



HISTOSONDA CADENAS ALFA DE LA HEMOGLOBINA

Referencia: CBM-0002-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

Las células eritroides son las únicas dedicadas a la producción de hemoglobina. En condiciones normales las células eritroides están ubicadas exclusivamente en la médula ósea de los adultos, pero en los períodos embrionarios, fetales y también en algunos procesos como la mielofibrosis hay hematopoyesis extramedular, generalmente en el bazo y en el hígado. También hay algunos tumores benignos, como el mielolipoma de la glándula suprarrenal y de los tejidos blandos donde hay eritropoyesis ectópica.

La serie eritroide es relativamente difícil de diferenciar en las biopsias habituales de médula ósea y más aún en el bazo y el hígado. En biopsias donde hay eritropoyesis atípica como es el caso de las anemias megaloblásticas, de los Síndromes Mielodisplásicos y de las Eritroleucemias es muy difícil de reconocer.

Hasta el momento actual la forma de diferenciar la serie eritroide era utilizando anticuerpos contra la hemoglobina o anticuerpos contra la Glicoforina A. El principal problema de estas técnicas de inmunohistoquímica es que también tiñen los eritrocitos ofreciendo de esta forma un fondo difuso que complica la observación histológica.

La Histosonda α -hemoglobina únicamente detecta aquellas células que sintetizan ARN de las cadenas alfa de la hemoglobina y por lo tanto sólo tiñen células nucleadas con la excepción de los escasos reticulocitos (hematíes precoces que aún conservan ARN de la globina) que puedan quedar en el tejido.

La hemoglobina es una molécula donde cuatro cadenas de globina se unen a un grupo HEM. Hay muchos tipos de hemoglobinas (Adulta, Fetal, Embrionaria, etc) pero todas ellas tienen dos cadenas de alfa-globina.

FINALIDAD PREVISTA

Para su uso en diagnóstico In Vitro.

La Histosonda Cadenas Alfa de la Hemoglobina es útil para la detección de las células eritroides en cualquier tejido y cuando su morfología está alterada por algunos de los procesos patológicos anteriormente mencionados.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

La Histosonda Cadenas Alfa de la Hemoglobina 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 suficiente de la Histosonda Cadenas Alfa de la Hemoglobina para 5 reacciones individuales.

La Histosonda Cadenas Alfa de la Hemoglobina consiste en un segmento de ADN de una sola cadena que tiene una longitud de 158 nucleótidos, complementario al ARN expresado. Esta sonda ha sido marcada 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 Cadenas Alfa de la Hemoglobina 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 para la expresión de este gen.

LIMITACIONES DEL ENSAYO

La Histosonda Cadenas Alfa de la Hemoglobina ha sido optimizada 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

Barbara J. Bain, David M. Clark, Irvin A. Lampert, Brodget S. Wilkins (2001): Bone Marrow Pathology. Third edition. Pag.67. Blackwell Science. Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology. Oxford University Press (1997). Pag 294

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 enérgicamente 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 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 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 165µl de sonda al corte asegurándose de que todo el tejido quede 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 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 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 y 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.
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 HEMOGLOBIN ALPHA CHAIN

Reference: CBM-0002-R5

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

Product classification:

*EU countries
For In Vitro Diagnostics

INTRODUCTION

Erythroid cells are the only cells that produce hemoglobin. Under normal conditions erythroid cells are located exclusively in adult bone marrow, but during embryonic and fetal periods (as well as in some processes such as myelofibrosis) there is extra medullary hematopoiesis, generally in the spleen and liver. There are some benign tumors such as myelolipoma of the suprarenal gland and soft tissues, in which ectopic erythropoiesis appears. The erythroid series is relatively difficult to differentiate in normal bone marrow biopsies and even more so in the spleen and liver. It can be very difficult to recognize in biopsies when there is atypical erythropoiesis, such as megaloblastic anemia, Myelodysplastic syndromes and erythroleukemias.

Until now, it has been necessary to use anti-hemoglobin or anti-Glycophorin A antibodies to differentiate the erythroid series. The main problem with these immunohistochemistry techniques is that they also stain erythrocytes, giving a diffuse background that complicates the histological observation. Our probes detect only those cells that synthesize RNA from alpha chain hemoglobin, so only nucleated cells are stained, not counting the scarce reticulocytes (early-stage red cells that still have globin RNA) that may still be in the tissue.

Hemoglobin is a molecule in which four globin chains are bound to a HEM group. There are many types of hemoglobins (Adult, fetal, embryonic, etc) but all of them have two alpha globin chains.

INTENDED USE

For use in In Vitro Diagnosis

The Histosonda Hemoglobin Alpha Chain is useful for erythroid cell detection in any tissue, as well as when its morphology is altered by some of the aforementioned pathological processes.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

Histosonda Hemoglobin Alpha Chain 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 (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 Hemoglobin Alpha Chain for developing 5 single reactions.

Histosonda Hemoglobin Alpha Chain consists of a fragment of single-stranded DNA with a length of 158 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.

INTERPRETATION OF RESULTS

Samples in which Hemoglobin Alpha 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

Histosonda Hemoglobin Alpha Chain 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

Barbara J. Bain, David M. Clark, Irvin A. Lampert, Bridget S. Wilkins (2001): Bone Marrow Pathology. Third edition. Page.67. Blackwell Science. Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology. Oxford University Press (1997). Page 294

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% 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 distilled 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 and 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 and 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