

BOND Ready-to-Use ISH CMV Probe

Catalog No: **PB0614**

Leica Biosystems Newcastle Ltd
Balliol Business Park
Benton Lane
Newcastle Upon Tyne NE12 8EW
United Kingdom
☎ +44 191 215 4242



[EN](#) [FR](#) [IT](#) [DE](#) [ES](#) [PT](#) [SV](#) [EL](#) [DA](#) [NL](#)
[NO](#) [TR](#) [BG](#) [HU](#) [RO](#) [RU](#) [PL](#) [SL](#) [CS](#) [SK](#) [AR](#)

Instructions for Use

Please read before using this product.

Mode d'emploi

À lire avant d'utiliser ce produit.

Istruzioni per L'uso

Si prega di leggere, prima di usare il prodotto.

Gebrauchsanweisung

Bitte vor der Verwendung dieses Produkts lesen.

Instrucciones de Uso

Por favor, leer antes de utilizar este producto.

Instruções de Utilização

Leia estas instruções antes de utilizar este produto.

Instruktioner vid Användning

Var god läs innan ni använder produkten.

Οδηγίες Χρήσης

Παρακαλούμε διαβάστε τις οδηγίες πριν χρησιμοποιήσετε το προϊόν αυτό.

Brugsanvisning

Læs venligst før produktet tages i brug.

Gebruiksaanwijzing

Lezen vóór gebruik van dit product.

Brugsanvisning

Vennligst les denne før du bruker produktet.

Kullanım Talimatları

Lütfen bu ürünü kullanmadan önce okuyunuz.

Инструкции за употреба

Моля, прочетете преди употреба на този продукт.

Használati utasítás

A termék használatba vétele előtt olvassa el.

Instrucțiuni de utilizare

Citiți aceste instrucțiuni înainte de a utiliza produsul.

Инструкция по применению

Прочтите перед применением этого продукта.

Instrukcja obsługi

Przed użyciem tego produktu należy przeczytać instrukcję.

Navodila za uporabo

Preberite pred uporabo tega izdelka.

Návod k použití

Čtěte před použitím tohoto výrobku.

Návod na použitie

Prosím, prečítajte si ho pred použitím produktov.

إرشادات الاستعمال

يُرجى القراءة قبل استخدام هذا المنتج.

Check the integrity of the packaging before use.

Vérifier que le conditionnement est en bon état avant l'emploi.

Prima dell'uso, controllare l'integrità della confezione.

Vor dem Gebrauch die Verpackung auf

Unversehrtheit überprüfen.

Comprobar la integridad del envase, antes de usarlo.

Verifique a integridade da embalagem antes de utilizar o produto.

Kontrollera att paketet är obrutet innan användning.

Ελέγξτε την ακεραιότητα της συσκευασίας πριν από τη χρήση.

Kontroller, at pakken er ubeskadiget før brug.

Controleer de verpakking vóór gebruik.

Sjekk at pakningen er intakt før bruk.

Kullanmadan önce ambalajın bozulmamış olmasını kontrol edin.

Проверете целостта на опаковката преди употреба.

Használat előtt ellenőrizze a csomagolás épségét.

Verificatiți integritatea ambalajului înainte de a utiliza produsul.

Перед применением убедитесь в целостности упаковки.

Przed użyciem należy sprawdzić, czy opakowanie jest szczelne.

Pred uporabo preverite celovitost embalaže.

Před použitím zkontrolujte neporušenost obalu.

Pre použitím skontrolujte, či balenie nie je porušené.
تحقق من سلامة العبوة قبل الاستخدام.

BOND Ready-to-Use ISH

CMV Probe

Catalog No: PB0614

Intended Use

This reagent is for *in vitro* diagnostic use.

CMV Probe is intended to be used for the qualitative identification of human cytomegalovirus early gene RNA transcript, in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue by *in situ* hybridization (ISH) using the automated BOND system (includes Leica BOND-MAX system and Leica BOND-III system).

The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies and proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Summary and Explanation

Cytomegalovirus (CMV) is a member of the Beta Herpes Virus family. CMV is transmitted via body fluids and can establish primary infection, latent infection and subsequent viral reactivation. CMV can establish infection in many organs including lung, kidney and liver, in particular, active virus has been observed in epithelial cells, endothelial cells, fibroblasts and smooth muscle cells as well as in mesenchymal cells, hepatocytes, granulocytes and monocyte-derived macrophages¹.

During active CMV infection, there is temporal synthesis of three categories of proteins, encoded by viral genes designated intermediate-early, early and late. Intermediate-early proteins are expressed 1-3 hours post infection and are thought to play a role in the efficiency of viral replication. Early proteins direct viral synthesis, while late proteins are mainly structural, involved in virion assembly.

CMV is a common opportunistic pathogen, capable of causing serious disease in immunocompromised individuals such as AIDS patients, transplant patients and in neonates. Congenital CMV is a result of intrauterine infection and although the majority of children are asymptomatic, congenital CMV can result in sensorineural hearing loss, cognitive, motor and visual deficits and seizures²⁻⁴.

ISH using CMV Probe is used for the detection of human CMV infections in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue⁵. The method is reproducible and should result in intense, brown predominately cytoplasmic staining of cells containing CMV early gene RNA.

Reagents Provided

CMV Probe is a fluorescein-conjugated oligonucleotide probe supplied in hybridization solution.

Total volume = 5.5 mL

Dilution and Mixing

CMV Probe is ready to use. Reconstitution, mixing, dilution or titration of this reagent is not required.

Materials Needed but not Provided

Refer to "Using BOND Reagents" in your BOND user documentation for a complete list of materials required for specimen treatment and *in situ* hybridization staining using the BOND system (includes Leica BOND-MAX system and Leica BOND-III system).

Storage and Stability

Store at 2–8 °C. The product is stable under these conditions up to the expiry date indicated on the container label.

There are no obvious signs indicating contamination and/or instability. Appropriate positive and negative tissue controls should be run at the same time as test tissue.

Return to 2–8 °C immediately after use.

Storage conditions other than those specified above must be verified by the user⁶.

Precautions

- This product is intended for *in vitro* diagnostic use.

CMV PROBE

Contains Formamide (<50%) and Dextran Sulphate (<30%).

GHS07: Exclamation mark.

GHS08: Health hazard.

Signal words: Danger.

H360D: May damage the unborn child.

H315: Causes skin irritation.

H319: Causes serious eye irritation.

P201: Obtain special instructions before use.

P202: Do not handle until all safety precautions have been read and understood.

P260: Do not breathe dust/fumes/gas/mist/vapours/spray.

P308+313: IF exposed or concerned: Get medical advice/attention.

P314: Get medical advice/attention if you feel unwell.

P264: Wash hands thoroughly after handling.

P280: Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.

P305+351+338: IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

P337+313: If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

P302+352: IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.

P332+313: If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.

P362+364: Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

Restricted to professional users.

- To obtain a copy of the Material Safety Data Sheet contact your local distributor or regional office of Leica Biosystems, or alternatively, visit the Leica Biosystems' Web site, www.LeicaBiosystems.com.
- Specimens, before and after fixation, and all materials exposed to them, should be handled as if capable of transmitting infection and disposed of with proper precautions. Never pipette reagents by mouth and avoid contacting the skin and mucous membranes with reagents or specimens. If reagents or specimens come in contact with sensitive areas, wash with copious amounts of water. Seek medical advice.
- Consult Federal, State or local regulations for disposal of any potentially toxic components.
- Minimize microbial contamination of reagents or an increase in non-specific staining may occur.
- Retrieval, incubation times or temperatures other than those specified may give erroneous results. Any such change must be validated by the user.

Instructions for Use

CMV Probe was developed for use on the automated BOND system (includes Leica BOND-MAX system and Leica BOND-III system) in combination with Anti-Fluorescein Antibody and BOND Polymer Refine Detection. The recommended staining protocol for CMV Probe is ISH Protocol A. Enzyme retrieval is recommended using the BOND Enzyme Pretreatment Kit, Enzyme 1, for 15 minutes.

Appropriate tissue and reagent controls should always be used. The protocol for the tissue and reagent controls should correspond to that of the CMV Probe.

Quality Control

Differences in tissue processing and technical procedures in the user's laboratory may produce significant variability in results, necessitating regular performance of in-house controls in addition to the following procedures.

Positive Tissue Control

Used to indicate correctly prepared tissues and proper staining techniques.

One positive tissue control should be included for each set of test conditions in each staining run. A tissue with weak positive staining is more suitable than a tissue with strong positive staining for optimal quality control and to detect minor levels of reagent degradation.

Negative Tissue Control

Should be examined after the positive tissue control to verify the specificity of the labeling of probe to the target.

Alternatively, the variety of different cell types present in most tissue sections frequently offers negative control sites, but this should be verified by the user.

Negative Reagent Control

Use RNA Negative Control Probe PB0809 in place of the CMV Probe with a section of each patient specimen to evaluate non-specific staining and allow better interpretation of specific staining at the target.

Positive Reagent Control

Use RNA Positive Control Probe PB0785 in place of the CMV Probe with a section of each patient specimen to provide information on the preservation of nucleic acids in the tissue as well as accessibility of nucleic acids to the probe. If the RNA Positive Control Probe fails to demonstrate positive staining, results with the test specimens should be considered invalid.

Patient Tissue

Examine patient specimens stained with CMV Probe last. Positive staining intensity should be assessed within the context of any non-specific background staining of the RNA Negative Control Probe PB0809.

Results Expected

Normal Tissues

No specific CMV mRNA staining was detected using PB0614 in a wide range of normal tissues. Faint staining was detected in epithelial cells of the thyroid, prostate, larynx, and esophagus, tubules of the kidney, secretory cells in the adrenal glands and Leydig cells. This staining does not interfere with staining interpretation. (Total number of normal cases evaluated = 100).

Abnormal Tissues

PB0614 stained 3/3 CMV infected lung, 1/1 CMV infected bowel and 1/1 CMV infected liver. No staining was seen in lung tumors (0/3), ovarian tumors (0/3), liver tumors (0/3), thyroid tumors (0/3), esophageal tumors (0/2), breast tumors (0/2), metastatic tumors of unknown origin (0/2), brain tumors (0/2), testicular tumors (0/2), skin tumors (0/2), a colon tumor (0/1), a stomach tumor (0/1), a rectal tumor (0/1), a tumor of the larynx (0/1) and a tumor of the thymus (0/1). (Total number of abnormal cases evaluated = 34).

PB0614 is recommended for the detection of CMV mRNA.

Product Specific Limitations

CMV Probe has been optimized at Leica Biosystems for use with Anti-Fluorescein Antibody, BOND Polymer Refine Detection and BOND ancillary reagents. Users who deviate from recommended test procedures must accept responsibility for interpretation of patient results under these circumstances. The protocol times may vary, due to variation in tissue fixation and the effectiveness of enzymatic digestion, and must be determined empirically. RNA Negative Control Probe should be used when optimising retrieval conditions and protocol times.

Troubleshooting

Reference 8 may aid in remedial action.

Test samples should be complemented by the appropriate tissue and reagent controls.

Contact your local distributor or the regional office of Leica Biosystems to report unusual staining.

Further Information

Further information on *in situ* hybridization with BOND reagents, under the headings Principle of the Procedure, Materials Required, Specimen Preparation, Quality Control, Assay Verification, Interpretation of Staining, Key to Symbols on Labels, and General Limitations can be found in "Using BOND Reagents" in your BOND user documentation.

References

1. Bissinger, A.L., Singzer, C., Kaiserling, E. and Jahn, G., 2002. Human cytomegalovirus as a direct pathogen: correlation of multiorgan involvement and cell distribution with clinical and pathological findings in a case of congenital inclusion disease. *Journal of Medical Virology* 67, pp. 200—206
2. Pass RF, Fowler KB, Boppana SB et al. Congenital CMV infection following first trimester maternal infection: Symptoms at birth and outcomes. *Journal of Clinical Virology* 2006;35:216—220.
3. Singh N. Cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients: new challenges and their implications for preventive strategies. *Journal of Clinical Virology*. 2006 Apr;35(4):474—7.
4. Erice A Tierney C Hirsch M Caliendo et al. AIDS Clinical Trials Group Protocol 360 Study Team. Cytomegalovirus (CMV) and human immunodeficiency virus (HIV) burden, CMV end-organ disease, and survival in subjects with advanced HIV infection (AIDS Clinical Trials Group Protocol 360). *Clinical Infectious Diseases*. 2003;37(4):567—78
5. TC Wu, WA Lee, MC Pizzorno et al. Localization of the human cytomegalovirus 2.7-kb major early beta-gene transcripts by RNA *in situ* hybridization in permissive and nonpermissive infections. *American Journal of Pathology*. 1992 141: 1247—1254.
6. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
7. Villanova PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. 1991; 7(9). Order code M29-P.
8. Wilkinson DG. The theory and practice of *in situ* hybridization. In: Wilkinson DG. (ed.) *In situ* Hybridization A practical approach. 2nd Edition. New York: Oxford University Press, 1998, pp.18—20.

Date of Issue

26 February 2020

BOND Ready-to-Use ISH

CMV Probe

Référence: PB0614

Utilisation Prévue

Ce réactif est destiné au diagnostic *in vitro*.

CMV Probe est conçue pour l'identification qualitative du transcrite ARN du gène précoce du cytomégalo virus humain par hybridation *in situ* (ISH) automatisée BOND (qui comprend les systèmes Leica BOND-MAX et Leica BOND-III) sur tissu fixé à la formaline et enrobé de paraffine.

L'interprétation clinique de tout marquage ou de son absence doit être complétée par des études morphologiques utilisant des contrôles appropriés et évaluée dans le contexte des antécédents cliniques du patient et des autres tests diagnostiques par un pathologiste qualifié.

Résumé et Explications

Le cytomégalo virus (CMV) est un membre de la famille des virus de l'herpès bêta. Le CMV se transmet par les liquides corporels et peut aisément entraîner une primo-infection, une infection latente et une réactivation virale ultérieure. Le CMV peut entraîner une infection dans de nombreux organes, notamment les poumons, les reins et le foie. En particulier, une activité virale a été observée dans les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les fibroblastes et les cellules musculaires lisses, ainsi que dans les cellules mésenchymateuses, hépatocytes, granulocytes et macrophages dérivés des monocytes¹.

Durant une infection évolutive par le CMV, il se produit une synthèse de trois catégories de protéines successives dans le temps, codées par des gènes viraux qualifiés de précoces-intermédiaires, précoces et tardifs. Les protéines précoces-intermédiaires sont exprimées 1 à 3 heures après l'infection et interviendraient dans l'efficacité de la réplication virale. Les protéines précoces commandent la synthèse virale, tandis que les protéines tardives sont principalement structurales et interviennent dans l'assemblage du virion.

Le CMV est un agent pathogène opportuniste courant, capable d'entraîner une maladie grave chez des personnes immunodéprimées comme les malades du sida, les transplantés et les nouveaux-nés. L'infection congénitale par le CMV résulte d'une infection intra-utérine. Bien que la plupart des enfants sont asymptomatiques, le CMV congénital peut entraîner une surdité de perception, des déficits cognitifs, moteurs et visuels, ainsi que des crises convulsives²⁻⁴.

L'ISH avec CMV Probe s'utilise pour la détection des infections par le CMV chez l'homme sur tissu fixé à la formaline et enrobé de paraffine⁵. La méthode est reproductible et devrait se traduire par un marquage principalement cytoplasmique marron intense des cellules contenant de l'ARN de gène précoce du CMV.

Réactifs Fournis

CMV Probe est une sonde oligonucléotidique conjuguée à la fluorescéine fournie en solution d'hybridation.

Volume total = 5,5 ml

Dilution et Mélange

CMV Probe est prête à l'emploi. Reconstitution, mélange, dilution ou titration de ce réactif non nécessaire.

Matériel Nécessaire Non Fourni

Voir "Utilisation des réactifs BOND" dans votre manuel d'utilisation BOND pour obtenir la liste complète du matériel nécessaire au traitement des échantillons et au marquage par hybridation *in situ* avec automatisée BOND (qui comprend les systèmes Leica BOND-MAX et Leica BOND-III).

Conservation et Stabilité

Conserver entre 2–8 °C. Le produit reste stable dans ces conditions jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette du récipient.

Il n'y a aucun signe évident indiquant une contamination et/ou une instabilité. Des contrôles tissulaires positifs et négatifs appropriés doivent être testés en même temps que le tissu analysé.

Remettre à 2–8 °C immédiatement après usage.

Des conditions de stockage différentes de celles ci-dessus doivent être contrôlées par l'utilisateur⁶.

Précautions

- Ce produit est conçu pour le diagnostic *in vitro*.

CMV PROBE

Contient Formamide (<50%) et le sulfate de dextran (<30%).
GHS07: Point d'exclamation.
GHS08: Danger pour la santé.
Mentions d'avertissement:
Danger.

H360D: Peut nuire au fœtus.
H315: Provoque une irritation cutanée.
H319: Provoque une sévère irritation des yeux.

P201: Se procurer les instructions avant utilisation.
P202: Ne pas manipuler avant d'avoir lu et compris toutes les précautions de sécurité.
P260: Ne pas respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols.
P308+313: EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée: consulter un médecin.
P314: Consulter un médecin en cas de malaise.
P264: Se laver les mains soigneusement après manipulation.
P280: Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
P305+351+338: EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.
P337+313: Si l'irritation oculaire persiste: consulter un médecin.
P302+352: EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: laver abondamment à l'eau et au savon.
P332+313: En cas d'irritation cutanée: consulter un médecin.
P362+364: Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation.
Usage réservé aux professionnels.

- Pour obtenir une copie de la fiche technique des substances dangereuses, contactez votre distributeur local ou le bureau régional de Leica Biosystems, ou allez sur le site Web de Leica Biosystems, www.LeicaBiosystems.com.
- Les échantillons, avant et après fixation, et tous les matériels ayant été en contact avec eux, devraient être manipulés comme s'ils étaient à risque infectieux et éliminés avec les précautions adéquates. Ne jamais pipeter les réactifs à la bouche et éviter le contact de la peau et des muqueuses avec les réactifs ou les échantillons. Si des réactifs ou des échantillons entrent en contact avec des zones sensibles, rincer abondamment à l'eau. Consultez un médecin.
- Renseignez-vous sur les règlements fédéraux, nationaux et locaux pour l'élimination des composés potentiellement toxiques.
- Éviter une contamination microbienne des échantillons qui peut entraîner un marquage non spécifique.
- Des durées ou températures de révélation ou d'incubation autres que celles spécifiées peuvent donner des résultats erronés. Tout changement doit être validé par l'utilisateur.

Mode D'emploi

CMV Probe a été développé pour être utilisé sur le système BOND automatisé (qui comprend les systèmes Leica BOND-MAX et Leica BOND-III) en association avec Anti-Fluorescein Antibody, BOND Polymer Refine Detection et les réactifs auxiliaires BOND. Le protocole de coloration recommandé pour CMV Probe est ISH Protocol A. Un prétraitement enzymatique est recommandé avec BOND Enzyme Pretreatment Kit, Enzyme 1, pendant 15 minutes.

Des contrôles appropriés de tissu et de réactif doivent toujours être employés. Le protocole relatif aux contrôles de tissu et de réactif doit correspondre à celui du CMV Probe.

Contrôle de qualité

Des différences de traitement des tissus et de procédures techniques dans le laboratoire de l'utilisateur sont susceptibles de conduire à une variabilité significative des résultats, ce qui rend nécessaire la mise en œuvre régulière de contrôles en interne, en plus des procédures suivantes.

Contrôle positif du tissu

Il est utilisé pour indiquer que les tissus ont été préparés correctement et que les techniques de marquage sont appropriées. Un contrôle positif du tissu doit être inclus pour chaque série de conditions d'essais et pour chaque essai de marquage. Un tissu présentant un marquage faiblement positif est plus adapté à un contrôle optimal de qualité qu'un tissu présentant un marquage fortement positif, il permet également de détecter des niveaux moindres de dégradation du réactif.

Contrôle négatif du tissu

Il doit être examiné après le contrôle positif du tissu afin de vérifier la spécificité du marquage de la sonde vers le site cible.

La diversité des différents types cellulaires présents dans la plupart des coupes tissulaires permet fréquemment de disposer de sites de contrôle négatif, mais cette possibilité doit être vérifiée par l'utilisateur.

Contrôle négatif du réactif

Utiliser RNA Negative Control Probe PB0809 à la place de CMV Probe avec une coupe de chaque échantillon du patient afin d'évaluer le marquage non spécifique et de permettre une meilleure interprétation du marquage spécifique au niveau du site cible.

Contrôle positif du réactif

Utiliser RNA Positive Control Probe PB0785 à la place de CMV Probe avec une coupe de chaque échantillon du patient afin d'obtenir des informations sur la préservation des acides nucléiques dans le tissu ainsi que la pénétrabilité des acides nucléiques vis-à-vis de la sonde. Si RNA Positive Control Probe ne présente pas de marquage positif, les résultats des échantillons d'essai doivent être considérés comme invalides.

Tissu du patient

Examiner les échantillons du patient marqués avec CMV Probe en dernier. L'intensité du marquage positif ne doit être évaluée que par rapport au marquage non spécifique obtenu avec RNA Negative Control Probe PB0809.

Résultats Attendus

Tissus sains

Aucune coloration spécifique de l'ARNm avec CMV n'a été détectée à l'aide de PB0614 dans un grand nombre de tissus normaux. Une légère coloration a été détectée dans les cellules épithéliales de la thyroïde, de la prostate, du larynx et de l'œsophage, des tubules du rein, des cellules sécrétrices dans les glandes surrénales et les cellules de Leydig. Cette coloration ne gêne pas l'interprétation de la coloration. (Nombre total de cas normaux évalués = 100).

Tissus tumoraux

PB0614 a coloré 3/3 CMV d'un poumon infecté, 1/1 CMV d'un intestin infecté et 1/1 CMV de foie infecté. Aucune coloration n'a été observée dans les tumeurs pulmonaires (0/3), tumeurs ovariennes (0/3), tumeurs du foie (0/3), tumeurs de la thyroïde (0/3), tumeurs de l'œsophage (0/2), tumeurs mammaires (0/2), tumeurs métastatiques d'origine inconnue (0/2), tumeurs du cerveau (0/2), tumeurs testiculaires (0/2), tumeurs de la peau (0/2), une tumeur du côlon (0/1), une tumeur de l'estomac (0/1), une tumeur rectale (0/1), une tumeur du larynx (0/1) et une tumeur du thymus (0/1). (Nombre total de cas anormaux évalués = 34).

PB0614 est recommandé pour la détection de l'ARNm avec CMV.

Limites Spécifiques du Produit

CMV Probe a été optimisée chez Leica Biosystems pour une utilisation avec Anti-Fluorescein Antibody, BOND Polymer Refine Detection et les réactifs auxiliaires BOND. Les utilisateurs qui ne respectent pas les procédures de test recommandées prennent la responsabilité de l'interprétation des résultats des patients dans ces conditions. Les durées du protocole doivent être déterminées empiriquement, à cause des variations de fixation des tissus et de l'efficacité de la digestion enzymatique. RNA Negative Control Probe devrait être réalisés lors de l'optimisation des conditions de révélation et des durées du protocole.

Dépannage

La référence 8 peut faciliter les mesures correctrices.

Les échantillons testés doivent être analysés avec les tissus et les contrôles appropriés.

Prenez contact avec votre distributeur local ou avec le bureau régional de Leica Biosystems pour signaler tout marquage inattendu.

Informations Complémentaires

Des informations complémentaires sur l'hybridation *in situ* avec les réactifs BOND, les principes de la procédure, le matériel requis, la préparation des échantillons, les contrôles qualité, les vérifications d'analyse, l'interprétation du marquage, les légendes et symboles sur les étiquettes et les limitations générales peuvent être trouvées dans "Utilisation des réactifs BOND" dans votre manuel d'utilisation BOND.

Références

1. Bissinger, A.L., Singzer, C., Kaiserling, E. and Jahn, G., 2002. Human cytomegalovirus as a direct pathogen: correlation of multiorgan involvement and cell distribution with clinical and pathological findings in a case of congenital inclusion disease. *Journal of Medical Virology* 67, pp. 200—206
2. Pass RF, Fowler KB, Boppana SB et al. Congenital CMV infection following first trimester maternal infection: Symptoms at birth and outcomes. *Journal of Clinical Virology* 2006;35:216—220.
3. Singh N. Cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients: new challenges and their implications for preventive strategies. *Journal of Clinical Virology*. 2006 Apr;35(4):474—7.
4. Erice A Tierney C Hirsch M Caliendo et al. AIDS Clinical Trials Group Protocol 360 Study Team. Cytomegalovirus (CMV) and human immunodeficiency virus (HIV) burden, CMV end-organ disease, and survival in subjects with advanced HIV infection (AIDS Clinical Trials Group Protocol 360). *Clinical Infectious Diseases*. 2003;37(4):567—78
5. TC Wu, WA Lee, MC Pizzorno et al. Localization of the human cytomegalovirus 2.7-kb major early beta-gene transcripts by RNA *in situ* hybridization in permissive and nonpermissive infections. *American Journal of Pathology*. 1992 141: 1247—1254.
6. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
7. Villanova PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. 1991; 7(9). Order code M29-P.
8. Wilkinson DG. The theory and practice of *in situ* hybridization. In: Wilkinson DG. (ed.) *In situ* Hybridization A practical approach. 2nd Edition. New York: Oxford University Press, 1998, pp.18—20.

Date de la Version

26 février 2020

BOND Ready-to-Use ISH

CMV Probe

N. catalogo: PB0614

Uso Previsto

Reagente per uso diagnostico *in vitro*.

L'uso della CMV Probe è previsto per l'identificazione qualitativa del trascritto di RNA del gene precoce del citomegalovirus umano in sezioni di tessuto fissate in formalina, incluse in paraffina attraverso l'ibridazione *in situ* (ISH, *In situ* Hybridization) con il sistema automatizzato BOND (include il sistema Leica BOND-MAX e il sistema Leica BOND-III).

L'interpretazione clinica di un'eventuale colorazione, o della sua assenza, deve avvalersi di studi morfologici e di opportuni controlli ed essere effettuata da patologi qualificati, nel contesto dell'anamnesi clinica del paziente e di altri test diagnostici.

Sintesi e Note Esplicative

Il citomegalovirus (CMV) appartiene alla famiglia degli herpes virus beta. Si trasmette attraverso i liquidi corporei e può determinare un'infezione primaria, un'infezione latente e una successiva riattivazione virale. L'infezione da CMV può instaurarsi in diversi organi, tra i quali polmone, rene e fegato; il virus attivo in particolare è stato osservato nelle cellule epiteliali, nelle cellule endoteliali, nei fibroblasti e nelle cellule muscolari lisce, nonché nelle cellule mesenchimali, negli epatociti, nei granulociti e nei macrofagi derivati dai monociti¹.

Durante l'infezione attiva da CMV si verifica la sintesi secondo un preciso ordine temporale di tre categorie di proteine, codificate da geni virali denominati medio-precoci, precoci e tardivi. L'espressione delle proteine medio-precoci, che si ritiene svolgano un ruolo nell'efficienza della replicazione virale, avviene tra 1 e 3 ore dall'infezione. Le proteine precoci guidano la sintesi virale, mentre quelle tardive sono prevalentemente strutturali e intervengono nell'assemblaggio del virione.

Il CMV è un patogeno opportunista comune, in grado di provocare malattie gravi nei soggetti immunocompromessi, come i pazienti con AIDS, i pazienti trapiantati e i neonati. Il CMV congenito origina da un'infezione intrauterina e sebbene la maggior parte dei bambini sia asintomatica, l'infezione congenita può dare luogo a perdita uditiva neurosensoriale, deficit cognitivo, motorio e visivo e convulsioni^{2,4}.

L'ISH con la CMV Probe viene utilizzata per l'individuazione delle infezioni da CMV umano in sezioni di tessuto fissate in formalina, incluse in paraffina⁵. Il metodo è riproducibile e deve determinare una intensa colorazione marrone, prevalentemente citoplasmatica, delle cellule che contengono l'RNA del gene precoce del CMV.

Reagenti Forniti

La CMV Probe è una sonda oligonucleotidica coniugata con fluoresceina fornita in soluzione per ibridazione.

Volume totale = 5,5 ml

Diluizione e Miscelazione

La CMV Probe è pronta per l'uso. Non è necessario ricostituire, miscelare, diluire o titolare il reagente.

Materiali Necessari Ma Non Forniti

Per un elenco completo dei materiali necessari per il trattamento del campione e l'ibridazione *in situ* con il sistema BOND (include il sistema Leica BOND-MAX e il sistema Leica BOND-III), consultare l'"Uso dei reagenti BOND" nella documentazione per l'utente BOND.

Conservazione e Stabilità

Conservare a 2–8 °C. In queste condizioni il prodotto è stabile fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta del contenitore.

Non vi sono segni evidenti che indichino contaminazione e/o instabilità. Eseguire i controlli tissutali positivi e negativi adeguati contemporaneamente al test.

Riportare a 2–8 °C immediatamente dopo l'uso.

L'utente deve verificare eventuali condizioni di conservazione diverse da quelle specificate⁶.

Precauzioni

- L'uso previsto del prodotto è per uso diagnostico *in vitro*.

CMV PROBE

Contiene Formammide (<50%) e destrano solfato (<30%).
GHS07: Punto esclamativo.
GHS08: Pericolo per la salute.
Avvertenze: Pericolo.

H360D: Può nuocere al feto.
H315: Provoca irritazione cutanea.
H319: Provoca grave irritazione oculare.

P201: Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso.

P202: Non manipolare prima di avere letto e compreso tutte le avvertenze.

P260: Non respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol.

P308+313: IN CASO di esposizione o di possibile esposizione, consultare un medico.

P314: In caso di malessere, consultare un medico.

P264: Lavare accuratamente mani dopo l'uso.

P280: Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/il viso.

P305+351+338: IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.

P337+313: Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico.

P302+352: IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua e sapone.

P332+313: In caso di irritazione della pelle: consultare un medico.

P362+364: Togliersi di dosso gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

Riservato ad utenti professionali.

- Una copia della Scheda di sicurezza può essere richiesta al distributore locale o all'ufficio di zona di Leica Biosystems o, in alternativa, visitando il sito di Leica Biosystems www.LeicaBiosystems.com.
- I campioni, prima e dopo la fissazione, e tutti i materiali esposti ad essi devono essere manipolati come potenziali vettori di infezione e smaltiti con le opportune precauzioni. Non pipettare mai i reagenti con la bocca ed evitare il contatto dei reagenti e dei campioni con la pelle e le membrane mucose. Se un reagente o un campione viene a contatto con superfici sensibili, lavare abbondantemente con acqua. Consultare un medico.
- Consultare la normativa nazionale, regionale o locale vigente per lo smaltimento dei componenti potenzialmente tossici.
- Ridurre al minimo la contaminazione microbica dei reagenti per evitare il rischio di una colorazione non specifica.
- Tempi o temperature di incubazione diversi da quelli specificati possono fornire risultati erranei. Ogni eventuale modifica deve essere validata dall'utente.

Istruzioni per L'uso

CMV Probe è stato sviluppato per l'uso sul sistema BOND automatizzato (include il sistema Leica BOND-MAX e il sistema Leica BOND-III) unitamente a Anti-Fluorescein Antibody, BOND Polymer Refine Detection e con i reagenti ausiliari BOND. Il protocollo di colorazione raccomandato per CMV Probe è ISH Protocol A. Si raccomanda un pretrattamento enzimatico usando BOND Enzyme Pretreatment Kit, Enzyme 1 per 15 minuti.

Usare sempre controlli appropriati dei tessuti e dei reagenti. Il protocollo per i controlli dei tessuti e dei reagenti deve corrispondere a quello di CMV Probe.

Controllo di qualità

Differenze nella lavorazione del tessuto e nei procedimenti tecnici in uso presso il laboratorio dell'utente possono produrre una discrepanza significativa nei risultati, rendendo necessaria la regolare esecuzione di controlli interni in aggiunta alle procedure descritte di seguito.

Controllo positivo del tessuto

È usato per indicare tessuti correttamente preparati e tecniche di colorazione appropriate. Per ogni gruppo di condizioni del test in ogni ciclo di colorazione, deve essere incluso un controllo positivo del tessuto. Un tessuto a debole colorazione positiva è più adatto di uno a forte colorazione positiva per un controllo di qualità ottimale e per rilevare livelli minimi di degradazione del reagente.

Controllo negativo del tessuto

Va esaminato dopo il controllo positivo del tessuto per verificare la specificità della marcatura della sonda sul bersaglio.

In alternativa, la varietà di tipi cellulari diversi presenti nella maggior parte delle sezioni tissutali offre spesso siti di controllo negativo, ma questo va verificato dall'utente.

Controllo negativo del reagente

Usare RNA Negative Control Probe PB0809 al posto di CMV Probe con una sezione di ogni campione del paziente per valutare la colorazione aspecifica e per consentire una migliore interpretazione della colorazione specifica in corrispondenza del sito bersaglio.

Controllo positivo del reagente

Usare RNA Positive Control Probe PB0785 al posto di CMV Probe con una sezione di ogni campione del paziente per fornire informazioni sulla preservazione degli acidi nucleici nel tessuto nonché sull'accessibilità degli acidi nucleici alla sonda. Se RNA Positive Control Probe non dimostra alcuna colorazione positiva, i risultati dei campioni analizzati vanno considerati non validi.

Tessuto del paziente

Per ultimi, esaminare i campioni del paziente colorati con CMV Probe. L'intensità della colorazione positiva va analizzata nel contesto di qualsiasi colorazione aspecifica di fondo di RNA Negative Control Probe PB0809.

Risultati Attesi

Tessuti normali

Non è stata rilevata colorazione specifica di mRNA CMV utilizzando PB0614 in una vasta gamma di tessuti normali. È stata rilevata una colorazione indistinta nelle cellule epiteliali di tiroide, prostata, laringe ed esofago, tubuli renali, cellule secretive nelle ghiandole surrenali e cellule di Leydig. Tale colorazione non interferisce con l'interpretazione della colorazione. (Numero totale di casi normali esaminati = 100).

Tessuti neoplastici

PB0614 ha colorato 3/3 polmoni infetti da CMV, 1/1 intestino infetto da CMV e 1/1 fegato infetto da CMV. Non è stata riscontrata colorazione nei tumori ai polmoni (0/3), tumori alle ovaie (0/3), tumori al fegato (0/3), tumori tiroidei (0/3), tumori esofagei (0/2), tumori mammari (0/2), tumori metastatici di origine ignota (0/2), tumori al cervello (0/2), tumori testicolari (0/2), tumori della pelle (0/2), tumore del colon (0/1), tumore allo stomaco (0/1), tumore del retto (0/1), tumore della laringe (0/1) e tumore del timo (0/1). (Numero totale di casi anormali esaminati = 34).

PB0614 è consigliata per il rilevamento di mRNA di CMV.

Limitazioni Specifiche del Prodotto

La CMV Probe è stata ottimizzata da Leica Biosystems per l'uso con l'Anti-Fluorescein Antibody, il BOND Polymer Refine Detection e con i reagenti ausiliari BOND. Gli utenti che modificano le procedure raccomandate devono assumersi la responsabilità dell'interpretazione dei risultati relativi ai pazienti in tali circostanze. I tempi del protocollo possono variare in base alle variazioni nella fissazione del tessuto e nell'efficienza della digestione enzimatica e devono essere definiti in modo empirico. Nell'ottimizzazione delle condizioni di riconoscimento e dei tempi del protocollo si devono impiegare del RNA Negative Control Probe.

Individuazione e Risoluzione dei Problemi

Il riferimento bibliografico n. 8 può essere di aiuto per le azioni di rimedio.

I campioni dei test devono essere completati dagli adeguati controlli dei tessuti e dei reagenti.

Per riferire una colorazione inusuale rivolgersi al distributore locale o all'ufficio di zona di Leica Biosystems.

