

BOND™ Ready-to-Use ISH HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51)

Catalog No: PB0829

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.

Bruksanvisning

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.

Verificați 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 HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51)

Catalog No: PB0829

Intended Use

This reagent is for *in vitro* diagnostic use.

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) is intended to be used for the qualitative identification of the Human Papillomavirus (HPV) DNA 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). This probe binds to the five high risk HPV subtypes, 16, 18, 31, 33 and 51.

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

There are over 100 known Human Papillomavirus (HPV) types, but only about 40 are known to infect the anogenital epithelium¹. HPV is the most common sexually transmitted virus and HPV prevalence is estimated to be greater than 20% depending on region². The virus infects the basal cells of the epithelium via micro-abrasions and is maintained in the nucleus as approximately an 8 kb double stranded DNA episome³. Activation of the HPV early genes, in particular E1, E2, E6 and E7, results in viral genomic replication and persistent cellular proliferation. Therefore, unlike normal epithelium, HPV infected cells remain in the cell cycle and retain their nuclei throughout their movement from the basal to the superficial layers of the epithelium. As the cells migrate to the superficial epithelial layers the late genes (L1 and L2), which encode capsid proteins, are expressed and self assemble to form mature encapsulated viral particles that are shed from the upper layers of the epithelium.

HPV infections have been associated with a number of malignant and benign lesions, including genital warts, anogenital cancers and oral head and neck cancers^{4,7}. Most notable HPV subtypes have been associated with above 95% of cervical cancers^{8,9}. As a result, HPV subtypes are broadly classified as high or low risk, depending on the incidence they are associated with cervical malignant transformation (high risk) and benign lesion development (low risk)⁵. There are 15 HPV subtypes classified as high risk, including 16, 18, 31, 33 and 51, but HPV subtypes 16 and 18 are the most frequent subtypes associated with cervical carcinogenesis and are detected in up to 71% of cervical cancers^{9,10}. It is now widely accepted that a HPV infection is necessary for cervical cancer progression; however, additional cellular events, such as HPV DNA intergration status and viral load, are also key factors associated with cancer progression¹¹.

DNA ISH using HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) is used for the detection of HPV DNA in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. The method is reproducible and should result in brown nuclear staining of cells containing HPV DNA. This staining pattern can vary from punctuated signal detection, particularly in basal epithelial cells, to diffuse nuclear signal detection. Cytoplasmic staining may also be observed and represents the detection of HPV RNA¹².

Reagents Provided

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) is a DNA probe supplied in hybridization solution.

Total volume = 6.25 mL

Dilution and Mixing

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) 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 user¹³.

Precautions

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

HPV PROBE (SUBTYPES

16, 18, 31, 33, 51)

Contains Formamide (<70%).

GHS08: Health hazard.

Signal words: Danger.

H360D: May damage the unborn child.

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.

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

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

P314: Get medical advice/attention if you feel unwell. 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 precautions¹⁴. 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.
- Minimise microbial contamination of reagents or an increase in non-specific staining may occur.
- Enzyme digestion incubation times or temperatures other than those specified may give erroneous results. Any such change must be validated by the user.

Instructions for Use

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) was developed for use on the automated BOND system (includes Leica BOND-MAX system and Leica BOND-III system) in combination with Anti-Biotin Antibody, Stringency Wash Solution and BOND Polymer Refine Detection. The recommended staining protocol for HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) is ISH Protocol B. Enzymatic pre-treatment 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 HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51).

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 DNA Negative Control PB0731 in place of the HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) 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 DNA Positive Control Probe PB0682 in place of the HPV probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) 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 DNA Positive Control Probe fails to demonstrate positive staining, results with the test specimens should be considered invalid.

Patient Tissue

Examine patient specimens stained with HPV probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) last. Positive staining intensity should be assessed within the context of any non-specific background staining of the DNA Negative Control PB0731.

Results Expected

Normal Tissues

Using HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) PB0829, no staining was observed in a wide range of normal tissues. Faint staining was detected in epithelial cells of the prostate, tubules of the kidney, secretory cells in the adrenal glands and stomach, acinar cells of pancreas and myeloid cells of the spleen. This staining does not interfere with staining interpretation. (Total number of normal cases evaluated = 82).

