



HISTOSONDA DUAL KAPPA-LAMBDA

Referencia: CBM-0027-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 la especie humana en los tejidos linfoides normales o reactivos el 60% aproximadamente de los linfocitos B portan cadenas ligeras kappa y el 40% restante cadenas lambda. En los tumores de linfocitos B por regla general únicamente existe un clon que prolifera, ya sea kappa o bien lambda de forma monoclonal. En los humanos el gen que codifica para las cadenas ligeras kappa está situado en el cromosoma 2 y el que codifica para las cadenas ligeras lambda en el 22. Estos genes en la primera mitad 5' poseen las zonas variables para la recombinación génica y en la mitad 3' la zona constante. Únicamente hay un gen funcional para la región constante de las cadenas ligeras k y cuatro genes funcionales para la región constante de las cadenas ligeras λ (CA1, CA2 CA3 y CA7). 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. También es útil para diferenciar células que han adsorbido inmunoglobulinas y por lo tanto detectables por inmunohistoquímica pero que en realidad no la producen como ocurre con las células de Reed-Sternberg en la Enfermedad de Hodgkin.

FINALIDAD PREVISTA

Para su uso en diagnóstico in Vitro. La Histosonda Dual Kappa-Lambda es útil para el estudio de monoclonalidad en los tumores linfoides, en los Síndromes linfoproliferativos, en los mielomas y para el estudio de los síndromes linfoproliferativos asociados a inmunodeficiencia.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

La Histosonda Dual Kappa-Lambda ha sido diseñada para su utilización en el diagnóstico in vitro para uso profesional, y debe ser manipulada 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 de la Histosonda Dual Kappa-Lambda para 5 reacciones individuales. La Histosonda Dual Kappa-Lambda consiste en dos segmentos de ADN de una sola cadena que varía en unas longitudes de 153 a 182 nucleótidos, complementario al RNA expresado. En esta sonda el fragmento de Lambda ha sido marcado con Digoxigenina y el fragmento de Kappa ha sido marcado con Biotina.

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 ligeras de las inmunoglobulinas deberán mostrar una coloración en el citoplasma celular que contrastará sobre el fondo azul-violeta que confiere la tinción con hematoxilina. Este color será marrón en el caso de las cadenas Lambda y de otro color dependiendo del reactivo cromogénico utilizado en el caso de las cadenas Kappa (generalmente rojo o azul). 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

La Histosonda Dual Kappa-Lambda ha sido optimizada para detectar la expresión de su RNAs 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 este 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.

INSTRUCCIONES DE USO

Protocolo recomendado para la utilización de las sondas Histosonda Dual.

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. Las sondas marcadas, de secuencia conocida, se hibridan con sus 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-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 10min 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 Proteína 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 en microondas, use la Proteína 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 Proteína 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. 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

1. Diluya un Anti-Biotina (no suministrado con este producto) hasta la concentración de trabajo (siguiendo las instrucciones del fabricante) con un anticuerpo Anti-Digoxina (no suministrado con este producto).
2. Cubra el tejido con 100µl del mix de anticuerpo primario resultante e incube en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante 30 mins.
3. Lave los portaobjetos con PBS pH 7.4.
4. Cubra los portaobjetos (1-2 gotas) con una mezcla de polímero secundario HRP y AP (no suministrados con este producto) teniendo en cuenta los anticuerpos primarios utilizados en el paso anterior y siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Incube en una cámara húmeda durante 30 mins.
5. Lave los portaobjetos con **TBS pH 7.4**.
6. 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.
7. Aplique la solución de DAB (50 µl) observe la evolución al microscopio.
8. Lave los portaobjetos con **TBS pH 7.4**.
9. Prepare la solución de Fast Red siguiendo las instrucciones del fabricante (normalmente 1.5 µl de Fast Red en 50 µl de sustrato para cada portaobjetos)
10. Aplique la solución de Fast Red (50 µl) y observe la evolución con el microscopio.
11. Lave con agua destilada y **proceda rápidamente** con la tinción (con hematoxilina Harris al 50% en agua destilada mediante tres inmersiones), la deshidratación y el montaje.

Fecha de emisión: 23/08/2016



HISTOSONDA DUAL KAPPA-LAMBDA

Reference: CBM-0027-R5

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

Product classification:
*EU countries
For In Vitro Diagnostics

INTRODUCTION

Immunologically competent B lymphocytes develop from a lymphoid stem cell until acquiring a receptor consisting of a single immunoglobulin molecule specific for a determined antigen. These immunoglobulin molecules are formed by two identical heavy chains and by two identical light chains (kappa or lambda). In humans, in normal or reactive lymphoid tissues, approximately 60% of the B lymphocytes bear kappa light chains and the remaining 40%, lambda light chains. In B lymphocyte tumors, there is generally only one clone that proliferates, be it kappa or lambda, in a monoclonal way. In humans the gene that codes for kappa light chains is located on chromosome 2, and the gene that codes for lambda light chains is located on chromosome 22. The variable regions for genetic recombination are located in the first 5' half of these genes, while the constant regions are located in the 3' half. There is only one functional gene for the constant region of kappa light chains, and four functional genes for the constant region of lambda light chains (CA1, CA2, CA3, and CA7). Detection of monoclonality is one of the most important tools for differentiating B lymphoid tumors from reactive processes.

In situ hybridization technique offers an important advantage over immunohistochemistry, as it virtually lacks background, and allows a clean and sharp viewing of the histological preparation. It is also useful to differentiate cells that have absorbed immunoglobulins, and are therefore detectable by immunohistochemistry, but in fact do not produce immunoglobulin, as occurs with the Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease.

INTENDED USE

For use in In Vitro Diagnosis. Histosonda Dual Kappa-Lambda is useful for the study of monoclonality in lymphoid tumors, lymphoproliferative syndromes, myelomas and for the study of immunodeficiency associated lymphoproliferative syndromes.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

Histosonda Dual Kappa-Lambda has 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.

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

COMPONENTS

1 tube with the necessary amount of Histosonda Dual Kappa-Lambda for developing 5 single reactions. Histosonda Dual Kappa-Lambda consists of two fragments of single-stranded DNA with lengths of 153 and 182 nucleotides that are complementary to expressed RNA. In this probe the Lambda fragment has been labeled with Digoxigenin and the Kappa fragment has been labeled with Biotin.

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 immunoglobulin light chains expression is observed will show color in the cell cytoplasm, which will contrast over the blue-violet background

given by hematoxylin staining. The color will be brown in the case of Lambda light chain, the color for Kappa light chains depends on the choice of chromogenic reagent used (generally red or blue). 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 for expression of this gene.

ASSAY LIMITATIONS

Histosonda Dual Kappa-Lambda 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.

PROCEDURE

Recommended protocol for Histosonda Dual 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 labelled 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, polímero comercial anti-mouse HRP commercial 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

- Heat slides at 62°C for 10mins using a hot plate or incubator.
- Immerse slides in:
 - Xylene: 10 mins
 - Xylene: 5mins
 - Absolute alcohol (ethanol or isopropanol): 1min X 2
 - Alcohol 96%: 1min X 3
 - Methanol containing 0.3% H₂O₂ or 3% H₂O₂ only: 5mins
- 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).

- 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

- Prepare a dilution of any commercial Proteinase K at a work concentration of 0,033mg/ml in PBS pH 7,4.
- Remove excess water from individual slides with tissue paper.
- Cover tissue sections with the 200µl of Proteinase K and incubate in a humid chamber for exactly 10mins at room temp.
- Wash well with distilled water.
- 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

- Remove excess buffer from sections as described previously.
- Add 65µl of probe to the tissue section ensuring the entire section is completely covered and avoiding air bubbles.
- Place the slides in a horizontal position in a humid chamber and close well.
- 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.!

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

5. Revealing the probe

- Dilute an Anti-Biotin (not provided with this product) to working concentration with an Anti-Digoxin antibody (not provided with this product(mouse) following the manufacturer's instructions.
- Cover slides with 100ul of the resulting primary antibody mix and incubate in a humid chamber at room temperature for 30mins.
- Wash the slides with PBS pH 7.4.
- Cover the slides (1-2drops) with secondary HRP and AP cocktail polymer (not provided with this product) attending to the type of the primary antibodies used previously and following the manufacturer's instructions. Incubate in a humid chamber at room temperature for 30mins.
- Wash slides with **TBS pH 7.4**
- Make up DAB solution (not provided with this product) following the manufacturers instructions (normally 1µl DAB in 50µl substrate for each slide)
- Apply DAB solution (50µl) and observe development by light microscope.
- Wash with **TBS pH 7.4**
- Make up Fast Red solution (not provided with this product) following the manufacturer's instructions (normally 1.5µl Fast Red in 50µl substrate for each slide)
- Apply Fast Red solution (50µl) and observe development by light microscope.
- Wash with distilled water and **proceed rapidly** with counterstain (Harris hematoxylin at 50% dilution in distilled water for 3 dips), dehydration and coverslipping.

Emission date: 23/08/2016



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