Altre Informazioni

Altre informazioni sull'ibridazione *in situ* con i reagenti BOND si trovano in "Uso dei reagenti BOND" nella documentazione per l'utente BOND, ai titoli Principio della procedura, Materiali necessari, Preparazione del campione, Controllo di qualità, Verifica del saggio, Interpretazione della colorazione, Leggenda dei simboli e delle etichette e Limitazioni generali.

Bibliografia

1. Bissinger, A.L., Singzer, C., Kaiserling, E. and Jahn, G., 2002. Human cytomegalovirus as a direct pathogen: correlation of multiorgan involvement and cell distribution with clinical and pathological findings in a case of congenital inclusion disease. *Journal of Medical Virology* 67, pp. 200—206
2. Pass RF, Fowler KB, Boppana SB et al. Congenital CMV infection following first trimester maternal infection: Symptoms at birth and outcomes. *Journal of Clinical Virology* 2006;35:216—220.
3. Singh N. Cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients: new challenges and their implications for preventive strategies. *Journal of Clinical Virology*. 2006 Apr;35(4):474—7.
4. Erice A Tierney C Hirsch M Caliendo et al. AIDS Clinical Trials Group Protocol 360 Study Team. Cytomegalovirus (CMV) and human immunodeficiency virus (HIV) burden, CMV end-organ disease, and survival in subjects with advanced HIV infection (AIDS Clinical Trials Group Protocol 360). *Clinical Infectious Diseases*. 2003;37(4):567—78
5. TC Wu, WA Lee, MC Pizzorno et al. Localization of the human cytomegalovirus 2.7-kb major early beta-gene transcripts by RNA *in situ* hybridization in permissive and nonpermissive infections. *American Journal of Pathology*. 1992 141: 1247—1254.
6. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
7. Villanova PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. 1991; 7(9). Order code M29-P.
8. Wilkinson DG. The theory and practice of *in situ* hybridization. In: Wilkinson DG. (ed.) *In situ* Hybridization A practical approach. 2nd Edition. New York: Oxford University Press, 1998, pp.18—20.

Data di Pubblicazione

26 febbraio 2020

BOND Ready-to-Use ISH

CMV Probe

Bestellnr.: PB0614

Verwendungszweck

Dieses Reagenz ist für die *In-vitro*-Diagnostik bestimmt.

CMV Probe ist für den qualitativen Nachweis von RNA-Transkripten früher Gene des humanen Cytomegalie-Virus in formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe mittels *In-situ*-Hybridisierung (ISH) mit dem automatischen BOND-System (bestehend aus dem Leica BOND-MAX-System und dem Leica BOND-III-System) vorgesehen.

Die klinische Auswertung der An- oder Abwesenheit einer Färbung sollte durch morphologische Untersuchungen und geeignete Kontrollen ergänzt werden und sollte im Zusammenhang mit der Krankengeschichte eines Patienten und anderen diagnostischen Tests von einem qualifizierten Pathologen vorgenommen werden.

Zusammenfassung und Erläuterung

Das Cytomegalie-Virus (CMV) gehört zur Familie der Beta-Herpesviren. Das CMV wird über Körperflüssigkeiten übertragen und kann zu einer Primärinfektion, einer latenten Infektion und einer späteren Virus-Reaktivierung führen. Das CMV kann viele Organe infizieren, darunter Lungen, Nieren und Leber, und aktive Viren wurden insbesondere in Epithelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten und glatten Muskelzellen sowie in Mesenchymzellen, Hepatozyten, Granulozyten und in von Monozyten abstammenden Makrophagen beobachtet¹.

Während einer aktiven CMV-Infektion findet eine zeitlich aufeinander folgende Synthese von drei Proteingruppen statt, welche durch virale Gene codiert werden, die als sofortige, frühe und späte (intermediate-early, early und late) Gene bezeichnet werden. Sofortproteine werden 1-3 Stunden nach der Infektion exprimiert und es wird angenommen, dass sie für die Effizienz der Virusreplikation von Bedeutung sind. Frühe Proteine leiten die Virussynthese, während späte Proteine überwiegend struktureller Natur und am Zusammenbau des Virions beteiligt sind.

Das CMV ist ein weit verbreiteter opportunistischer Krankheitserreger, das in immunsupprimierten Personen wie AIDS-Patienten, Transplantationspatienten und Neugeborenen eine schwere Krankheit verursachen kann. Eine kongenitale CMV-Infektion ist das Ergebnis einer intrauterinen Infektion, und auch wenn die Mehrheit der betroffenen Kinder asymptomatisch ist, kann eine kongenitale CMV-Infektion zu einem Verlust des sensorineuralen Hörvermögens, kognitiven, motorischen und visuellen Störungen und Krämpfen führen²⁻⁴.

Die ISH mit der CMV Probe wird zum Nachweis humaner CMV-Infektionen in formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe eingesetzt⁵. Die Methode ist reproduzierbar und sollte zu einer intensiven, braunen und überwiegend zytoplasmatischen Färbung von Zellen führen, die RNA früher CMV-Gene enthalten.

Im Lieferumfang Enthaltene Reagenzien

CMV Probe ist eine Fluorescein-konjugierte Oligonukleotidsonde, die in einer Hybridisierungslösung geliefert wird.

Gesamtvolumen = 5,5 ml

Verdünnung und Mischung

CMV Probe ist gebrauchsfertig. Rekonstitution, Mischen, Verdünnen oder Titrieren dieses Reagenzes ist nicht erforderlich.

Zusätzlich Benötigte Materialien

Eine vollständige Liste der Materialien, die für die Probenbehandlung und die Färbung durch *In-situ*-Hybridisierung mit dem BOND-System (bestehend aus dem Leica BOND-MAX-System und dem Leica BOND-III-System) benötigt werden, befindet sich im Abschnitt "Das Arbeiten mit BOND-Reagenzien" in Ihrem BOND-Benutzerhandbuch.

Aufbewahrung und Stabilität

Bei 2–8 °C lagern. Das Produkt ist unter diesen Bedingungen bis zu dem auf dem Behälteretikett angegebenen Verfallsdatum stabil.

Es gibt keine klaren Zeichen, die auf eine Kontamination und/oder Instabilität hinweisen. Passende positive und negative Gewebekontrollen sollten zusammen mit dem untersuchten Gewebe analysiert werden.

Unmittelbar nach Gebrauch wieder bei 2–8 °C aufbewahren.

Andere als die oben angegebenen Lagerungsbedingungen müssen vom Anwender selbst getestet werden⁶.

Vorsichtsmaßnahmen

- Dieses Produkt ist für die *In-vitro*-Diagnostik bestimmt.

CMV PROBE

Enthält Formamid (<50%)
und Dextran-Sulfat
(<30%).
GHS07: Ausrufezeichen.
GHS08:
Gesundheitsgefahr.
Signalwörter: Gefahr.

H360D: Kann das
Kind im Mutterleib
schädigen.
H315: Verursacht
Hautreizungen.
H319: Verursacht
schwere Augenreizung.

P201: Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
P202: Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.
P260: Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen.
P308+313: BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/
ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P314: Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen/ ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P264: Nach Gebrauch Hände gründlich waschen.
P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz
tragen.
P305+351+338: BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang
behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit
entfernen. Weiter spülen.
P337+313: Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche
Hilfe hinzuziehen.
P302+352: BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife
waschen.
P332+313: Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe
hinzuziehen.
P362+364: Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen
waschen.
Nur von Fachleuten zu verwenden.

- Ein Exemplar des Sicherheitsdatenblattes erhalten Sie von Ihrer örtlichen Vertriebsfirma, von der Regionalniederlassung von Leica Biosystems oder über die Webseite von Leica Biosystems unter www.LeicaBiosystems.com.
- Behandeln Sie Präparate vor und nach der Fixierung sowie sämtliche damit in Berührung kommende Materialien so, als ob sie Infektionen übertragen könnten und entsorgen Sie sie mit den entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen. Pipettieren Sie Reagenzien niemals mit dem Mund und vermeiden Sie den Kontakt von Haut oder Schleimhäuten mit Reagenzien oder Präparaten. Falls Reagenzien oder Präparate mit empfindlichen Bereichen in Kontakt kommen, spülen Sie diese mit reichlich Wasser. Holen Sie anschließend ärztlichen Rat ein.
- Beachten Sie bei der Entsorgung potentiell giftiger Bestandteile die behördlichen und örtlichen Vorschriften.
- Mikrobielle Kontaminationen sollten minimiert werden, da es sonst zu einer Zunahme unspezifischer Färbungen kommen kann.
- Die Verwendung anderer als die angegebenen Retrievals, Inkubationszeiten oder Temperaturen kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Diesbezügliche Änderungen müssen vom Anwender selbst getestet werden.

Gebrauchsanweisung

CMV Probe wurde zur Nutzung auf dem automatisierten BOND-System (bestehend aus dem Leica BOND-MAX-System und dem Leica BOND-III-System) in Kombination mit Anti-Fluorescein Antibody, BOND Polymer Refine Detection und BOND-Zusatzreagenzien optimiert entwickelt. ISH Protocol A ist das empfohlene Färbeprotokoll für CMV Probe. Es wird eine Enzymvorbehandlung unter Anwendung von BOND Enzyme Pretreatment Kit, Enzyme 1 für 15 Minuten.

Es sind stets geeignete Gewebe- und Reagenzkontrollen zu nutzen. Das Protokoll für die Gewebe- und Reagenzkontrollen sollte dem für CMV Probe entsprechen.

Qualitätskontrolle

Unterschiede bei der Gewebeparbeitung und den technischen Verfahren im Labor des Benutzers können zu signifikanten Schwankungen bei den Ergebnissen führen. Daher ist es wichtig, zusätzlich zu den folgenden Verfahren regelmäßige laborinterne Kontrollen durchzuführen.

Positive Gewebekontrolle

Zeigt korrekt vorbereitete Gewebe und korrekte Färbetechniken an. In jedem Färbelauf sollte für jeden Satz Testbedingungen eine positive Gewebekontrolle durchgeführt werden. Gewebe mit schwach positiver Färbung ist für die optimale Qualitätskontrolle und den Nachweis kleiner Minderungen in der Reagenzleistung besser geeignet, als ein Gewebe mit stark positiver Färbung.

Negative Gewebekontrolle

Sollte im Anschluss an die positive Gewebekontrolle durchgeführt werden, um die Spezifität der Zielsenkenmarkierung zu verifizieren. Alternativ bietet die Vielfalt unterschiedlicher Zelltypen, die in den meisten Gewebeschnitten vorliegen, häufig Stellen für eine negative Kontrolle. Jedoch sollte dies vom Benutzer verifiziert werden.

Negative Reagenzkontrolle

Zur Beurteilung einer unspezifischen Färbung und zur besseren Bewertung einer spezifischen Färbung an der Zielstelle ist mit einem Schnitt jedes Patientenpräparates RNA Negative Control Probe PB0809 anstelle CMV Probe zu verwenden.

Positive Reagenzkontrolle

Verwenden Sie RNA Positive Control Probe PB0785 anstelle CMV Probe bei einem Schnitt jedes Patientenpräparates, um Informationen über die Erhaltung von Nukleinsäuren in dem Gewebe und die Zugänglichkeit von Nukleinsäuren zu der Sonde zu erhalten. Falls RNA Positive Control Probe keine positive Färbung nachweisen kann, sollten die mit den Testproben erzielten Ergebnisse als ungültig betrachtet werden.

Patientengewebe

Die mit CMV Probe gefärbten Patientenproben müssen zuletzt untersucht werden. Eine positive Färbeintensität ist im Kontext einer unspezifischen Hintergrundfärbung der RNA Negative Control Probe PB0809 zu bewerten.

Erwartete Ergebnisse

Normale Gewebe

PB0614 zeigte an einem breiten Spektrum normaler Gewebe keine spezifische CMV-mRNA-Anfärbung. Eine schwache Färbung wurde in den Epithelzellen von Schilddrüse, Prostata, Larynx und Ösophagus, den Tubuli der Niere, den sekretorischen Zellen der Nebenniere und in Leydig-Zellen beobachtet. Diese Färbung hat keinen Einfluss auf die Interpretation der Färbungen. (Anzahl der insgesamt untersuchten Normalgewebeprobe(n) = 100).

Tumorgewebe

PB0614 färbte 3/3 mit CMV infizierte Proben der Lunge, 1/1 mit CMV infizierte Probe des Darms und 1/1 mit CMV infizierte Probe der Leber. Bei Tumoren von Lunge (0/3), Eierstöcken (0/3), Leber (0/3), Schilddrüse (0/3), Ösophagus (0/2), Brust (0/2), metastatischen Tumoren unbekanntem Ursprungs (0/2), Tumoren von Gehirn (0/2), Testikeln (0/2), Haut (0/2) und je einem Tumor von Colon (0/1), Magen (0/1), Rektum (0/1), Larynx (0/1) und Thymus (0/1) wurde keine Färbung nachgewiesen. (Anzahl der insgesamt untersuchten pathologischen Gewebeprobe(n) = 34).

PB0614 wird für die Bestimmung der CMV-mRNA empfohlen.

Produktspezifische Einschränkungen

CMV Probe wurde von Leica Biosystems zur Verwendung mit dem Anti-Fluorescein Antibody, dem BOND Polymer Refine Detection und BOND-Zusatzreagenzien optimiert. Anwender, die andere als die empfohlenen Testverfahren verwenden, müssen unter diesen Umständen die Verantwortung für die Auswertung der Patientenergebnisse übernehmen. Die Verfahrenszeiten können aufgrund von Unterschieden in der Gewebefixierung und der Wirksamkeit der enzymatischen Verdauung variieren und müssen empirisch bestimmt werden. Bei der Optimierung der Retrieval-Bedingungen und Verfahrenszeiten sollte RNA Negative Control Probe verwendet werden.

Fehlersuche

Maßnahmen zur Abhilfe beim Auftreten von Fehlern finden Sie in Referenz 8.

Die Analyse der Proben sollte zusammen mit geeigneten Gewebe- und Reagenzkontrollen durchgeführt werden.

Falls Sie ungewöhnliche Färbegergebnisse beobachten, wenden Sie sich an Ihre örtliche Vertriebsfirma oder die Regionalniederlassung von Leica Biosystems.

Weitere Informationen

Weitere Informationen zur *In-situ*-Hybridisierung mit BOND-Reagenzien finden Sie in den Abschnitten Grundlegende Vorgehensweise, Erforderliches Material, Probenvorbereitung, Qualitätskontrolle, Assay-Verifizierung, Deutung der Färbung, Schlüssel der Symbole auf den Etiketten und Allgemeine Einschränkungen in "Das Arbeiten mit BOND-Reagenzien" in Ihrem BOND-Benutzerhandbuch.

Referenzen

1. Bissinger, A.L., Singler, C., Kaiserling, E. and Jahn, G., 2002. Human cytomegalovirus as a direct pathogen: correlation of multiorgan involvement and cell distribution with clinical and pathological findings in a case of congenital inclusion disease. *Journal of Medical Virology* 67, pp. 200—206
2. Pass RF, Fowler KB, Boppana SB et al. Congenital CMV infection following first trimester maternal infection: Symptoms at birth and outcomes. *Journal of Clinical Virology* 2006;35:216—220.
3. Singh N. Cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients: new challenges and their implications for preventive strategies. *Journal of Clinical Virology*. 2006 Apr;35(4):474—7.
4. Erice A Tierney C Hirsch M Caliendo et al. AIDS Clinical Trials Group Protocol 360 Study Team. Cytomegalovirus (CMV) and human immunodeficiency virus (HIV) burden, CMV end-organ disease, and survival in subjects with advanced HIV infection (AIDS Clinical Trials Group Protocol 360). *Clinical Infectious Diseases*. 2003;37(4):567—78
5. TC Wu, WA Lee, MC Pizzorno et al. Localization of the human cytomegalovirus 2.7-kb major early beta-gene transcripts by RNA *in situ* hybridization in permissive and nonpermissive infections. *American Journal of Pathology*. 1992 141: 1247—1254.
6. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
7. Villanova PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. 1991; 7(9). Order code M29-P.
8. Wilkinson DG. The theory and practice of *in situ* hybridization. In: Wilkinson DG. (ed.) *In situ* Hybridization A practical approach. 2nd Edition. New York: Oxford University Press, 1998, pp.18—20.

Datum der Herausgabe

26 Februar 2020

BOND Ready-to-Use ISH CMV Probe

Catálogo Nº.: PB0614

Uso Propuesto

Este reactivo es para uso diagnóstico *in vitro*.

CMV Probe es para uso en la identificación cualitativa de transcripciones tempranas de ARN de genes de citomegalovirus humano en tejidos fijados en formalina e incluidas en parafina por hibridación *in situ* (ISH) usando el sistema automatizado BOND (incluye el sistema Leica BOND-MAX y el sistema Leica BOND-III).

La interpretación clínica de cualquier tinción o de la ausencia de ésta debe complementarse con estudios morfológicos y controles adecuados, y debe evaluarla un patólogo cualificado junto con el historial clínico del paciente y con otras pruebas diagnósticas.

Resumen y Explicación

El citomegalovirus (CMV) es un miembro de la familia de los herpesvirus beta. Este virus se transmite mediante fluidos corporales y puede producir infección primaria, infección latente y reactivación vírica posterior. Puede producir infección en muchos órganos como los pulmones, riñones e hígado; en particular, se ha observado virus activos en células epiteliales, células endoteliales, fibroblastos y células de musculatura lisa, así como en células mesenquimales, hepatocitos, granulocitos y macrófagos derivados de monocitos¹.

Durante la infección activa por CMV, hay síntesis temporal de tres categorías de proteínas, codificadas por genes víricos designados como intermedios-tempranos, tempranos y tardíos. Las proteínas intermedias-tempranas se expresan de 1 a 3 horas después de la infección, y se piensa que desempeñan alguna función en la eficiencia de la replicación vírica. Las proteínas tempranas dirigen la síntesis vírica, mientras que las proteínas tardías son principalmente estructurales, implicadas en el ensamblaje del virión.

El citomegalovirus es un patógeno oportunista común, capaz de causar enfermedades graves en individuos con riesgo inmunológico tales como los pacientes de SIDA, pacientes sometidos a trasplantes y en neonatos. El CMV congénito es resultado de una infección intrauterina y, aunque la mayoría de los niños son asintomáticos, puede provocar pérdida neurosensorial de audición, déficit cognitivo, motor y visual, y convulsiones^{2,4}.

Para la detección de infecciones por CMV humano se utiliza ISH usando CMV Probe en tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina⁵. El método es reproducible y debe dar lugar a una tinción intensa, predominantemente citoplásmica, de color marrón, de las células que contienen ARN de genes tempranos de CMV.

Reactivos Suministrados

CMV Probe es una sonda de oligonucleótido conjugado con fluoresceína que se suministra en solución de hibridación.

Volumen total = 5,5 mL

Dilución y Mezcla

CMV Probe está listo para usar. No es necesaria la reconstitución, mezcla, dilución o titulación de este reactivo.

Materiales Necesarios Pero No Suministrados

Consulte en el apartado "Utilización de reactivos BOND" de la documentación de usuario de BOND la lista completa del material necesario para el tratamiento de las muestras y la hibridación *in situ* cuando se utiliza el sistema BOND (incluye el sistema Leica BOND-MAX y el sistema Leica BOND-III).

Conservación y Estabilidad

Almacenar a 2–8 °C. El producto es estable en estas condiciones hasta la fecha de caducidad que se indica en la etiqueta del recipiente.

No hay signos obvios que indiquen contaminación o inestabilidad. Deben realizarse los controles positivos y negativos adecuados de tejido, al mismo tiempo que se analiza el tejido de prueba.

Volver a guardar a 2–8 °C inmediatamente después de su uso.

Si las condiciones de conservación son diferentes de las especificadas, el usuario debe realizar las comprobaciones necesarias⁶.

Precauciones

- Este producto es para uso diagnóstico *in vitro*.

CMV PROBE

Contiene Formamida

(<50%) y sulfato de

dextrano (<30%).

GHS07: Signo de

exclamación.

GHS08: Peligro para la

salud.

Palabras de advertencia:

Peligro.

H360D: Puede dañar
al feto.

H315: Provoca irritación
cutánea.

H319: Provoca irritación
ocular grave.

P201: Pedir instrucciones especiales antes del uso.

P202: No manipular la sustancia antes de haber leído y comprendido todas las instrucciones de seguridad.

P260: No respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol.

P308+313: EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Consultar a un médico.

P314: Consultar a un médico en caso de malestar.

P264: Lavarse manos concienzudamente tras la manipulación.

P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

P305+351+338: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.

P337+313: Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.

P302+352: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.

P332+313: En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico.

P362+364: Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

Limitado a usuarios profesionales.

- Si desea obtener un ejemplar de la Hoja de datos de seguridad de los materiales, póngase en contacto con su distribuidor o con la oficina regional de Leica Biosystems, o visite la página Web de Leica Biosystems en www.LeicaBiosystems.com.
- Las muestras, antes y después de ser fijadas, y cualquier material en contacto con ellas, deben ser tratados como sustancias capaces de transmitir infecciones y deben ser eliminadas con las precauciones correspondientes. No pipetee nunca los reactivos con la boca, y evite el contacto de la piel y las mucosas con reactivos o muestras. Si algún reactivo o alguna muestra entra en contacto con zonas sensibles, lave éstas con agua abundante. Consulte a un médico.
- Consulte la normativa federal, nacional o local referente a la eliminación de sustancias potencialmente tóxicas.
- Minimice la contaminación microbiana de los reactivos, ya que puede producir un aumento de las tinciones inespecíficas.
- Los tiempos de exposición e incubación, y las temperaturas diferentes de las especificadas pueden dar resultados erróneos. Cualquier cambio que se produzca deberá ser validado por el usuario.

Instrucciones de Uso

CMV Probe se ha desarrollado para usarse en el sistema automatizado BOND (incluye el sistema Leica BOND-MAX y el sistema Leica BOND-III) en combinación con Anti-Fluorescein Antibody, BOND Polymer Refine Detection y reactivos auxiliares BOND. El protocolo de tinción recomendado para CMV Probe es ISH Protocol A. El pretratamiento enzimático se recomienda usando BOND Enzyme Pretreatment Kit, Enzyme 1, durante 15 minutos.

Siempre se deben usar controles apropiados de tejidos y de reactivos. El protocolo para los controles de tejidos y de reactivos debe corresponder al de CMV Probe.

Control de calidad

Las diferencias en el procesamiento de los tejidos y en los procedimientos técnicos del laboratorio del usuario pueden producir una variabilidad significativa en los resultados; por ello, es necesario que éste lleve a cabo regularmente sus propios controles, además de los siguientes procedimientos.

Control positivo de tejido

Se utiliza para indicar la preparación correcta de los tejidos y las técnicas de tinción adecuadas. Debe incluirse un control positivo de tejido por cada conjunto de condiciones de ensayo en cada serie de tinciones realizada. Un tejido con una tinción positiva débil es más adecuado que un tejido con una tinción positiva intensa para un control de calidad óptimo y para detectar niveles bajos de degradación del reactivo.

Control negativo de tejido

Debe examinarse después del control positivo de tejido, a fin de verificar la especificidad del marcado de la sonda en la diana.

O bien, la variedad de diferentes tipos de células presentes en la mayoría de los cortes de tejido ofrece con frecuencia lugares de control negativo, pero esto debe ser verificado por el usuario.

Control negativo de reactivo

Utilice RNA Negative Control Probe PB0809 en lugar de CMV Probe con un corte de cada muestra del paciente a fin de evaluar la tinción no específica y obtener una mejor interpretación de la tinción específica en la diana.

Control positivo de reactivo

Utilice RNA Positive Control Probe PB0785 en lugar de CMV Probe con un corte de cada muestra del paciente a fin de brindar información acerca de la conservación de los ácidos nucleicos en el tejido y de la accesibilidad de los ácidos nucleicos para la sonda. Si RNA Positive Control Probe no muestra tinción positiva, los resultados de las muestras analizadas deben considerarse no válidos.

Tejido del paciente

Examine las muestras del paciente teñidas con CMV Probe al final. La intensidad de la tinción positiva debe valorarse en el contexto de cualquier tinción de fondo no específica de RNA Negative Control Probe PB0809.

Resultados Esperados

Tejidos normales

Al emplear PB0614, en una amplia gama de tejidos sanos no se detectó tinción de ARNm específico de CMV. Se detectó una ligera tinción en células epiteliales de la glándula tiroidea, la próstata, la laringe y el esófago, y en los túbulos del riñón, las células secretoras de las glándulas suprarrenales y las células de Leydig. Esta tinción no afectó a la interpretación. (Número total de casos normales evaluados = 100).

Tejidos tumorales

PB0614 tiñó las 3/3 citomegalovirus pulmonar, la 1/1 citomegalovirus intestinal y la 1/1 citomegalovirus hepática. No se observó tinción en los cánceres de pulmón (0/3), los cánceres ováricos (0/3), los cánceres hepáticos (0/3), los cánceres tiroideos (0/3), los cánceres esofágicos (0/2), los cánceres de mama (0/2), los cánceres metastásicos de origen desconocido (0/2), los tumores cerebrales (0/2), los tumores testiculares (0/2), los cánceres de piel (0/2), el cáncer de colon (0/1), el cáncer gástrico (0/1), el tumor rectal (0/1), el cáncer de laringe (0/1) y el cáncer de timo (0/1). (Número total de casos anormales evaluados = 34).

Se recomienda PB0614 para detectar el ARNm de CMV.

Limitaciones Específicas del Producto

CMV Probe se ha optimizado en Leica Biosystems para su uso con Anti-Fluorescein Antibody, BOND Polymer Refine Detection y reactivos auxiliares BOND. Los usuarios que se aparten de los procedimientos de análisis recomendados deben asumir la responsabilidad de interpretar los resultados del paciente tomando en cuenta estas circunstancias. Los tiempos de protocolo pueden diferir debido a la variación en la fijación de los tejidos y a la eficacia en la digestión enzimática y deben ser determinados empíricamente. Se debe utilizar RNA Negative Control Probe a la hora de optimizar las condiciones de detección y los tiempos de protocolo.

Solución de Problemas

La referencia 8 puede ayudar en las acciones correctoras.

Las muestras de prueba deben complementarse con los controles adecuados de tejidos y reactivos.

Contacte con su distribuidor local o la oficina regional de Leica Biosystems para informar de cualquier tinción anómala.

Para Obtener Más Información

Para obtener más información sobre la hibridación *in situ* con reactivos BOND, consulte los apartados Principio del procedimiento, Material necesario, Preparación de las muestras, Control de calidad, Verificación del análisis, Interpretación de la tinción, Clave de símbolos en las etiquetas y Limitaciones generales de la sección "Utilización de Reactivos BOND" de la documentación de usuario suministrada por BOND.

Referencias

1. Bissinger, A.L., Singzer, C., Kaiserling, E. and Jahn, G., 2002. Human cytomegalovirus as a direct pathogen: correlation of multiorgan involvement and cell distribution with clinical and pathological findings in a case of congenital inclusion disease. *Journal of Medical Virology* 67, pp. 200—206
2. Pass RF, Fowler KB, Boppana SB et al. Congenital CMV infection following first trimester maternal infection: Symptoms at birth and outcomes. *Journal of Clinical Virology* 2006;35:216—220.
3. Singh N. Cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients: new challenges and their implications for preventive strategies. *Journal of Clinical Virology*. 2006 Apr;35(4):474—7.
4. Erice A Tierney C Hirsch M Caliendo et al. AIDS Clinical Trials Group Protocol 360 Study Team. Cytomegalovirus (CMV) and human immunodeficiency virus (HIV) burden, CMV end-organ disease, and survival in subjects with advanced HIV infection (AIDS Clinical Trials Group Protocol 360). *Clinical Infectious Diseases*. 2003;37(4):567—78
5. TC Wu, WA Lee, MC Pizzorno et al. Localization of the human cytomegalovirus 2.7-kb major early beta-gene transcripts by RNA *in situ* hybridization in permissive and nonpermissive infections. *American Journal of Pathology*. 1992 141: 1247—1254.
6. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
7. Villanova PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. 1991; 7(9). Order code M29-P.
8. Wilkinson DG. The theory and practice of *in situ* hybridization. In: Wilkinson DG. (ed.) *In situ* Hybridization A practical approach. 2nd Edition. New York: Oxford University Press, 1998, pp.18—20.

Fecha de Publicación

26 de febrero de 2020

BOND Ready-to-Use ISH

CMV Probe

Nº de catálogo: PB0614

Utilização Prevista

Este reagente destina-se a utilização diagnóstica *in vitro*.

A CMV Probe destina-se a ser usada para a identificação qualitativa da cópia de ARN do gene precoce do citomegalovírus humano em tecidos fixos com formalina e incluídos em parafina por hibridização *in situ* (ISH) utilizando o sistema BOND automatizado (inclui o sistema Leica BOND-MAX e o sistema Leica BOND-III).

A interpretação clínica de qualquer coloração ou da sua ausência deve ser complementada por estudos morfológicos utilizando controlos adequados, e deve ser avaliada no contexto da história clínica do doente e de outros testes complementares de diagnóstico por um anátomo-patologista qualificado.

Resumo e Explicação

O Citomegalovírus (CMV) é um membro da família de Vírus Herpes Beta. O CMV é transmitido por fluidos corporais e pode estabelecer uma infecção primária, infecção latente e reactivação viral subsequente. O CMV pode estabelecer infecção em muitos órgãos, incluindo o pulmão, rim e fígado, em particular o vírus activo foi observado em células epiteliais, células endoteliais, fibroblastos e células do músculo liso, bem como em células mesenquimatosas, hepatócitos, granulócitos e macrófagos derivados de monócitos¹.

Durante a infecção activa por CMV, existe uma síntese temporal de três categorias de proteínas, codificadas por genes virais e designadas intermediárias-precoces, precoces e tardias. As proteínas intermediárias-precoces são expressas 1 a 3 horas após a infecção, e pensa-se que desempenham um papel na eficiência da replicação viral. As proteínas precoces orientam a síntese viral, enquanto as proteínas tardias são principalmente estruturais, envolvidas na montagem do virião.

O CMV é um agente patogénico oportunista comum, capaz de provocar doença grave em indivíduos imunocomprometidos tais como doentes com SIDA, doentes transplantados e recém-nascidos. A infecção congénita por CMV é consequência da infecção intrauterina, e embora a maioria das crianças seja assintomática, a infecção congénita por CMV pode provocar perda da audição neurosensorial, déficits cognitivos, motores e visuais e crises convulsivas²⁻⁴.

A ISH utilizando a CMV Probe é usada na detecção de infecção por CMV no homem em tecidos fixos com formalina e incluídos em parafina⁵. O método é reprodutível e deve originar uma coloração intensa e castanha predominantemente citoplásmica, de células contendo o ARN do gene precoce do CMV.

Reagentes Fornecidos

A CMV Probe é uma sonda de oligonucleótidos conjugados com fluoresceína, fornecida em solução de hibridização.

Volume total = 5,5 mL.

Diluição e Mistura

A CMV Probe está pronta a utilizar. Não é necessária reconstituição, mistura, diluição ou titulação deste reagente.

Materiais Necessários Mas Não Fornecidos

Consultar "Utilizar os reagentes BOND" na documentação do utilizador BOND para uma lista completa de materiais necessários para tratamento de amostras e coloração por hibridização *in situ* utilizando o sistema BOND (inclui o sistema Leica BOND-MAX e o sistema Leica BOND-III).

Armazenamento e Estabilidade

Armazene a uma temperatura de 2–8 °C. Nestas condições, o produto permanece estável até ao fim do prazo de validade referido no rótulo do recipiente.

Não existem sinais evidentes que indiquem contaminação e/ou instabilidade. Devem ser executados controlos tecidulares positivos e negativos adequados em simultâneo com o tecido de teste.

Coloque entre 2–8 °C imediatamente depois de utilizar.

Condições de armazenamento diferentes das acima especificadas devem ser confirmadas pelo utilizador⁶.

Precauções

- Este produto destina-se a utilização diagnóstica *in vitro*.

CMV PROBE

Contém Formamida (<50%) e sulfato de dextrano (<30%).
GHS07: Ponto de exclamação.
GHS08: Perigo para a saúde.
Palavras-sinal: Perigo.

H360D: Pode afectar o nascituro.
H315: Provoca irritação cutânea.
H319: Provoca irritação ocular grave.

P201: Pedir instruções específicas antes da utilização.
P202: Não manuseie o produto antes de ter lido e percebido todas as precauções de segurança.
P260: Não respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.
P308+313: EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: consulte um médico.
P314: Em caso de indisposição, consulte um médico.
P264: Lavar mãos cuidadosamente após manuseamento.
P280: Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial.
P305+351+338: SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar.
P337+313: Caso a irritação ocular persista: consulte um médico.
P302+352: SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar com sabonete e água abundantes.
P332+313: Em caso de irritação cutânea: consulte um médico.
P362+364: Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a voltar a usar.
Limitado a utilizadores profissionais.

- Para obter uma cópia da Ficha de Dados de Segurança do Material, entre em contacto com o seu distribuidor local ou sucursal regional da Leica Biosystems ou, em alternativa, visite o site da Leica Biosystems na internet, www.LeicaBiosystems.com.
- As amostras, antes e depois da fixação, e todo o material que a elas seja exposto, devem ser manipulados como se fossem capazes de transmitir infecção e eliminados usando as precauções adequadas. Nunca pipete reagentes com a boca e evite o contacto entre a pele e membranas mucosas e reagentes ou amostras. Se reagentes ou amostras entrarem em contacto com áreas sensíveis, lave-as com uma quantidade abundante de água. Consulte um médico.
- Consulte os regulamentos federais, estaduais e locais relativamente à eliminação de quaisquer componentes potencialmente tóxicos.
- Minimize a contaminação microbiana dos reagentes ou poderá ocorrer um aumento da coloração inespecífica.
- A utilização de tempos e temperaturas de recuperação e incubação diferentes dos especificados pode produzir resultados erróneos. Qualquer alteração deste tipo deve ser validada pelo utilizador.

Instruções de Utilização

CMV Probe foi desenvolvido para utilização no sistema automatizado BOND (inclui o sistema Leica BOND-MAX e o sistema Leica BOND-III) juntamente com Anti-Fluorescein Antibody, BOND Polymer Refine Detection e reagentes auxiliares BOND. O protocolo de coloração recomendado para CMV Probe é o ISH Protocol A. Recomenda-se o pré-tratamento enzimático com BOND Enzyme Pretreatment Kit, Enzyme 1, durante 15 minutos.

Devem ser sempre utilizados os controlos apropriados de tecidos e reagentes. O protocolo para os controlos de tecidos e reagentes deve corresponder ao protocolo de CMV Probe.

Controlo de qualidade

As diferenças no processamento de tecidos e nos procedimentos técnicos do laboratório do utilizador podem produzir uma variabilidade significativa de resultados, exigindo a realização regular de controlos internos além dos procedimentos a seguir descritos.

Controlo positivo do tecido

Utilizado para indicar os tecidos correctamente preparados e as técnicas de coloração adequadas. Cada conjunto de condições de teste, em cada processo de coloração, deve incluir um controlo positivo do tecido. Um tecido com uma coloração positiva fraca é mais adequado do que um tecido com uma coloração positiva forte para assegurar um controlo de qualidade óptimo e para detectar níveis mínimos de degradação dos reagentes.

Controlo negativo do tecido

Este deve ser examinado depois do controlo positivo do tecido para verificar a especificidade da marcação da sonda em relação ao alvo.

Alternativamente, a variedade de diferentes tipos de células presentes na maior parte dos cortes tecidulares oferece frequentemente locais de controlo negativo, no entanto, isto deve ser verificado pelo utilizador.

Controlo negativo do reagente

Utilize RNA Negative Control Probe PB0809 em vez de CMV Probe com um corte de cada amostra do doente para avaliar a coloração não específica e permitir uma melhor interpretação da coloração específica no alvo.