Abnormal Tissues

PB0829 stained 8/15 oropharyngeal squamous cell carcinomas, 3/4 cervical intraepithelial neoplasia III, 2/4 cervical carcinomas and 1/1 condylomata acuminata. No staining was seen in ovarian tumors (0/3), thyroid tumors (0/3), liver tumors (0/2), breast tumors (0/2), lung tumors (0/2), metastatic tumors of unknown origin (0/2), brain tumors (0/2), testicular tumors (0/2), skin tumors (0/2), a cervical intraepithelial neoplasia I/II (0/1), a colon tumor (0/1), a stomach tumor (0/1), a rectal tumor (0/1), and a tumor of the thymus (0/1). (Total number of abnormal cases evaluated = 49).

PB0829 is recommended for the detection of HPV (subtypes 16, 18, 31, 33, 51) viral DNA.

Product Specific Limitations

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) has been optimized at Leica Biosystems for use with Anti-Biotin Antibody, Stringency Wash Solution, BOND Polymer Refine Detection and BOND ancillary reagents on formalin-fixed, paraffin-embedded cervical tissue.

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 type, fixation and processing. In addition, BOND Enzyme concentration and incubation time may require optimisation depending on tissue type, processing and fixation conditions. Negative reagent controls should be used when optimising pre-treatment conditions and protocol times.

The probe sets have been optimized using stringent hybridization and post hybridization washing conditions, however; potential cross hybridization between homologous subtypes should be considered when interpreting staining results¹⁶.

Troubleshooting

Reference 14 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* hybridisation 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.

Bibliography

1. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, et al., 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, pp.,17–27
2. Bosch FX, de Sanjosé S. 2003. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer—burden and assessment of causality. *Journal of the National Cancer Institute Monogr* 31 pp. 3–13
3. Hebner CM and Laimins LA., 2006. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Reviews in Medical Virology* 16, pp. 83–97
4. zur Hausen H., 1996 Papillomavirus infections—a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1288 pp. F55–78
5. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, et al., 2003. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *Journal of the National Cancer Institute* 95 pp. 1772–1783
6. Trottier H and Franco EL., 2006 The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* 24 pp. S1–15.
7. Herrero R., 2003. Chapter 7: Human papillomavirus and cancer of the upper aerodigestive tract. *Journal of the National Cancer Institute Monogr* 31 pp. 3–13
8. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ and Munoz N., 1999 Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology* 189 pp.12–19
9. Munoz N, Bosch FX, Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, Hammouda D, Shah KV and Meijer C.J., 2004 Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *International Journal of Cancer* 111 pp. 278–285
10. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ and International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. 2003 Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England Journal of Medicine* 348 pp. 518–527
11. Woodman CB, Collins SI and Young LS., 2007 The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7 pp. 11–22
12. Burns J, Graham AK, Frank C, Fleming KA, Evans MF, McGee JO. 1987 Detection of low copy human papilloma virus DNA and mRNA in routine paraffin sections of cervix by non-isotopic *in situ* hybridisation. *Journal of Clinical Pathology* 40:858–864.
13. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
14. 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.
15. Southern SA, Graham DA, Harrington CS, 1998. Discrimination of Human Papillomavirus Types in Low and High Grade Cervical Squamous Neoplasia by *In situ* Hybridization. *Diagnostic Molecular Pathology* 7 (2): 114–121.
16. 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

24 September 2018

BOND™ Ready-to-Use ISH HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51)

Référence: PB0829

Utilisation Prévue

Ce réactif est destiné au diagnostic *in vitro*.

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) est conçue pour servir au dosage qualitatif de l'ADN du virus du papillome humain (HPV) sur du tissu fixé au formol et inclus en paraffine, par hybridation *in situ* (ISH) sur l'automate BOND (qui comprend les systèmes Leica BOND-MAX et Leica BOND-III). Cette sonde se lie aux cinq sous-types à risque élevé (16, 18, 31, 33 et 51) du virus du papillome humain.

