to 3' - Cµ, Cδ, Cγ3 Cγ1, Cα1, Cγ2, Cγ4, Cε y Cα2.

In human normal or reactive lymphoid tissues the immunoglobulin producing cells appear in similar proportions to the seric distribution of immunoglobulins with the IgG cells being more abundant, then the IgA cells and finally the IgM cells, with the exception of the intestinal lamina in which the most abundant immunoglobulin is IgA. Very few plasmatic cells producing IgD are observed in lymphoid tissues with the exception of nasopharyngeal tonsils where they can be more abundant. In the B lymphocyte tumors, as a general rule, only one clone proliferates and therefore only one heavy chain is observed. The detection of monoclonality is one of the most important tools for differentiating B lymphoid tumors from reactive processes.

The "in situ" hybridization technique has an important advantage over immunohistochemistry in that there is virtually no background staining and it permits a clear visualization of the histological preparation.

INTENDED USE

For use in In Vitro Diagnosis.

The Histosondas of the Immunoglobulin Heavy Chains are useful for the study of monoclonality in lymphoid tumours, lymphoproliferative syndromes, myelomas and for the study of immunodeficiency syndromes where the chain-specific plasmatic cells are absent or diminished (supposedly one in every 350 Europeans suffer from selective deficit of IgA).

WARNINGS AND PRECAUTIONS

The Histosondas of the Immunoglobulin Heavy Chains have been designed for professional use in In Vitro Diagnosis 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 (NaN₃). 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 with the necessary amount of Histosonda Delta or Epsilon for developing 5 single reactions.
The Histosondas of the Immunoglobulin Heavy Chains consist of a fragment of single-stranded DNA with a length of between 557 and 601 nucleotides, complementary to expressed RNA. These probes 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. width are sufficient to conduct the study.

INTERPRETATION OF RESULTS

Samples in which immunoglobulin heavy chain expression is observed will show a brownish color in the cell cytoplasm, 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 the positive and negative controls.

ASSAY LIMITATIONS

The Histosondas of the Immunoglobulin Heavy Chains have been optimized to detect RNA expression in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. Their use is not recommended for other types of samples or preparation techniques.

The correct operation of these products 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. Peter J. Delves And Ivan M. Roitt: Immunoglobulin genes. In ENCYCLOPEDIA OF IMMUNOLOGY, Page 1323. Second Edition, ACADEMIC PRESS LIMITED (1998)
2. Cunningham-Rundles C, Bodian C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. Clin Immunol 1999;92:34-48
3. Clark JA, Callicot PA, Brenner NA. Selective IgA deficiency in blood donors. Am J Clin Pathol 1983; 80:210-213.
4. Notarangelo LD, Duse M, Ugazio AG. Immunodeficiency with hyper IgM (HIM). Immunodef Rev 1992;3:101-121

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 Histosonda 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, polímero 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% H₂O₂ or 3% H₂O₂ 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 in the microwave previously 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. It is very important to wash the slides well to ensure the probe solution is completely removed!

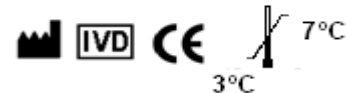
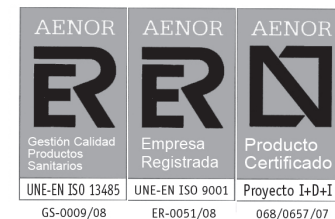
1. Wash the surface of the section vigorously with PBS pH 7.4 to remove the probe.
2. Agitate in PBS for 5mins.

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 pH 7.4, 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 distilled water.
9. Counter stain the sections briefly (2-3secs) with Harris hematoxylin diluted 50% in distilled water.
10. Wash with distilled 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