Controlo positivo do reagente

Utilize RNA Positive Control Probe PB0785 em vez de CMV Probe com um corte de cada amostra do doente para dar informações sobre a conservação dos ácidos nucleicos no tecido e sobre a acessibilidade dos ácidos nucleicos à sonda. Se RNA Positive Control Probe não demonstrar uma coloração positiva, os resultados obtidos com as amostras do teste devem ser considerados inválidos.

Tecido do doente

Examine, no fim, as amostras do doente coradas com CMV Probe. A intensidade da coloração positiva deve ser avaliada no contexto de qualquer coloração não específica de fundo de RNA Negative Control Probe PB0809.

Resultados Esperados

Tecidos normais

Não foi detetada nenhuma coloração específica do ARNm do CMV (citomegalovírus) utilizando o PB0614 numa grande variedade de tecidos normais. Foi detetada uma coloração fraca em células epiteliais da tiróide, próstata, laringe e esófago, túbulos renais, células secretoras nas glândulas adrenais e células de Leydig. Esta coloração não interfere com a interpretação da coloração. (Número total de casos normais avaliados = 100).

Tecidos tumorais

O PB0614 corou 3/3 pulmões infetados com CMV, 1/1 intestino infetado com CMV e 1/1 fígado infetado com CMV. Não foram observadas colorações em tumores pulmonares (0/3), tumores ováricos (0/3), tumores hepáticos (0/3), tumores da tiróide (0/3), tumores esofágicos (0/2), tumores mamários (0/2), tumores metastáticos de origem desconhecida (0/2), tumores cerebrais (0/2), tumores testiculares (0/2), tumores da pele (0/2), um tumor do cólon (0/1), um tumor do estômago (0/1), um tumor do reto (0/1), um tumor da laringe (0/1) e tumores do timo (0/1). (Número total de casos anormais avaliados = 34).

O PB0614 é recomendado para a deteção de ARNm do CMV.

Limitações Específicas do Produto

A CMV Probe foi otimizada na Leica Biosystems para utilização com o Anti-Fluorescein Antibody, BOND Polymer Refine Detection e reagentes auxiliares BOND. Utilizadores que se desviem dos procedimentos de teste recomendados devem assumir a responsabilidade pela interpretação dos resultados dos doentes nestas circunstâncias. Os tempos de protocolo podem variar, devido a variações na fixação tecidual e na eficácia de digestão enzimática, devendo ser determinados de forma empírica. Os RNA Negative Control Probe deve ser utilizados quando se optimizam as condições de recuperação e os tempos do protocolo.

Resolução de Problemas

A Referência 8 pode ajudar na acção de resolução.

As amostras de teste devem ser complementadas pelos controlos tecidulares e de reagente adequados.

Entre em contacto com o seu distribuidor local ou com a sucursal regional da Leica Biosystems para notificar qualquer coloração pouco habitual.

Informações Adicionais

Poderá encontrar informações adicionais sobre hibridização *in situ* com reagentes BOND nas secções de Princípios do Procedimento, Material Necessário, Preparação da Amostra, Controlo de Qualidade, Verificação do Ensaio, Interpretação da Coloração, Significado dos Símbolos nos Rótulos e Limitações Gerais em "Utilizar os Reagentes BOND" na documentação do utilizador BOND.

Bibliografia

1. Bissinger, A.L., Singzer, C., Kaiserling, E. and Jahn, G., 2002. Human cytomegalovirus as a direct pathogen: correlation of multiorgan involvement and cell distribution with clinical and pathological findings in a case of congenital inclusion disease. *Journal of Medical Virology* 67, pp. 200—206
2. Pass RF, Fowler KB, Boppana SB et al. Congenital CMV infection following first trimester maternal infection: Symptoms at birth and outcomes. *Journal of Clinical Virology* 2006;35:216—220.
3. Singh N. Cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients: new challenges and their implications for preventive strategies. *Journal of Clinical Virology*. 2006 Apr;35(4):474—7.
4. Erice A Tierney C Hirsch M Caliendo et al. AIDS Clinical Trials Group Protocol 360 Study Team. Cytomegalovirus (CMV) and human immunodeficiency virus (HIV) burden, CMV end-organ disease, and survival in subjects with advanced HIV infection (AIDS Clinical Trials Group Protocol 360). *Clinical Infectious Diseases*. 2003;37(4):567—78
5. TC Wu, WA Lee, MC Pizzorno et al. Localization of the human cytomegalovirus 2.7-kb major early beta-gene transcripts by RNA *in situ* hybridization in permissive and nonpermissive infections. *American Journal of Pathology*. 1992 141: 1247—1254.
6. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
7. Villanova PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. 1991; 7(9). Order code M29-P.
8. Wilkinson DG. The theory and practice of *in situ* hybridization. In: Wilkinson DG. (ed.) *In situ* Hybridization A practical approach. 2nd Edition. New York: Oxford University Press, 1998, pp.18—20.

Data de Emissão

26 de Fevereiro de 2020

BOND Ready-to-Use ISH

CMV Probe

Artikelnummer: PB0614

Användningsområde

Reagenset är avsett för *in vitro*-diagnostik.

CMV Probe är avsedd för användning vid kvalitativ identifikation av humant cytomegalovirus tidig gen-RNA-transkript i formalinfixerad, paraffinbäddad vävnad genom *in situ* hybridisering (ISH) i det automatiserade BOND-systemet (som innefattar systemen Leica BOND-MAX och Leica BOND-III).

Den kliniska tolkningen av varje infärgning, eller utebliven infärgning, måste alltid kompletteras med morfologiska studier och lämpliga kontroller. Utvärderingen bör göras av kvalificerad patolog och inkludera patientens anamnes och övriga diagnostiktester.

Förklaring och Sammanfattning

Cytomegalovirus (CMV) tillhör familjen beta-herpesvirus. CMV överförs via kroppsvätskor och kan ge primär infektion, latent infektion och efterföljande viral reaktivering. CMV kan orsaka infektion i flera organ, inklusive lungor, njurar och lever; aktiva virus har speciellt observerats i epitel-celler, endotelceller, fibroblaster och glatta muskelceller liksom i mesenchymceller, hepatocyter, granulocyter och monocytderiverande makrofager¹.

Under en aktiv CMV-infektion förekommer temporal syntes av tre kategorier av proteiner, kodade av virala gener betecknade intermediärt tidiga, tidiga och sena. Intermediärt tidiga proteiner ses 1–3 timmar efter infektion och tros spela en roll i hur effektivt den virala replikationen sker. Tidiga proteiner styr den virala syntesen, medan sena proteiner i huvudsak är strukturella och involverade i hopsättning av virioner.

CMV är en vanligt förekommande opportunistisk patogen som kan orsaka allvarliga sjukdomstillstånd hos individer med nedsatt immunförsvar såsom AIDS-patienter, transplantationspatienter och neonatala. Kongenital CMV är ett resultat av intrauterin infektion och även om majoriteten av barnen är asymptomatiska kan kongenital CMV leda till sensorineural hörselnedsättning och kognitiva, motoriska och visuella defekter samt attacker²⁻⁴.

ISH med CMV Probe används för att spåra humana CMV-infektioner i formalinfixerad, paraffinbäddad vävnad⁵. Metoden är reproducerbar och bör resultera i en intensivt brun, övervägande cytoplasmisk infärgning av celler som innehåller CMV, tidigt gen-RNA.

Ingående Reagens

CMV Probe är en fluoresceinkonjugerad oligonukleotid-probe som tillhandahålls i en hybridiseringslösning.

Total volym = 5,5 ml

Spädning och Blandning

CMV Probe är färdig att användas. Reagenset behöver varken rekonstitueras, blandas, spådas eller titreras.

Nödvändigt Materiel Som Ej Medföljer

I "Använda BOND-reagens" i BOND-användardokumentationen finns en fullständig lista med den materiel du behöver för att behandla ett prov och göra en *in situ*-hybridiseringsfärgning med BOND-systemet (som innefattar systemen Leica BOND-MAX och Leica BOND-III).

Förvaring och Stabilitet

Förvara vid 2–8 °C. Produkten är under dessa förhållanden stabil fram till det utgångsdatum som anges förpackningsetiketten.

Det finns inga uppenbara tecken som indikerar kontaminering och/eller instabilitet. Lämpliga positiva och negativa vävnadskontroller ska köras samtidigt med testvävnaden.

Ställ tillbaka i 2–8 °C omedelbart efter användning.

Andra förvaringsbetingelser än de ovan angivna måste verifieras av användaren⁶.

Säkerhetsföreskrifter

- Produkten är avsedd för *in vitro*-diagnostik.

CMV PROBE

Innehåller Formamid (<50%)

och dextransulfat (<30%).

GHS07: Utropstecken.

GHS08: Hälsofara.

Signalord: Fara.

H360D: Kan skada det ofödda barnet.

H315: Irriterar huden.

H319: Orsakar allvarlig ögonirritation.

P201: Inhämta särskilda instruktioner före användning.

P202: Använd inte produkten innan du har läst och förstått säkerhetsanvisningarna.

P260: Inandas inte damm/rök/gaser/dimma/ångor/sprej.

P308+313: Vid exponering eller misstanke om exponering Sök läkarhjälp.

P314: Sök läkarhjälp vid obehag.

P264: Tvätta händerna grundligt efter användning.

P280: Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd.

P305+351+338: VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja.

P337+313: Vid bestående ögonirritation: Sök läkarhjälp.

P302+352: VID HUDKONTAKT: Tvätta med mycket tvål och vatten.

P332+313: Vid hudirritation: Sök läkarhjälp.

P362+364: Ta av nedstänkta kläder och tvätta dem innan de används igen.

Endast för yrkesmässig användning.

- Du kan få tillgång till säkerhetsdatablad genom att kontakta en lokal distributör eller Leica Biosystems regionkontor. En annan möjlighet är Leica Biosystems webbplats på www.LeicaBiosystems.com.
- Prover, både före och efter fixeringen, och allt material som använts tillsammans med dem ska hanteras som infektiöst avfall enligt gängse praxis. Pipettera aldrig reagenser med munnen och undvik att reagenser eller prover kommer i kontakt med hud och slemhinnor. Om reagenser eller prover kommer i kontakt med känsliga områden, skölj med stora mängder vatten. Sök läkarvård.
- Angående avfallshantering av potentiellt toxiska material hänvisar vi till gällande europeiska, nationella och lokala bestämmelser och förordningar.
- Minimera mikrobiologisk kontamination av reagens. Om detta inte görs kan det leda till en ökad icke-specifik infärgning.
- Återvinande och andra inkubationstider eller temperaturer än de specificerade kan ge felaktiga resultat. Sådana förändringar ska valideras av användaren.

Instruktioner Vid Användning

CMV Probe har utvecklats för användning med det automatiska BOND-systemet (som innefattar systemen Leica BOND-MAX och Leica BOND-III) i kombination med Anti-Fluorescein Antibody, BOND Polymer Refine Detection och BOND hjälpreagenser. Det rekommenderade färgningsprotokollet för CMV Probe är ISH Protocol A. Enzymatisk förbehandling med BOND Enzyme Pretreatment Kit, Enzyme 1 rekommenderas, 15 minuter.

Använd alltid för ändamålet avsedda vävnads- och reagenskontroller. Vävnads- och reagensprotokollen ska överensstämma med CMV Probe-protokollet.

Kvalitetskontroll

Skilnader i vävnadsbehandling och tekniska metoder i användarens laboratorium kan ge stor variation i resultaten; regelbundna internkontroller är därför nödvändiga utöver metoderna nedan.

Positiv vävnadskontroll

Används för att påvisa korrekt förberedda vävnader och rätt färgningstekniker. En positiv vävnadskontroll per testuppsättning bör ingå vid varje färgningskörning. En vävnad med svag positiv färgning är bättre lämpad för optimal kvalitetskontroll och för att upptäcka låga nivåer av reagensdegradering än en vävnad med stark positiv färgning.

Negativ vävnadskontroll

Bör undersökas efter den positiva vävnadskontrollen, för att bekräfta sondmärkningens specificitet gentemot målet. Alternativt ger ofta den mängd olika celltyper som finns i de flesta vävnadssnitt upphov till negativa kontrollområden, men detta bör kontrolleras av användaren.

Negativ reagenskontroll

Använd RNA Negative Control Probe PB0809 i stället för CMV Probe på en begränsad del av varje patientprov för att utvärdera icke-specifik färgning och underlätta tolkningen av specifik infärgning av målet.

Positiv reagenskontroll

Använd RNA Positive Control Probe PB0785 i stället för CMV Probe på en begränsad del av varje patientprov för information om bibehållande av nukleinsyror i vävnaden samt sondens tillgång till nukleinsyror. Om den positiva vävnadskontrollen inte uppvisar positiv färgning bör resultat erhållna från testproverna anses vara ogiltiga.

Patientvävnad

Undersök patientprover färgade med CMV Probe sist. Positiv färgningsintensitet bör utvärderas inom ramen för all ospecifik bakgrunds-färgning av RNA Negative Control Probe PB0809.

Förväntade Resultat

Normala vävnader

Ingen specifik CMV mRNA-färgning detekterades med användning av PB0614 i flera olika normala vävnader. Svag färgning detekterades i epitelialceller i sköldkörteln, prostata, struphuvud samt matstrupe, njurgångar, sekretoriska celler i binjurarna samt Leydig-celler. Denna färgning interfererar inte med tolkning av färgningen. (Totalt antal utvärderade normalfall = 100).

Tumörvävnader

PB0614 färgade 3/3 CMV-infekterad lunga, 1/1 CMV-infekterad tarm samt 1/1 CMV-infekterad lever. Ingen färgning sågs i lungtumörer (0/3), äggstockstumörer (0/3), levertumörer (0/3), sköldkörteltumörer (0/3), esofagealtumörer (0/2), brösttumörer (0/2), metastatiska tumörer av okänt ursprung (0/2), hjärntumörer (0/2), testikeltumörer (0/2), hudtumörer (0/2), en kolontumör (0/1), en magsäckstumör (0/1), en rektal tumör (0/1), en struphuvudstumör (0/1) samt en thymustumör (0/1). (Totalt antal utvärderade onormala fall = 34).

PB0614 rekommenderas för detektion av CMV mRNA.

Produktspecifika Begränsningar

CMV Probe har optimerats hos Leica Biosystems för användning med Anti-Fluorescein Antibody, BOND Polymer Refine Detection och BOND hjälpreagenser. Användare som avviker från rekommenderat testförfarande måste vid ändrade förhållanden ta ansvar för tolkningen av patientresultaten. Protokolliderna kan variera på grund av variationer i vävnads fixering och hur effektivt enzymerna smälter och skall fastställas empiriskt. RNA Negative Control Probe ska användas då förhållanden för återvinande och protokollider ska optimeras.

Felsökning

Referens 8 kan vara till hjälp vid felsökningsåtgärd.

Testprover ska kompletteras med lämpliga vävnads- och reagenskontroller.

Kontakta en lokal distributör eller Leica Biosystems regionkontor för att rapportera onormal infärgning.

Mer Information

Mer information om *in situ*-hybridisering med BOND-reagens finns under rubrikerna Bakgrund till metoden, Nödvändig materiel, Förbereda provet, Kvalitetskontroll, Verifiering av assayer, Tolka infäringsresultat, Symbolförklaring för etiketter och Allmänna begränsningar i "Använda BOND-reagens" i BOND användardokumentation.

Referenser

1. Bissinger, A.L., Singzer, C., Kaiserling, E. and Jahn, G., 2002. Human cytomegalovirus as a direct pathogen: correlation of multiorgan involvement and cell distribution with clinical and pathological findings in a case of congenital inclusion disease. *Journal of Medical Virology* 67, pp. 200—206
2. Pass RF, Fowler KB, Boppana SB et al. Congenital CMV infection following first trimester maternal infection: Symptoms at birth and outcomes. *Journal of Clinical Virology* 2006;35:216—220.
3. Singh N. Cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients: new challenges and their implications for preventive strategies. *Journal of Clinical Virology*. 2006 Apr;35(4):474—7.
4. Erice A Tierney C Hirsch M Caliendo et al. AIDS Clinical Trials Group Protocol 360 Study Team. Cytomegalovirus (CMV) and human immunodeficiency virus (HIV) burden, CMV end-organ disease, and survival in subjects with advanced HIV infection (AIDS Clinical Trials Group Protocol 360). *Clinical Infectious Diseases*. 2003;37(4):567—78
5. TC Wu, WA Lee, MC Pizzorno et al. Localization of the human cytomegalovirus 2.7-kb major early beta-gene transcripts by RNA *in situ* hybridization in permissive and nonpermissive infections. *American Journal of Pathology*. 1992 141: 1247—1254.
6. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
7. Villanova PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. 1991; 7(9). Order code M29-P.
8. Wilkinson DG. The theory and practice of *in situ* hybridization. In: Wilkinson DG. (ed.) *In situ* Hybridization A practical approach. 2nd Edition. New York: Oxford University Press, 1998, pp.18—20.

Utgivningsdatum

26 februari 2020

BOND Ready-to-Use ISH

CMV Probe

Αρ. καταλόγου: PB0614

Σκοπός Χρήσης

Αυτό το αντιδραστήριο προορίζεται για διαγνωστική χρήση *in vitro*.

Το CMV Probe προορίζεται για χρήση για την ποιοτική ταυτοποίηση του πρώιμου γονιδιακού μεταγραφήματος RNA του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού σε μονιμοποιημένο με φορμόλη, ενσωματωμένο σε παραφίνη ιστό με *in situ* υβριδισμό (ISH) με χρήση του αυτοματοποιημένου συστήματος BOND (περιλαμβάνει το σύστημα Leica BOND-MAX και το σύστημα Leica BOND-III).

Η κλινική ερμηνεία οποιασδήποτε χρώσης ή της απουσίας της θα πρέπει να συμπληρώνεται με μορφολογικές μελέτες και σωστούς μάρτυρες και θα πρέπει να αξιολογείται στα πλαίσια του κλινικού ιστορικού του ασθενούς και άλλων διαγνωστικών εξετάσεων από ειδικευμένο παθολογοανατόμο.

Περίληψη και Επεξήγηση

Ο κυτταρομεγαλοϊός (CMV) είναι μέλος της οικογένειας των β ερπητοϊών. Ο CMV μεταδίδεται μέσω σωματικών υγρών και είναι δυνατόν να εδραιώσει πρωτοπαθή λοίμωξη, λανθάνουσα λοίμωξη και επακόλουθη ιική επανενεργοποίηση. Ο CMV είναι δυνατόν να εδραιώσει λοίμωξη σε πολλά όργανα, συμπεριλαμβανομένου του πνεύμονα, του νεφρού και του ήπατος, συγκεκριμένα, ενεργός ιός έχει παρατηρηθεί σε επιθηλιακά κύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες και λεία μυϊκά κύτταρα, καθώς και μεσεγχεματικά κύτταρα, ηπατοκύτταρα, κοκκιοκύτταρα και προερχόμενα από μονοκύτταρα μακροφάγα¹.

Κατά τη διάρκεια ενεργούς CMV λοίμωξης, υπάρχει χρονική σύνθεση τριών κατηγοριών πρωτεϊνών, κωδικοποιημένων από ιικά γονίδια που ονομάζονται ενδιάμεσα-πρώιμα, πρώιμα και όψιμα. Οι ενδιάμεσες-πρώιμες πρωτεΐνες εκφράζονται 1-3 ώρες μετά τη λοίμωξη και πιστεύεται ότι διαδραματίζουν ρόλο στην αποτελεσματικότητα της ιικής αντιγραφής. Οι πρώιμες πρωτεΐνες κατευθύνουν την ιική σύνθεση, ενώ οι όψιμες πρωτεΐνες είναι κυρίως δομικές, ενεχόμενες στη συγκρότηση του ισωματίου.

Ο CMV είναι ένα κοινό ευκαιριακό παθογόνο, ικανό να προκαλεί σοβαρή νόσο σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς όπως οι ασθενείς με AIDS, οι ασθενείς με μόσχευμα και στα νεογνά. Ο συγγενής CMV είναι αποτέλεσμα ενδομήτριας λοίμωξης και παρά τη τλειονότητα των παιδιών είναι ασυμπτωματικά, ο συγγενής CMV είναι δυνατόν να έχει ως αποτέλεσμα νευροαισθητηριακή βλάβη, γλωστικά, κινητικά και οπτικά ελλείμματα, καθώς και επιληπτικές κρίσεις^{2,4}.

Ο ISH με χρήση του CMV Probe χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των ανθρώπινων CMV λοιμώξεων σε μονιμοποιημένο με φορμόλη, ενσωματωμένο σε παραφίνη ιστό⁵. Η μέθοδος είναι αναπαραγώγιμη και πρέπει να έχει ως αποτέλεσμα έντονη, καστανή, κυρίαρχα κυτταροπλασματική χρώση κυττάρων που περιέχουν πρώιμο γονιδιακό RNA του CMV.

Αντιδραστήρια Που Παρέχονται

Το CMV Probe είναι ένας συζευγμένος με φλουορεσκήνη ανιχνευτής ολιγονουκλεοτιδίων που παρέχεται σε διάλυμα υβριδισμού.

Συνολικός όγκος = 5,5 mL

Αραίωση και Ανάμειξη

Το CMV Probe είναι έτοιμο για χρήση. Δεν απαιτείται ανασύσταση, ανάμειξη, αραίωση ή τιτλοδότηση του αντιδραστηρίου αυτού.

Υλικά Που Απαιτούνται Αλλά Δεν Παρέχονται

Για μια πλήρη λίστα των υλικών που απαιτούνται για την επεξεργασία δειγμάτων και τη χρώση *in situ* υβριδισμού με χρήση του συστήματος BOND (περιλαμβάνει το σύστημα Leica BOND-MAX και το σύστημα Leica BOND-III), ανατρέξτε στην ενότητα "Χρήση αντιδραστηρίων BOND" στο υλικό τεκμηρίωσης χρήσης της BOND.

Φύλαξη και Σταθερότητα

Φυλάσσετε στους 2–8 °C. Το προϊόν είναι σταθερό υπό τις συνθήκες αυτές έως την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα του περιέκτη.

Δεν υπάρχουν εμφανείς ενδείξεις που να υποδεικνύουν μόλυνση ή/και αστάθεια. Ταυτόχρονα με τον ιστό της εξέτασης πρέπει να αναλύονται κατάλληλοι θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες ιστού.

Επαναφέρετε το προϊόν στους 2–8 °C αμέσως μετά τη χρήση.

Συνθήκες φύλαξης εκτός από αυτές που καθορίζονται παραπάνω πρέπει να επαληθεύονται από τον χρήστη⁶.

Προφυλάξεις

- Αυτό το προϊόν προορίζεται για διαγνωστική χρήση *in vitro*.

CMV PROBE

Περιέχει Φορμαϊδιο (<50%) και θεϊκή δεξτράνη (<30%).
GHS07: Θαυμαστικό.
GHS08: Κίνδυνος για την υγεία.
Προειδοποιητές λέξεις: Κίνδυνος.

H360D: Μπορεί να βλάψει το έμβρυο.
H315: Προκαλεί ερεθισμό του δέρματος.
H319: Προκαλεί σοβαρό οφθαλμικό ερεθισμό.

P201: Εφοδιαστείτε με τις ειδικές οδηγίες πριν από τη χρήση.
P202: Μην το χρησιμοποιήσετε πριν διαβάσετε και κατανοήσετε τις οδηγίες προφύλαξης.
P260: Μην αναπνέετε σκόνη/αναθυμιάσεις/αέρια/σταγονίδια/ατμούς/εκνεφώματα.
P308+313: ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ έκθεσης ή πιθανότητας έκθεσης: Συμβουλευθείτε/Επισκεφθείτε γιατρό.
P314: Συμβουλευθείτε/Επισκεφθείτε γιατρό εάν αισθανθείτε αδιαθεσία.
P264: Πλύνετε χέρια σχολαστικά μετά το χειρισμό.
P280: Να φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/πρόσωπο.
P305+351+338: ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΑ ΜΑΤΙΑ: Ξεπλύνετε προσεκτικά με νερό για αρκετά λεπτά. Εάν υπάρχουν φακοί επαφής, αφαιρέστε τους, εφόσον είναι εύκολο.
Συνεχίστε να ξεπλύνετε.
P337+313: Εάν δεν υποχωρεί ο οφθαλμικός ερεθισμός: Συμβουλευθείτε/Επισκεφθείτε γιατρό.
P302+352: ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΟ ΔΕΡΜΑ: Πλύνετε με άφθονο νερό και σαπούνι.
P332+313: Εάν παρατηρηθεί ερεθισμός του δέρματος: Συμβουλευθείτε/Επισκεφθείτε γιατρό.
P362+364: Βγάλτε τα μολυσμένα ρούχα και πλύνετε τα πριν τα ξαναχρησιμοποιήσετε.
Μόνο για επαγγελματική χρήση.

- Για να λάβετε ένα αντίτυπο του δελτίου δεδομένων ασφαλείας υλικού, επικοινωνήστε με τον τοπικό σας διανομέα ή τα περιφερειακά γραφεία της Leica Biosystems ή, εναλλακτικά, επισκεφθείτε τον ιστότοπο της Leica Biosystems, www.LeicaBiosystems.com.
- Τα δείγματα, πριν και μετά τη μονιμοποίηση, καθώς και όλα τα υλικά που εκτίθενται σε αυτά, πρέπει να υποβάλλονται σε χειρισμό ως δυνητικά μετάδοσης λοίμωξης και να απορρίπτονται με κατάλληλες προφυλάξεις. Μην αναρροφάτε ποτέ με πιπέτα τα αντιδραστήρια ή τα στόμα και αποφεύγετε την επαφή του δέρματος και των βλεννογόνων με αντιδραστήρια ή δείγματα. Εάν τα αντιδραστήρια ή τα δείγματα έλθουν σε επαφή με ευαίσθητες περιοχές, πλύνετε με άφθονες ποσότητες νερού. Ζητήστε τη συμβουλή ιατρού.
- Συμβουλευτείτε τους ομοσπονδιακούς, πολιτειακούς ή τοπικούς κανονισμούς για απόρριψη τυχόν δυνητικών τοξικών συστατικών.
- Ελαχιστοποιήστε τη μικροβιακή μόλυνση των αντιδραστηρίων, διότι διαφορετικά ενδέχεται να αυξηθεί η μη ειδική χρώση.
- Ανάκτηση, χρόνοι ή θερμοκρασίες επώασης διαφορετικές από εκείνες που καθορίζονται ενδέχεται να δώσουν εσφαλμένα αποτελέσματα. Τυχόν τέτοια μεταβολή πρέπει να επικυρώνεται από το χρήστη.

Οδηγίες Χρήσης

Το CMV Probe αναπτύχθηκε προς χρήση στο αυτοματοποιημένο σύστημα BOND (περιλαμβάνει το σύστημα Leica BOND-MAX και το σύστημα Leica BOND-III), σε συνδυασμό με τα ακόλουθα: Anti-Fluorescein Antibody, BOND Polymer Refine Detection και τα βοηθητικά αντιδραστήρια BOND. Το συνιστώμενο πρωτόκολλο χρώσης για το CMV Probe είναι το ISH Protocol A. Συνιστάται ενζυμική προεπεξεργασία με χρήση του BOND Enzyme Pretreatment Kit, Enzyme 1, για 15 πρακτικά.

Θα πρέπει πάντα να χρησιμοποιούνται κατάλληλοι μάρτυρες ιστού και αντιδραστήριου. Το πρωτόκολλο για τους μάρτυρες ιστού και αντιδραστήριου θα πρέπει να αντιστοιχεί στο πρωτόκολλο του CMV Probe.

Ποιοτικός έλεγχος

Τυχόν διαφορές στην επεξεργασία των ιστών και τις τεχνικές διαδικασίες στο εργαστήριο του χρήστη ενδέχεται να προκαλέσουν σημαντική μεταβλητότητα στα αποτελέσματα, καθιστώντας αναγκαία την τακτική εκτέλεση εσωτερικών ελέγχων επιπρόσθετα προς τις ακόλουθες διαδικασίες.

Θετικοί μάρτυρες ιστού

Χρησιμοποιείται για να υποδεικνύει σωστά παρασκευασμένους ιστούς και σωστές τεχνικές χρώσης. Θα πρέπει να περιλαμβάνεται ένας θετικός μάρτυρας ιστού για κάθε σύνολο συνθηκών εξέτασης σε κάθε εκτέλεση χρώσης. Ένας ιστός με ασθενή θετική χρώση είναι καταλληλότερος από έναν ιστό με ισχυρή θετική χρώση για βέλτιστο ποιοτικό έλεγχο και για την ανίχνευση πολύ μικρών επιπέδων τυχόν αποδόμησης των αντιδραστηρίων.

Αρνητικός μάρτυρας ιστού

Θα πρέπει να εξετάζεται μετά από το θετικό μάρτυρα ιστού για επαλήθευση της ειδικότητας της σήμανσης του ανιχνευτή στο στόχο. Εναλλακτικά, η ποικιλία διαφόρων κυτταρικών τύπων που υπάρχουν στις περισσότερες τομές ιστών παρέχει συχνά θέσεις αρνητικού μάρτυρα, αλλά αυτό θα πρέπει να επαληθεύεται από το χρήστη.

Αρνητικός μάρτυρας αντιδραστήριου

Χρησιμοποιήστε το RNA Negative Control Probe PB0809 αντί του CMV Probe με μια τομή κάθε δείγματος ασθενούς, για να αξιολογήσετε τη μη ειδική χρώση και να επιπρέψετε την καλύτερη ερμηνεία της ειδικής χρώσης στο στόχο.

Θετικός μάρτυρας αντιδραστήριου

Χρησιμοποιήστε το RNA Positive Control Probe PB0785 αντί του CMV Probe με μια τομή κάθε δείγματος ασθενούς, για να παράσχετε πληροφορίες σχετικά με τη διατήρηση νουκλεϊκών οξέων στον ιστό, καθώς και την προσπελασιμότητα των νουκλεϊκών οξέων από τον ανιχνευτή. Εάν το RNA Positive Control Probe δεν παρουσιάζει θετική χρώση, τα αποτελέσματα με τα δείγματα της εξέτασης θα πρέπει να θεωρούνται άκυρα.

Ιστός ασθενούς

Εξετάστε τα δείγματα ασθενούς που έχουν υποστεί χρώση με το CMV Probe στο τέλος. Η ένταση της θετικής χρώσης θα πρέπει να εκτιμάται στο πλαίσιο τυχόν μη ειδικής χρώσης υποβάθρου του RNA Negative Control Probe PB0809.

Αναμενόμενα Αποτελέσματα

Φυσιολογικοί ιστοί

Κατά τη χρήση του PB0614 σε μεγάλο εύρος φυσιολογικών ιστών δεν παρατηρήθηκε ειδική χρώση mRNA κυτταρομεγαλοϊού (CMV). Ασθενής χρώση παρατηρήθηκε σε επιθηλιακά κύτταρα του θυρεοειδή, του προστάτη, του λάρυγγα και του οισοφάγου, των νεφρικών σωληναρίων, σε εκκριτικά κύτταρα των επινεφριδίων και σε κύτταρα Leydig. Αιτή η χρώση δεν επηρεάζει την ερμηνεία της χρώσης. (Συνολικός αριθμός φυσιολογικών περιστατικών που αξιολογήθηκαν = 100).

Νεοπλασματικοί ιστοί

Κατά τη χρήση του PB0614 παρατηρήθηκε χρώση σε 3/3 πνεύμονες με λοίμωξη από CMV, 1/1 έντερο με λοίμωξη από CMV και 1/1 ήπαρ με λοίμωξη από CMV. Δεν παρατηρήθηκε χρώση σε όγκους των πνευμόνων (0/3), όγκους των ωοθηκών (0/3), όγκους του ήπατος (0/3), όγκους του θυρεοειδή (0/3), όγκους του οισοφάγου (0/2), όγκους του μαστού (0/2), μεταστατικούς όγκους ανώστου αιτολογίας (0/2), όγκους του εγκεφάλου (0/2), όγκους των όρχεων (0/2), όγκους του δέρματος (0/2), έναν όγκο στο κόλον (0/1), έναν όγκο του στομάχου (0/1), έναν όγκο του ορθού (0/1), έναν όγκο του λάρυγγα (0/1) και έναν όγκο του θύμου αδένος (0/1). (Συνολικός αριθμός μη φυσιολογικών περιστατικών που αξιολογήθηκαν = 34).

Το PB0614 συνιστάται για την ανίχνευση mRNA κυτταρομεγαλοϊού.

Ειδικοί Περιορισμοί Του Προϊόντος

Το CMV Probe έχει βελτιστοποιηθεί στην Leica Biosystems για χρήση με το Anti-Fluorescein Antibody, το BOND Polymer Refine Detection και τα βοηθητικά αντιδραστήρια BOND. Χρήστες που αποκλίνουν από τις συνιστώμενες διαδικασίες εξέτασης πρέπει να αποδέχονται την ευθύνη για ερμηνεία των αποτελεσμάτων ασθενών υπό τις συνθήκες αυτές. Οι χρόνοι του πρωτοκόλλου ενδέχεται να διαφέρουν, λόγω της μεταβλητότητας της μονιμοποίησης του ιστού και της αποτελεσματικότητας της ενζυμικής πέψης και πρέπει να προσδιορίζονται εμπειρικά. Κατά τη βελτιστοποίηση των συνθηκών ανάκτησης και των χρόνων πρωτοκόλλου, πρέπει να χρησιμοποιηθεί RNA Negative Control Probe.

Αντιμετώπιση Προβλημάτων

Η παραπομπή 8 ενδέχεται να βοηθήσει στην ενέργεια αποκατάστασης.

Τα δείγματα εξέτασης πρέπει να συμπληρώνονται με τους κατάλληλους μάρτυρες ιστού και αντιδραστηρίων.

Για να αναφέρετε περιπτώσεις ασυνήθους χρώσης, επικοινωνήστε με τον τοπικό σας διανομέα ή το περιφερειακό γραφείο της Leica Biosystems.

Πρόσθετες Πληροφορίες

Μπορείτε να βρείτε περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τον *in situ* υβριδισμό με αντιδραστήρια BOND, υπό τους τίτλους "Αρχή της διαδικασίας", "Απαιτούμενα υλικά", "Προετοιμασία δείγματος", "Ποιοτικός έλεγχος", "Επαλήθευση προσδιορισμού", "Ερμηνεία της χρώσης", "Υπόμνημα για τα σύμβολα στις ετικέτες" και "Γενικοί περιορισμοί" στην ενότητα "Χρήση αντιδραστηρίων BOND" στο υλικό τεκμηρίωσης χρήσης της BOND.

Παραπομπές

1. Bissinger, A.L., Singzer, C., Kaiserling, E. and Jahn, G., 2002. Human cytomegalovirus as a direct pathogen: correlation of multiorgan involvement and cell distribution with clinical and pathological findings in a case of congenital inclusion disease. *Journal of Medical Virology* 67, pp. 200—206
2. Pass RF, Fowler KB, Boppana SB et al. Congenital CMV infection following first trimester maternal infection: Symptoms at birth and outcomes. *Journal of Clinical Virology* 2006;35:216—220.
3. Singh N. Cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients: new challenges and their implications for preventive strategies. *Journal of Clinical Virology*, 2006 Apr;35(4):474—7.
4. Erice A Tierney C Hirsch M Caliendo et al. AIDS Clinical Trials Group Protocol 360 Study Team. Cytomegalovirus (CMV) and human immunodeficiency virus (HIV) burden, CMV end-organ disease, and survival in subjects with advanced HIV infection (AIDS Clinical Trials Group Protocol 360). *Clinical Infectious Diseases*. 2003;37(4):567—78
5. TC Wu, WA Lee, MC Pizzorno et al. Localization of the human cytomegalovirus 2.7-kb major early beta-gene transcripts by RNA *in situ* hybridization in permissive and nonpermissive infections. *American Journal of Pathology*. 1992 141: 1247—1254.
6. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
7. Villanova PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. 1991; 7(9). Order code M29-P.
8. Wilkinson DG. The theory and practice of *in situ* hybridization. In: Wilkinson DG. (ed.) *In situ* Hybridization A practical approach. 2nd Edition. New York: Oxford University Press, 1998, pp.18—20.

Ημερομηνία Έκδοσης

26 Φεβρουαρίου 2020

BOND Ready-to-Use ISH CMV Probe

Katalognummer.: PB0614

Tilsigtet Anvendelse

Dette reagens er beregnet til brug i *in vitro*-diagnostik.

CMV Probe er beregnet til brug til kvalitativ identifikation af humant cytomegalovirus' tidlige gen-RNA-transkript i formalinfikseret, paraffinindstøbt væv vha *in situ*-hybridisering (ISH) med brug af det automatiske BOND-system (bestående af Leica BOND-MAX-systemet og Leica BOND-III-systemet).

Den kliniske fortolkning af enhver farvning eller fravær af samme skal ledsages af morfologiske undersøgelser og egnede kontroller og skal evalueres af en uddannet patolog i konteksten af patientens anamnese samt andre diagnostiske prøver.

Resumé og Forklaring

Cytomegalovirus (CMV) er et medlem af beta-herpesvirusgruppen. CMV overføres via legemsvæsker og kan etablere primær infektion, latent infektion og efterfølgende viral reaktivering. CMV kan tilvejebringe infektion i mange organer, herunder lunger, nyrer og leveren, navnlig er aktivt virus set i epitelceller, endotelceller, fibroblaster og celler i glatte muskler samt i mesenchymale celler, hepatocytter, granulocytter og monocytderiverede makrofager¹.

Under aktiv CMV-infektion er der tidsbestemt syntese af tre kategorier af proteiner, indkodet med virale gener betegnet middeltidlige, tidlige og sene. Middeltidlige proteiner eksprimeres 1-3 timer efter infektion og menes at spille en rolle for effekten af viral replikation. Tidlige proteiner styrer viral syntese, mens sene proteiner hovedsageligt er strukturelle, involveret i virionsamling.

CMV er et almindeligt opportunistisk patogen, der er i stand til at forårsage alvorlig sygdom hos immunkompromitterede personer, såsom AIDS-patienter, transplantationspatienter og hos nyfødte. Kongenit CMV er et resultat af intrauterin infektion, og selv om hovedparten af børn er symptomfrie, kan kongenit CMV resultere i sensorineuralt høretab, kognitive, motoriske og synsmæssige mangler og krampeanfald²⁻⁴.

ISH med brug af CMV Probe anvendes til detektion af humane CMV-infektioner i formalinfikseret, paraffinindstøbt væv⁵. Metoden er reproducerbar og bør resultere i intens brun overvejende cytoplasmatiske farvning af celler indeholdende tidligt gen-RNA fra CMV.

Leverede Reagenser

CMV Probe er en fluoresceinkonjugeret oligonukleotidsonde leveret i hybridiseringsopløsning.

Totalt volumen = 5,5 ml

Fortynding og Blanding

CMV Probe er klar til brug. Rekonstitution, blanding, fortynding eller titrering af dette reagens er ikke påkrævet.

Nødvendige Materialer, Der Ikke Medfølger

Der henvises til "Anvendelse af BOND-reagenser" i BOND-brugerdokumentationen for en komplet liste over materialer, der er nødvendige til præparatbehandling og *in situ*-hybridiseringsfarvning ved hjælp af BOND-systemet (bestående af Leica BOND-MAX-systemet og Leica BOND-III-systemet).

Opbevaring og Stabilitet

Opbevares ved 2–8 °C. Produktet er under disse forhold stabilt frem til udløbsdatoen, der er angivet på beholderens etiket.

Der er ingen tydelige tegn, der indikerer kontaminering og/eller ustabilitet. Passende positive og negative vævskontroller bør køres samtidigt med testvæv.

Sættes tilbage til opbevaring ved 2–8 °C umiddelbart efter brug.

Opbevaringsbetingelser ud over de oven for specificerede skal verificeres af brugeren⁶.

Forholdsregler

- Dette produkt er beregnet til brug i *in vitro*-diagnostik.

CMV PROBE

Indeholder Formamid (<50%) og dextransulfat (<30%).

GHS07: Udråbstegn.

GHS08: Sundhedsfarer.

Signalord: Fare.

H360D: Kan skade det ufødte barn.

H315: Forårsager hudirritation.

H319: Forårsager alvorlig øjenirritation.

P201: Indhent særlige anvisninger før brug.

P202: Anvend ikke produktet, før alle advarsler er læst og forstået.

P260: Indånd ikke pulver/røg/gas/låge/damp/spray.

P308+313: VED eksponering eller mistanke om eksponering: Søg lægehjælp.

P314: Søg lægehjælp ved ubehag.

P264: Vask hænder grundigt efter brug.

P280: Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjensbeskyttelse/ansigtsbeskyttelse.

P305+351+338: VED KONTAKT MED ØJNENE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis dette kan gøres let. Fortsæt skyllning.

P337+313: Ved vedvarende øjenirritation: Søg lægehjælp.

P302+352: VED KONTAKT MED HUDEN: Vask med rigeligt sæbe og vand.

P332+313: Ved hudirritation: Søg lægehjælp.

P362+364: Forurenede tøj tages af og vaskes, før det bruges igen.

Må kun anvendes af professionelle brugere.

- En kopi af sikkerhedsdatabladet (MSDS) kan fås ved henvendelse til den lokale distributør eller til Leica Biosystems' regionale kontor. Det kan tillige hentes på Leica Biosystems' hjemmeside www.LeicaBiosystems.com.
- Præparater, både før og efter fiksering, samt alle øvrige materialer, der eksponeres for disse, skal håndteres som værende i stand til at overføre infektion og skal bortskaffes under iagttagelse af passende forholdsregler. Afpipetter ikke reagenser med munden, og undgå at reagenser og præparater kommer i kontakt med hud og slimhinder. Hvis reagenser eller præparater kommer i kontakt med følsomme områder, skal disse vaskes med rigelige mængder vand. Søg læge.
- Bortskaffelse af potentielt toksiske komponenter skal ske i overensstemmelse med gældende statslig eller lokal lovgivning.
- Mikrobiel kontamination af reagenser skal minimeres for at undgå en øget ikke-specifik farvning.
- Genfindning, inkubationstider eller -temperaturer ud over de specificerede kan give fejlagtige resultater. Enhver ændring af denne art skal valideres af brugeren.

Brugsanvisning

CMV Probe er udviklet til brug for det automatiserede BOND system (bestående af Leica BOND-MAX-systemet og Leica BOND-III-systemet) i kombination med Anti-Fluorescein Antibody, BOND Polymer Refine Detection og BOND-hjælpereagenser. Brugere. Den anbefalede farvningsprotokol for CMV Probe er ISH Protocol A. Til enzymforbehandling, som anbefales, bruges BOND Enzyme Pretreatment Kit, Enzyme 1 i 15 minutter.

Der skal altid bruges egnede vævs- og reagenskontroller. Protokollen for vævs- og reagenskontrollerne skal svare til protokollen for CMV Probe.

Kvalitetskontrol

Forskelle i behandlingen af væv og forskelle i tekniske procedurer i brugerens laboratorium kan frembringe betydeligt varierende resultater og nødvendiggøre regelmæssig udførelse af kontroller på stedet ud over nedenstående procedurer.

Positiv vævskontrol

Anvendes til påvisning af, at vævet er fremstillet korrekt, og at der er anvendt korrekte farvningsteknikker. Der bør inkluderes en positiv vævskontrol for hvert sæt testbetingelser i hver farvekørsel. Svagt positivt farvet væv er mere egnet end kraftigt positivt farvet væv til optimal kvalitetskontrol og påvisning af små niveauer af reagensnedbrydning.

Negativ vævskontrol

Skal undersøges efter den positive vævskontrol for at verificere specificiteten af mærkningen af prøben i forhold til målstedet.

Alternativt frembyder de mange forskellige celletyper, der er til stede i de fleste vævssnit, ofte negative kontrolsteder, men dette skal verificeres af brugeren.

Negativ reagenskontrol

Brug RNA Negative Control Probe PB0809 i stedet for CMV Probe på et snit af hver patientprøve for at vurdere uspecifik farvning og muliggøre bedre fortolkning af specifik farvning på målstedet.

Positiv reagenskontrol

Brug RNA Positive Control Probe PB0785 i stedet for CMV Probe på et snit af hver patientprøve for at undersøge holdbarheden af kernesyrerne og samtidig probens tilgængelighed til kernesyrerne. Hvis den RNA Positive Control Probe ikke udviser positiv farvning, må testresultatet fortolkes som ikke brugbart.

Patientvæv

Undersøg patientprøver farvet med CMV Probe sidst. Intensiteten af positiv farvning skal bedømmes i sammenhæng med uspecifik baggrundsfarvning af RNA Negative Control Probe PB0809.

Forventede Resultater

Normalt væv

Ingen specifik CMV-mRNA farvning blev påvist ved hjælp af PB0614 i en lang række af normale væv. Svag farvning blev påvist i epitelceller i thyreoidea, prostata, larynx og øsofagus, tubuli i nyren, sekretoriske celler i binyrerne og Leydigs celler. Denne farvning påvirker ikke tolkning af farvningen. (Samlet antal evaluerede, normale tilfælde = 100).

Tumørvæv

PB0614 farvede 3/3 CMV-inficeret lunge, 1/1 CMV-inficeret tarm og 1/1 CMV-inficeret lever. Der blev ikke observeret farvning i lungetumorer (0/3), ovarietumorer (0/3), levertumorer (0/3), thyreoideatumorer (0/3), øsofagustumorer (0/2), brysttumorer (0/2), metastatiske tumorer af ukendt oprindelse (0/2), hjernetumorer (0/2), testikeltumorer (0/2), hudtumorer (0/2), en colontumor (0/1), en mave tumor (0/1), en tumor i rectum (0/1), en tumor i larynx (0/1) og en thymustumor (0/1). (Samlet antal evaluerede, abnorme tilfælde = 34).

PB0614 anbefales til påvisning af CMV-mRNA.

Produktspecifikke Begrænsninger

CMV Probe er blevet optimeret hos Leica Biosystems til brug sammen med Anti-Fluorescein Antibody, BOND Polymer Refine Detection og BOND-hjælpereagenser. Brugere, som afviger fra anbefalede testprocedurer, må selv tage ansvaret for fortolkningen af patientresultater under disse betingelser. Protokolliderne kan variere på grund af variationer i vævsfiksering og effektiviteten af enzymatisk nedbrydning og skal bestemmes empirisk. Der skal anvendes RNA Negative Control Probe ved optimering af genfi ndingsbetingelser og protokollider.

Fejlfinding

Reference 8 kan være til hjælp ved afhjælpende foranstaltninger.

Testprøver skal suppleres med de relevante vævs- og reagenskontroller.

Kontakt den lokale distributør eller Leica Biosystems' regionale kontor for at rapportere usædvanlig farvning.

Yderligere Oplysninger

Yderligere oplysninger om *in situ*-hybridisering med BOND-reagenser kan findes i "Anvendelse af BOND-reagenser" i BOND-brugerdokumentationen under overskrifterne Proceduremæssige principper, Nødvendige materialer, Præparatklargøring, Kvalitetskontrol, Analyseverifikation, Fortolkning af farvning, Nøgle til symboler på etiketter og Generelle begrænsninger.

Referencer

1. Bissinger, A.L., Singzer, C., Kaiserling, E. and Jahn, G., 2002. Human cytomegalovirus as a direct pathogen: correlation of multiorgan involvement and cell distribution with clinical and pathological findings in a case of congenital inclusion disease. *Journal of Medical Virology* 67, pp. 200—206
2. Pass RF, Fowler KB, Boppana SB et al. Congenital CMV infection following first trimester maternal infection: Symptoms at birth and outcomes. *Journal of Clinical Virology* 2006;35:216—220.
3. Singh N. Cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients: new challenges and their implications for preventive strategies. *Journal of Clinical Virology*. 2006 Apr;35(4):474—7.
4. Erice A Tierney C Hirsch M Caliendo et al. AIDS Clinical Trials Group Protocol 360 Study Team. Cytomegalovirus (CMV) and human immunodeficiency virus (HIV) burden, CMV end-organ disease, and survival in subjects with advanced HIV infection (AIDS Clinical Trials Group Protocol 360). *Clinical Infectious Diseases*. 2003;37(4):567—78
5. TC Wu, WA Lee, MC Pizzorno et al. Localization of the human cytomegalovirus 2.7-kb major early beta-gene transcripts by RNA *in situ* hybridization in permissive and nonpermissive infections. *American Journal of Pathology*. 1992 141: 1247—1254.
6. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
7. Villanova PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. 1991; 7(9). Order code M29-P.
8. Wilkinson DG. The theory and practice of *in situ* hybridization. In: Wilkinson DG. (ed.) *In situ* Hybridization A practical approach. 2nd Edition. New York: Oxford University Press, 1998, pp.18—20.

Udgivelsesdato

26 februar 2020

BOND Ready-to-Use ISH CMV Probe

Catalogusnummer: PB0614

Beoogd gebruik

Dit reagens is bedoeld voor *in vitro* diagnostisch gebruik.

CMV Probe is bedoeld voor gebruik bij de kwalitatieve identificatie van humaan cytomegalovirus early gene RNA-transcript in met formaline gefixeerd, in paraffine ingebed weefsel, door *in situ* hybridisatie (ISH) met gebruik van het automatische BOND systeem (waaronder het Leica BOND-MAX-systeem en het Leica BOND-III-systeem).

De klinische interpretatie van eventuele kleuring of ontbreken daarvan moet worden aangevuld met morfologisch onderzoek en het gebruik van relevant controlemateriaal, en moet worden geëvalueerd binnen de context van de klinische geschiedenis van de patiënt en eventuele andere diagnostische tests door een gekwalificeerde patholoog.

Samenvatting en uitleg

Cytomegalovirus (CMV) is lid van de familie van bèta-herpesvirussen. CMV wordt overgebracht via lichaamsvloeistoffen en kan resulteren in primaire infectie, latente infectie en latere virale reactivatie. CMV kan vele organen infecteren, waaronder longen, nieren en lever. In actieve staat wordt het virus met name gevonden in epitheelcellen, endotheelcellen, fibroblasten en gladde spiercellen, maar ook in mesenchymcellen, hepatocyten, granulocyten en van monocyten afgeleide macrofagen¹.

Tijdens actieve CMV-infectie is er een tijdelijke synthese van drie soorten eiwitten, gecodeerd door virale genen en aangeduid als onmiddellijk vroege (immediate early, IE-), vroege en late eiwitten. Onmiddellijk vroege eiwitten komen tot expressie 1-3 uur na de infectie en hebben vermoedelijk invloed op de efficiëntie van de virusvermenigvuldiging. Vroege eiwitten sturen de virale synthese aan, terwijl late eiwitten voornamelijk structureel werk verrichten, bij de assemblage van virusdeeltjes.

CMV is een veelvoorkomend opportunistisch pathogeen dat mensen met een zwak immuunsysteem, zoals aidspatiënten, transplantatiepatiënten en pasgeborenen ernstig ziek kan maken. Congenitale CMV is het resultaat van infectie in de baarmoeder en hoewel het merendeel van de kinderen asymptomatisch is, kan congenitale CMV resulteren in sensorineurale doofheid, cognitieve, motorische en visuele gebreken en epileptische aanvallen²⁻⁴.

ISH met behulp van CMV Probe wordt gebruikt voor de detectie van humane CMV-infecties in met formaline gefixeerd, in paraffine ingebed weefsel⁵. De methode is reproduceerbaar en zou moeten resulteren in diepbruine, hoofdzakelijk cytoplasmatische kleuring van cellen die vroege genen-RNA van CMV bevatten.

Geleverde reagentia

CMV Probe is een fluoresceïne-gekoppelde oligonucleotideprobe in Hybridization Solution.

Totaal volume = 5,5 mL

Verdunnen en mengen

CMV Probe is klaar voor gebruik. Reconstrueren, mengen, verdunnen of titreren van dit reagens is niet vereist.

Benodigde materialen die niet worden meegeleverd

Zie "Het gebruik van BOND reagentia" in de gebruikersdocumentatie over BOND voor een compleet overzicht van materialen die nodig zijn voor monsterbehandeling en *in situ* hybridisatiekleuring met behulp van het BOND systeem (waaronder het Leica BOND-MAX-systeem en het Leica BOND-III-systeem).

Opslag en stabiliteit

Bewaar bij 2–8 °C. Onder deze omstandigheden is het product stabiel tot de vervaldatum die op het etiket van de container is vermeld.

Er zijn geen zichtbare tekenen die kunnen duiden op besmetting en/of instabiliteit. Tegelijk met het testweefsel moet weefsel voor positieve en negatieve controle worden gebruikt.

Zet het product direct na gebruik weer terugbij een temperatuur van 2-8 °C.

Afwijkende opslagomstandigheden moeten worden geverifieerd door de gebruiker⁶.

Voorzorgsmaatregelen

- Dit product is bedoeld voor *in vitro* diagnostisch gebruik.

CMV PROBE

Bevat Formamide (<50%) en dextraansulfaat (<30%).

GHS07: Uitroepteken.

GHS08: Gezondheidsgevaar.

Signaalwoorden: Gevaar.

H360D: Kan het ongeboren kind schaden.

H315: Veroorzaakt huidirritatie.

H319: Veroorzaakt ernstige oogirritatie.

P201: Verkrijgen alvorens te gebruiken de speciale aanwijzingen raadplegen.

P202: Pas gebruiken nadat u alle veiligheidsvoorschriften gelezen en begrepen heeft

P260: Stof/rook/gas/nevel/damp/spuitnevel niet inademen.

P308+313: NA (mogelijke) blootstelling: een arts raadplegen.

P314: Bij onwel voelen een arts raadplegen.

P264: Na het werken met dit product handen grondig wassen.

P280: Beschermende handschoenen/beschermende kleding/ogbescherming/gelaatsbescherming dragen.

P305+351+338: BIJ CONTACT MET DE OGEN: voorzichtig afspoelen met water gedurende een aantal minuten; contactlenzen verwijderen, indien mogelijk; blijven spoelen.

P337+313: Bij aanhoudende oogirritatie: een arts raadplegen.

P302+352: BIJ CONTACT MET DE HUID: met veel water en zeep wassen.

P332+313: Bij huidirritatie: een arts raadplegen.

P362+364: Verontreinigde kleding uittrekken en wassen alvorens deze opnieuw te gebruiken.

Alleen voor professionele gebruikers.

- Neem voor het veiligheidsinformatieblad contact op met uw lokale distributeur of regionale kantoor van Leica Biosystems, of ga naar de website van Leica Biosystems: www.LeicaBiosystems.com
- Monsters, vóór en na fixatie, en alle materialen die eraan worden blootgesteld, moeten worden behandeld alsof zij tot infectie in staat zijn, en met de juiste voorzorgsmaatregelen worden afgevoerd. Reagentia mogen nooit met de mond worden gepipetteerd. Vermijd contact van huid en slijmvliezen met reagentia of monsters. Als reagentia of monsters in contact komen met gevoelige gebieden, moet u deze gebieden wassen met een ruime hoeveelheid water. Neem contact op met een arts.
- Raadpleeg de richtlijnen van de lokale, provinciale of nationale overheid voor het afvoeren van potentieel giftige componenten.
- Minimaliseer de kans op microbiële contaminatie van reagentia. Als u dit niet doet, kan er een toename van niet-specifieke kleuring optreden.
- Terugwinning, incubatietijden of temperaturen die afwijken van de specificaties kunnen foutieve resultaten geven. Zulke veranderingen moeten worden gevalideerd door de gebruiker.

Gebruiksaanwijzing

CMV Probe is ontwikkeld voor gebruik op het geautomatiseerde BOND systeem (waaronder het Leica BOND-MAX-systeem en het Leica BOND-III-systeem), in combinatie met Anti-Fluorescein Antibody en BOND Polymer Refine Detection. Het aanbevolen kleuringsprotocol voor CMV Probe is ISH Protocol A. Het wordt aanbevolen enzymen terug te winnen met behulp van de BOND Enzyme Pretreatment Kit, Enzyme 1, gedurende 15 minuten.

Gebruik altijd geschikte controles voor weefsel en reagens. Het protocol voor controle van weefsel en reagens dient overeen te stemmen met het protocol van de CMV Probe.

Kwaliteitscontrole

Verschillen in weefselverwerking en technische procedures in het laboratorium van de gebruiker kunnen significante verschillen in resultaten geven, wat het noodzakelijk maakt regelmatig interne controles uit te voeren in aanvulling op de volgende procedures.

Positieve weefselcontrole

Wortd gebruikt om een indicatie te geven dat de weefsels juist geprepareerd zijn en dat de juiste kleuringstechnieken zijn gebruikt.

Er dient één positieve weefselcontrole te worden opgenomen voor iedere set testcondities waarin de kleuring wordt uitgevoerd. Voor optimale kwaliteitscontrole en detectie van lichte degeneratie van het reagens is een weefsel met zwakke positieve kleuring meer geschikt dan een weefsel met sterke positieve kleuring.

Negatieve weefselcontrole

Dient te worden onderzocht ná het positieve controleweefsel, om de specificiteit van de labeling van de probe met het target te verifiëren.

De verscheidenheid aan cellypen die in de meeste weefselcoupes aanwezig zijn levert vaak negatieve controlelocaties op, maar dit moet wel worden geverifieerd door de gebruiker.

Negatieve reagenscontrole

Gebruik RNA Negative Control Probe PB0809 in plaats van de CMV Probe met een coupe van ieder patiëntmonster om niet-specifieke kleuring te evalueren en specifieke kleuring bij het target beter te kunnen interpreteren.

Positieve reagenscontrole

Gebruik RNA Positive Control Probe PB0785 in plaats van de CMV Probe met een coupe van ieder patiëntmonster om informatie te verkrijgen over het behoud van nucleïnezuren in het weefsel, en over toegankelijkheid van nucleïnezuren voor de probe. Als de RNA Positive Control Probe geen positieve kleuring vertoont, moeten de resultaten die op basis van testmonsters zijn verkregen als ongeldig worden beschouwd.

Patiëntweefsel

Bekijk patiëntmonsters gekleurd met CMV Probe als laatste. Bepaal de intensiteit van de positieve kleuring binnen de context van iedere niet-specifieke achtergrondkleuring van de RNA Negative Control Probe PB0809.

Verwachte Resultaten

Normale weefsels

Er werd geen specifieke CMV mRNA-kleuring gedetecteerd bij gebruik van PB0614 op een breed scala aan normale weefsels. Er werd een zwakke kleuring gedetecteerd in epitheelcellen van schildklier, prostaat, larynx en slokdarm, niertubuli, secretoire cellen in de bijnieren en Leydigcellen. Deze kleuring staat interpretatie van de kleuring niet in de weg. (Totaal aantal beoordeelde normale gevallen = 100).

Tumorweefsels

PB0614 kleurde 3/3 met CMV geïnfecteerde longen, 1/1 met CMV geïnfecteerde darmen en 1/1 met CMV geïnfecteerde lever. Er werd geen kleuring waargenomen in longtumoren (0/3), ovariumtumoren (0/3), levertumoren (0/3), schildkliertumoren (0/3), slokdarmtumoren (0/2), borsttumoren (0/2), gemetastaseerde tumoren van onbekende oorsprong (0/2), hersentumoren (0/2), testistumoren (0/2), huidtumoren (0/2), een colontumor (0/1), een rectumtumor (0/1), een tumor van de larynx (0/1) en een tumor van de thymus (0/1). (Totaal aantal beoordeelde afwijkende gevallen = 34).

PB0614 wordt aanbevolen voor de detectie van mRNA van CMV.

Productspecifieke beperkingen

CMV Probe is door Leica Biosystems geoptimaliseerd voor gebruik met BOND Polymer Refine Detection en BOND hulpreagentia. Gebruikers die afwijken van de aanbevolen testprocedures moeten verantwoordelijkheid nemen voor interpretatie van patiëntresultaten onder deze omstandigheden. De protocollijden kunnen verschillen als gevolg van variatie in weefselfixatie en de effectiviteit van enzymatische vertering, en moeten empirisch worden vastgesteld. Gebruik RNA Negative Control Probe bij optimalisatie van de omstandigheden voor terugwinning, en van protocollijden.

Probleemoplossing

Referentie 8 helpt mogelijk bij fouterstelling.

Testmonsters moeten worden aangevuld met het juiste weefsel en de juiste reagenscontroles. Neem contact op met uw lokale distributeur of het regionale kantoor van Leica Biosystems om ongebruikelijke kleuring te melden.

Nadere informatie

Nadere informatie over *in situ* hybridisatie met BOND reagens, onder de kopjes Principe van de procedure, Benodigde materialen, Monsterpreparatie, Kwaliteitscontrole, Testverificatie, Interpretatie van kleuring, Uitleg bij symbolen op etiketten en Algemene beperkingen, kunt u vinden in "Het gebruik van BOND reagentia" in de gebruikersdocumentatie behorende bij BOND.

References

1. Bissinger, A.L., Singzer, C., Kaiserling, E. and Jahn, G., 2002. Human cytomegalovirus as a direct pathogen: correlation of multiorgan involvement and cell distribution with clinical and pathological findings in a case of congenital inclusion disease. *Journal of Medical Virology* 67, pp. 200—206
2. Pass RF, Fowler KB, Boppana SB et al. Congenital CMV infection following first trimester maternal infection: Symptoms at birth and outcomes. *Journal of Clinical Virology* 2006;35:216—220.
3. Singh N. Cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients: new challenges and their implications for preventive strategies. *Journal of Clinical Virology*. 2006 Apr;35(4):474—7.
4. Erice A Tierney C Hirsch M Caliendo et al. AIDS Clinical Trials Group Protocol 360 Study Team. Cytomegalovirus (CMV) and human immunodeficiency virus (HIV) burden, CMV end-organ disease, and survival in subjects with advanced HIV infection (AIDS Clinical Trials Group Protocol 360). *Clinical Infectious Diseases*. 2003;37(4):567—78
5. TC Wu, WA Lee, MC Pizzorno et al. Localization of the human cytomegalovirus 2.7-kb major early beta-gene transcripts by RNA *in situ* hybridization in permissive and nonpermissive infections. *American Journal of Pathology*. 1992 141: 1247—1254.
6. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
7. Villanova PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. 1991; 7(9). Order code M29-P.
8. Wilkinson DG. The theory and practice of *in situ* hybridization. In: Wilkinson DG. (ed.) *In situ* Hybridization A practical approach. 2nd Edition. New York: Oxford University Press, 1998, pp.18—20.

Publicatiedatum

26 februari 2020

BOND Ready-to-Use ISH

CMV Probe

Katalognummer: PB0614

Tiltenkt bruk

Denne reagenten er for *in vitro* diagnostisk bruk.

CMV Probe er tiltenkt bruk for kvalitativ identifisering av human cytomegalovirus tidlig gen RNA-transkriptet, i formalinfixert, parafininnstøpte vev ved *in situ* hybridisering (ISH) med det automatiske BOND-systemet (herunder Leica BOND-MAX-systemet og Leica BOND-III-systemet).

Den kliniske tolkningen av eventuelle flekker eller dens fravær bør suppleres med morfologiske studier og forsvarlig kontroll og bør vurderes i sammenheng med pasientens kliniske historie og andre diagnostiske tester av en kvalifisert patolog.

Sammendrag og forklaring

Cytomegalovirus (CMV) er et medlem av beta herpesvirus-familien. CMV overføres via kroppsvæsker og kan etablere en primær infeksjon, latent infeksjon og påfølgende viral reaktivering. CMV kan etablere infeksjon i mange organer, inkludert lunge, nyre og lever, i særdeleshet, har aktivt virus blitt observert i epitelceller, endotelceller, fibroblaster og glattmuskelceller, så vel som i mesenkymale celler, hepatocytter, granulocytter og monocytt-avledede makrofager¹.

I løpet av aktiv CMV-infeksjon, er det en tidsmessige syntese av tre kategorier av proteiner kodet av virale gener betegnet mellomliggende – tidlig, tidlig og sen. Mellomliggende-tidlige proteiner uttrykkes 1-3 timer etter infeksjon, og er antatt å spille en rolle for effektiviteten av viral replikasjon. Tidlige proteiner dirigerer viral syntese, mens sene proteiner er i hovedsak strukturelle, involvert i virusoppbyggingen.

CMV er et vanlig opportunistisk patogen, i stand til å forårsake alvorlig sykdom hos immunsupprimerte individer som AIDS-pasienter, transplanterte pasienter og hos nyfødte. Medfødt CMV er et resultat av intrauterin infeksjon, og selv om de fleste av barna er asymptomatiske, kan medfødt CMV føre til nevrogen hørselstap, kognitivt, motor og visuelt underskudd og anfall²⁻⁴.

ISH ved hjelp av CMV Probe anvendes for påvisning av humane CMV-infeksjoner i formalinfixert, parafininnstøpte vev⁵.

Frengangsmåten er reproducerbar og bør resultere i intens brun hovedsakelig cytoplasmisk farging av celler inneholdende CMV-tidlig gen RNA.

Reagens som følger med

CMV Probe er en fluorescein-konjugert oligonukleotid-sonde levert i hybridiseringsoppløsningen.

Samlet volum = 5,5 mL

Oppløsning og blanding

CMV Probe er klar til bruk. Rekonstituering, blanding, fortykning eller titrering av denne reagens er ikke nødvendig.

Materialer som trengs, men som ikke følger med

Henvis til "Bruke BOND reagenser" i BOND brukerdokumentasjonen for en komplett liste over materialer som kreves for prøvebehandling og *in situ* hybridisering flekker ved hjelp av BOND-systemet (herunder Leica BOND-MAX-systemet og Leica BOND-III-systemet).

Oppbevaring og stabilitet

Oppbevar ved 2-8 ° C. Produktet er stabilt under disse forholdene opp til utløpsdatoen som er angitt på beholderen etiketten.

Det er ingen åpenbare tegn som indikerer forurensning og/eller ustabilitet. Egnede positive og negative kontroller vev skal kjøres samtidig som testvevet.

Gå tilbake til 2-8 ° C umiddelbart etter bruk.

Oppbevaringsbetingelser annet enn de som er oppgitt ovenfor må bekreftes av brukeren⁶.

Forholdsregler

- Dette produktet er for *in vitro* diagnostisk bruk.

CMV PROBE

Inneholder Formamid (<50%)

og dekstransulfat (<30%).

GHS07: Utoprsteget.

GHS08: Helsefare.

Signalord: Fare.

H360D: Kan skade det ufødte barnet.

H315: Irriterer huden.

H319: Gir alvorlig

øyeirritasjon.

P201: Innhent særskilt instruks før bruk.

P202: Skal ikke håndteres før alle advarsler er lest og oppfattet.

P260: Ikke innånd støv/røyk/gass/tåke/damp/aerosoler.

P308+313: Ved eksponering eller mistanke om eksponering: Søk legehjelp.

P314: Søk legehjelp ved ubehag.

P264: Vask hender grundig etter bruk.

P280: Benytt vernehansker/verneklær/vernebriller beskyttelse / ansiktsskjerm.

P305+351+338: VED KONTAKT MED ØYNENE: Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser dersom dette enkelt lar seg gjøre. Fortsett skyllingen.

P337+313: Ved vedvarende øyeirritasjon: Søk legehjelp.

P302+352: VED HUDKONTAKT: Vask med mye såpe og vann.

P332+313: Ved hudirritasjon: Søk legehjelp.

P362+364: Ta av forurenset tøy og vask det før gjenbruk.

Kun til yrkesmessig bruk.

- For å få en kopi av HMS-databladet, kan du kontakt din lokale leverandør eller regionale kontor til Leica Biosystems, eller alternativt, besøke Leica Biosystems Nettside, www.LeicaBiosystems.com
- Prøver, før- og etter fiksering, og alle materialer utsatt for dem, skal håndteres som om i stand til å overføre smitte og kastes med riktige forholdsregler⁷. Pipetter aldri reagenser via munnen og unngå kontakt med hud og slimhinner med reagenser eller prøver. Hvis reagenser eller prøver kommer i kontakt med sensitive områder, vask med store mengder vann. Oppsøk medisinsk tilsyn.
- Søkk råd hos føderale, statlige eller lokale forskrifter for avhending av alle potensielt giftige komponenter.
- Reduser mikrobiell forurensning av reagensene, eller en økning av ikke- spesifikk farging kan forekomme.
- Henting, inkubasjonstider eller temperaturer andre enn de som er spesifisert, kan gi feilaktige resultater. Enhver slik endring skal godkjennes av brukeren.

Bruksanvisninger

CMV Probe ble utviklet for bruk på automatiserte BOND-systemet (herunder Leica BOND-MAX-systemet og Leica BOND-III-systemet) i kombinasjon med Anti-Fluorescein Antibody og BOND Polymer Refine Detection. Den anbefalte fargingsprotokollen for CMV Probe er ISH Protocol A. Enzym gjenhenting anbefales å bruke BOND Enzyme Pretreatment Kit, Enzyme 1, i 15 minutter.

Passende vev- og reagenskontroller skal alltid brukes. Protokollen for vev- og reagenskontroller skal tilsvare CMV Probe.

Kvalitetskontroll

Forskjeller i vevbehandling og tekniske prosedyrer i brukerens laboratorium kan medføre signifikant variasjon i resultatene, nødvendigvis regelmessig yter interne kontroller i tillegg til følgende prosedyrer.

Positiv vevskontroll

Brukes til å angi riktig forberedt vev og riktig fargeteknikker.

En positiv vevskontroll bør inkluderes for hvert sett med testforhold i hver fargekjøring. Et vev med svakt positiv farging er mer egnet enn et vev med sterk positiv farging for optimal kvalitetskontroll og å detektere små nivåer av reagens degradering.

Negativ vevskontroll

Skal undersøkes etter den positive vev kontroll for å kontrollere spesifisiteten av merking av sonden til målet.

Alternativt, variasjonen av ulike celletyper som finnes i de fleste vevseksjoner ofte tilby negative kontrollområder, men dette bør verifiseres av brukeren.

Negativ reagenskontroll

Bruk RNA Negative Control Probe PB0809 i stedet for CMV Probe med en del av hver pasientprøve for å vurdere ikke-spesifikk farging og tillate bedre tolkning av spesifikk farging på målet.

Positiv reagenskontroll

Bruk RNA Positive Control Probe PB0785 i stedet for CMV Probe med en del av hver pasientprøve for å gi informasjon om bevaring av nukleinsyrer i vevet, så vel som tilgjengeligheten av nukleinsyrer til sonden. Hvis RNA Positive Control Probe unnlater å demonstrere positiv farging, bør resultater med prøvene anses som ugyldige.

Pasientvev

Undersøke pasientprøver farget med CMV Probe til slutt. Positiv fargingsintensitet skal bli vurdert i sammenheng med hvilken som helst ikke-spesifikk bakgrunnsfarging av RNA Negative Control Probe PB0809.

Forventede resultater

Normalt vev

Ingen spesifikk CMV mRNA farging ble oppdaget ved bruk av PB0614 i et vidt spekter av normale vev. Svak farging ble oppdaget i epitelceller i skjoldbruskkjertelen, prostata, strupehode og spiserør, tubuli i nyrene, sekresjonscellene i binyrene og Leydig-cellene. Denne fargingen forstyrrer ikke fargingstolkning. (Totalt antall evaluerte normale tilfeller = 100).

Tumorvev

PB0614 farget 3/3 CMV smittet lunge, 1/1 CMV smittet tarm og 1/1 CMV smittet lever. Ingen farging ble observert i lungesvulster (0/3), ovarietumorer (0/3), leversvulster (0/3), skjoldbruskkjertelsvulster (0/3), spiserørsvulster (0/2), brystsvulster (0/2), metastatiske svulster med ukjent opprinnelse (0/2), hjernesvulster (0/2), testikkelsvulster (0/2), hudkreft (0/2), en kolonsvulst (0/1), en magesvulst (0/1), en rektal tumor (0/1), en svulst i strupehodet (0/1), og en tumor i brisselen (0/1). (Totalt antall evaluerte unormale tilfeller = 34).

PB0614 anbefales for oppdagelse av CMV mRNA.

Produktspesifikke begrensninger

CMV Probe har blitt optimalisert på Leica Biosystems for bruk med Anti-Fluorescein Antibody, BOND Polymer Refine Detection og BOND ekstra reagenser. Brukere som avviker fra anbefalte testprosedyrer må ta ansvar for tolkning av pasient resultater under disse omstendighetene. Protokollen kan variere på grunn av variasjoner i vev fiksering og effektiviteten av enzymatisk oppslutning, og må bestemmes empirisk. RNA negativ kontrollsonde bør brukes når du optimaliserer gjenfinningsforhold og protokoll flere ganger.

Feilsøking

Referanse 8 kan hjelpe i forbedringstiltak.

Testprøver skal utfylles av faktiske vev- og reagenskontroller. Kontakt din lokale forhandler eller regionale kontor for Leica Biosystems for rapportering av uvanlige flekker.

Videre informasjon

Ytterligere informasjon om *in situ* hybridisering med BOND reagenser, under overskriften Prinsipp for prosedyren, Materialer som er nødvendige, forberedning, kvalitetskontroll, analysebekreftelse, tolkning av farging, symbol på etiketter og general begrensninger kan finnes i "Bruk av BOND reagenser" i din BOND brukerdokumentasjon.

Referanser

1. Bissinger, A.L., Singzer, C., Kaiserling, E. and Jahn, G., 2002. Human cytomegalovirus as a direct pathogen: correlation of multiorgan involvement and cell distribution with clinical and pathological findings in a case of congenital inclusion disease. *Journal of Medical Virology* 67, pp. 200—206
2. Pass RF, Fowler KB, Boppana SB et al. Congenital CMV infection following first trimester maternal infection: Symptoms at birth and outcomes. *Journal of Clinical Virology* 2006;35:216—220.
3. Singh N. Cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients: new challenges and their implications for preventive strategies. *Journal of Clinical Virology*. 2006 Apr;35(4):474—7.
4. Erice A Tierney C Hirsch M Caliendo et al. AIDS Clinical Trials Group Protocol 360 Study Team. Cytomegalovirus (CMV) and human immunodeficiency virus (HIV) burden, CMV end-organ disease, and survival in subjects with advanced HIV infection (AIDS Clinical Trials Group Protocol 360). *Clinical Infectious Diseases*. 2003;37(4):567—78
5. TC Wu, WA Lee, MC Pizzorno et al. Localization of the human cytomegalovirus 2.7-kb major early beta-gene transcripts by RNA *in situ* hybridization in permissive and nonpermissive infections. *American Journal of Pathology*. 1992 141: 1247—1254.
6. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
7. Villanova PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. 1991; 7(9). Order code M29-P.
8. Wilkinson DG. The theory and practice of *in situ* hybridization. In: Wilkinson DG. (ed.) *In situ* Hybridization A practical approach. 2nd Edition. New York: Oxford University Press, 1998, pp.18—20.

Utgivelsesdato

26 februar 2020

BOND Ready-to-Use ISH CMV Probe

Katalog No: PB0614

Kullanım Amacı

Bu reaktif, *in vitro* tanı kullanımı içindir.

CMV Probe, otomatik BOND sistemi kullanılarak (Leica BOND-MAX sistemini ve Leica BOND-III sistemini de içermektedir) *in situ* hibridizasyon (ISH) yoluyla formalinde fikse edilmiş parafine gömülü dokudaki insan sitomegalovirüs erken gen RNA transkriptinin kalitatif tanımlanmasında kullanılmak üzere tasarlanmıştır.

Boyamaların veya bulunmamasının klinik yorumu morfolojik çalışmalar ve uygun kontrollerle tamamlanmalı ve uzman bir patoloğ tarafından hastanın klinik öyküsü ve diğer tanı testleri bağlamında değerlendirilmelidir.

Özet ve Açıklama

Sitomegalovirüs (CMV) Beta Herpes Virüs ailesinin bir üyesidir. CMV vücut sıvıları ile bulaşır ve primer enfeksiyon, latent enfeksiyon ve takip eden viral reaktivasyona neden olabilir. CMV akciğer, böbrek ve karaciğer gibi birçok organda enfeksiyona neden olabilir ve özellikle aktif virüs epitelyal hücreler, endotelial hücreler, fibroblastlar ve düz kas hücreleri ve ayrıca mezenkimal hücreler, hepatositler, granülositler ve monosit türü makrofajlarda gözlemlenmiştir¹.

Aktif CMV enfeksiyonu sırasında, ara-erken, erken ve geç olarak atanmış viral genler tarafından kodlanmış üç protein kategorisinin temporal sentezi meydana gelir. Ara-erken proteinler enfeksiyondan 1-3 saat sonra eksprese edilir ve viral replikasyonun etkililiğinde rol oynadıkları düşünülür. Erken proteinler viral sentezi yönlendirirken, geç proteinler öncelikli olarak yapısal şekilde virion grubuna katılır.

CMV, AIDS hastaları, transplant hastaları ve yenidoğanlar gibi bağışıklık sistemi bozulmuş bireylerde ciddi hastalıklara neden olma kapasitesine sahip yaygın bir fırsatçı patojendir. Kongenital CMV intrauterin enfeksiyonunun bir sonucudur ve çocukların büyük kısmı asemptomatik olsa da, kongenital CMV sensorinöral işitme kaybı, bilişsel, motor ve görme bozuklukları ve nöbetler²⁻⁴.

CMV Probe'un kullanıldığı ISH formalinde fikse edilmiş parafine gömülü dokudaki insan CMV enfeksiyonlarının saptanması için kullanılır⁵. Yöntem tekrarlanabilir ve CMV erken gen RNA'sı içeren hücrelerin genel olarak yoğun, kahverengi sitoplazmik boyaması ile sonuçlanmalıdır.

Sağlanan Reaktifler

CMV Probe, hibridizasyon çözeltisi içinde temin edilen fluoresein-konjuge oligonükleotid probdur.

Toplam hacim = 5,5 mL

Sevreltme ve Karıştırma

CMV Probe kullanıma hazırdır. Bu reaktifin sulandırılması, karıştırılması, sevreltilmesi veya titre edilmesi gerekmez.

Gerekli Olan Fakat Sağlanmamış Malzemeler

BOND sistemi kullanılarak (Leica BOND-MAX sistemini ve Leica BOND-III sistemini de içermektedir) numune işleme ve *in situ* hibridizasyon boyama için gerekli malzemelerin tam listesi için BOND kullanıcı dokümantasyonundaki "BOND Reaktiflerinin Kullanımı" bölümüne bakınız.

Saklama ve Stabilite

2-8 °C'de saklayın. Ürün kap etiketinde belirtilen son kullanma tarihine kadar bu koşullar altında stabildir.

Kontaminasyon ve/veya instabilite gösteren açık bir belirti yoktur. Uygun pozitif ve negatif doku kontrolleri test dokusu ile aynı anda gerçekleştirilmelidir.

Kullanımdan hemen sonra derhal 2-8 °C sıcaklığa dönün.

Yukarıda belirtilenler dışındaki saklama koşulları kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır⁶.

Önemler

- Bu ürün *in vitro* tanı kullanımı için tasarlanmıştır.

CMV PROBE

Formamid (<50%) içeriyor ve dekstran sülfat (<30%).
GHS07: Ünllem işareti.
GHS08: Sağlık tehlikesi.
İsaret kelimesi: Tehlike.

H360D: Anne karnında çocuğa zarar verebilir.
H315: Cilt tahrislerine neden olur.
H319: Ciddi göz tahrişine neden olur.

P201: Kullanmadan önce özel talimatları alınız.

P202: Kullanmadan önce tüm güvenlik talimatlarını okuyunuz ve anlayınız.

P260: Toz/duman/gaz/sis/buhar/aerosol solumayınız.

P308+313: Maruziyet veya etkilene HALİNDE: Tıbbi tavsiye / bakım alın.

P314: Kendinizi iyi hissetmiyorsanız tıbbi tavsiye / bakım alın.

P264: Kullandıktan sonra ellerinizi iyice yıkayınız.

P280: koruyucu eldiven/koruyucu elbise/göz koruyucu/yüz siperi kullanınız.

P305+351+338: GÖZLERLE TEMAS HALİNDE: Birkaç dakika dikkatlice suyla yıkayınız. Mümkünse mevcut kontak lensleri çıkarınız. Yıkamaya devam ediniz.

P337+313: Göz tahrisinin devamı halinde: Tıbbi tavsiye / bakım alın.

P302+352: CİLT İLE TEMAS HALİNDE: Bol miktarda su ve sabunla yıkayınız.

P332+313: Cilt tahrisinde: Tıbbi tavsiye / bakım alın.

P362+364: Kontamine olmuş giysileri çıkarın ve tekrar kullanmadan önce yıkayın.

Sadece uzmanlar tarafından kullanılmalıdır.

- Malzeme Güvenlik Bilgi Formunun bir kopyasını almak için yerel distribütörünüz veya Leica Biosystems bölge ofisi ile iletişime geçin veya Leica Biosystems'in internet sitesini ziyaret edin:
www.LeicaBiosystems.com
- Fiksasyondan önce ve sonra numuneler ve bunlara maruz kalan tüm malzemeler⁷ enfeksiyon bulaştırabilen maddeler olarak ele alınmalı ve uygun önlemler alınarak imha edilmelidir. Reaktifleri hiçbir zaman ağızınızla pipetlemeyin ve reaktiflerin veya numunelerin cilt ve muköz membranlarla temasından kaçının. Reaktiflerin veya numunelerin hassas bölgelerle temas etmesi halinde, bol su ile yıkayın. Tıbbi yardım alın.
- Toksik olma potansiyeli olan bileşenleri imha etmek için Federal, Devlet veya yerel düzenlemeleri takip edin.
- Reaktiflerin mikrobiyal kontaminasyonunu en aza indirin, aksi halde spesifik olmayan boyamada bir artış meydana gelebilir.
- Belirtilenlerin dışındaki geri alma, inkübasyon süreleri veya sıcaklıklar hatalı sonuçlara neden olabilir. Bu gibi değişiklikler kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır.

Kullanım Talimatları

CMV Probe Anti-Fluorescein Antibody ve BOND Polymer Refine Detection ile kombinasyon halinde otomatik BOND sistemi (Leica BOND-MAX sistemini ve Leica BOND-III sistemini de içermektedir) üzerinde kullanılmak için geliştirilmiştir. CMV Probe için önerilen boyama protokolü ISH Protocol A'dır. BOND Enzyme Pretreatment Kit, Enzyme 1 kullanılarak 15 dakika boyunca enzim geri alımı tavsiye edilir.

Her zaman uygun doku ve reaktif kontrolleri kullanılmalıdır. Doku ve reaktif kontrolleri protokolü CMV Probe'un protokolüne uygun olmalıdır.

Kalite Kontrol

Kullanıcının laboratuvarındaki doku işleme ve teknik prosedürlerdeki farklılıklar sonuçlarda anlamlı değişkenliğe yol açarak aşağıdaki prosedürlere ek olarak düzenli şekilde şirket içi kontrollerin gerçekleştirilmesini gerektirebilir.

Pozitif Doku Kontrolü

Doğru şekilde hazırlanmış dokuları ve uygun boyama tekniklerini göstermek için kullanılır.

Her boyama döngüsünde her test koşulu setine bir pozitif doku kontrolü dahil edilmelidir. Minör düzeydeki reaktif bozulmalarını saptamak için zayıf pozitif boyama yapılan bir doku optimal kalite kontrol için güçlü pozitif boyama yapılmış bir dokudan daha uygundur.

Negatif Doku Kontrolü

Prob etiketinin hedefe göre spesifikliğini doğrulamak için pozitif doku kontrolünden sonra incelenmesi gerekir.

Alternatif olarak, birçok doku kesitinde bulunan farklı hücre tipleri sık sık negatif kontrol alanları sunar, fakat bu kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır.

Negatif Reaktif Kontrolü

Spesifik olmayan boyamayı değerlendirmek ve hedefteki spesifik boyamanın daha iyi şekilde yorumlanmasını sağlamak için her hasta numunesinin bir kesiti ile CMV Probe yerine RNA Negative Control Probe PB0809'u kullanın.

Pozitif Reaktif Kontrolü

Dokudaki nükleik asitlerin korunması ve nükleik asitlerin proba ulaşabilirliği hakkında bilgi sağlamak için her hasta numunesinin bir kesiti ile CMV prob yerine RNA Positive Control Probe PB0785'i kullanın. RNA Positive Control Probe'un pozitif boyama gösteremediği durumlarda, test numuneleri ile elde edilen sonuçlar geçersiz olarak kabul edilmelidir.

Hasta Dokusu

En son CMV prob ile boyanmış hasta numunelerini inceleyin. Pozitif boyama yoğunluğu şu probun spesifik olmayan arka plan boyaması bağlamında değerlendirilmelidir: RNA Negative Control Probe PB0809.

Öngörülen Sonuçlar

Normal Dokular

PB0614 kullanıldığında çok sayıda normal dokuda spesifik CMV mRNA boyaması saptanmamıştır. Tiroid epitelial hücreleri, prostat, larinks ve özofagus, böbrek tübüleri, böbreküstü bezlerindeki salgı hücreleri ve Leydig hücrelerinde soluk boyama saptanmıştır. Bu boyama, boyamanın yorumlanmasını engellemektedir. (Değerlendirilen toplam vaka sayısı = 100).

Tümörli Dokular

PB0614 3/3 CMV enfeksiyonu akciğeri, 1/1 CMV enfeksiyonlu bağırsağı ve 1/1 CMV enfeksiyonlu karaciğer boyamıştır. Akciğer tümörleri (0/3), overyen tümörleri (0/3), karaciğer tümörleri (0/3), tiroid tümörleri (0/3), özofagus tümörleri (0/2), göğüs tümörleri (0/2), bilinmeyen nedenlerle meydana gelen metastatik tümörler (0/2), beyin tümörleri (0/2), testiküler tümörler (0/2), cilt tümörleri (0/2), kolon tümörü (0/1), mide tümörü (0/1), rektal tümör (0/1), larinks tümörü (0/1) ve timus tümöründe (0/1) boyama görülmemiştir. (Değerlendirilen toplam normal olmayan vaka sayısı = 34).

PB0614 CMV mRNA'nın saptanması için tavsiye edilir.

Ürüne Özgü Sınırlamalar

CMV Probe Leica Biosystems'te Anti-Fluorescein Antibody, BOND Polymer Refine Detection ve BOND yardımcı reaktifleri ile kullanım için optimize edilmiştir. Tavsiye edilen test prosedürlerine riayet etmeyen kullanıcılar bu koşullar altında hasta sonuçların yorumlanmasını ilgili sorumluluğu üstlenmelidir. Protokol süreleri doku fiksasyonundaki varyasyon ve enzimatik sindirim etkililiği nedeniyle farklılık gösterebilir ve ampirik olarak belirlenmelidir. RNA Negative Control Probe geri alma koşulları ve protokol süreleri optimize edilirken kullanılmamalıdır.

Sorun Giderme

Referans 8 soruların giderilmesinde faydalı olabilir.

Test numuneleri uygun doku ve reaktif kontrolleri ile tamamlanmalıdır. Olağandışı boyamayı bildirmek için yerel distribütörünüz veya Leica Biosystems bölge ofisi ile iletişime geçin.

Daha Fazla Bilgi

BOND reaktifleri *in situ* hibridizasyon hakkında daha fazla bilgi BOND kullanıcı dokümantasyonundaki "BOND Reaktiflerinin Kullanımı" içinde Prosedür Prensipleri, Gereklilikler, Numunenin Hazırlanması, Kalite Kontrol, Miktar Tayini Doğrulaması, Boyamanın Yorumlanması, Etiket Üzerindeki Sembollerin Açıklaması ve Genel Sınırlamalar başlıkları altında bulunabilir.

Referanslar

1. Bissinger, A.L., Singzer, C., Kaiserling, E. and Jahn, G., 2002. Human cytomegalovirus as a direct pathogen: correlation of multiorgan involvement and cell distribution with clinical and pathological findings in a case of congenital inclusion disease. *Journal of Medical Virology* 67, pp. 200—206
2. Pass RF, Fowler KB, Boppana SB et al. Congenital CMV infection following first trimester maternal infection: Symptoms at birth and outcomes. *Journal of Clinical Virology* 2006;35:216—220.
3. Singh N. Cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients: new challenges and their implications for preventive strategies. *Journal of Clinical Virology*. 2006 Apr;35(4):474—7.
4. Erice A Tierney C Hirsch M Caliendo et al. AIDS Clinical Trials Group Protocol 360 Study Team. Cytomegalovirus (CMV) and human immunodeficiency virus (HIV) burden, CMV end-organ disease, and survival in subjects with advanced HIV infection (AIDS Clinical Trials Group Protocol 360). *Clinical Infectious Diseases*. 2003;37(4):567—78
5. TC Wu, WA Lee, MC Pizzorno et al. Localization of the human cytomegalovirus 2.7-kb major early beta-gene transcripts by RNA *in situ* hybridization in permissive and nonpermissive infections. *American Journal of Pathology*. 1992 141: 1247—1254.
6. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
7. Villanova PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. 1991; 7(9). Order code M29-P.
8. Wilkinson DG. The theory and practice of *in situ* hybridization. In: Wilkinson DG. (ed.) *In situ* Hybridization A practical approach. 2nd Edition. New York: Oxford University Press, 1998, pp.18—20.

Düzenlenme Tarihi

26 Şubat 2020

BOND Ready-to-Use ISH CMV Probe

Каталожен №: PB0614

Предназначение

Този реагент е за употреба при *in vitro* диагностика.

Продуктът CMV Probe е предназначен за качествена идентификация на ранния РНК транскрипт на човешкия цитомегаловирус, във фиксирана с формалин, вградена в парафин тъкан чрез *in situ* хибризация (ISH) с помощта на автоматизираната система BOND (включва системите Leica BOND-MAX и Leica BOND-III).

Клиничната интерпретация на всяко оцветяване или неговата липса следва да бъде допълнена от морфологични проучвания и съответните контроли и да се оценява в контекста на клиничната история на пациента и други диагностични изследвания от квалифициран патолог.

Описателна и разяснителна

Цитомегаловирусът (CMV) е част от семейството на бета-херпесните вируси. CMV се предава посредством телесни течности и може да причини първична инфекция, латентна инфекция и последваща вирусна реактивация. CMV може да доведе до инфекция в много органи, включително белите дробове, бъбреците и черния дроб, по-специално активният вирус се наблюдава в епителните клетки, ендотелиалните клетки, фибробластите и гладките мускулни клетки, както и в мезенхималните клетки, хепатоцитите, гранулоцитите и макрофагите, извлечени от моноцити¹.

По време на активна инфекция с CMV се наблюдава временен синтез на три категории протеини, кодирани от вирусни гени, обозначени като средно-ранни, ранни и късни. Средно-ранните протеини се отделят 1-3 часа след инфекцирането и се смята, че допринасят за ефективността на вирусната репликация. Ранните протеини контролират вирусния синтез, а късните протеини са основно структурни и участват във формирането на вириона.

CMV е широко разпространен опортюнистичен патоген, който може да причини сериозни заболявания при имунокомпрометирани лица, като например пациенти със СПИН, трансплантирани пациенти и новородени. Вроденият CMV е резултат от втрематочна инфекция и независимо че повечето-голяма част от децата протича безсимптомно, вроденият CMV може да доведе до сензонеурална загуба на слуха, когнитивни, двигателни и зрителни нарушения и припадъци²⁻⁴.

ISH посредством CMV Probe се използва за откриване на инфекции с човешки CMV във фиксирана с формалин, вградена в парафин тъкан⁵. Методът е възпроизводим, а очакваният резултат е наситено кафяво оцветяване на цитоплазмата на клетките, съдържащи РНК на ранните CMV гени.

Предоставени реагенти

CMV Probe е конюгирана с флуоресцин олигонуклеотидна проба, доставена в разтвор за хибризация.

Общ обем = 5,5 mL

Разреждане и смесване

Продуктът CMV Probe е готов за употреба. Не се изисква възстановяване, смесване, разреждане или титриране на този реагент.

Необходими, но непредоставени материали

Вижте „Употреба на реагенти BOND“ във вашата документация за потребителя на BOND за пълен списък от материали, необходими за третиране на спесимени и *in situ* оцветяване с хибризация при използване на системата BOND (включва системите Leica BOND-MAX и Leica BOND-III).

Съхранение и стабилност

Съхранявайте при температура 2 – 8 °C. Продуктът е стабилен при тези условия до изтичане на срока на годност, указан на етикета на контейнера.

Не са налице очевидни признаци, указващи замърсяване и/или нестабилност. Съответните позитивни и негативни тъканни контроли трябва да бъдат обработени едновременно с тестовата тъкан.

Да се върне на температура 2 – 8 °C веднага след употреба.

Другите условия на съхранение, освен посочените по-горе, трябва да бъдат проверени от потребителя⁶.

Предпазни мерки

- Този продукт е предназначен за *in vitro* диагностика.

CMV PROBE

Съдържа формамид (<50%) и декстран сулфат (<30%).
GHS07: Удивителен знак.
GHS08: Опасност за здравето.
Сигнални думи: Опасност.

H360D: Може да увреди плода.
H315: Предизвиква дразнене на кожата.
H319: Предизвиква сериозно дразнене на очите.

P201: Преди употреба се снабдете със специални инструкции.
P202: Не използвайте, преди да сте прочели и разбрали всички предпазни мерки за безопасност.
P260: Не вдишвайте прах/пушек/газ/дим/изпарения/аерозоли.
P308+313: ПРИ явна или предполагаема експозиция: Потърсете медицински съвет/помощ.
P314: При неразположение потърсете медицински съвет/помощ.
P264: Измийте ръцете си старателно след употреба.
P280: Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице.
P305+351+338: ПРИ КОНТАКТ С ОЧИТЕ: Изплакнете внимателно с вода в продължение на няколко минути. Свалете контактните лещи, ако има такива и доколкото това е възможно. Продължете с изплакването.
P337+313: При продължително дразнене на очите: Потърсете медицински съвет/помощ.
P302+352: ПРИ КОНТАКТ С КОЖАТА: Измийте обилно със сапун и вода.
P332+313: При поява на кожно дразнене: Потърсете медицински съвет/помощ.
P362+364: Свалете замърсеното облекло и го изперете преди повторна употреба.
Само за професионална употреба.

- За да получите копие на Информационния лист за безопасност на материалите, свържете се с Вашия местен дистрибутор или регионален офис на Leica Biosystems или посетете уебсайта на Leica Biosystems, www.LeicaBiosystems.com
- Спесимените преди и след фиксация, както и всички материали, изложени на тяхното влияние, трябва да бъдат третирани като способни да предадат инфекция и да бъдат изхвърлени, прилагайки съответните предпазни мерки. Никого не пипетирайте реагенти с уста и избягвайте контакт на кожата и лигавиците с реагенти или спесимени. При контакт на реагенти или спесимени с чувствителни зони измийте зоните с обилно количество вода. Потърсете медицинска помощ.
- Консултирайте се с федералните, държавните или местните регламенти относно изхвърлянето на потенциално токсични компоненти.
- Свеждайте до минимум микробната контаминация на реагентите, в противен случай може да се появи увеличаване на неспецифичното оцветяване.
- Извличането, инкубационните времена или температури, различни от посочените, могат да доведат до погрешни резултати. Всякакви подобни промени трябва да бъдат валидирани от потребителя.

Инструкции за употреба

Продуктът CMV Probe е разработен за употреба с автоматизираната система BOND (включва система Leica BOND-MAX и система Leica BOND-III) в комбинация с Anti-Fluorescein Antibody и BOND Polymer Refine Detection. Препоръчителният протокол за оцветяване за CMV Probe е ISH Protocol A. Препоръчва се извличане на ензими в продължение на 15 минути с помощта на BOND Enzyme Pretreatment Kit, Enzyme 1.

Винаги трябва да се използват подходящи контроли на тъкани и реагенти. Протоколът за контролите на тъкани и реагенти трябва да съответства на този за CMV Probe.

Качествен контрол

Различията в обработката на тъканите и техническите процедури в лабораторията на потребителя могат да доведат до значително вариране на резултатите, налагащо редовно извършване на вътрешен контрол в допълнение към следните процедури.

Позитивна тъканна контрола

Използва се, за да се покажат правилно приготвени тъкани и правилни техники на оцветяване.

Една позитивна тъканна контрола трябва да бъде включена за всеки сет с тестови условия при всяка серия проби за оцветяване. Тъкан със слабо позитивно оцветяване е по-подходяща от тъкан със силно позитивно оцветяване за оптимален качествен контрол и за откриване на по-малки нива на деградация на реагента.

Негативна тъканна контрола

Трябва да се изследва след позитивната тъканна контрола, за да се провери специфичността на маркирането на целевия елемент от сондата.

Алтернативно, разнообразието от различни видове клетки, присъстващи в повечето тъканни срези, често предлага места за негативна контрола, но това трябва да се провери от потребителя.

Негативна контрола на реагента

Използвайте RNA Negative Control Probe PB0809 вместо CMV Probe с участък от спесимена на всеки пациент, за да направите оценка на неспецифичното оцветяване и да дадете по-добра интерпретация на специфичното оцветяване на прицелния елемент.

Позитивна контрола на реагента

Използвайте RNA Positive Control Probe PB0785 вместо CMV Probe с участък от спесимена на всеки пациент, за да предоставите информация за запазването на нуклеиновите киселини в тъканта, както и за достъпността на нуклеиновите киселини за пробата. Ако RNA Positive Control Probe не показва позитивно оцветяване, резултатите от пробите, включени в теста, трябва да се считат за невалидни.

Тъкан от пациента

Спесимените на пациенти, оцветени със CMV Probe, трябва да се изследват последни. Наситеността на позитивното оцветяване трябва да бъде оценена в контекста на всяко неспецифично фоново оцветяване на RNA Negative Control Probe PB0809.

Очаквани резултати

Нормални тъкани

Не се открива специфично оцветяване на мРНК със CMV при използване на PB0614 за широк набор от нормални тъкани. Бледото оцветяване се открива при епителни клетки на щитовидната жлеза, простатата, ларинкса и хранопровода, бъбречните каналчета, секреторните клетки в надбъбречната жлеза и клетките на Лейдиг. Това оцветяване не засяга интерпретирането на оцветяването. (Общ брой на оценените нормални случаи = 100).

Абнормни тъкани

PB0614 оцветява 3/3 CMV-инфектиран бял дроб, 1/1 CMV-инфектирано дебело черво 1/1 CMV-инфектиран черен дроб. Не се наблюдава оцветяване при белодробни тумори (0/3), тумори на яйчниците (0/3), тумори на черния дроб (0/3), тумори на щитовидната жлеза (0/3), тумори на хранопровода (0/2), тумори на млечната жлеза (0/2), метастатични тумори с неизвестна етиология (0/2), мозъчни тумори (0/2), тумори на тестисите (0/2), кожни тумори (0/2), тумор на ободното черво (0/1), тумор на стомаха (0/1), ректален тумор (0/1), тумор на ларинкса (0/1) и тумор на тимуса (0/1). (Общ брой на оценените абнормни случаи = 34).

PB0614 се препоръчва за откриване на мРНК със CMV.

Специфични ограничения на продукта

Продуктът CMV Probe е оптимизиран от Leica Biosystems за употреба с Anti-Fluorescein Antibody, BOND Polymer Refine Detection и спомагателни реагенти BOND. Потребителите, които се отклоняват от препоръчаните процедури за тестване, трябва да поемат отговорност за интерпретацията на резултатите на пациентите при тези обстоятелства. Времетраенето на протоколите може да варира поради вариацията във фиксацията на тъканта и ефективността на ензиматичната асимилация и трябва да се определи емпирично. Трябва да се използва RNA Negative Control Probe при оптимизиране на условията на извличане и времетраенето на протоколите.

Отстраняване на неизправности

Референция 8 може да подпомогне при коригиращи действия.

Тестовите проби трябва да бъдат допълнени от подходящите контроли на тъкани и реагенти.

Свържете се с Вашия местен дистрибутор или регионалният офис на Leica Biosystems, за да съобщите за необичайно оцветяване.

Допълнителна информация

Допълнителна информация за *in situ* хибридизация с реагенти BOND можете да намерите в „Употреба на реагенти BOND“ във вашата документация за потребителя на BOND под заглавията „Принцип на процедурата“, „Необходими материали“, „Приготвяне на спесимен“, „Контрол на качеството“, „Потвърждаване на анализа“, „Интерпретация на оцветяването“, „Легенда на символите на етикетите“ и „Общи ограничения“.

Използвана литература

1. Bissinger, A.L., Singzer, C., Kaiserling, E. and Jahn, G., 2002. Human cytomegalovirus as a direct pathogen: correlation of multiorgan involvement and cell distribution with clinical and pathological findings in a case of congenital inclusion disease. *Journal of Medical Virology* 67, pp. 200—206
2. Pass RF, Fowler KB, Boppana SB et al. Congenital CMV infection following first trimester maternal infection: Symptoms at birth and outcomes. *Journal of Clinical Virology* 2006;35:216—220.
3. Singh N. Cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients: new challenges and their implications for preventive strategies. *Journal of Clinical Virology*. 2006 Apr;35(4):474—7.
4. Erice A Tierney C Hirsch M Caliendo et al. AIDS Clinical Trials Group Protocol 360 Study Team. Cytomegalovirus (CMV) and human immunodeficiency virus (HIV) burden, CMV end-organ disease, and survival in subjects with advanced HIV infection (AIDS Clinical Trials Group Protocol 360). *Clinical Infectious Diseases*. 2003;37(4):567—78
5. TC Wu, WA Lee, MC Pizzorno et al. Localization of the human cytomegalovirus 2.7-kb major early beta-gene transcripts by RNA *in situ* hybridization in permissive and nonpermissive infections. *American Journal of Pathology*. 1992 141: 1247—1254.
6. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
7. Villanova PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. 1991; 7(9). Order code M29-P.
8. Wilkinson DG. The theory and practice of *in situ* hybridization. In: Wilkinson DG. (ed.) *In situ* Hybridization A practical approach. 2nd Edition. New York: Oxford University Press, 1998, pp.18—20.

Дата на издаване

26 февруари 2020

BOND Ready-to-Use ISH

CMV Probe

Katalógusszám: PB0614

Alkalmazási terület

Ez a reagens *in vitro* diagnosztikai használatra szolgál.

A CMV Probe a humán citomegalovírus gének korai RNS-transzkriptumának kvalitatív azonosítására szolgál formalinban fixált, paraffinba ágyazott szövetben, *in situ* hibridizáció (ISH) útján, automata BOND rendszer (így a Leica BOND-MAX rendszer vagy a Leica BOND-III rendszer) használatával.

Minden festődés meglétének vagy hiányának klinikai értelmezését morfológiai vizsgálatokkal és megfelelő kontrollokkal kell kiegészíteni, valamint az értékelést a beteg klinikai kórtörténete és egyéb diagnosztikai vizsgálatok figyelembevételével, képzett patológusnak kell elvégeznie.

Összefoglalás és magyarázat

A citomegalovírus (CMV) a béta-herpeszvírus családba tartozik. A CMV a testnedvekkel terjed, és elsődleges fertőzést, látens fertőzést okozhat, és későbbi vírusreaktiváció is előfordul. A CMV-fertőzés számos szervet érinthet, beleértve elsősorban a tüdőt, vesét és májat; aktív vírust figyeltek meg a hámsejtekben, endotelsejtekben, fibroblasztokban és simaizomsejtekben, valamint a mesenchymasejtekben, májsejtekben, granulocitákban és a monocita eredetű makrofágokban¹.

Az aktív CMV-fertőzés során átmenetileg három fehérjecsoport szintetizálódik, amelyeket az azonnali-korai, korai és késői virális gének kódolnak. Az azonnali-korai fehérjék a fertőzés után 1–3 órával expresszálódnak, és az elképzelések szerint a vírusreplikáció hatékonyságában játszanak szerepet. A korai fehérjék a vírusszintézist irányítják, míg a késői fehérjék főleg struktúrfehérjék, és a virion összeállításában vesznek részt.

A CMV egy gyakori oportunistá patogén, ami súlyos betegséget okoz immunkomprimált személyeknél, például AIDS-betegeknek, szervátültetettéknél és újszülötteknél. A veleszületett CMV-fertőzés méhen belüli fertőződés eredménye, és noha a gyermekek többsége tünetmentes, a veleszületett CMV érzüdegi eredetű hallásvesztést, csökkent kognitív, motoros és vizuális funkciókat és görcsrohamokat okozhat²⁻⁴.

A CMV Probe próbát alkalmazó ISH a humán CMV-fertőzés kimutatására szolgál formalinban fixált, paraffinba ágyazott szövetben⁵.

A módszer reprodukálható, és intenzív, barna, főként citoplazmikus festődést eredményez a CMV gének korai RNS-ét tartalmazó sejtekben.

Biztosított reagensek

A CMV Probe egy hibridizáló oldatban található, fluoreszceinnel konjugált oligonukleotid próba.

Teljes mennyiség = 5,5 ml

Hígítás és elegyítés

A CMV Probe használatra kész. Nem szükséges a reagens feloldása, elegyítése, hígítása vagy titrálása.

Szükséges, de nem biztosított anyagok

A minta kezeléséhez és a BOND rendszerrel (így a Leica BOND-MAX rendszerrel vagy a Leica BOND-III rendszerrel) végzett *in situ* hibridizációs festéshez szükséges anyagok teljes listáját lásd a BOND felhasználói dokumentáció „BOND reagensek használata” című részében.

Tárolás és stabilitás

2–8 °C-on tárolandó. A termék ilyen körülmények között a tartály címkéjén jelzett lejárati dátumig stabil marad.

Nincsenek szennyeződésre és/vagy instabilitásra utaló egyértelmű jelek. A vizsgált szövettel egy időben a megfelelő pozitív és negatív szövetkontrollok futtatását is el kell végezni.

Felhasználás után azonnal tegye vissza 2–8 °C közötti hőmérsékletre.

A fentiekben előírtaktól eltérő tárolási feltételeket a felhasználónak ellenőriznie kell⁶.

Óvintézkedések

- Ez a termék *in vitro* diagnosztikai használatra szolgál.

CMV PROBE

Formamidot (<50%) és dextrán-szulfátot (<30%) tartalmaz.

GHS07: Felkiáltójel.

GHS08: Egészségi veszély.

Jelzőszók: Veszély.

H360D: Károsíthatja a születendő gyermeket.

H315: Bőrirritáló hatású.

H319: Súlyos szemirritációt okoz.

P201: Használat előtt ismerje meg az anyagra vonatkozó különleges utasításokat.

P202: Ne használja addig, amíg az összes biztonsági óvintézkedést el nem olvasta és meg nem értette.

P260: A por/füst/gáz/köd/gőzök/permet belélegzése tilos.

P308+313: Expozíció vagy annak gyanúja esetén: orvosi ellátást kell kérni.

P314: Rosszullét esetén orvosi ellátást kell kérni.

P264: A használatot követően a kezét alaposan meg kell mosni.

P280: Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő használata kötelező.

P305+351+338: SZEMBE KERÜLS ESETÉN: Óvatos öblítés vízzel több percen keresztül. Adott esetben kontaktlencsék eltávolítása, ha könnyen megoldható. Az öblítés folytatása.

P337+313: Ha a szemirritáció nem múlik el: orvosi ellátást kell kérni.

P302+352: HA BŐRRE KERÜL: Lemosás bő szappanos vízzel.

P332+313: Bőrirritáció esetén: orvosi ellátást kell kérni.

P362+364: A szennyezett ruhadarabot le kell vetni, és az újbóli használat előtt ki kell mosni.

Kizárólag szakemberek általi használatra.

- Az anyagbiztonsági adatlap igényléséhez forduljon a Leica Biosystems helyi forgalmazójához vagy regionális irodájához, vagy keresse fel a Leica Biosystems weboldalát a www.LeicaBiosystems.com címen.
- A mintákat fixálás előtt és után, valamint a velük érintkező összes anyagot fertőzések terjesztésére képes anyagként kell kezelni, és megfelelő körültekintéssel kell ártalmatlanítani. Soha ne pipettázza szájjal a reagenseket, továbbá kerülje a bőr és a nyálkahártyák érintkezését a reagensekkel és a mintákkal. Ha a reagensek vagy minták érzékeny területtel érintkeznek, bő vízzel mossa le az érintett területet. Forduljon orvoshoz.
- Minden potenciálisan toxikus összetevő ártalmatlanításával kapcsolatban kövesse a szövetségi, állami és helyi előírásokat.
- Minimálisan kell csökkenteni a reagensek mikrobiális szennyeződését, különben megnövekedhet a nem specifikus festődés.
- A megadottaktól eltérő feltételi körülmények, inkubációs idők és hőmérsékletek hibás eredményekhez vezethetnek. A felhasználónak minden ilyen jellegű változtatást validálnia kell.

Használati útmutató

A CMV Probe automata BOND rendszerrel (így a Leica BOND-MAX rendszerrel vagy a Leica BOND-III rendszerrel) és az Anti-Fluorescein Antibody antitesttel és a BOND Polymer Refine Detection kittel való együttes használatra lett kifejlesztve. A CMV Probe próbához javasolt festési protokoll az ISH Protocol A. Az enzimes feltáráshoz a BOND Enzyme Pretreatment Kit, Enzyme 1 oldat 15 percig tartó alkalmazása javasolt.

Mindig kell megfelelő szövet- és reagenskontrollokat alkalmazni. A szövet- és reagenskontrollokhoz alkalmazott protokollnak meg kell felelnie a CMV Probe protokolljának.

Minőség-ellenőrzés

A felhasználó laboratóriumában alkalmazott szövetfeldolgozási és technikai eljárások eltérései jelentős különbséget okozhatnak az eredményekben, ami az alábbi eljárásokon túl belső kontrollok rendszeres futtatását teszi szükségessé.

Pozitív szövetkontroll

A megfelelő szövet-előkészítés és festési technikák ellenőrzésére használatos.

Minden tesztelési körülményegyes esetben és minden megfestési sorozatban kell alkalmazni egy pozitív szövetkontrollt. A gyengén pozitív festődésű szövet alkalmasabb az erősebben pozitív festődésű szövetnél az optimális minőség-ellenőrzéshez, valamint a kismértékű reagensbomlás észleléséhez.

Negatív szövetkontroll

A pozitív szövetkontroll után azért kell megvizsgálni, hogy a próba célnak megfelelő jelölésének specificitását ellenőrizni lehessen. Ezenkívül a legtöbb szövetmetszetben jelen lévő különböző sejttypusok gyakran használhatók negatív kontrollként, de ezeket a felhasználónak kell ellenőriznie.

Negatív reagenskontroll

A nem specifikus festődés kiértékeléséhez és a célsejtekben létrejövő specifikus festődés jobb értelmezéséhez a CMV Probe helyett alkalmazza az RNA Negative Control Probe PB0809 készítményt minden betegminta esetén egy metszetenél.

Pozitív reagenskontroll

A nukleinsavak szöveti megtartottságával, valamint a nukleinsavak próba általi hozzáférhetőségével kapcsolatos információk kinyeréséhez a CMV Probe helyett alkalmazza az RNA Positive Control Probe PB0785 készítményt minden betegminta esetén egy metszetenél. Ha az RNA Positive Control Probe nem mutat pozitív festődést, a vizsgált minták eredményeit érvénytelennek kell tekinteni.

Betegszövet

A CMV Probe próbával festett betegmintákat vizsgálja meg utolsóként. A pozitív festődés intenzitását az RNA Negative Control Probe PB0809 esetleges nem specifikus háttérfestődésének viszonylatában értékelje.

Várható eredmények

Normál szövetek

A PB0614 alkalmazásával számos normál szövetben nem volt megfigyelhető specifikus CMV mRNS-festődés. Halvány festődés volt észlelhető a pajzsmirigy, prosztata, gége és nyelőcső hámszejtei, a vesetubulusok, a mellékvesék szekretoros sejtjei és a Leydig-sejtek esetén. A festődés nem zavarja meg a festés értelmezését. (Vizsgált normál esetek összesített száma = 100).

Kóros szövetek

A PB0614 megfestett 3/3 CMV-fertőzött tüdő, 1/1 CMV-fertőzött bél és 1/1 CMV-fertőzött máj esetet. Nem volt festődés észlelhető tüdődaganatok (0/3), petefészek-daganatok (0/3), májdaganatok (0/3), pajzsmirigy-daganatok (0/3), nyelőcső-daganatok (0/2), emlődaganatok (0/2), ismeretlen eredetű áttétes daganatok (0/2), agydaganatok (0/2), heredaganatok (0/2), bőrdaganatok (0/2), vastagbél-daganat (0/1), gyomordaganat (0/1), végbél-daganat (0/1), gégedaganat (0/1) és csecsemőmirigy-daganat (0/1) esetén. (Vizsgált kóros esetek összesített száma = 34).

A PB0614 a CMV mRNS detektálására ajánlott.

Termékspecifikus korlátozások

A CMV Probe terméket a Leica Biosystems az Anti-Fluorescein Antibody antitesttel, a BOND Polymer Refine Detection kittel és a BOND segédreagensekkel való használatra optimalizálta. A tesztelési eljárásoktól való eltérés esetén a felhasználó felelőssége a betegeredmények értelmezése az adott körülmények között. A protokoll végrehajtásához szükséges idő a szövet fixálásának és az enzimes emésztés hatékonyságának eltérései miatt változó lehet, ezért tapasztalati alapon történő meghatározást igényel. A feltételi körülmények és a protokollidők optimalizálásakor használni kell az RNA Negative Control Probe készítményt.

Hibaelhárítás

A 8. számú hivatkozás segíthet a javító intézkedéseket illetően.

A vizsgálandó mintákat a megfelelő szövet- és reagenskontrollokkal kell kiegészíteni.

Szokatlan festődés bejelentéséhez forduljon a Leica Biosystems helyi forgalmazójához vagy regionális irodájához.

További információk

A BOND reagensekkel végzett *in situ* hibridizációra vonatkozó további információkat a BOND felhasználói dokumentáció „BOND reagensek használata” című részében talál a következő szakaszokban: Az eljárás elve, Szükséges anyagok, A minták előkészítése, Minőség-ellenőrzés, A teszt ellenőrzése, A festődés értelmezése, A címkéken szereplő szimbólumok magyarázata és Általános korlátozások.

Irodalomjegyzék

1. Bissinger, A.L., Singzer, C., Kaiserling, E. and Jahn, G., 2002. Human cytomegalovirus as a direct pathogen: correlation of multiorgan involvement and cell distribution with clinical and pathological findings in a case of congenital inclusion disease. *Journal of Medical Virology* 67, pp. 200—206
2. Pass RF, Fowler KB, Boppana SB et al. Congenital CMV infection following first trimester maternal infection: Symptoms at birth and outcomes. *Journal of Clinical Virology* 2006;35:216—220.
3. Singh N. Cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients: new challenges and their implications for preventive strategies. *Journal of Clinical Virology*. 2006 Apr;35(4):474—7.
4. Erice A Tierney C Hirsch M Caliendo et al. AIDS Clinical Trials Group Protocol 360 Study Team. Cytomegalovirus (CMV) and human immunodeficiency virus (HIV) burden, CMV end-organ disease, and survival in subjects with advanced HIV infection (AIDS Clinical Trials Group Protocol 360). *Clinical Infectious Diseases*. 2003;37(4):567—78
5. TC Wu, WA Lee, MC Pizzorno et al. Localization of the human cytomegalovirus 2.7-kb major early beta-gene transcripts by RNA *in situ* hybridization in permissive and nonpermissive infections. *American Journal of Pathology*. 1992 141: 1247—1254.
6. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
7. Villanova PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. 1991; 7(9). Order code M29-P.
8. Wilkinson DG. The theory and practice of *in situ* hybridization. In: Wilkinson DG. (ed.) *In situ* Hybridization A practical approach. 2nd Edition. New York: Oxford University Press, 1998, pp.18—20.

Kiadás dátuma

26 február 2020

BOND Ready-to-Use ISH

CMV Probe

Nr. catalog: PB0614

Utilizare prevăzută

Acest reactiv este destinat utilizării pentru diagnosticare *in vitro*.

CMV Probe este prevăzută pentru utilizare în identificarea calitativă a transcripției ARN-ului genelor timpurii ale citomegavirusului uman în țesut fixat cu formalină și încorporat în parafină, prin hibridizare *in situ* (ISH) utilizând sistemul automatizat BOND (care include sistemul Leica BOND-MAX și sistemul Leica BOND-III).

Interpretarea clinică a oricărei colorații sau a absenței acesteia trebuie verificată prin studii morfologice, folosind proceduri de control adecvate, și trebuie evaluată în contextul antecedentelor clinice ale pacientului, precum și al altor teste de diagnosticare efectuate de către un patologic calificat.

Rezumat și explicație

Citomegalovirusul (CMV) este un membru al familiei virusului herpetic beta. CMV se transmite prin fluide corporale și poate crea infecție primară, infecție latentă și reactivare virală ulterioară. CMV poate crea infecție în multe organe, care includ plămânul, rinichiul și ficatul, în mod specific virusul activ a fost observat în celulele epiteliale, celulele endoteliale, fibroblaste și celulele ale mușchilor netezi, precum și în celulele mezenchimale, hepatocite, granulocite și macrofage derivate din monocite¹.

În timpul infecției CMV active există o sinteză temporală a trei categorii de proteine, codificate de gene virale desemnate ca intermediare-timpurii, timpurii și târzii. Proteinele intermediare-timpurii sunt exprimate 1-3 ore după infecție și se crede că joacă un rol în eficiența replicării virale. Proteinele timpurii conduc sinteza virală, în timp ce proteinele târzii sunt în principal structurale, implicate în asamblarea virionilor.

CMV este un patogen oportunist comun, capabil să cauzeze boli grave la persoane imunocompromise cum ar fi pacienții SIDA, pacienți de transplant și nou născuți. CMV congenital este rezultatul infecției intrauterine și deși cei mai mulți copii sunt asimptomatici, CMV congenital poate duce la pierdere a auzului senzorial, deficit cognitiv, motor și vizual și convulsii²⁻⁴.

ISH utilizând CMV Probe este utilizată în detectarea infecțiilor CMV umane în țesut fixat cu formalină și încorporat în parafină⁵. Metoda este reproductibilă și ar trebui să ducă la o colorație cafenie predominant citoplasmatică a celulelor care conțin RNA de gene timpurii CMV.

Reactivi furnizați

CMV Probe este o probă de oligonucleotide conjugată cu fluoresceină furnizată în soluție de hibridizare.

Volum total = 5,5 ml.

Diluare și amestecare

CMV Probe este gata de utilizare. Reconstituirea, amestecarea, diluarea sau titrarea acestui reactiv nu sunt necesare.

Materiale necesare, dar care nu sunt furnizate

Consultați „Utilizarea reactivilor BOND” din documentația dumneavoastră de utilizare a sistemului BOND pentru o listă completă a materialelor necesare pentru tratarea specimenelor și colorarea prin hibridizare *in situ* utilizând sistemul BOND (care include sistemul Leica BOND-MAX și sistemul Leica BOND-III).

Depozitare și stabilitate

A se depozita la 2–8 °C. Produsul este stabil în aceste condiții până la data expirării indicată pe eticheta recipientului.

Nu există semne evidente care să indice contaminarea și/sau instabilitatea. Trebuie utilizate țesuturi de control adecvate, pozitive și negative, în același timp cu țesutul de test.

A se returna la 2–8 °C imediat după utilizare.

Alte condiții de depozitare decât cele specificate mai sus trebuie verificate de către utilizator⁶.

Precauții

- Acest produs este destinat utilizării pentru diagnosticare *in vitro*.

CMV PROBE

Conține fomamidă (<50%) și sulfat de dextran (<30%).

GHS07: Semn de exclamare.

GHS08: Pericol pentru sănătate.

Cuvinte de avertizare: Pericol.

H360D: Poate dăuna

fătului.

H315: Provoacă iritarea

pielii.

H319: Provoacă o iritare gravă a ochilor.

P201: Procurați instrucțiuni speciale înainte de utilizare.

P202: A nu se manipula decât după ce au fost citite și înțelese toate măsurile de securitate.

P260: Evitați să inspirați praful/fumul/gazul/ceața/vaporii/pulverizarea.

P308+313: ÎN CAZ DE expunere sau de posibilă expunere: Consultați medicul.

P314: Consultați medicul, dacă nu vă simțiți bine.

P264: Spălați-vă bine mâinile după manipulare.

P280: Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/echipament de protecție a ochilor/ echipament de protecție a feței.

P305+351+338: ÎN CAZ DE CONTACT CU OCHII: Clătiți cu atenție cu apă, timp de mai multe minute. Scoateți lentilele de contact, dacă este cazul și dacă acest lucru se poate face cu ușurință. Continuați să clătiți.

P337+313: Dacă iritarea ochilor persistă: Consultați medicul.

P302+352: ÎN CAZ DE CONTACT CU PIELEA: Spălați cu multă apă și săpun.

P332+313: În caz de iritare a pielii: Consultați medicul.

P362+364: Scoateți îmbrăcăminte contaminată și spălați înainte de reutilizare.

Nu mai pentru utilizatori profesioniști.

- Pentru a obține o copie a fișei tehnice de securitate pentru material, luați legătura cu distribuitorul dvs. local sau cu biroul regional al Leica Biosystems sau, ca alternativă, vizitați site-ul web al Leica Biosystems, www.LeicaBiosystems.com
- Specimenele, înainte și după fixare, precum și toate materialele expuse la acestea, trebuie manipulate ca și când ar avea potențialul de a transmite infecții și trebuie eliminate luând măsurile de precauție adecvate⁷. Nu pipetați niciodată reactivii cu gura și evitați contactul reactivilor și probelor cu pielea și membranele mucoase. Dacă reactivii sau probele vin în contact cu suprafețele sensibile, spălați cu apă din abundență. Solicitați asistență medicală.
- Consultați reglementările naționale, județene sau locale pentru informații privind eliminarea oricăror componente cu potențial toxic.
- Reduceți la minimum contaminarea microbiană a reactivilor, în caz contrar poate apărea o creștere a colorării nespecifice.
- Timpii sau temperaturile de recuperare, încubare care diferă de valorile specificate pot genera rezultate eronate. Orice astfel de modificări trebuie validate de către utilizator.

Instrucțiuni de utilizare

CMV Probe a fost dezvoltată pentru utilizarea pe sistemul automat BOND (care include sistemul Leica BOND-MAX și sistemul Leica BOND-III) în combinație cu Anti-Fluorescein Antibody și BOND Polymer Refine Detection. Protocolul de colorație recomandat pentru CMV Probe este ISH Protocol A. Se recomandă pretratarea enzimatică utilizând BOND Enzyme Pretreatment Kit, Enzyme 1, timp de 15 minute.

Trebuie utilizate întotdeauna țesuturi și reactivi de control corespunzători. Protocolul pentru țesuturile și reactivii de control trebuie să corespundă cu cel al CMV Probe.

Controlul calității

Diferențele în ceea ce privește procesarea țesutului și procedurile tehnice în laboratorul utilizatorului pot cauza o variabilitate semnificativă a rezultatelor, necesitând efectuarea de controale interne, în plus față de următoarele proceduri.

Țesutul de control pozitiv

Folosit pentru a indica țesuturile pregătite corect și tehnicile de colorare adecvate.

O probă de țesut de control pozitiv trebuie să fie inclusă pentru fiecare set de condiții de testare în fiecare etapă de colorare. Un țesut cu colorare pozitivă slabă este mai adecvat decât un țesut cu colorare pozitivă puternică în vederea unui control optim al calității și pentru a detecta nivelurile minore de degradare a reactivului.

Țesutul de control negativ

Trebuie examinat după țesutul de control pozitiv pentru a verifica specificitatea informațiilor etichetării probei față de țintă.

Ca alternativă, varietatea de tipuri diferite de celule prezente în majoritatea secțiunilor tisulare oferă frecvent locuri de control negativ, dar acest lucru trebuie verificat de către utilizator.

Reactivul de control negativ

Folosiți RNA Negative Control Probe PB0809 în locul CMV Probe cu o secțiune din specimenul fiecărui pacient pentru a evalua colorarea nespecifică și a permite o mai bună interpretare a colorării specifice la țintă.

Reactivul de control pozitiv

Folosiți RNA Positive Control Probe PB0785 în locul CMV Probe cu o secțiune din specimenul fiecărui pacient pentru a furniza informații despre conservarea acizilor nucleici în țesut precum și accesibilitatea acizilor nucleici pentru probă. Dacă RNA Positive Control Probe nu demonstrează colorația pozitivă, rezultatele obținute cu speciamele testate trebuie considerate nevalide.

Țesutul pacientului

Examinați speciamele pacientului colorate cu CMV Probe ultimele. Intensitatea colorării pozitive trebuie evaluată în contextul oricărei colorații de fundal nespecifice a RNA Negative Control Probe PB0809.

Rezultate așteptate

Țesuturi normale

Nu a fost detectată colorația CMV mRNA utilizând PB0614 într-o varietate de țesuturi normale. A fost detectată o colorare vagă în celulele epiteliale ale tiroidei, prostatei, laringelui și esofagului, tubulelor renale, celulelor secretoare din glandele suprarenale și celulele Leydig. Această colorare nu afectează interpretarea colorării. (Numărul total al cazurilor normale evaluate = 100).

Țesuturi anormale

PB0614 a colorat 3/3 plămâni infectați cu CMV, 1/1 intestin infectat cu CMV și 1/1 ficat infectat cu CMV. Nu s-a observat colorare la tumori pulmonare (0/3), tumori ovariene (0/3), tumori hepatice (0/3), tumori tiroidiene (0/3), tumori esofagiene (0/2), tumori mamare (0/2), tumori metastatice de origine necunoscută (0/2), tumori cerebrale (0/2), tumori testiculare (0/2), tumori de piele (0/2), o tumoră de colon (0/1), o tumoră gastrică (0/1), o tumoră rectală (0/1), o tumoră a laringelui (0/1) și o tumoră a timusului (0/1). (Numărul total al cazurilor anormale evaluate = 34).

PB0614 este recomandat pentru detectarea CMV mRNA.

Restricții specifice produsului

CMV Probe a fost optimizată la Leica Biosystems pentru utilizarea cu Anti-Fluorescein Antibody, BOND Polymer Refine Detection și cu reactivii auxiliari BOND. Utilizatorii care se abat de la procedurile de testare recomandate trebuie să accepte responsabilitatea pentru interpretarea rezultatelor pacientului în aceste circumstanțe. Timpii protocolului pot varia, datorită variației în fixarea țesutului și eficacității digestiei enzimatiche, și trebuie să fie determinați empiric. Atunci când se optimizează condițiile de recuperare și timpii protocolului trebuie utilizată RNA Negative Control Probe.

Rezolvarea problemelor

Referința 8 poate ajuta la acțiunile de remediere.

Eșantioanele de test trebuie completate cu țesuturi și reactivi de control adecvați.

Contactați distribuitorul dumneavoastră local sau biroul regional al Leica Biosystems pentru raportarea colorării neobișnuite.

Informații suplimentare

Informații suplimentare referitoare la hibridizarea *in situ* cu reactivi BOND, sub titlurile Principiul procedurii, Materiale necesare, Pregătirea specimenului, Controlul calității, Verificarea analizei, Interpretarea colorării, Explicarea simbolurilor de pe etichete și Limitări generale pot fi găsite în „Utilizarea Reactivilor BOND” din documentația dumneavoastră de utilizare a sistemului BOND.

Referințe

1. Bissinger, A.L., Singzer, C., Kaiserling, E. and Jahn, G., 2002. Human cytomegalovirus as a direct pathogen: correlation of multiorgan involvement and cell distribution with clinical and pathological findings in a case of congenital inclusion disease. *Journal of Medical Virology* 67, pp. 200—206
2. Pass RF, Fowler KB, Boppana SB et al. Congenital CMV infection following first trimester maternal infection: Symptoms at birth and outcomes. *Journal of Clinical Virology* 2006;35:216—220.
3. Singh N. Cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients: new challenges and their implications for preventive strategies. *Journal of Clinical Virology*. 2006 Apr;35(4):474—7.
4. Erice A Tierney C Hirsch M Caliendo et al. AIDS Clinical Trials Group Protocol 360 Study Team. Cytomegalovirus (CMV) and human immunodeficiency virus (HIV) burden, CMV end-organ disease, and survival in subjects with advanced HIV infection (AIDS Clinical Trials Group Protocol 360). *Clinical Infectious Diseases*. 2003;37(4):567—78
5. TC Wu, WA Lee, MC Pizzorno et al. Localization of the human cytomegalovirus 2.7-kb major early beta-gene transcripts by RNA *in situ* hybridization in permissive and nonpermissive infections. *American Journal of Pathology*. 1992 141: 1247—1254.
6. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
7. Villanova PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. 1991; 7(9). Order code M29-P.
8. Wilkinson DG. The theory and practice of *in situ* hybridization. In: Wilkinson DG. (ed.) *In situ* Hybridization A practical approach. 2nd Edition. New York: Oxford University Press, 1998, pp.18—20.

Data publicării

26 februarie 2020

BOND Ready-to-Use ISH CMV Probe

Номер по каталогу: PB0614

Назначение

Этот реактив предназначен для *in vitro* диагностики.

CMV Probe предназначен для качественного определения РНК-транскрипта раннего гена цитомегаловируса человека в фиксированных формалином и залитых в парафин образцах тканей путем гибридизации *in situ* (ISH) с использованием автоматизированной системы BOND (включающей системы Leica BOND-MAX и Leica BOND-III).

Клиническая интерпретация любого окрашивания или его отсутствия должна быть дополнена морфологическими исследованиями с надлежащими контролями и должна быть оценена квалифицированным патологом с учетом анамнеза пациента и других диагностических тестов.

Краткое изложение и пояснение

Цитомегаловирус (ЦМВ) относится к семейству бетагерпесвирусов. ЦМВ переносится через биологические жидкости и может вызвать первичную инфекцию, латентную инфекцию и последующую реактивацию вирусной инфекции. ЦМВ может вызвать инфекцию во многих органах, включая легкие, почки и печень, в частности, активный вирус наблюдали в клетках эпителия и эндотелия, фибробластах и клетках гладкой мускулатуры, а также в мезенхимальных клетках, гепатоцитах, гранулоцитах и макрофагах моноцитарного происхождения¹.

Во время активной инфекции ЦМВ происходит временный синтез трех категорий белков, кодируемых вирусными генами: непосредственно ранними, ранними и поздними. Экспрессия непосредственно ранних белков происходит спустя 1–3 часа после инфекции, и считается, что это имеет значение для эффективности репликации вируса. Ранние белки направляют синтез вируса, тогда как поздние белки, в основном, являются структурными и вовлечены в сборку вирионов.

ЦМВ представляет собой условно-патогенный микроорганизм, способный вызвать серьезное заболевание у индивидуумов с ослабленным иммунитетом, таких как больные СПИДом, пациенты после трансплантации и новорожденные. Врожденный ЦМВ является результатом внутриутробной инфекции. Несмотря на то что у большинства детей симптомы заболевания не проявляются, врожденный ЦМВ может вызвать сенсорную тугоухость, когнитивные расстройства, двигательные и зрительные расстройства и эпилептические припадки^{2–4}.

Гибридизация *in situ* посредством CMV Probe используется для обнаружения инфекций ЦМВ человека в фиксированных формалином и залитых в парафин образцах тканей⁵. Данный метод является воспроизводимым и должен приводить к интенсивному, коричневому, преимущественно цитоплазматическому окрашиванию клеток, содержащих ранние гены ЦМВ в РНК.

Реактивы, входящие в комплект поставки

CMV Probe представляет собой конъюгированный с флуоресцеином олигонуклеотидный зонд, поставляемый в растворе для гибридизации.

Общий объем = 5,5 мл

Разведение и смешивание

CMV Probe готов к применению. Этот реактив не нуждается в восстановлении, смешивании, разведении или титровании.

Необходимые материалы, не входящие в комплект поставки

Полный список материалов, необходимых для обработки и окрашивания путем гибридизации *in situ* образцов в системе BOND (включающей системы BOND-MAX и BOND-III компании Leica), имеется в разделе «Применение реактивов BOND» документации пользователя системы BOND.

Хранение и стабильность

Хранить при температуре 2–8 °С. В этих условиях продукция остается стабильной до истечения срока годности, который указан на этикетке контейнера.

Не существует очевидных признаков, свидетельствующих о контаминации и/или нестабильности (реактива). Ткани, использующиеся в качестве соответствующих положительного и отрицательного контроля, следует подготавливать в то же самое время, что и исследуемые ткани.

Немедленно после применения вернуть на хранение при 2–8 °С.

Условия хранения, отличающиеся от указанных выше, должны быть верифицированы пользователем⁶.

Меры предосторожности

- Этот продукт предназначен для диагностики *in vitro*.

CMV PROBE

Содержит формамид (Formamide) (<50 %) и сульфат декстрана (Dextran Sulphate) (<30 %).
GHS07: Восклицательный знак.
GHS08: Опасность для здоровья человека.
Сигнальное слово: Опасно.

H360D: Может нанести вред нерожденному ребенку.
H315: Вызывает раздражение кожи.
H319: Вызывает серьезное раздражение глаз.

P201: Перед использованием необходимо получить специальные указания.
P202: Не использовать до тех пор, пока не будут прочтены и приняты к сведению все указания по технике безопасности.
P260: Не вдыхайте пыль, дым, газ, туман, пары и распыления.
P308+313: В случае воздействия или опасечкоенности: обратитесь за медицинской помощью.
P314: Обратитесь за медицинской помощью/консультацией, если вы отмечаете ухудшение самочувствия.
P264: После обращения с веществом тщательно вымойте руки.
P280: Используйте защитные перчатки, защитную одежду, защиту глаз и лица.
P305+351+338: ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: В течение нескольких минут тщательно промойте водой. Если вы носите контактные линзы, по возможности снимите их. Продолжайте промывать глаза водой.
P337+313: Если раздражение глаз не проходит: обратитесь за медицинской помощью.
P302+352: ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ: Промойте большим количеством воды с мылом.
P332+313: В случае возникновения раздражения кожи: обратитесь за медицинской помощью.
P362+364: Снимите загрязненную одежду и выстирайте перед повторным использованием.
Только для профессионального использования.

- Для получения копии паспорта безопасности химической продукции обратитесь к местному дистрибьютору или в региональный офис компании Leica Biosystems либо посетите веб-сайт компании Leica Biosystems: www.LeicaBiosystems.com.
- С образцами (до и после фиксации) и всеми материалами, на которые они воздействуют, следует обращаться как с потенциально опасными к передаче инфекции и утилизировать, соблюдая соответствующие меры предосторожности⁷. Никогда не набирайте реактивы в пипетку ртом. Избегайте контакта реактивов и образцов с кожей и слизистыми оболочками. В случае контакта реактивов или образцов с чувствительными зонами промойте их большим количеством воды. Обратитесь за медицинской помощью.
- По вопросам утилизации любых возможно токсических компонентов выполняйте требования федеральных, региональных или местных нормативных документов.
- Сводите к минимуму микробное загрязнение реактивов во избежание усиления неспецифического окрашивания.
- Нарушение указанных в инструкции правил демаскировки, времени инкубации и термической обработки может привести к ошибочным результатам. Любые подобные изменения должны быть валидированы пользователем.

Инструкция по применению

CMV Probe был разработан для использования в автоматизированной системе BOND (включающей системы BOND-MAX и BOND-III компании Leica) в сочетании с антителами к флуоресцентину Anti-Fluorescein Antibody и системой обнаружения BOND Polymer Refine Detection. Рекомендуемым протоколом иммуногистохимического окрашивания для CMV Probe является ISH Protocol A. Ферментативное демаскирование рекомендуется выполнять с использованием набора предварительной обработки фермента BOND Enzyme Pretreatment Kit, Enzyme 1 в течение 15 минут.

Всегда следует использовать ткани и реактивы, представляющие собой соответствующие контроли. Протокол, в котором применяются ткани и реактивы, являющиеся контролями, должен соответствовать тому, который проводится с использованием зонда CMV Probe.

Контроль качества

Различия в методах обработки тканей и технических процедурах, выполняемых в лаборатории пользователя, могут привести к существенной вариабельности результатов, в связи с чем требуется регулярное выполнение внутрिलाбораторных контролей в дополнение к указанным ниже процедурам.

Положительный контроль ткани

Применяется для проверки правильности подготовки тканей и методов окрашивания.

В каждый набор условий теста при каждом цикле окрашивания следует включать один срез ткани для положительного контроля. Для оптимального контроля качества и обнаружения незначительных уровней деградации реактива более подходит ткань со слабым положительным окрашиванием, чем ткань с сильным положительным окрашиванием.

Отрицательный контроль ткани

Это испытание следует выполнять после исследования ткани, используемой в качестве положительного контроля с тем, чтобы верифицировать специфичность маркирования зонда относительно цели.

Кроме того, разнообразные типы клеток для отрицательного контроля можно часто найти в большинстве срезов тканей, однако такие препараты должны быть проверены пользователем.

Отрицательный контроль реактива

Для оценки неспецифического окрашивания и лучшей интерпретации специфического окрашивания целевой области при исследовании срезов каждого образца, взятого у пациента, вместо зонда CMV Probe, предназначенного для испытаний, используйте RNA Negative Control Probe PB0809.

Реактив, представляющий собой положительный контроль

Для получения информации о сохранности нуклеиновых кислот в тканях, а также о возможности их достичь с помощью зонда при исследовании срезов каждого образца, взятого у пациента, вместо зонда CMV Probe, предназначенного для испытаний, используйте RNA Positive Control Probe PB0785. Если RNA Positive Control Probe (PHK-зонд, использующийся в качестве положительного контроля), демонстрирует неудовлетворительные результаты с точки зрения положительного окрашивания, результаты исследования образцов следует считать недостоверными.

Ткань, полученная у пациента

Исследуйте образцы ткани, взятой у пациента и окрашенной с использованием зонда CMV Probe, в последнюю очередь. Интенсивность положительного окрашивания следует оценивать в контексте любого неспецифического фонового окрашивания RNA Negative Control Probe PB0809 (PHK-зонда, являющегося отрицательным контролем PB0809).

Ожидаемые результаты

Нормальные ткани

При использовании PB0614 не было обнаружено неспецифическое окрашивание ЦМВ мРНК на выборке нормальных тканей. Слабое окрашивание может обнаруживаться в эпителиальных клетках щитовидной железы, простаты, гортани и пищевода, канальцев почек, секреторных клетках надпочечников, а также клетках Лейдига. Данное окрашивание не должно препятствовать интерпретации окрашивания. (Общее число исследованных нормальных тканей = 100).

Патологически измененные ткани

PB0614 окрасил 3/3 случаев инфекции ЦМВ в легких, 1/1 случая инфекции ЦМВ в кишечнике и 1/1 случая инфекции ЦМВ в печени. Окрашивания не наблюдалось при следующих нозологиях : опухоли легкого (0/3), опухоли яичников (0/3), опухоли печени (0/3), опухоли щитовидной железы (0/3), опухоли пищевода (0/2), опухоли молочной железы (0/2), метастатические опухоли неизвестного происхождения (0/2), опухоли головного мозга (0/2), опухоли яичка (0/2), опухоли кожи (0/2), опухоли толстой кишки (0/1), опухоли желудка (0/1), опухоли прямой кишки (0/1), опухоли гортани (0/1) и опухоли тимуса (0/1). (Общее число исследованных патологически измененных образцов = 34).

PB0614 рекомендуется использовать для обнаружения ЦМВ мРНК.

Ограничения, специфичные для этого продукта

Зонд CMV Probe оптимизирован компанией Leica Biosystems для применения с реактивами Anti-Fluorescein Antibody, BOND Polymer Refine Detection и дополнительными реактивами BOND. Пользователи, отклоняющиеся от рекомендованных процедур анализа, должны брать на себя ответственность за интерпретацию результатов исследований пациентов, выполненных в таких условиях. Продолжительность выполнения протокола может варьировать в зависимости от варианта фиксации тканей и эффективности ферментативного расщепления и должна определяться эмпирически. В процессе оптимизации условий демаскирования антигенов и продолжительности выполнения протокола должен использоваться RNA Negative Control Probe (PHK-зонд, выполняющий функции отрицательного контроля).

Поиск и устранение неполадок

Источник (8) может помочь в принятии мер по устранению неполадок.

Исследуемые образцы необходимо дополнить соответствующими тканями и реактивами, используемыми в качестве контроля. С сообщениями о необычном окрашивании обращайтесь к своему местному дистрибьютору или в региональный офис компании Leica Biosystems.

Дополнительная информация

Дополнительная информация, касающаяся проведения гибридизации *in situ* с использованием реактивов BOND, содержится в рубриках «Принцип метода», «Необходимые материалы», «Подготовка образцов», «Контроль качества», «Проверка достоверности анализа», «Интерпретация окрашивания», «Значения символов в маркировке продукции» и «Общие ограничения» раздела «Применение реактивов BOND» в документации пользователя системы BOND.

Список источников

1. Bissinger, A.L., Singzer, C., Kaiserling, E. and Jahn, G., 2002. Human cytomegalovirus as a direct pathogen: correlation of multiorgan involvement and cell distribution with clinical and pathological findings in a case of congenital inclusion disease. *Journal of Medical Virology* 67, pp. 200—206
2. Pass RF, Fowler KB, Boppana SB et al. Congenital CMV infection following first trimester maternal infection: Symptoms at birth and outcomes. *Journal of Clinical Virology* 2006;35:216—220.
3. Singh N. Cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients: new challenges and their implications for preventive strategies. *Journal of Clinical Virology*. 2006 Apr;35(4):474—7.
4. Erice A Tierney C Hirsch M Caliendo et al. AIDS Clinical Trials Group Protocol 360 Study Team. Cytomegalovirus (CMV) and human immunodeficiency virus (HIV) burden, CMV end-organ disease, and survival in subjects with advanced HIV infection (AIDS Clinical Trials Group Protocol 360). *Clinical Infectious Diseases*. 2003;37(4):567—78
5. TC Wu, WA Lee, MC Pizzorno et al. Localization of the human cytomegalovirus 2.7-kb major early beta-gene transcripts by RNA *in situ* hybridization in permissive and nonpermissive infections. *American Journal of Pathology*. 1992 141: 1247—1254.
6. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
7. Villanova PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. 1991; 7(9). Order code M29-P.
8. Wilkinson DG. The theory and practice of *in situ* hybridization. In: Wilkinson DG. (ed.) *In situ* Hybridization A practical approach. 2nd Edition. New York: Oxford University Press, 1998, pp.18—20.

Дата выпуска

26 Февраль 2020

BOND Ready-to-Use ISH CMV Probe

Nr katalogowy: PB0614

Przeznaczenie

Ten odczynnik jest przeznaczony do stosowania w diagnostyce *in vitro*.

Preparat CMV Probe jest przeznaczony do ilościowego oznaczania wczesnego transkryptu RNA ludzkiego cytomegalowirusa w utrwalonej formalinie tkance zatopionej w parafinie przez hybrydyzację *in situ* (ISH) przy użyciu automatycznego systemu BOND (w tym systemów Leica BOND-MAX i Leica BOND-III).

Kliniczną interpretację wybarwienia lub jego braku należy uzupełnić badaniami morfologicznymi oraz odpowiednimi kontrolami. Oceny powinien przeprowadzić wykwalifikowany patolog w kontekście historii choroby pacjenta oraz innych badań diagnostycznych.

Podsumowanie i objaśnienie

Cytomegalowirus (CMV) należy do rodziny wirusów Beta Herpes. CMV jest przenoszony przez płyny ustrojowe i może wywołać infekcję pierwotną, infekcję utajoną i późniejszą reaktywację wirusa. CMV może powodować infekcję wielu narządów, w tym płuc, nerek i wątroby. W szczególności aktywność wirusa zaobserwowano w komórkach nabłonka, komórkach śródbłonka, fibroblastach i komórkach mięśni gładkich, a także w komórkach mezenchymalnych, hepatocytach, granulocytach i makrofagach pochodzących z monocytów¹.

Podczas aktywnego zakażenia CMV dochodzi do czasowej syntezy trzech kategorii białek kodowanych przez geny wirusa: średnio-wczesnych, wczesnych i późnych. Średnio-wczesne białka ulegają ekspresji 1-3 godziny po zakażeniu i uważa się, że mają wpływ na efektywność replikacji wirusa. Wczesne białka kierują bezpośrednią syntezą wirusa, natomiast białka późne mają głównie charakter strukturalny, biorą udział w tworzeniu wirionów.

CMV jest powszechnie występującym patogenem oportunistycznym, który może wywołać poważne choroby u osób z obniżoną odpornością, na przykład u pacjentów z AIDS, pacjenci po przeszczepach i noworodki. Wrodzona CMV jest wynikiem zakażenia wewnątrzmacicznego i chociaż u większości dzieci przebiega bezobjawowo, wrodzona CMV może skutkować niedostłuchem odbiorczym, deficytami poznawczymi, motorycznymi i wzrokowymi oraz drgawkami²⁻⁴.

Metoda ISH (hybrydyzacja *in situ*) korzystająca z CMV Probe służy do wykrywania ludzkiego wirusa CMV w utrwalonej w formalinie tkance zatopionej w parafinie⁵. Metoda jest powtarzalna i jej efektem powinno być intensywne, brązowe barwienie komórek zawierających RNA wczesnych genów CMV.

Odczynniki znajdujące się w zestawie

Preparat CMV Probe to skoniugowana z fluoresceiną sonda oligonukleotydowa dostarczana w roztworze do hybrydyzacji.

Łączna objętość = 5,5 ml

Rozcieńczanie i mieszanie.

Preparat CMV Probe jest gotowy do użycia. W przypadku tego odczynnika nie jest konieczne dodawanie wody, mieszanie, rozcieńczanie ani miareczkowanie.

Wymagane materiały niedołączone do zestawu

Aby uzyskać pełną listę materiałów potrzebnych do przygotowania próbek i barwienia immunohistochemicznego *in situ* za pomocą systemu BOND (w tym systemów Leica BOND-MAX i Leica BOND-III) zob. „Korzystanie z odczynników BOND” w dokumentacji użytkownika BOND.

Przechowywanie i trwałość

Przechowywać w temperaturze 2-8°C. Produkt jest stabilny w tych warunkach do upływu daty ważności podanej na etykiecie pojemnika.

Nie istnieją żadne widoczne oznaki skażenia i/lub niestabilności. Odpowiednie pozytywne i negatywne kontrole tkankowe należy przeprowadzać w tym samym czasie co badanie tkanki.

Niezwłocznie po użyciu ponownie umieścić w temperaturze 2-8°C.

Przechowywanie w warunkach innych od wskazanych powyżej wymaga weryfikacji użytkownika⁶.

Środki ostrożności

- Test jest przeznaczony do stosowania w diagnostyce *in vitro*.

CMV PROBE

Zawiera formamid (<50%) i siarczan dekstranu (<30%).
GHS07: Wykrzyknik.
GHS08: Zagrożenie dla zdrowia.
Słowa sygnalizujące:
Niebezpieczeństwo.

H360D: Może działać szkodliwie na dziecko w łonie matki
H315: Działa drażniąco na skórę.
H319: Działa drażniąco na oczy.

P201: Przed użyciem zapoznać się ze specjalnymi środkami ostrożności.
P202: Nie używać przed zapoznaniem się z rozumieniem wszystkich środków bezpieczeństwa.
P260: Nie wdychać pyłu/dymu/gazu/mgły/par/rozpylonej cieczy.
P308+313: W PRZYPADKU narażenia lub styczości: Zasięgnąć porady lekarza.
P314: W przypadku złego samopoczucia należy zasięgnąć porady lekarza.
P264: Dokładnie umyć ręce po użyciu.
P280: Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy.
P305+351+338: W PRZYPADKU KONTAKTU Z OCZAMI: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.
P337+313: W przypadku utrzymania się działania drażniącego na oczy: Zasięgnąć porady lekarza.
P302+352: W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKÓRĄ: Przemyc dużą ilością wody z mydłem.
P332+313: W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry: Zasięgnąć porady lekarza.
P362+364: Zanieczyszczoną odzież zdjąć i wyprać przed ponownym użyciem.
Wyłącznie do użytku zawodowego.

- Aby otrzymać egzemplarz karty charakterystyki, należy skontaktować się z lokalnym dystrybutorem lub regionalnym biurem Leica Biosystems, lub odwiedzić stronę internetową, www.LeicaBiosystems.com.
- Z próbkami przed utwaleniem i po utwaleniu, jak również ze wszystkimi materiałami, które mają z nimi styczność, należy obchodzić się tak, jak z materiałami potencjalnie zakaźnymi i należy je utylizować, zachowując odpowiednie środki ostrożności. Podczas pobierania pipetą nie wolno zasysać odczynników ustami i należy unikać kontaktu odczynników i preparatów ze skórą oraz błonami śluzowymi. W razie kontaktu odczynników lub próbek ze szczególnie narażonymi miejscami przemyc miejsce kontaktu dużą ilością wody. Należy zasięgnąć porady lekarza.
- Wszelkie potencjalnie toksyczne składniki należy utylizować zgodnie z krajowymi lub lokalnymi przepisami.
- Chronić odczynniki przed skażeniem drobnoustrojami, ponieważ może ono doprowadzić do zwiększonego barwienia niespecyficznego.
- Zastosowanie czasów odzyskiwania, inkubacji lub temperatur innych niż podano w instrukcji może spowodować błędne wyniki. Wszelkie zmiany tego typu muszą zostać zweryfikowane przez użytkownika.

Instrukcja stosowania

Preparat CMV Probe został opracowany z myślą o zastosowaniu w automatycznym systemie BOND (obejmującym systemy Leica BOND-MAX i Leica BOND-III system) w połączeniu z Anti-Fluorescein Antibody oraz BOND Polymer Refine Detection. Zalecany protokół barwienia dla CMV Probe to ISH Protocol A. Zalecane jest odmaskowywanie enzymu przy użyciu zestawu BOND Enzyme Pretreatment Kit, Enzyme 1, przez 15 minut.

Zawsze należy stosować odpowiednie kontrole tkanek i odczynników. Protokół kontroli tkanek i odczynników powinien odpowiadać protokołowi CMV Probe.

Kontrola jakości

Różnice w przetwarzaniu tkanek i procedurach technicznych w laboratorium użytkownika mogą doprowadzić do znacznej zmienności wyników, co oznacza konieczność dodatkowego przeprowadzania regularnych kontroli wewnętrznych.

Tkankowa kontrola pozytywna

Stosowana w celu wskazania prawidłowo przygotowanych tkanek i prawidłowych technik barwienia.

W każdej serii barwienia każdy zestaw warunków testowych powinien uwzględniać jedną tkankową kontrolę pozytywną. Do optymalnej kontroli jakości i do wykrywania niewielkich poziomów degradacji odczynników bardziej nadaje się tkanka o słabym barwieniu pozytywnym niż tkanka o silnym barwieniu pozytywnym.

Tkankowa kontrola negatywna

Należy ją wykonać po tkankowej kontroli pozytywnej, aby sprawdzić swoistość znakowania docelowej substancji przez sondę.

Ewentualnie tkankowa kontrola negatywna może obejmować różne typy komórek obecne w większości skrawków tkankowych, jednak powinno to zostać zweryfikowane przez użytkownika.

Negatywna kontrola odczynnika

Aby przeprowadzić ocenę barwienia niespecyficznego oraz umożliwić lepszą interpretację barwienia specyficznego należy użyć RNA Negative Control Probe PB0809 zamiast CMV Probe na każdym skrawku z próbki pobranej od pacjenta.

Pozytywna kontrola odczynnika

Abym informacje o zachowaniu kwasów nukleinowych w tkance, a także o możliwości znakowania kwasów nukleinowych przez sondę, należy użyć RNA Positive Control Probe PB0785 zamiast CMV Probe na każdym skrawku z próbki pobranej od pacjenta. Jeśli RNA Positive Control Probe nie wykaże odpowiedniego pozytywnego barwienia, wyniki testu przeprowadzonego na próbkach pobranych od pacjenta należy uznać za nieważne.

Tkanka pacjenta

Próbki pacjenta barwione CMV Probe należy badać jako ostatnie. Intensywność barwienia pozytywnego należy oceniać w kontekście ewentualnego niespecyficznego barwienia tła w negatywnej kontroli odczynnika PB0809.

Oczekiwane wyniki

Tkanki prawidłowe

Nie wykryto specyficznego barwienia CMV mRNA przy użyciu PB0614 w szerokim zakresie normalnych tkanek. Słabe wybarwienie stwierdzono w komórkach nabłonka tarczycy, prostaty, krtni i przelyku, kanalikach nerkowych, komórkach wydzielniczych w nadnerczach i komórkach Leydiga. Taki rodzaj barwienia nie zakłada interpretacji. (Łączna liczba ocenionych prawidłowych przypadków = 100).

Tkanki patologiczne

PB0614 wybarwił 3/3 przypadki zakażenia CMV w płucach, 1/1 zakażenia CMV w jelitach i 1/1 zakażenia CMV w wątrobie. Nie stwierdzono barwienia guzów płuc (0/3), guzów jajnika (0/3), guzów wątroby (0/3), guzów tarczycy (0/3), guzów przelyku (0/2), guzów sutka (0/2), guzów przerzutowych o nieznanym pochodzeniu (0/2), guzów mózgu (0/2), guzów jąder (0/2), nowotworów skóry (0/2), guzów okrężnicy (0/1), guzów żołądka (0/1), guza odbytnicy (0/1), guza krtni (0/1) ani guza grasicy (0/1). (Łączna liczba ocenionych nieprawidłowych przypadków = 34).

Zaleca się stosowanie PB0614 do wykrywania CMV mRNA.

Szczególne ograniczenia dla produktu

Preparat CMV Probe został zoptymalizowany w Leica Biosystems pod kątem stosowania z Anti-Fluorescein Antibody, BOND Polymer Refine Detection i pomocniczymi odczynnikami BOND. W tych okolicznościach użytkownicy, którzy postępują niezgodnie z zalecanymi procedurami testowymi muszą wziąć odpowiedzialność za interpretację wyników chorego. Czasy protokołu mogą być różne w związku ze zróżnicowaniem w zakresie utrwalenia tkanek i skuteczności trawienia enzymatycznego - należy je określić doświadczalnie. Podczas optymalizacji warunków odmaskowywania i czasów protokołu należy stosować RNA Negative Control Probe.

Rozwiązywanie problemów

Odnośnik 8 może być pomocny w podejmowaniu działań zaradczych.

Próbki testowe należy uzupełnić odpowiednimi kontrolami tkanek i odczynników.

W celu zgłoszenia nietypowego barwienia należy skontaktować się z lokalnym dystrybutorem lub z regionalnym biurem firmy Leica Biosystems.

Dodatkowe informacje

Dodatkowe informacje dotyczące hybrydyzacji *in situ* przy użyciu odczynników BOND opisanej w rozdziałach „Zasady postępowania”, „Wymagane materiały”, „Przygotowanie próbek”, „Kontrola jakości”, „Weryfikacja testu”, „Interpretacja barwienia”, „Objaśnienie symboli na etykietach” i „Ograniczenia ogólne” można znaleźć w rozdziale „Stosowanie odczynników BOND” w dokumentacji użytkownika systemu BOND.

Literatura

1. Bissinger, A.L., Singzer, C., Kaiserling, E. and Jahn, G., 2002. Human cytomegalovirus as a direct pathogen: correlation of multiorgan involvement and cell distribution with clinical and pathological findings in a case of congenital inclusion disease. *Journal of Medical Virology* 67, pp. 200—206
2. Pass RF, Fowler KB, Boppana SB et al. Congenital CMV infection following first trimester maternal infection: Symptoms at birth and outcomes. *Journal of Clinical Virology* 2006;35:216—220.
3. Singh N. Cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients: new challenges and their implications for preventive strategies. *Journal of Clinical Virology*. 2006 Apr;35(4):474—7.
4. Erice A Tierney C Hirsch M Caliendo et al. AIDS Clinical Trials Group Protocol 360 Study Team. Cytomegalovirus (CMV) and human immunodeficiency virus (HIV) burden, CMV end-organ disease, and survival in subjects with advanced HIV infection (AIDS Clinical Trials Group Protocol 360). *Clinical Infectious Diseases*. 2003;37(4):567—78
5. TC Wu, WA Lee, MC Pizzorno et al. Localization of the human cytomegalovirus 2.7-kb major early beta-gene transcripts by RNA *in situ* hybridization in permissive and nonpermissive infections. *American Journal of Pathology*. 1992 141: 1247—1254.
6. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
7. Villanova PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. 1991; 7(9). Order code M29-P.
8. Wilkinson DG. The theory and practice of *in situ* hybridization. In: Wilkinson DG. (ed.) *In situ* Hybridization A practical approach. 2nd Edition. New York: Oxford University Press, 1998, pp.18—20.

Data publikacji

26 lutego 2020

BOND Ready-to-Use ISH

CMV Probe

Katalogška št.: PB0614

Predvidena uporaba

Ta reagent je namenjen diagnostični uporabi *in vitro*.

Sonda CMV Probe je namenjena za uporabo v kvalitativni identifikaciji transkripta RNA zgodnjega gena s humanim citomegalovirusom v tkivu, fiksiranem s formalinom in vstavljenem v parafin, s hibridizacijo (ISH) *in situ* z uporabo avtomatiziranega sistema BOND (vključuje sistem Leica BOND-MAX in sistem Leica BOND-III).

Klinično razlago kakršnega koli obarvanja ali odsotnosti le-tega morajo dopolnjevati morfološke študije in ustrezni kontrolni vzorci, ki jih v okviru klinične anamneze bolnika in drugih diagnostičnih testov oceni usposobljen patolog.

Povzetek in razlaga

Citomegalovirus (CMV) je član družine virusov Beta Herpes. CMV se prenaša s telesnimi tekočinami in lahko vzpostavi primarno okužbo, latentno okužbo in kasnejšo reaktivacijo virusa. CMV lahko vzpostavi okužbo v številnih organih, vključno s pljuči, z ledvicami in jetri, aktivni virus pa so zlasti opazili v epiteljskih celicah, endoteljskih celicah, fibroblastih in celicah gladkih mišic, pa tudi v mezenhimijskih celicah, hepatocitih, granulocitih in monocitnih makrofagih¹.

Med aktivno okužbo s CMV pride dočasne sinteze treh kategorij proteinov, ki jih kodirajo virusni geni ter so označeni kot vmesni zgodnji, zgodnji in pozni. Vmesni zgodnji proteini se izražajo 1 do 3 ure po okužbi in naj bi igrali vlogo pri učinkovitosti replikacije virusa. Zgodnji proteini usmerjajo sintezo virusa, medtem ko so pozni proteini predvsem strukturni in sodelujejo pri asembiranju virusa.

CMV je splošni oportunistični patogen, ki lahko povzroči resno bolezen posameznikov z oslabiljenim imunskim sistemom, kot so bolniki z AIDS-om, bolniki po presaditvah in novorojenčki. Kongenitalni CMV je posledica intrauterine okužbe in čeprav je večina otrok asimptomatskih, lahko kongenitalni CMV povzroči senzorično izgubo sluha, kognitivne, motorične in vizualne deficite ter napade²⁻⁴.

ISH s sondo CMV Probe se uporablja pri zaznavanju humanih okužb s CMV v tkivu, fiksiranem s formalinom in vstavljenem v parafin⁵. Ta metoda je ponovljiva in bi morala povzročiti intenzivno rjavo obarvanje zlasti citoplazme celic, ki vsebujejo RNA zgodnjega gena s CMV.

Priloženi reagenti

Sonda CMV Probe je fluorescein-konjugirana oligonukleotidna sonda, ki jo dobimo v raztopini hibridizacije.

Skupna prostornina = 5,5 ml.

Redčenje in mešanje

Sonda CMV Probe je pripravljena za uporabo. Rekonstitucija, mešanje, redčenje ali titracija tega reagenta niso potrebni.

Potrebni materiali, ki niso priloženi

Glejte »Uporaba reagentov BOND« v priloženi dokumentaciji BOND za uporabnika za popoln seznam materialov, ki so potrebni za obdelavo vzorcev in barvanje s hibridizacijo *in situ* pri uporabi sistema BOND (vključuje sistem Leica BOND-MAX in sistem Leica BOND-III).

Shranjevanje in stabilnost

Hraniti pri temperaturi 2–8 °C. Izdelek je stabilen pod temi pogoji do datuma izteka roka uporabnosti, ki je naveden na oznaki vsebnika.

Ni očitnih znakov, ki bi kazali na kontaminacijo in/ali nestabilnost. Primerno pozitivno in negativno kontrolno tkiva morate obdelati sočasno s testnim vzorcem tkiva.

Takoj po uporabi ohladite na temperaturo 2–8 °C.

Uporabnik mora potrditi ustreznost pogojev shranjevanja, če se ti razlikujejo od zgoraj navedenih⁶.

Previdnosti ukrepi

- Ta izdelek je namenjen za diagnostično uporabo *in vitro*.

CMV PROBE

Vsebuje formamid (< 50 %) in dekstranov sulfat (< 30 %).

GHS07: Klicaj.

GHS08: Nevarno za zdravje.

Signalne besede: Nevarno.

H360D: Lahko škoduje nerojenemu otroku.

H315: Povzroča draženje kože.

H319: Povzroča hudo draženje oči.

P201: Pred uporabo pridobiti posebna navodila.

P202: Ne uporabljajte, dokler se ne seznanite z vsemi varnostnimi ukrepi.

P260: Ne vdihavati prahu/dima/plina/meglice/hlapov/razpršila.

P308+313: PRI izpostavljenosti ali sumu izpostavljenosti: Poiščite zdravniško pomoč/oskrbo.

P314: Ob slabem počutju poiščite zdravniško pomoč/oskrbo.

P264: Po uporabi temeljito umiti roke.

P280: Nositi zaščitne rokavice/zaščitno obleko/zaščito za oči/zaščito za obraz.

P305+351+338: PRI STIKU Z OČMI: Previdno izpirati z vodo nekaj minut. Odstranite kontaktne leče, če jih imate in če to lahko storite brez težav. Nadaljujte z izpiranjem.

P337+313: Če draženje oči ne preneha: Poiščite zdravniško pomoč/oskrbo.

P302+352: PRI STIKU S KOŽO: Umiti z veliko mila in vode.

P332+313: Če nastopi draženje kože: Poiščite zdravniško pomoč/oskrbo.

P362+364: Sledi kontaminirana oblačila in jih oprati pred ponovno uporabo.

Omejeno na strokovne uporabnike.

- Kopijo varnostnega lista lahko dobite pri lokalnem distributerju ali regionalni pisarni družbe Leica Biosystems ali na spletnem mestu www.LeicaBiosystems.com.
- Z vzorci, pred fiksiranjem in po njem, in vsemi materiali, s katerimi so prišli v stik, morate rokovati, kot da bi lahko prenašali okužbe, in pri njihovem odstranjevanju upoštevati ustrezne previdnostne ukrepe. Nikoli ne pipetirajte reagentov skozi usta; pazite, da reagenti in vzorci ne pridejo v stik s kožo ali sluznicami. Če reagenti ali vzorci pridejo v stik z občutljivimi deli, jih izperite z obilo vode. Poišcite zdravniško pomoč.
- Sledite zveznim, državnim ali lokalnim predpisom za odstranjevanje katerih koli morebitno strupenih sestavin.
- Pazite, da ne pride do mikrobne okužbe reagentov, saj lahko povzroči nespecifično barvanje.
- Če uporabite čas ali temperature razkrivanja in inkubacije, ki se razlikujejo od navedenih, lahko pridobite napačne rezultate. Uporabnik mora validirati morebitne spremembe.

Navodila za uporabo

Sonda CMV Probe je bila razvita za uporabo na avtomatiziranem sistemu BOND (vključuje sistem Leica BOND-MAX in sistem Leica BOND-III) skupaj s sistemoma Anti-Fluorescein Antibody in BOND Polymer Refine Detection. Priporočeni protokol za barvanje za sondo CMV Probe je protokol ISH A. Priporočen način pridobivanja encimov je z uporabo BOND Enzyme Pretreatment Kit, Enzyme 1 za 15 minut.

Vedno morate uporabljati ustrezne kontrolna tkiva in reagente. Protokol za kontrolna tkiva in kontrolne reagente mora biti primeren za test s sondo CMV Probe.

Kontrola kakovosti

Razlike pri obdelavi tkiva in tehničnih postopkih v laboratoriju uporabnika lahko vodijo do precejšnje variabilnosti rezultatov, kar zahteva redne interne kontrole učinkovitosti poleg spodaj navedenih postopkov.

Pozitivni kontrolni vzorci tkiva

Uporabite jih za opredelitev pravilno pripravljenih tkiv in ustreznih tehnik barvanja.

Pri vsakem postopku barvanja morate vsakemu sklopu preizkusnih pogojev dodati en pozitiven kontrolni vzorec tkiva. Za najboljšo kontrolo kakovosti in zaznavanje manjših ravni razpadanja reagentov je tkivo s šibkim pozitivnim obarvanjem bolj primerno kot tkivo z močnim pozitivnim obarvanjem.

Negativni kontrolni vzorci tkiva

Pregledati jih morate po pregledu pozitivnih kontrolnih vzorcev tkiva, da preverite specifičnost označevanja tarče s sondo.

Drugače pa se kot negativni kontrolni vzorci pogosto uporablja vrsta različnih celic, ki so prisotne v večini rezin tkiv, vendar pa mora tako uporabo preveriti uporabnik.

Negativni kontrolni reagent

Za oceno nespecifičnega obarvanja in boljšo razlago specifičnega obarvanja uporabite kontrolni reagent RNA Negative Control Probe PB0809 namesto sonde CMV Probe z eno rezino vsakega vzorca bolnika.

Pozitivni kontrolni reagent

Da preverite ohranjenost nukleinskih kislin v tkivu ter dostopnost nukleinskih kislin sondi, uporabite kontrolni reagent RNA Positive Control Probe PB0785 namesto sonde CMV Probe z eno rezino vsakega vzorca bolnika. Če sonda RNA Positive Control Probe ne kaže pozitivnega obarvanja, morate rezultate vzorcev šteti za neveljavne.

Bolnikovo tkivo

Nazadnje preglejte bolnikove vzorce, obarvane s sondo CMV Probe. Intenzivnost pozitivnega obarvanja morate oceniti v kontekstu morebitnega nespecifičnega obarvanja ozadja v kontrolnem vzorcu z izdelkom RNA Negative Control Probe PB0809.

Pričakovani rezultati

Normalna tkiva

Z uporabo PB0614 pri širokem naboru normalnih tkiv ni bilo zaznano nobeno specifično obarvanje CMV mRNA. Šibko obarvanje so ugotovili v epiteljskih celicah ščitnice, prostate, grla in požiralnika, v tubulah ledvic, sekretornih celicah v nadledvičnih žlezah in Leydigovih celicah. To obarvanje ne vpliva na interpretacijo obarvanja. (Skupno število ocenjenih normalnih primerov = 100).

Neormalna tkiva

PB0614 je obarval 3/3 pljuč, okuženih s CMV, 1/1 črevesa, okuženega s CMV, in 1/1 jeter, okuženih s CMV. Obarvanja niso opazili v pljučnih tumorjih (0/3), tumorjih na jajčnikih (0/3), tumorjih jeter (0/3), tumorjih ščitnice (0/3), tumorjih požiralnika (0/2), tumorjih dojke (0/2), metastatskih tumorjih neznanega izvora (0/2), možganskih tumorjih (0/2), tumorjih testisov (0/2), tumorjih kože (0/2), tumorju debelega črevesa (0/1), tumorju želodca (0/1), tumorju rektuma (0/1), tumorju grla (0/1) in tumorju priželjca (0/1). (Skupno število ocenjenih anomalnih primerov = 34).

PB0614 je priporočen za zaznavanje CMV mRNA.

Specifične omejitve izdelka

Družba Leica Biosystems je sondo CMV Probe optimizirala za uporabo s Anti-Fluorescein Antibody, s sistemom BOND Polymer Refine Detection in pomožnimi reagenti BOND. Uporabniki, ki odstopijo od priporočenih preizkusnih postopkov, morajo prevzeti odgovornost za razlago bolnikovih rezultatov pod temi pogoji. Trajanje protokola se lahko spreminja zaradi sprememb pri fiksaciji tkiva in učinkovitosti encimske razgradnje, zato ga je treba določiti empirično. Pri optimizaciji pogojev pridobivanja in trajanja protokola morate uporabiti izdelek RNA Negative Control Probe.

Odpravljanje težav

Referenca 8 lahko pomaga pri ukrepanju za odpravljanju napake.

Testne vzorce morajo spremljati ustrezne kontrole za tkiva in reagente.

Če želite poročati o nenavadnem obarvanju, se obrnite na svojega lokalnega distributerja ali regionalno pisarno družbe Leica Biosystems.

Dodatne informacije

Dodatne informacije o hibridizaciji *in situ* z reagenti BOND so na voljo v priloženi dokumentaciji za uporabnika »Uporaba reagentov BOND« v poglavjih Načelo postopka, Potrebni materiali, Priprava vzorcev, Kontrola kakovosti, Verifikacija testa, Razlaga obarvanja, Legenda simbolov na oznakah in Splošne omejitve.

Viri

1. Bissinger, A.L., Singzer, C., Kaiserling, E. and Jahn, G., 2002. Human cytomegalovirus as a direct pathogen: correlation of multiorgan involvement and cell distribution with clinical and pathological findings in a case of congenital inclusion disease. *Journal of Medical Virology* 67, pp. 200—206
2. Pass RF, Fowler KB, Boppana SB et al. Congenital CMV infection following first trimester maternal infection: Symptoms at birth and outcomes. *Journal of Clinical Virology* 2006;35:216—220.
3. Singh N. Cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients: new challenges and their implications for preventive strategies. *Journal of Clinical Virology*. 2006 Apr;35(4):474—7.
4. Erice A Tierney C Hirsch M Caliendo et al. AIDS Clinical Trials Group Protocol 360 Study Team. Cytomegalovirus (CMV) and human immunodeficiency virus (HIV) burden, CMV end-organ disease, and survival in subjects with advanced HIV infection (AIDS Clinical Trials Group Protocol 360). *Clinical Infectious Diseases*. 2003;37(4):567—78
5. TC Wu, WA Lee, MC Pizzorno et al. Localization of the human cytomegalovirus 2.7-kb major early beta-gene transcripts by RNA *in situ* hybridization in permissive and nonpermissive infections. *American Journal of Pathology*. 1992 141: 1247—1254.
6. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
7. Villanova PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. 1991; 7(9). Order code M29-P.
8. Wilkinson DG. The theory and practice of *in situ* hybridization. In: Wilkinson DG. (ed.) *In situ* Hybridization A practical approach. 2nd Edition. New York: Oxford University Press, 1998, pp.18—20.

Datum izdaje

26 februar 2020

BOND Ready-To-Use ISH

CMV Probe

Kat. č.: PB0614

Zamýšlené použití

Tato reagencie je určena k diagnostickému použití *in vitro*.

Sonda CMV Probe je určena k použití při kvalitativním stanovení časného genového RNA transkriptu lidského cytomegaloviru ve tkáni fixované formalínem a zalité v parafínu hybridizací *in situ* (ISH) pomocí automatického systému BOND (včetně systému Leica BOND-MAX a Leica BOND-III system).

Klinickou interpretaci jakéhokoliv barvení nebo jeho nepřítomnosti je nutné doplnit morfologickým vyšetřením s použitím správných kontrol a zhodnotit je musí kvalifikovaný patolog v kontextu s klinickou anamnézou pacienta a jinými diagnostickými testy.

Souhrn a vysvětlení

Cytomegalovirus (CMV) je členem rodiny beta herpesvirů. CMV se přenáší tělesnými tekutinami a může vyvolávat primární infekci, latentní infekci a následnou reaktivaci viru. CMV může vyvolat infekci v mnoha orgánech včetně plic, ledvin a jater. Aktivní virus byl zejména zaznamenán v epitelálních buňkách, endotelálních buňkách, fibroblastech a buňkách hladké svaloviny a také v buňkách mezenchymu, hepatocytech, granulocytech a makrofázích derivovaných z monocytů¹.

Během aktivní infekce CMV probíhá dočasná syntéza tří kategorií proteinů kódovaných virovými geny: středně časné, časné a pozdní. Středně časné proteiny jsou exprimovány 1–3 hodiny po infekci a jejich předpokládanou funkcí je zajistit účinnost replikace viru. Časné proteiny řídí syntézu viru a pozdní proteiny jsou především strukturální povahy a podílí se na sestavování virionu.

CMV je běžným oportunistickým patogenem způsobujícím závažná onemocnění u imunokomprimovaných jedinců, jako jsou pacienti s AIDS, pacienti pro transplantaci a novorozenci. Kongenitální CMV je výsledkem nitroděložní infekce, a přestože je většina dětí asymptomatická, kongenitální CMV může způsobit sensorineurální nedoslýchavost, kognitivní, motorickou a vizuální deficienci a záchvaty^{2,4}.

ISH využívající sondu CMV Probe se používá k detekci lidských infekcí CMV ve tkáni fixované formalínem a zalité v parafínu⁵. Tato metoda je reprodukovatelná a měla by vést k intenzivnímu hnědému převážně cytoplasmatickému zbarvení buněk, které obsahují RNA časných genů viru CMV.

Dodávané reagencie

Sonda CMV Probe je fluorescein-konjugovaná oligonukleotidová sonda dodávaná v hybridizačním roztoku.

Celkový objem = 5,5 ml

Ředění a míchání

Sonda CMV Probe je připravena k použití. Rekonstituce, míchání, ředění ani titrace této reagentie nejsou nutné.

Potřebný materiál, který není součástí dodávky

Úplný seznam materiálů potřebných ke zpracování vzorku a k barvení místa hybridizace *in situ* pomocí systému BOND (včetně systému Leica BOND-MAX a Leica BOND-III system) je uveden v bodě „Použití reagentií BOND“ v uživatelské dokumentaci BOND.

Skladování a stabilita

Uchovávejte při teplotě 2–8 °C. Produkt je za těchto podmínek stabilní až o datum expirace uvedeného na štítku nádoby.

Neexistují zjevné známky indikující kontaminaci anebo nestabilitu. Současně s vyšetřovanou tkání je třeba provést i hodnocení příslušné pozitivní a negativní tkáňové kontroly.

Okamžitě po použití vraťte do prostředí s teplotou 2–8 °C.

Podmínky skladování jiné než výše uvedené musí uživatel⁶ validovat.

Bezpečnostní opatření

- Tento produkt je určen pouze pro diagnostické použití *in vitro*.

CMV PROBE

Obsahuje formamid (< 50 %)

a dextran sulfát (< 30 %).

GHS07: Vykřičník.

GHS08: Ohrožení zdraví.

Signální slova: Nebezpečí.

H360D: Může poškodit

plod v těle matky.

H315: Dráždí kůži.

H319: Způsobuje vážné

podráždění očí.

P201: Před použitím si

obstarejte speciální instrukce. P202: Nepoužívejte, dokud jste si nepřečetli všechny bezpečnostní pokyny a neporozuměli jim.

P260: Nevdechujte prach/dým/plyn/mlh/páru/aerosoly.

P308+313: PŘI expozici nebo podezření na ni: Vyhleďte lékařskou pomoc/ošetření.

P314: Necítíte-li se dobře, vyhleďte lékařskou pomoc/ošetření.

P264: Po manipulaci si důkladně omyjte ruce.

P280: Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.

P305+351+338: PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně oplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování.

P337+313: Pfetrvává-li podráždění očí: Vyhleďte lékařskou pomoc/ošetření.

P302+352: PŘI STYKU S KŮŽÍ: Omyjte velkým množstvím vody a mýdla.

P332+313: Při podráždění kůže: Vyhleďte lékařskou pomoc/ošetření.

P362+364: Kontaminovaný oděv svlékněte a před opětovným použitím vyperte.

Omezeno na profesionální uživatele.

- Výtisk bezpečnostního listu materiálu získáte od místního distributora nebo oblastní kanceláře společnosti Leica Biosystems, nebo můžete navštívit webové stránky Leica Biosystems: www.LeicaBiosystems.com.
- Se vzorky, před fixací i po fixaci, a se všemi materiály, které s nimi přišly do kontaktu, je nutno zacházet, jako by mohly přenášet infekci, a zlikvidovat je s použitím příslušných bezpečnostních opatření. Nikdy reagencie nepipetujte ústy a zabraňte kontaktu reagencí a vzorků s kůží a sliznicemi. Pokud se reagencie nebo vzorky dostanou do kontaktu s citlivými oblastmi, omyjte je velkým množstvím vody. Vyhledejte lékařskou pomoc.
- Údaje o likvidaci jakýchkoli potenciálně toxických komponent prostudujte ve federálních, státních nebo místních nařízeních.
- Minimalizujte mikrobiální kontaminaci reagencí, mohlo by dojít ke zvýšení výskytu nespecifického barvení.
- Získávání, inkubační doba nebo teploty jiné než specifikované mohou vést k chybným výsledkům. Všechny takové změny musí být uživatelem validovány.

Návod k použití

Sonda CMV Probe byla vyvinuta k použití v automatickém systému BOND (včetně systému Leica BOND-MAX a Leica BOND-III) v kombinaci s Anti-Fluorescein Antibody, a soupravou BOND Polymer Refine Detection. Protokol doporučeného barvení pro sondu CMV Probe je ISH Protocol A. Odmaskování enzymu je doporučeno za použití soupravy BOND Enzyme Pretreatment Kit, Enzyme 1 na 15 minut.

Vždy se musí použít příslušné tkáňové a reagenční kontroly. Protokol tkáňové a reagenční kontroly musí odpovídat kontrolám sondy CMV Probe.

Kontrola jakosti

Rozdíly ve zpracování tkání a v technických postupech v laboratoři uživatele mohou způsobit významnou variabilitu výsledků, což vyžaduje kromě níže uvedených postupů i pravidelné provádění kontrol v laboratoři.

Pozitivní tkáňová kontrola

Používá se k průkazu správně připravených tkání a správných barvicích technik.

V každém barvicím cyklu musí být použita jedna pozitivní tkáňová kontrola pro každý soubor testovacích podmínek. Pro optimální kontrolu jakosti a k detekci menšího stupně degradace reagencie je vhodnější tkáň se slabým pozitivním barvením než tkáň se silným pozitivním barvením.

Negativní tkáňová kontrola

Musi být vyšetřena po pozitivní tkáňové kontrole k ověření specifity označení sondy podle cílové tkáně.

Alternativně často představuje místa negativní kontroly řada různých typů buněk přítomných ve většině tkáňových řezů, to ale musí uživatel validovat.

Negativní reagenční kontrola

K vyhodnocení nespecifického barvení a umožnění lepší interpretace specifického barvení cílové tkáně použijte na řezu z každého vzorku pacienta kontrolu RNA Negative Control Probe PB0809 namísto sondy CMV Probe.

Pozitivní reagenční kontrola

K získání informací o konzervaci nukleových kyselin ve tkáni a přístupnosti nukleových kyselin pro sondu použijte na řezu z každého vzorku pacienta kontrolu RNA Positive Control Probe PB0785 namísto sondy CMV Probe. Pokud sonda RNA Positive Control Probe nevykazuje pozitivní barvení, musí být výsledky testovaných vzorků považovány za neplatné.

Tkáň pacienta

Nakonec vyšetřete vzorky pacienta barvené pomocí sondy CMV Probe. Intenzita pozitivního barvení musí být zhodnocena v kontextu se vším nespecifickým barvením pozadí u sondy RNA Negative Control Probe PB0809.

Očekávané výsledky

Normální tkáně

V širokém rozsahu normálních tkání nebylo detekováno žádné specifické CMV mRNA barvení při použití sondy PB0614. Slabé barvení bylo detekováno u epitelálních buněk štítné žlázy, prostaty, hrtnanu a jícnu, ledvinových tubulů, sekrečních buněk nadledvin a Leydigových buněk. Toto barvení neinterferuje s interpretací barvení. (Celkový počet normálních vyšetřovaných tkání = 100).

Abnormální tkáně

Sonda PB0614 obarvila 3/3 vzorků plic infikovaných virem CMV, 1/1 vzorku střeva infikovaného virem CMV a 1/1 vzorku jater infikovaných virem CMV. Žádné barvení nebylo pozorováno u nádorů plic (0/3), ovariálních nádorů (0/3), nádorů jater (0/3), nádorů štítné žlázy (0/3), nádorů jícnu (0/2), nádorů prsu (0/2), metastatických nádorů neznámého původu (0/2), nádorů mozku (0/2), testikulárních nádorů (0/2), nádorů kůže (0/2), nádoru tlustého střeva (0/1), nádoru žaludku (0/1), rektálního nádoru (0/1), nádoru hrtnanu (0/1) a nádoru thymu (0/1). (Celkový počet vyšetřených abnormálních tkání = 34).

Sonda PB0614 je doporučena k detekci CMV mRNA.

Omezení specifická pro tento produkt

Sonda CMV Probe byla společností Leica Biosystems optimalizována pro použití s Anti-Fluorescein Antibody, soupravou BOND Polymer Refine Detection a s pomocnými reagenciemi BOND. Uživatelé, kteří se při vyšetření odchýlí od doporučeného postupu, musí za těchto okolností přijmout odpovědnost za interpretaci výsledku u pacienta. Doby uvedené v protokolu se mohou lišit v důsledku odchylek při fixaci tkání a účinnosti enzymatické digesce a musí být stanoveny empiricky. Při optimalizaci podmínek při získávání a dob v protokolu musí být použita sonda RNA Negative Control Probe.

Řešení problémů

Odkaz 8 může napomoci při provádění nápravných opatření.

Testovací vzorky je nutné doplnit příslušnou tkání a použitím kontrolních reagensů.

S hlášením neobvyklého barvení kontaktujte místního distributora nebo oblastní kancelář společnosti Leica Biosystems.

Další informace

Další informace o hybridizaci *in situ* reagensy BOND naleznete pod názvy Princip metody, Potřebné materiály, Příprava vzorku, Kontrola kvality, Ověření testů, Interpretace barvení, Vysvětlení symbolů na štítcích a Obecná omezení v uživatelské dokumentaci BOND, v bodě „Použití reagensů BOND“.

Literatura

1. Bissinger, A.L., Singzer, C., Kaiserling, E. and Jahn, G., 2002. Human cytomegalovirus as a direct pathogen: correlation of multiorgan involvement and cell distribution with clinical and pathological findings in a case of congenital inclusion disease. *Journal of Medical Virology* 67, pp. 200—206
2. Pass RF, Fowler KB, Boppana SB et al. Congenital CMV infection following first trimester maternal infection: Symptoms at birth and outcomes. *Journal of Clinical Virology* 2006;35:216—220.
3. Singh N. Cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients: new challenges and their implications for preventive strategies. *Journal of Clinical Virology*. 2006 Apr;35(4):474—7.
4. Erice A Tierney C Hirsch M Caliendo et al. AIDS Clinical Trials Group Protocol 360 Study Team. Cytomegalovirus (CMV) and human immunodeficiency virus (HIV) burden, CMV end-organ disease, and survival in subjects with advanced HIV infection (AIDS Clinical Trials Group Protocol 360). *Clinical Infectious Diseases*. 2003;37(4):567—78
5. TC Wu, WA Lee, MC Pizzorno et al. Localization of the human cytomegalovirus 2.7-kb major early beta-gene transcripts by RNA *in situ* hybridization in permissive and nonpermissive infections. *American Journal of Pathology*. 1992 141: 1247—1254.
6. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
7. Villanova PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. 1991; 7(9). Order code M29-P.
8. Wilkinson DG. The theory and practice of *in situ* hybridization. In: Wilkinson DG. (ed.) *In situ* Hybridization A practical approach. 2nd Edition. New York: Oxford University Press, 1998, pp.18—20.

Datum vydání

26 únor 2020

BOND Ready-to-Use ISH

Sonda CMV Probe

Katalógové č.: PB0614

Zamýšľané použitie

Toto činidlo je určené na diagnostické použitie *in vitro*.

Sonda CMV Probe je určená na kvalitatívnu identifikáciu ľudského cytomegalovírusu pri včasnom prepise génov RNA v tkanive zaliatom v parafíne a fixovanom formalínom prostredníctvom hybridizácie *in situ* (ISH) použitím automatizovaného systému BOND (vrátane systému Leica BOND-MAX a Leica BOND-III).

Klinická interpretácia akéhokoľvek zafarbenia alebo jeho absencie musí byť kombinovaná s morfológickými vyšetreniami a zodpovedajúcimi kontrolami. Výsledky je nutné vyhodnotiť v kontexte klinickej anamnézy pacienta a ďalších diagnostických testov vedených kvalifikovaným patológom.

Zhrnutie a vysvetlenie

Cytomegalovírus (CMV) patrí do skupiny beta-herpes vírusov. CMV sa prenáša telesnými tekutinami a môže spôsobiť primárnu infekciu, latentnú infekciu a následnú vírusovú reakciu. CMV môže spôsobiť infekciu mnohých orgánov vrátane pľúc, obličiek a pečene, predovšetkým bol aktívny vírus zistený v epitelových bunkách, endotelových bunkách, fibroblastoch a bunkách hladných svalov, ako aj v mezenchýmálnych bunkách, hepatocytoch, granulocytoch a makrofágoch odvodených z monocytov¹.

Počas aktívnej infekcie CMV existuje dočasná kombinácia troch kategórií proteínov, kódovaných vírusovými génmi označenými ako stredne včasné, včasné a neskoré. Stredne včasné proteíny sa exprimujú 1 – 3 hodiny po infekcii a zdá sa, že zohrávajú dôležitú úlohu pri efektívnej vírusovej replikácii. Včasné proteíny riadia vírusovú syntézu, kým neskoré proteíny sú prevažne štruktúrované a zapájajú sa do vírusovej zostavy.

CMV je spoločný oportunistický patogén, schopný spôsobiť vážne ochorenia u jednotlivcov s ohrozenou imunitou, ako sú napríklad pacienti s AIDS, pacienti s transplantátmi a novorodenci. Vrodený CMV je výsledok vnútro maternicovej infekcie a aj napriek tomu, že väčšina detí nemá príznaky, vrodený CMV môže viesť k senzoroneurálnej strate sluchu, kognitívnym, pohybovým a vizuálnym problémom a záchvatom²⁻⁴.

ISH metóda využívajúca CMV Probe sa používa na detekciu infekcií ľudským CMV v tkanive zaliatom v parafíne a fixovanom vo formalíne⁵. Metóda je reprodukovateľná a mala by viesť k intenzívnemu hnedému prevažne cytoplazmatickému zafarbeniu buniek obsahujúcich RNA včasných génov CMV.

Dodané činidlá

Sonda CMV Probe je oligonukleotidová sonda konjugovaná s fluoresceínom dodávaná v hybridizačnom roztoku.

Celkový objem = 5,5 ml

Riedenie a miešanie

Sonda CMV Probe je pripravená na okamžité použitie. Rekonštitúcia, miešanie, riedenie ani titrácia tohto činidla nie sú potrebné.

Potrebný nedodaný materiál

Úplný zoznam materiálov potrebných na spracovanie vzorky a zafarbenie pri hybridizácii *in situ* pomocou systému BOND (zahŕňa systémy Leica BOND-MAX a Leica BOND-III) si pozrite v časti „Používanie činidiel BOND“ v používateľskej dokumentácii k systému BOND.

Uskladnenie a stabilita

Skladujte pri teplote 2 – 8 °C. Za týchto podmienok sú všetky komponenty stabilné až do dátumu expirácie, ktorý sa uvádza na štítku zásobníka.

Neexistujú žiadne evidentné známky signalizujúce kontamináciu a/alebo nestabilitu. Súčasne s testovaným tkanivom treba analyzovať aj kontroly s pozitívnym aj negatívnym tkanivom.

Okamžite po použití vráťte do prostredia s teplotou 2 – 8 °C.

Iné než vyššie uvedené podmienky skladovania si vyžadujú validáciu používateľom⁶.

Bezpečnostné opatrenia

- Tento produkt je určený na diagnostické použitie *in vitro*.

SONDA CMV PROBE

Obsahuje formamid (<50 %) a dextrán sulfát (<30 %).

GHS07: Výkričník.

GHS08: Nebezpečný pre zdravie.

Signálne slová:

Nebezpečenstvo.

H360D: Môže poškodiť nenarodené dieťa.

H315: Dráždi kožu.

H319: Spôsobuje vážne podráždenie očí.

P201: Pred použitím sa oboznámte s osobitnými pokynmi.

P202: Nepoužívajte, kým si neprečítate a nepochopíte všetky bezpečnostné opatrenia.

P260: Nevdychujte prach/dym/plyn/hmlu/pary/aerosóly.

P308+313: Po expozícii alebo podozrení z nej: Vyhľadajte lekársku pomoc/starostlivosť.

P314: Ak pociťujete zdravotné problémy, vyhľadajte lekársku pomoc/starostlivosť.

P264: Po manipulácii si dôkladne umyte ruky.

P280: Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre.

P305+351+338: PO ZASIAHNUTÍ OČÍ: Opatrne niekoľko minút oplachujte vodou. Ak používate kontaktné šošovky a ak je to možné, odstráňte ich. Pokračujte vo vyplachovaní.

P337+313: Ak podráždenie očí pretrváva: Vyhľadajte lekársku pomoc/starostlivosť.

P302+352: PRI KONTAKTE S POKOŽKOU: Umyte veľkým množstvom mydla a vodou.

P332+313: Ak sa prejaví podráždenie pokožky: Vyhľadajte lekársku pomoc/starostlivosť.

P362+364: Kontaminovaný odev vyzlečte a pred opätovným použitím vyperte.

Určené iba pre odborníkov.

- Kartu bezpečnostných údajov materiálov vám poskytne miestny distribútor alebo regionálna pobočka spoločnosti Leica Biosystems, prípadne navštívte webovú lokalitu spoločnosti Leica Biosystems www.LeicaBiosystems.com.
- So vzorkami pred fixáciou a po nej a všetkými materiálmi, ktoré s nimi prišli do kontaktu, je nutné manipulovať ako s potenciálne infekčnými a zlikvidovať ich pri dodržaní zodpovedajúcich bezpečnostných opatrení. Činidlá nikdy nepipetujte ústami a zabráňte kontaktu činidiel a vzoriek s kožou a sliznicami. Ak sa činidlá alebo vzorky dostanú do kontaktu s citlivými oblasťami, umyte ich veľkým množstvom vody. Vyhľadajte lekársku pomoc.
- Likvidáciu prípadných potenciálne toxických súčastí definujú federálne, štátne alebo miestne predpisy.
- Minimalizujte mikrobiálnu kontamináciu činidiel. V opačnom prípade môže dôjsť k zvýšeniu nešpecifického zafarbenia.
- Neoddržanie predpísaných dôb záchytu, inkubačných dôb alebo teplôt môže viesť k nesprávnym výsledkom. Všetky takéto zmeny si vyžadujú validáciu používateľom.

Návod na použitie

Sonda CMV Probe bola vytvorená na použitie v automatizovanom systéme BOND (zahŕňa systémy Leica BOND-MAX a Leica BOND-III) v kombinácii s Anti-Fluorescein Antibody a systémom BOND Polymer Refine Detection. Odporúčaný protokol farbenia pre sondu CMV Probe je ISH Protocol A. Na vyhľadávanie enzýmov sa odporúča použiť súpravu BOND Enzyme Pretreatment Kit, Enzyme 1, po dobu 15 minút.

Vždy sa musia používať vhodné kontroly tkanivom a činidlom. Protokol pre kontroly tkanivom a činidlom musí zodpovedať protokolu pre sondu CMV Probe.

Kontrola kvality

Rozdiely v spracovaní tkaniva a technických postupoch v laboratóriu používateľa môžu viesť k významnému kolísaniu výsledkov, čo si vyžaduje, okrem nasledujúcich postupov, aj pravidelné interné kontroly.

Positívna kontrola tkanivom

Identifikuje správne pripravené tkanivá a správne techniky zafarbenia.

Každá súprava testových podmienok v každom cykle zafarbenia musí obsahovať jednu pozitívnu kontrolu tkanivom. Tkanivo so slabým pozitívnym farbením je na optimálnu kontrolu kvality a na detekciu slabšej degradácie činidla vhodnejšie než tkanivo so silným pozitívnym farbením.

Negatívna kontrola tkanivom

Nutné vyšetříť po pozitívnej kontrole tkanivom s cieľom overiť špecifitu značenia sondy na celi.

Ako negatívnu kontrolu je možné použiť aj rôzne typy buniek prítomné vo väčšine tkanivových rezov, takýto postup si však vyžaduje validáciu používateľom.

Negatívna kontrola činidlom

Na vyhodnotenie nešpecifického zafarbenia použite sondu RNA Negative Control Probe PB0809 miesto sondy CMV Probe s rezom jednotlivých vzoriek pacienta, čo umožní lepšiu interpretáciu špecifického farbenia cieľa.

Positívna kontrola činidlom

Použitie sondy RNA Positive Control Probe PB0785 namiesto sondy CMV Probe s rezom vzorky jednotlivých pacientov poskytne informácie o zachovaní nukleových kyselín v tkanive, ako aj o dostupnosti nukleových kyselín pre sondu. Ak sonda RNA Positive Control Probe nebude vykazovať pozitívne zafarbenie, výsledky testovaných vzoriek je nutné považovať za neplatné.

Tkanivo pacienta

Pacientske vzorky zafarbené sondou CMV Probe preskúmajte ako posledné. Intenzitu pozitívneho farbenia je nutné vyhodnotiť v kontexte prípadného nešpecifického zafarbenia sondy RNA Negative Control Probe PB0809 na pozadí.

Očakávané výsledky

Normálne tkanivá

Pri použití sondy PB0614 nebolo pozorované žiadne zafarbenie mRNA CMV na širokej škále rôznych tkanív. Slabé zafarbenie bolo zistené v epitelových bunkách štítnej žľazy, prostaty, hrtanu a pažeráka, tubuloch obličky, sekrečných bunkách nadobličiek a Leydigových bunkách. Toto zafarbenie nemá vplyv na interpretáciu farbenia. (Celkový počet normálnych vyšetrených prípadov = 100).

Abnormálne tkanivá

PB0614 zafarbila 3/3 pľúc infikovaných CMV, 1/1 čreva infikovaného CMV a 1/1 pečene infikovanej CMV. Zafarbenie nebolo pozorované pri nádoroch pľúc (0/3), nádoroch vaječníka (0/3), nádoroch pečene (0/3), nádoroch štítnej žľazy (0/3), nádoroch pažeráka (0/2), nádoroch prsníka (0/2), metastatických nádoroch neznámeho pôvodu (0/2), nádoroch mozgu (0/2), nádoroch semenníka (0/2), nádoroch kože (0/2), nádore hrubého čreva (0/1), nádore žalúdka (0/1), nádore konečníka (0/1), nádore hrtanu (0/1) a nádore detskej žľazy (0/1). (Celkový počet abnormálnych vyšetrených prípadov = 34).

Sonda PB0614 sa odporúča na detekciu mRNA CMV.

Špecifické obmedzenia pre tento výrobok

Sonda CMV Probe bola v spoločnosti Leica Biosystems optimalizovaná na použitie s Anti-Fluorescein Antibody, so systémom BOND Polymer Refine Detection a pomocnými činidlami BOND. Používatelia, ktorí sa odchyľia od odporúčaných testovacích postupov, musia akceptovať zodpovednosť za interpretáciu výsledkov pacienta za týchto okolností. Časy jednotlivých protokolov sa môžu líšiť z dôvodu odchýlok vo fixácii tkaniva a účinnosti enzymatického zhrustenia a musia sa zistiť empiricky. Pri optimalizácii podmienok vyhľadávania a časov jednotlivých protokolov je potrebné použiť sondu RNA Negative Control Probe.

Riešenie problémov

Pri náprave môže byť nápomocná referencia 8.

Testovacie vzorky majú doplniť vhodné kontrolné tkanivá a kontrolné činidlá.

Neobyvklé zafarbenie ohláste miestnemu distribútorovi alebo regionálnej pobočke spoločnosti Leica Biosystems.

Ďalšie informácie

Ďalšie informácie o hybridizácii *in situ* s činidlami BOND nájdete v častiach Princíp postupu, Požadované materiály, Príprava vzorky, Kontrola kvality, Overenie testu, Interpretácia zafarbenia, Legenda k symbolom na označení a Všeobecné obmedzenia v používateľskej dokumentácii k systému BOND „Používanie činidiel BOND“.

Referencie

1. Bissinger, A.L., Singzer, C., Kaiserling, E. and Jahn, G., 2002. Human cytomegalovirus as a direct pathogen: correlation of multiorgan involvement and cell distribution with clinical and pathological findings in a case of congenital inclusion disease. *Journal of Medical Virology* 67, pp. 200—206
2. Pass RF, Fowler KB, Boppana SB et al. Congenital CMV infection following first trimester maternal infection: Symptoms at birth and outcomes. *Journal of Clinical Virology* 2006;35:216—220.
3. Singh N. Cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients: new challenges and their implications for preventive strategies. *Journal of Clinical Virology*. 2006 Apr;35(4):474—7.
4. Erice A Tierney C Hirsch M Caliendo et al. AIDS Clinical Trials Group Protocol 360 Study Team. Cytomegalovirus (CMV) and human immunodeficiency virus (HIV) burden, CMV end-organ disease, and survival in subjects with advanced HIV infection (AIDS Clinical Trials Group Protocol 360). *Clinical Infectious Diseases*. 2003;37(4):567—78
5. TC Wu, WA Lee, MC Pizzorno et al. Localization of the human cytomegalovirus 2.7-kb major early beta-gene transcripts by RNA *in situ* hybridization in permissive and nonpermissive infections. *American Journal of Pathology*. 1992 141: 1247—1254.
6. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
7. Villanova PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. 1991; 7(9). Order code M29-P.
8. Wilkinson DG. The theory and practice of *in situ* hybridization. In: Wilkinson DG. (ed.) *In situ* Hybridization A practical approach. 2nd Edition. New York: Oxford University Press, 1998, pp.18—20.

Dátum vydania

26 február 2020

BOND Ready-to-Use ISH CMV Probe

رقم الدليل: PB0614

الاستعمال المستهدف

هذا الكاشف مخصص للاستعمال في أغراض التشخيص في المختبرات .

يتمثل الغرض من CMV Probe في استخدامه في التحديد النوعي لنسخة الحمض النووي الريبوزي (RNA) للجين المبكر للفيروس الممرض للخلايا البشرية في النسيج المثبت بالفورمالين، والمضمن في البارافين، عن طريق التجهيز في الموضع (ISH) باستخدام نظام BOND الآلي (يشمل نظامي Leica BOND-MAX و Leica BOND-III).

ينبغي أن يستكمل التفسير السريري لوجود أي تلوين أو غيابه من خلال الدراسات المورفولوجية والخصائص الصحيحة، وينبغي تقييم ذلك في سياق التاريخ السريري للمريض وغيره من الاختبارات التشخيصية التي يُجرىها أخصائي مؤهل في علم الأمراض.

المفصل والشرح

بعد الفيروس الممرض للخلايا (CMV) عضوًا في عائلة فيروس هيرس بيتا. ينتقل الفيروس الممرض للخلايا عبر سوائل الجسم ويمكنه أن يسبب عدوى أولية، وعدوى كامنة، وإعادة تنشيط لاحقة للفيروس. يمكن للفيروس الممرض للخلايا أن يسبب العدوى في العديد من الأعضاء بما في ذلك الرئة، والكلى، والكبد، على وجه الخصوص، تمت ملاحظة وجود فيروس نشط في الخلايا الظهارية، والخلايا البطانية، والخلايا الليفية، وخلايا العضلات الملساء، وكذلك في خلايا اللحمية المتوسطة، والخلايا الكبدية، والخلايا الحبيبية، والبلاعم المستمدة من الوحيدات.

خلال العدوى النشطة للفيروس الممرض للخلايا، يكون هناك اصطناع صدغي ثلاث فئات من البروتينات، والتي تم تمييزها من قبل الجينات الفيروسية المعينة والوسطية المبكرة، والمبكرة، والمتأخرة. يتم ظهور البروتينات الوسطية المبكرة بعد العدوى بـ 3-1 ساعات ويعتقد أنها تلعب دورًا في فعالية تكاثر الفيروس. تقوم البروتينات المبكرة باصطناع فيروسى مباشر، بينما تكون البروتينات المتأخرة هيكلية بشكل أساسي، وتشارك في تجميع الفيروس.

يعتبر الفيروس الممرض للخلايا مسبب عدوى انتهازية شائع، وقادر على التسبب في الإصابة بمرض خطير للأفراد منقوصي المناعة مثل مرضى الإيدز، ومرضى زرع الأعضاء، وحنثي الولادة. يتكون الفيروس الخلفي الممرض للخلايا نتيجة لعدوى تحدث داخل الرحم وعلى الرغم من أن غالبية الأطفال لا يصابوا بأعراض بسبب العدوى، إلا أن الفيروس الخلفي الممرض للخلايا قد يسبب فقدان السمع الحسي العصبي، والقصور الإدراكي والحركي، والعجز البصري، والتشنجات²⁻⁴.

يستخدم التجهيز الموضوعي بمسبار CMV Probe في الكشف عن عدوى الفيروسات البشرية المضمنة للخلايا في الأنسجة المثبتة بالفورمالين، والمضمنة في البارافين⁵. تعد هذه الطريقة قابلة للتكاثر وينبغي أن تؤدي إلى حدوث تلوين مكثف، وتلوين سيتوبلازمي بني سائد للخلايا التي تحتوي على الحمض النووي الريبوزي (RNA) للجين المبكر للفيروس الممرض للخلايا.

الكواشف المتوفرة

بعد مسبار CMV Probe مسبارًا قليل النوكليوتيد مترافق الفلوريسين يتم تزويده في محلول تهيّج.

الحجم الكلي = 5.5 مل

التخفيف والخلط

مسبار CMV Probe جاهز للاستعمال. لا يلزم إعادة تشكيل هذا الكاشف، أو خلطه، أو تخفيفه، أو معايرته.

المواد المطلوبة لكنها غير متوفرة

ارجع إلى «الاستعمال كواشف» في وثائق مستخدم BOND التي يجوز ذلك للحصول على قائمة كاملة بالمواد المطلوبة لمعالجة العينات والتلوين التهيّج في الموضع باستخدام نظام BOND (يشمل نظامي Leica BOND-MAX و Leica BOND-III).

التخزين والاستقرار

يُخزن في درجة حرارة 2-8 درجة مئوية. يكون المنتج مستقرًا في ظل هذه الظروف حتى تاريخ انتهاء الصلاحية المدون على ملصق الحاوية.

ليس ثمة علامات واضحة تشير إلى التلوث أو/أو عدم الاستقرار. ينبغي تشغيل ضوابط النسيج الإيجابية والسلبية الملائمة في نفس الوقت الذي يجري فيه اختبار النسيج.

أعد درجة الحرارة إلى 2-8 درجة مئوية بعد الاستعمال مباشرة.

يجب التحقق من ظروف التخزين بمعرفة المستخدم بخلاف الظروف المحددة أعلاه.

الاحتياطات

هذا المنتج مخصص للاستعمال في أغراض التشخيص في المختبرات.

CMV PROBE

يحتوي على الفوراميد (>50%)

وكبريتات الديكستران (>30%).

GHS07: علامة متعجب.

GHS08: خطر على الصحة.

كلمات الإشارة: خطر.

H360D: قد يضر الطفل الذي

لم يولد بعد.

H315: يسبب تهيج الجلد.

H319: يسبب تهيجًا خطيرًا

في العينين.

P201: احصل على تعليمات خاصة قبل الاستخدام.

P202: لا تبدأ في التعامل حتى تقرأ جميع احتياطات السلامة وتفهمها.

P260: لا تستنشق الغبار/الابخنة/الضباب/الأبخرة/الراداد.

P281: استخدم معدات الوقاية الشخصية كما هو مطلوب.

P308+313: في حالة التعرض أو المخاوف: احصل على المشورة الطبية/الاهتمام الطبي.

P314: احصل على المشورة الطبية/الاهتمام الطبي إذا شعرت أنك لست على ما يُرام.

P264: اغسل اليدين جيدًا بعد المعالجة.

P280: قم بارتداء قفاز واقية/وسيلة حماية للعين/وسيلة حماية للوجه.

P305+351+338: في حالة العينين: اشطف بحرص بالماء لبضع دقائق. ازرع العدسات اللاصقة إذا كانت موجودة ومن السهل خلعها. استمر في الشطف.

P337+313: في حالة استعراة تهيج العينين: احصل على المشورة الطبية/الاهتمام الطبي.

P302+352: في حالة الجلد: اغسل بكمية وفيرة من الماء والصابون.

P332+313: في حالة حدوث تهيج الجلد: احصل على المشورة الطبية/الاهتمام الطبي.

P362: اخلع الملابس الملوثة واغسلها قبل إعادة استعمالها.

مقصور على المستخدمين المتخصصين.

للحصول على نسخة من صحيفة بيانات سلامة المواد، اتصل بالموزم المحلي لديك أو مكتب Leica Biosystems الإقليمي، أو يمكنك بدلاً من ذلك زيارة موقع Leica Biosystems على شبكة الويب على العنوان الإلكتروني www.LeicaBiosystems.com

ينبغي التعامل مع العينات، قبل التثبيت وبعده، وكذلك مع جميع المواد التي تتعرض لها كما ولو كانت قادرة على نقل العدوى، وينبغي التخلص منها مع اتخاذ الاحتياطات السلمية⁷. لا تصم الكواشف مطلقًا عن طريق الفم، وتجنب احتكاك الجلد والأغشية المخاطية بالكواشف أو العينات. إذا كانت الكواشف أو العينات تمتلك بمناطق حساسة، فغسل هذه المناطق بكميات وفيرة من الماء. اطلب المشورة الطبية.

راجع اللوائح الفيدرالية، أو لوائح الولاية، أو اللوائح المحلية للتخلص من أي مكونات سامة محتملة.

قلّل التلوث الميكروبي للكواشف وإلا قد تحدث زيادة في التلوين غير المحدد.

قد تؤدي ظروف الاسترجاع، أو أوقات الحضانة، أو درجات الحرارة بخلاف تلك الظروف المحددة إلى الحصول على نتائج خاطئة. أي تغيير كهذا يجب التحقق منه من جانب المستخدم.

إرشادات الاستعمال

تم تطوير CMV Probe لاستخدامه في نظام BOND الآلي (يشمل نظامي Leica BOND-III و Leica BOND-MAX) بالاقتران مع Anti-Fluorescein Antibody و BOND Polymer Refine Detection بروتوكول التلوين الموصى به لمسبار CMV Probe هو ISH Protocol A. يُوصى باسترجاع الإنزيم باستخدام BOND Enzyme Pretreatment Kit: Enzyme 1، لمدة 15 دقيقة.

ينبغي دائماً استخدام الأنسجة وضوابط الكواشف المناسبة. يجب أن يتوافق بروتوكول الأنسجة وضوابط الكواشف مع مسبار CMV Probe.

ضبط الجودة

قد تؤدي الاختلافات في معالجة الأنسجة والإجراءات التقنية في مختبر المستخدم إلى حدوث تباين كبير في النتائج، مما يتطلب الأداء المنتظم للضوابط الداخلية بالإضافة إلى الإجراءات التالية.

ضوابط النسيج الإيجابي

يُستخدم للإشارة إلى الأنسجة التي تم إعدادها بصورة صحيحة وأساليب التلطixح السليمة.

يجب تضمين نسيج إيجابي واحد لكل مجموعة من ظروف الاختبار في كل عملية تلطيخ. يكون النسيج ذو التلطixح الإيجابي الضعيف ملائماً بصورة أكبر من النسيج ذي التلطixح الإيجابي القوي، وذلك بغرض ضبط الجودة المثلى والكشف عن مستويات طفيفة من تدهور الكاشف.

ضوابط النسيج السلبي

ينبغي فحصه بعد ضوابط النسيج الإيجابي للتحقق من خصوصية وضع تسميات المسبار نحو الهدف.

وبدلاً من ذلك، هناك مجموعة متنوعة من مختلف أنواع الخلايا الموجودة في معظم قطاعات النسيج توفر في كثير من الأحيان مواقع التحكم السلبي، ولكن يجب التحقق من هذا من جانب المستخدم.

ضباط الكاشف السلبي

استخدم مسبار RNA Negative Control Probe PB0809 بدلاً من مسبار CMV Probe مع قطاع من كل عينة من المرضى لتقييم التلطixح غير المحدد والسماح بتفسير التلطixح المحدد عند الهدف بشكل أفضل.

ضباط الكاشف الإيجابي

استخدم مسبار RNA Positive Control Probe PB0785 بدلاً من مسبار CMV Probe مع قطاع من كل عينة من المرضى لتوفير معلومات حول حفظ الأحماض النووية في النسيج وكذلك إمكانية وصول الأحماض النووية إلى المسبار. إذا فشل RNA Positive Control Probe في إظهار التلطixح الإيجابي، فينبغي اعتبار نتائج عيانت الاختبار غير صحيحة.

نسيج المريض

فحص عينات المرضى الملطخة بمسبار CMV Probe في النهاية. ينبغي تقييم كثافة التلطixح الإيجابي في سياق أي تلطيخ غير محدد بالخلفية بخصوص RNA Negative Control Probe PB0809.

النتائج المتوقعة

الأنسجة الطبيعية

لم يتم الكشف عن تلطيخ CMV mRNA محدد باستخدام مسبار PB0614 في مجموعة كبيرة من الأنسجة الطبيعية. تم كشف تلطيخ خافت في الخلايا الظهارية بالغدة الدرقية، والبروستاتا، والخصية، والمريء، وأنابيب الكلى، والخلايا الإفرازية في الغدة الكظرية وخلايا لانديج. لا يتعارض هذا التلطixح مع تفسير التلطixح. (إجمالي عدد الحالات العادية التي تم تقييمها = 100).

الأنسجة غير الطبيعية

المسبار PB0614 تلخ 3/3 من الفيروس المضخم لخلايا الرئة المصابة، و1/1 من الفيروس المضخم لخلايا الأمعاء المصابة، و1/1 من الفيروس المضخم لخلايا الكبد المصابة. لم تتم ملاحظة وجود أي تلطيخ في أورام الرئة (0/3)، وأورام المبيض (0/3)، وأورام الكبد (0/3)، وأورام الغدة الدرقية (0/3)، وأورام المريء (0/2)، وأورام الثدي (0/2)، والأورام الغليظة من أصل غير معروف (0/2)، وأورام المخ (0/2)، وأورام الخصية (0/2)، وأورام الجلد (0/2)، وورم القولون (0/1)، وورم المعدة (0/1)، وورم المستقيم (0/1)، وورم الخصية (0/1)، وورم الصغرة (0/1). (إجمالي عدد الحالات غير العادية التي تم تقييمها = 34).

يوصى باستخدام مسبار PB0614 للكشف عن CMV mRNA.

القيود الخاصة بالمنتج

تم تحسين مسبار CMV Probe في Leica Biosystems لاستخدامه مع Anti-Fluorescein Antibody، وBOND Polymer Refine Detection، وكواشف BOND المساعدة. على المستخدمين الذين يجيدون عن إجراءات الاختبار الموصى بها قبول تحمل المسؤولية عن تفسير نتائج المرضى في ظل هذه الظروف. قد تختلف أوقات البروتوكول بسبب الاختلاف في تثبيت الأنسجة وفعالية هضم الإنزيمات، ويجب تحديد ذلك تجريبياً. ينبغي استعمال RNA Negative Control Probe عند تحسين ظروف الاسترجاع وأوقات البروتوكول.

اكتشاف المشكلات وحلها

قد يساعد المرجع رقم 8 في الحصول على إجراء علاجي.

ينبغي استكمال عيانت الاختبار بضوابط النسيج والكواشف الملائمة.

اتصل بالموزع المحلي لنليك أو بـمكتب Leica Biosystems الإقليمي للإبلاغ عن أي تلطيخ غير اعتيادي.

المزيد من المعلومات

يمكن العثور على المزيد من المعلومات حول التجهيز في الموضوع باستخدام كواشف BOND، تحت العناوين التالية: مبدأ الإجراءات، المواد المطلوبة، إعداد العينة، ضبط الجودة، التحقق من صحة الفحص، تفسير التلطixح، مفتاح الرموز المدونة على الملصقات، والقيود العامة، وذلك في قسم «استعمال كواشف BOND» وفي وثائق مستخدم BOND التي بحوزتك.

مراجع

1. Bissinger, A.L., Singzer, C., Kaiserling, E. and Jahn, G., 2002. Human cytomegalovirus as a direct pathogen: correlation of multiorgan involvement and cell distribution with clinical and pathological findings in a case of congenital inclusion disease. *Journal of Medical Virology* 67, pp. 200—206
2. Pass RF, Fowler KB, Boppana SB et al. Congenital CMV infection following first trimester maternal infection: Symptoms at birth and outcomes. *Journal of Clinical Virology* 2006;35:216—220.
3. Singh N. Cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients: new challenges and their implications for preventive strategies. *Journal of Clinical Virology*. 2006 Apr;35(4):474—7.
4. Erice A Tierney C Hirsch M Caliendo et al. AIDS Clinical Trials Group Protocol 360 Study Team. Cytomegalovirus (CMV) and human immunodeficiency virus (HIV) burden, CMV end-organ disease, and survival in subjects with advanced HIV infection (AIDS Clinical Trials Group Protocol 360). *Clinical Infectious Diseases*. 2003;37(4):567—78
5. TC Wu, WA Lee, MC Pizzorno et al. Localization of the human cytomegalovirus 2.7-kb major early beta-gene transcripts by RNA *in situ* hybridization in permissive and nonpermissive infections. *American Journal of Pathology*. 1992 141: 1247—1254.

6. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
7. Villanova PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. 1991; 7(9). Order code M29-P.
8. Wilkinson DG. The theory and practice of *in situ* hybridization. In: Wilkinson DG. (ed.) *In situ* Hybridization A practical approach. 2nd Edition. New York: Oxford University Press, 1998, pp.18—20.

تاریخ الإصدار
26 فبراير 2020

Leica Biosystems Newcastle Ltd
Balliol Business Park
Benton Lane
Newcastle Upon Tyne NE12 8EW
United Kingdom
☎ +44 191 215 4242



Leica Biosystems Canada
71 Four Valley Drive
Concord, Ontario L4K 4V8
Canada
☎ +1 800 248 0123

Leica Biosystems Inc
1700 Leider Lane
Buffalo Grove IL 60089
USA
☎ +1 800 248 0123

Leica Biosystems Melbourne
Pty Ltd
495 Blackburn Road
Mt Waverley VIC 3149
Australia
☎ +61 2 8870 3500