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

Il existe plus de 100 types répertoriés de virus du papillome humain (HPV), mais seuls 40 environ sont connus pour infecter l'épithélium anogénital¹. HPV est le virus sexuellement transmissible le plus courant. On a estimé sa prévalence à plus de 20% dans certaines régions². Le virus infecte les cellules basales de l'épithélium par des micro-abrasions et se perpétue dans le noyau sous la forme d'un épisode d'ADN double brin de 8 kb environ³. L'activation des gènes précoces de HPV, en particulier E1, E2, E6 et E7, se traduit par une réplication génomique virale et une prolifération cellulaire persistante. Par conséquent, contrairement à l'épithélium normal, les cellules infectées par le virus du papillome humain demeurent en cycle cellulaire et conservent leur noyau tout au long de leur migration depuis l'épithélium basal jusqu'aux couches superficielles de l'épithélium. Au fur et à mesure que les cellules migrent vers les couches superficielles de l'épithélium, les gènes tardifs (L1 et L2), qui codent les protéines de capsid, sont exprimés et leurs produits s'assemblent automatiquement pour former des particules virales encapsulées matures, qui sont relarguées par les couches supérieures de l'épithélium.

Les infections à HPV ont été associées à un certain nombre de lésions malignes et bénignes, notamment verrues génitales, cancers anogénitaux et cancers oraux à la tête et au cou⁴⁻⁷. Les sous-types majeurs de HPV ont été associés à plus de 95 % des cas de cancer du col de l'utérus^{8,9}. Par conséquent, on distingue généralement des sous-types de HPV à risque élevé ou à faible risque, suivant l'incidence avec laquelle ils sont associés à la transformation maligne du col de l'utérus (risque élevé) ou l'apparition d'une lésion bénigne (faible risque)⁶. Il existe 15 sous-types de HPV classés à risque élevé, y compris les sous-types 16, 18, 31, 33 et 51, mais les sous-types 16 et 18 du HPV sont les plus fréquemment associés à la cancérogenèse du col de l'utérus et sont détectés dans une proportion allant jusqu'à 71 % des cas de cancer du col¹⁰. Il est maintenant largement admis qu'une infection à HPV n'évolue pas nécessairement en un cancer du col de l'utérus ; cependant, d'autres événements cellulaires, comme l'état d'intégration de l'ADN du HPV et la charge virale, sont également des facteurs déterminants associés à l'évolution du cancer¹¹.

L'ISH de l'ADN avec HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) s'utilise pour détecter l'ADN de HPV sur du tissu fixé au formol et inclus en paraffine. La méthode est reproductible et doit se traduire par une coloration nucléaire marron des cellules contenant de l'ADN de virus du papillome humain. Le profil de marquage peut aller d'une détection ponctuelle du signal, en particulier dans les cellules de l'épithélium basal, à une détection nucléaire diffuse du signal. Un marquage cytoplasmique peut également être observé et représente la détection de l'ARN de HPV¹².

Réactifs Fournis

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) est une sonde ADN fournie dans une solution d'hybridation.

Volume total = 6.25 ml

Dilution et Mélange

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) est prête à l'emploi. Reconstitution, mélange, dilution ou titration de ce réactif non nécessaire.

Matériel Nécessaire mais Non Fournis

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* sur l'automate BOND (qui comprend les systèmes Leica BOND-MAX et Leica BOND-III).

Conservation et Stabilité

Conserver à une température comprise entre 2–8 °C. Dans ces conditions, le produit reste stable jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette du récipient.

Il n'y a pas de signe évident indicateur d'une contamination et/ou d'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 conservation différentes de celles ci-dessus doivent être contrôlées par l'utilisateur¹³.

Précautions

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

HPV PROBE (SUBTYPES 16, 18, 31, 33, 51) Contient Formamide (<70%). GHS08: Danger pour la santé. Mentions d'avertissement: Danger.	H360D: Peut nuire au fœtus.	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. P280: Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. P308+313: EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée: consulter un médecin. P314: Consulter un médecin en cas de malaise. Usage réservé aux professionnels.
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

- Pour obtenir un exemplaire de la fiche technique des substances dangereuses (Material Safety Data Sheet), contactez votre distributeur local ou le bureau régional de Leica Biosystems, ou consultez 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, doivent être manipulés comme s'ils étaient à risque infectieux et éliminés avec les précautions adéquates¹⁴. 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 réglementations fédérales, nationales et locales concernant l'élimination des composés potentiellement toxiques.
- Éviter une contamination microbienne des réactifs, qui peut favoriser un marquage non spécifique.
- Des durées ou des températures d'incubation pour la digestion enzymatique autres que celles spécifiées peuvent entraîner des résultats erronés. Tout changement doit être validé par l'utilisateur.

Mode d'Emploi

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) a été développé pour une utilisation sur le système BOND automatisé (qui comprend les systèmes Leica BOND-MAX et Leica BOND-III) en association avec Anti-Biotin Antibody, Stringency Wash Solution, BOND Polymer Refine Detection et les réactifs auxiliaires BOND. Le protocole de coloration recommandé pour HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) est ISH Protocol B. 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 de HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51).

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 DNA Negative Control PB0731 à la place de HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) 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 DNA Positive Control Probe PB0682 à la place de HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) 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 DNA 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 HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) en dernier. L'intensité du marquage positif ne doit être évaluée que par rapport au marquage non spécifique obtenu avec DNA Negative Control PB0731.

Résultats Attendus

Tissus sains

Avec HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) PB0829, aucune coloration n'a été détectée dans une large gamme de tissus normaux. Une faible coloration a été détectée dans les cellules épithéliales de la prostate, les tubules rénaux, les cellules sécrétrices des glandes surrénales et de l'estomac, les cellules acinaires du pancréas et les cellules myéloïdes de la rate. Cette coloration ne gêne pas l'interprétation de la coloration. (Nombre total de cas normaux évalués = 82).

Tissus tumoraux

PB0829 a coloré 8/15 carcinomes à cellules squameuses oropharyngiques, 3/4 néoplasies intraépithéliales cervicales de grade 3, 2/4 carcinomes du col de l'utérus et 1/1 condylome acuminé. Aucune coloration n'a été observée dans des tumeurs ovariennes (0/3), des tumeurs de la thyroïde (0/3), des tumeurs du foie (0/2), des tumeurs du sein (0/2), des tumeurs du poulmon (0/2), des tumeurs métastatiques d'origine inconnue (0/2), des tumeurs du cerveau (0/2), des tumeurs testiculaires (0/2), des tumeurs de la peau (0/2), une néoplasie intraépithéliale cervicale de grade I/II (0/1), une tumeur du côlon (0/1), une tumeur de l'estomac (0/1), une tumeur rectale (0/1) et une tumeur du thymus (0/1). (Nombre total de cas anormaux évalués = 49).

PB0829 est recommandé pour la détection de l'ADN viral du papillomavirus humain (HPV, sous-types 16, 18, 31, 33, 51).

Limites Spécifiques du Produit

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) a été optimisée par Leica Biosystems pour une utilisation avec Anti-Biotin Antibody, Stringency Wash Solution, BOND Polymer Refine Detection et les réactifs auxiliaires BOND sur du tissu de col de l'utérus fixé au formol et inclus en paraffine.

Les utilisateurs qui ne respectent pas les procédures recommandées prennent la responsabilité de l'interprétation des résultats des patients dans ces conditions. Les durées du protocole peuvent varier en raison des variations de type, de fixation et de traitement des tissus. En outre, la concentration en BOND Enzyme et la durée d'incubation peuvent nécessiter une optimisation en fonction du type de tissu, de son traitement et des conditions de fixation. Des contrôles réactifs négatifs doivent être testés lors de l'optimisation des conditions de prétraitement et des durées du protocole.

Les jeux de sondes ont été optimisés par des conditions stringentes d'hybridation et de lavage après hybridation ; cependant, l'éventualité d'une hybridation croisée entre sous-types homologues doit être envisagée lors de l'interprétation des résultats du marquage¹⁶.

Identification des Problèmes

La référence bibliographique n° 15 peut aider à la mise au point d'une mesure corrective.

Les échantillons à tester doivent être complétés par les contrôles réactifs et tissulaires appropriés.

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

Informations Complémentaires

Vous trouverez des informations complémentaires sur l'hybridation *in situ* à l'aide des réactifs BOND sous les en-têtes suivants du chapitre "Utilisation des réactifs BOND" de votre manuel d'utilisation BOND: Principes de la méthode, Matériel nécessaire, Préparation des échantillons, Contrôle qualité, Vérification de l'analyse, Interprétation du marquage, Légende des symboles sur les étiquettes et Limites générales.

Bibliographie

1. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, et al., 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, pp.17–27
2. Bosch FX, de Sanjosé S. 2003. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer—burden and assessment of causality. *Journal of the National Cancer Institute Monograph* 31 pp. 3–13
3. Hebner CM and Laimins LA., 2006. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Reviews in Medical Virology* 16, pp. 83–97
4. zur Hausen H., 1996 Papillomavirus infections—a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1288 pp. F55–78
5. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, et al., 2003. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *Journal of the National Cancer Institute* 95 pp. 1772–1783
6. Trottier H and Franco EL., 2006 The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* 24 pp. S1–15.
7. Herrero R., 2003. Chapter 7: Human papillomavirus and cancer of the upper aerodigestive tract. *Journal of the National Cancer Institute Monograph* 31 pp. 3–13
8. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ and Munoz N., 1999 Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology* 189 pp.12–19
9. Munoz N, Bosch FX, Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, Hammouda D, Shah KV and Meijer CJ., 2004 Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *International Journal of Cancer* 111 pp. 278–285
10. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ and International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. 2003 Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England Journal of Medicine* 348 pp. 518–527
11. Woodman CB, Collins SI and Young LS., 2007 The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7 pp. 11–22
12. Burns J, Graham AK, Frank C, Fleming KA, Evans MF, McGee JO. 1987 Detection of low copy human papilloma virus DNA and mRNA in routine paraffin sections of cervix by non-isotopic *in situ* hybridisation. *Journal of Clinical Pathology* 40:858–864.
13. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
14. 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.
15. Southern SA, Graham DA, Harrington CS, 1998. Discrimination of Human Papillomavirus Types in Low and High Grade Cervical Squamous Neoplasia by *In situ* Hybridization. *Diagnostic Molecular Pathology* 7 (2): 114–121.
16. 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 Publication

24 septembre 2018

BOND™ Ready-to-Use ISH HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51)

N. Catalogo: PB0829

Uso Previsto

Reagente per uso diagnostico *in vitro*.

L'uso dell'HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) è previsto per l'identificazione qualitativa del DNA del virus del papilloma umano (HPV) in tessuto fissato in formalina incluso in paraffina attraverso l'ibridazione *in situ* (ISH, *In situ* Hybridisation) con il sistema automatizzato BOND (include il sistema Leica BOND-MAX e il sistema Leica BOND-III). Questa sonda si lega ai cinque sottotipi di HPV ad alto rischio: 16, 18, 31, 33 e 51.

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.

Sommario e Spiegazione

Si conoscono più di 100 tipi del virus del papilloma umano (HPV), ma sono solo circa 40 quelli di cui è nota la capacità di infettare l'epitelio anogenitale¹. L'HPV è il più comune tra i virus a trasmissione sessuale e la sua prevalenza tra le donne è stimata, in alcune zone, oltre il 20%². Attraverso le microabrasioni il virus infetta le cellule basali dell'epitelio e rimane nel nucleo sotto forma di DNA episomiale a doppia elica di circa 8 kb³. L'attivazione dei geni precoci dell'HPV, in particolare gli E1, E2, E6 ed E7, dà luogo alla replicazione del genoma virale e alla proliferazione cellulare persistente. Quindi a differenza dell'epitelio normale, le cellule infettate dall'HPV rimangono nel ciclo cellulare e mantengono il loro nucleo durante tutta la migrazione dallo strato basale a quello superficiale dell'epitelio. Quando le cellule migrano nello strato epiteliale superficiale si avvia l'espressione dei geni tardivi (L1 ed L2), che codificano per le proteine del capside; essi si autoaggregano a formare particelle virali incapsulate mature che si disperdono dagli strati superiori dell'epitelio.

Le infezioni da HPV sono state associate a numerose lesioni maligne e benigne, tra le quali i condilomi, i tumori anogenitali, e quelli orali della testa e del collo^{4,7}. Va ricordato soprattutto che alcuni sottotipi dell'HPV sono stati associati a oltre il 95% dei tumori della cervice uterina^{8,9}. Ne consegue che i sottotipi dell'HPV vengono classificati grossolanamente come a basso o ad alto rischio, in base all'incidenza con cui si associano alla trasformazione maligna (alto rischio) o allo sviluppo di lesioni benigne (basso rischio) a livello cervicale⁸. Vi sono 15 sottotipi di HPV classificati ad alto rischio, tra i quali il 16, il 18, il 31, il 33 e il 51, ma i sottotipi 16 e 18 sono quelli che più di frequente si associano alla cancerogenesi cervicale e vengono rilevati nei tumori cervicali anche nel 71% dei casi^{9,10}. Oggi è ampiamente riconosciuto che per la progressione del tumore cervicale è necessaria l'infezione da HPV; tuttavia anche altri eventi cellulari, come lo stato dell'integrazione del DNA dell'HPV e la carica virale, sono fattori determinanti associati alla progressione tumorale¹¹.

La ISH del DNA con l'HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) viene utilizzata per la rilevazione del DNA dell'HPV in tessuto fissato in formalina, incluso in paraffina. Il metodo è riproducibile e deve dare luogo alla colorazione marrone del nucleo delle cellule che contengono il DNA dell'HPV. Questo modello di colorazione può variare, dalla rilevazione puntata del segnale, soprattutto nelle cellule dell'epitelio basale, alla rilevazione diffusa del segnale nel nucleo. Si può osservare anche la colorazione del citoplasma, che rappresenta la rilevazione dell'RNA dell'HPV¹².

Reagenti Forniti

L'HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) è una sonda di DNA fornita in soluzione di ibridazione.

Volume totale = 6.25 ml

Diluizione e Miscelazione

L'HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) è pronta per l'uso. Non è necessario ricostituire, miscelare, diluire o titolare il reagente.

Materiale Necessario Non Fornito

Per un elenco completo del materiale necessario per il trattamento del campione e la colorazione per 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 riportata sull'etichetta del contenitore.

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

Immediatamente dopo l'uso, riportare a 2–8 °C.

L'utente deve verificare eventuali condizioni di conservazione diverse da quelle specificate¹³.

Precauzioni

- Il prodotto è destinato all'uso diagnostico *in vitro*.

HPV PROBE (SUBTYPES 16, 18, 31, 33, 51)

Contiene Formammide (<70%).

GHS08: Pericolo per la salute.

Avvertenze: Pericolo.

H360D: Può nuocere al feto.

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.

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

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

P314: In caso di malessere, consultare un medico.

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 precauzioni¹⁴. Non pipettare mai i reagenti con la bocca ed evitare il contatto dei reagenti e dei campioni con la cute e le mucose. Se un reagente o un campione viene a contatto con zone sensibili, lavare abbondantemente con acqua. Consultare un medico.
- Consultare la normativa nazionale, regionale o locale per lo smaltimento dei componenti potenzialmente tossici.
- Ridurre al minimo la contaminazione microbica dei reagenti per non incrementare il rischio di una colorazione non specifica.
- Tempi o temperature di incubazione della digestione enzimatica diversi da quelli specificati possono fornire risultati erranei. Ogni eventuale modifica deve essere convalidata dall'utente.

Istruzioni per l'Uso

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) 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-Biotin Antibody, Stringency Wash Solution, BOND Polymer Refine Detection e con i reagenti ausiliari BOND. Il protocollo di colorazione raccomandato per HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) è ISH Protocol B. 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 HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51).

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 DNA Negative Control PB0731 al posto di HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) 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 bersaglio.

Controllo positivo del reagente

Usare DNA Positive Control Probe PB0682 al posto di HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) 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 DNA 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 HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51). L'intensità della colorazione positiva va analizzata nel contesto di qualsiasi colorazione aspecifica di fondo di DNA Negative Control PB0731.

Risultati Attesi

Tessuti normali

Utilizzando HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) PB0829, non è stata osservata colorazione in una vasta gamma di tessuti normali. È stata rilevata una colorazione indistinta nelle cellule epiteliali di prostata, tubuli renali, cellule secretive nelle ghiandole surrenali e stomaco, cellule acinose del pancreas e cellule mieloidi della milza. Tale colorazione non interferisce con l'interpretazione della colorazione. (Numero totale di casi normali esaminati = 82).

Tessuti neoplastici

PB0829 ha colorato 8/15 carcinomi a cellule squamose orofaringei, 3/4 neoplasie intraepiteliali cervicali di grado III, 2/4 carcinomi

cervicali e 1/1 condiloma acuminato. Non è stata riscontrata colorazione nei tumori alle ovaie (0/3), tumori tiroidei (0/3), tumori al fegato (0/2), tumori mammari (0/2), tumori ai polmoni (0/2), tumori metastatici di origine ignota (0/2), tumori al cervello (0/2), tumori testicolari (0/2), tumori della pelle (0/2), neoplasia intraepiteliale cervicale di grado I/II (0/1), tumore al colon (0/1), tumore allo stomaco (0/1), tumore del retto (0/1) e tumore del timo (0/1). (Numero totale di casi anormali esaminati = 49).

PB0829 è consigliata per il rilevamento di DNA virale di HPV (sottotipi 16, 18, 31, 33, 51).

Limitazioni Specifiche del Prodotto

L'HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) è stata ottimizzata da Leica Biosystems per l'uso con l'Anti-Biotin Antibody, la Stringency Wash Solution, il BOND Polymer Refine Detection e i reagenti ausiliari BOND su tessuto cervicale fissato in formalina, incluso in paraffina.

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 nel tipo di tessuto, nella fissazione e nel trattamento. Inoltre può essere necessario ottimizzare la concentrazione e il tempo di incubazione del BOND Enzyme in base al tipo di tessuto e alle condizioni di trattamento e di fissazione. Nell'ottimizzazione delle condizioni di pretrattamento e dei tempi del protocollo si devono impiegare dei controlli negativi del reagente.

Le strutture delle sonde sono state ottimizzate utilizzando condizioni di ibridazione e di lavaggio post-ibridazione rigorose, tuttavia nell'interpretazione dei risultati della colorazione si deve tenere conto della possibile ibridazione crociata tra sottotipi omologhi¹⁶.

Soluzione Problemi

Il riferimento bibliografico n. 15 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.

Ulteriori Informazioni

Ulteriori 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. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, et al., 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, pp.17–27
2. Bosch FX, de Sanjose S. 2003. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer--burden and assessment of causality. *Journal of the National Cancer Institute Monogr* 31 pp. 3–13
3. Hebner CM and Laimins LA., 2006. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Reviews in Medical Virology* 16, pp. 83–97
4. zur Hausen H., 1996 Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1288 pp. F55–78
5. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, et al., 2003. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *Journal of the National Cancer Institute* 95 pp. 1772–1783
6. Trottier H and Franco EL., 2006 The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* 24 pp. S1–15.
7. Herrero R., 2003. Chapter 7: Human papillomavirus and cancer of the upper aerodigestive tract. *Journal of the National Cancer Institute Monogr* 31 pp. 3–13
8. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ and Munoz N., 1999 Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology* 189 pp.12–19
9. Munoz N, Bosch FX, Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, Hammouda D, Shah KV and Meijer CJ., 2004 Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *International Journal of Cancer* 111 pp. 278–285
10. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ and International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. 2003 Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England Journal of Medicine* 348 pp. 518–527
11. Woodman CB, Collins SI and Young LS., 2007 The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7 pp. 11–22
12. Burns J, Graham AK, Frank C, Fleming KA, Evans MF, McGee JO. 1987 Detection of low copy human papilloma virus DNA and mRNA in routine paraffin sections of cervix by non-isotopic *in situ* hybridisation. *Journal of Clinical Pathology* 40:858–864.
13. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
14. 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.
15. Southern SA, Graham DA, Harrington CS, 1998. Discrimination of Human Papillomavirus Types in Low and High Grade Cervical Squamous Neoplasia by *In situ* Hybridization. *Diagnostic Molecular Pathology* 7 (2): 114–121.
16. 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

24 settembre 2018

BOND™ Ready-to-Use ISH

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51)

Bestellnr.: PB0829

Verwendungszweck

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

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) ist für den qualitativen Nachweis der DNA des Humanen Papillomavirus (HPV) in formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe durch *In-situ*-Hybridisierung (ISH) mit dem automatischen BOND-System (bestehend aus dem Leica BOND-MAX-System und dem Leica BOND-III-System) bestimmt. Diese Sonde bindet an die fünf Hochrisiko-HPV-Subtypen 16, 18, 31, 33 und 51.

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 des Patienten und anderen diagnostischen Tests von einem qualifizierten Pathologen vorgenommen werden.

Zusammenfassung und Erläuterung

Es sind über 100 verschiedene Typen von Humanen Papillomaviren (HPV) bekannt, von denen jedoch lediglich ca. 40 Typen bekanntermaßen das anogenitale Epithel befallen¹. HPV ist das häufigste sexuell übertragene Virus. Die HPV-Prävalenz bei Frauen wurde je nach Region auf mehr als 20% geschätzt². Das Virus infiziert die Basalzellen des Epithels über kleine Wunden und wird im Nukleus als ungefähr 8 kb großes doppelsträngiges DNA-Episom erhalten³. Die Aktivierung der frühen HPV-Gene, insbesondere E1, E2, E6 und E7, führt zu einer Replikation des viralen Genoms und anhaltender Zellproliferation. Daher verbleiben HPV-infizierte Zellen im Gegensatz zu normalen Epithelzellen im Zellzyklus und behalten ihre Zellkerne während ihrer Wanderung von den basalen Schichten an die Oberfläche des Epithels bei. Während die Zellen in die oberflächlichen Epithelschichten wandern, werden die späten Gene (L1 und L2) für die Kapsidproteine exprimiert. Die Genprodukte setzen sich selbstorganisatorisch zu reifen Viruspartikeln zusammen, die von den oberen Epithelschichten abgestoßen werden.

HPV-Infektionen wurden mit einer Reihe bösartiger und gutartiger Läsionen in Verbindung gebracht, darunter Genitalwarzen, Anogenitalkrebs, Mund-, Kopf- und Halskrebsarten^{4,7}. Insbesondere wurden HPV-Subtypen mit mehr als 95% der Fälle von Zervixkarzinomen assoziiert^{8,9}. Daher wurden HPV-Subtypen in die Kategorien Hochrisiko oder Niedrigrisiko eingeteilt, in Abhängigkeit von ihrer Fähigkeit, bösartige Zervixtransformationen (Hochrisiko) oder gutartige Läsionen (Niedrigrisiko) hervorzurufen⁵. Es gibt 15 HPV-Subtypen, die in die Hochrisikokategorie eingeteilt wurden, darunter die Subtypen 16, 18, 31, 33 und 51. Die beiden HPV-Subtypen 16 und 18 werden dabei am häufigsten mit einer Zervixkarzinogenese assoziiert und in bis zu 71% der Fälle von Zervixkarzinomen nachgewiesen^{9,10}. Die heute vorherrschende Ansicht ist, dass eine HPV-Infektion für die Ausbildung eines Zervixkarzinoms notwendig ist. Weitere wichtige Zellereignisse wie der Status der HPV-DNA-Integration und die Viruslast gehören ebenfalls zu den Schlüsselfaktoren, die mit dem Krebsverlauf assoziiert sind¹¹.

Die DNA-ISH mit HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) wird zum Nachweis von HPV-DNA in formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe eingesetzt. Die Methode ist reproduzierbar und sollte zu einer braunen, nukleären Färbung von HPV-DNA-haltigen Zellen führen. Das Färbemuster kann von einem deutlichen Signal, das vor allem in Basalepithelzellen zu beobachten ist, bis zu einem diffusen nukleären Signal reichen. Des Weiteren kann eine zytoplasmatische Färbung beobachtet werden, die das Vorhandensein von HPV-RNA nachweist¹².

Mitgelieferte Reagenzien

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) ist eine DNA-Sonde, die in Hybridisierungslösung geliefert wird.

Gesamtvolumen = 6,25 ml

Verdünnung und Mischung

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) ist gebrauchsfertig. Rekonstitution, Mischen, Verdünnen oder Titrieren dieses Reagenzes ist nicht erforderlich.

Erforderliche, aber Nicht Mitgelieferte 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.

Lagerung 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 Anzeichen für eine Kontamination und/oder Instabilität des Produkts. 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 werden¹³.

Vorsichtsmaßnahmen

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

HPV PROBE (SUBTYPES 16, 18, 31, 33, 51)

Enthält Formamid (<70%).

GHS08: Gesundheitsgefahr.

Signalwörter: Gefahr.

H360D: Kann das Kind im Mutterleib schädigen.

P201: Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.

P202: Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.

P260: Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen.

P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.

P308+313: BEI Exposition oder falls betroffen:

Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P314: Bei Unwohlsein.

Nur von Fachleuten zu verwenden.

- Ein Exemplar des Sicherheitsdatenblattes erhalten Sie von Ihrer örtlichen Vertriebsfirma, 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 kommenden Materialien so, als ob diese Infektionen übertragen können und entsorgen Sie sie unter Beachtung der entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen¹⁴. Pipettieren Sie Reagenzien niemals mit dem Mund und vermeiden Sie den Kontakt von Haut und Schleimhäuten mit Reagenzien oder Präparaten. Falls Reagenzien oder Präparate mit empfindlichen Bereichen in Kontakt gekommen sind, spülen Sie diese mit reichlich Wasser. Holen Sie anschließend ärztlichen Rat ein.
- Beachten Sie bei der Entsorgung potentiell toxischer Bestandteile die behördlichen und örtlichen Vorschriften.
- