



HISTOSONDA EBER

Referencia: CBM-0001-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

El virus de Epstein-Barr es un miembro de los gamma-herpes virus (HHV-4). Es un virus lineal de ADN de doble cadena con 184.000 pares de bases. Es el primer virus que se descubrió como oncogénico (1). La primoinfección por este virus puede tener la sintomatología de un cuadro viral leve o bien mostrarse como el cuadro clínico conocido como Mononucleosis Infecciosa. Las células diana más habituales para el virus de Epstein-Barr son el linfocito B y la célula epitelial nasofaríngea. El virus de Epstein-Barr infecta de forma masiva a la población humana y estudios seroepidemiológicos demuestran que el 90% de los humanos adultos han sido infectados por este virus (2). Los linfocitos B infectados de forma latente expresan, entre otros genes, de forma abundante (10^4 - 10^5 copias) una cadena corta de RNA no poliadenilado que no se traduce a proteína y que consta de dos segmentos conocidos como EBER 1 y EBER 2. La expresión de EBER (Epstein-Barr virus encoded RNAs) es nuclear. Aunque básicamente se desconoce la función de EBER se piensa que puede tener un papel en la oncogénesis producida por el virus (3). Los tumores humanos relacionados con el EBV son numerosos y varían desde el Carcinoma Nasofaríngeo Indiferenciado hasta el Linfoma de Burkitt africano, la Enfermedad de Hodgkin Celularidad Mixta, algunos linfomas B, T y NK y en procesos linfoproliferativos asociados a inmunodeficiencia (4).

FINALIDAD PREVISTA

Para uso en el Diagnóstico In Vitro.
La Histosonda EBER está indicada para la detección del ARN de EBER 1+2 en células infectadas por el virus de Epstein-Barr tanto en células reactivas como tumorales estando indicado su uso en los tumores anteriormente citados así como en ganglios linfáticos de pacientes con patología reactiva atípica producida por Mononucleosis Infecciosa. 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 EBER 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 (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 EBER para 5 reacciones individuales.
La Histosonda EBER consiste en un segmento de ADN de una sola cadena de 527 nucleótidos, complementaria al EBER expresado. Esta sonda detecta al gen EBER en su totalidad incluyendo EBER 1 y EBER 2. El DNA de la sonda contiene nucleótidos que han sido marcados 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

Al igual que para el control positivo, las muestras en las que se observe expresión de EBER deberán mostrar una coloración marrón en el núcleo celular que contras-

tará 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 para la expresión de este gen.

LIMITACIONES DEL ENSAYO

La Histosonda EBER ha sido optimizada para detectar la expresión de EBER 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) Gómez-Román J.J, Martínez M.N, Fernández S.L, Val-Bernal J.F. Epstein-Barr virus-associated adenocarcinomas and squamous-cell lung carcinomas. *Modern Pathology* (2009) 22, 530-537
- 2) Domínguez-Duran E, et al. Laryngeal Lymphomatoid Granulomatosis in a HIV Patient. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011. doi: 10.1016/j.eimc.2011.02.017
- 3) Koletska T, et al. Synchronous Presence of Nasopharyngeal Carcinoma and Marginal Zone (MALT-Type) B-Cell Lymphoma in the Pharynx. *Pathology Research International* (2011) doi:10.4061/2011/340763
- 4) Epstein M, Achong B, Barr Y. Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblast from Burkitt's lymphoma. *J.Exp.Med.* 1965; 121:761-770.
- 5) Henle G, Henle W, Clifford P, et al. Antibodies to EB virus in Burkitt's lymphoma and control groups. *J. Nat. Cancer Inst.* 1969; 43: 1147-1157.
- 6) Komano, J.S, Maruo, K, Kurozumi, T, Oda, K, Takada. 1999. Oncogenic role of Epstein-Barr virus encoded RNAs in Burkitt's lymphoma cell line Akata. *J. Virol* 73: 9827-31.
- 7) Elaine S. Jaffe, Nancy Lee Harris, Harald Stein, James W. Vardiman. 2001. Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (World Health Organization Classification of Tumours). IARC Press. Chapters 6,7,8.

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:
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% H_2O_2 o 3% H_2O_2 solo : 5mins

3. Lave energícamente los portaobjetos con agua destilada y 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 transféralos 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 Proteínasa K e incube en una cámara húmeda exactamente 10mins a temperatura ambiente.
4. Lave energícamente 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 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 la 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

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 energícamente con PBS, y agite 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, 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 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



HISTOSONDA EBER

Reference: CBM-0001-R5

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

Product classification:
*EU countries
For In Vitro Diagnostics

INTRODUCTION

The Epstein-Barr virus is a member of the gamma-herpes viruses (HHV-4). It is a linear 184,000 base pairs double stranded DNA virus and was the first virus to be discovered as oncogenic (1).

Primoinfection by this virus can show signs of a slight viral infection or it can present as Infectious Mononucleosis. The most common target cells for the Epstein-Barr virus are the B lymphocyte and nasopharyngeal epithelial cell. The Epstein-Barr virus massively infects the human population and sero-epidemiological studies show that 90% of adults have been infected by this virus (2).

Latently infected B lymphocytes express abundantly (10^4 - 10^5 copies), among other genes, a short non-polyadenylated chain of RNA that does not transduce to a protein, consisting of two fragments known as EBER 1 and EBER 2. The expression of EBER (Epstein-Barr virus encoded RNAs) is nuclear. Although the function of EBER is unknown, it is believed that it may play a role in virus-produced oncogenesis (3).

There are numerous human tumors associated with EBV, ranging from non-differentiated nasopharyngeal carcinoma to African Burkitt's lymphoma, Hodgkin's disease Mixed cellularity, some B, T and NK lymphomas, as well as in lymphoproliferative processes associated with immunodeficiency(4).

INTENDED USE

For use in In Vitro Diagnosis. Histosonda EBER is intended for the detection of EBER 1+2 RNA in cells infected by the Epstein-Barr virus, both in reactive and tumoral cells. Its use is intended for the aforementioned tumors, as well as in lymph nodes of patients with atypical reactive pathology as produced by Infectious Mononucleosis. This detection is carried out by in situ hybridization in paraffin-embedded, formalin-fixed histological sections.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

Histosonda EBER 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.

This product contains sodium azide as a preservative (NaN_3). 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 EBER for developing 5 single reactions.

Histosonda EBER consists of a fragment of single stranded DNA of 527 nucleotides, complementary to expressed EBER. This probe detects the EBER gene in full, including EBER 1 and EBER 2. The DNA of the probe 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 EBER expression is observed will show a brownish color in cell nucleus, 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

Histosonda EBER 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) Gómez-Román J.J, Martínez M.N, Fernández S.L, Val-Bernal J.F. Epstein-Barr virus-associated adenocarcinomas and squamous-cell lung carcinomas. *Modern Pathology* (2009) 22, 530-537
- 2) Domínguez-Duran E, et al. Laryngeal Lymphomatoid Granulomatosis in a HIV Patient. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011. doi: 10.1016/j.eimc.2011.02.017
- 3) Koletska T, et al. Synchronous Presence of Nasopharyngeal Carcinoma and Marginal Zone (MALT-Type) B-Cell Lymphoma in the Pharynx. *Pathology Research International* (2011) doi:10.4061/2011/340763
- 4) Epstein M, Achong B, Barr Y. Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblast from Burkitt's lymphoma. *J.Exp.Med.* 1965; 121:761-770.
- 5) Henle G, Henle W, Clifford P, et al. Antibodies to EB virus in Burkitt's lymphoma and control groups. *J. Nat. Cancer Inst.* 1969; 43: 1147-1157.
- 6) Komano J.S. Maruo K. Kurozumi T. Oda K. Takada. 1999. Oncogenic role of Epstein-Barr virus encoded RNAs in Burkitt's lymphoma cell line Akata. *J. Virol* 73: 9827-31.
- 7) Elaine S. Jaffe, Nancy Lee Harris, Harald Stein, James W. Vardiman. 2001. Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (World Health Organization Classification of Tumours). IARC Press. Chapters 6,7,8.

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, 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% H_2O_2 or 3% H_2O_2 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, agitate in PBS 1min.
7. Remove excess buffer from sections and apply commercial Diaminobenzidine (DAB) 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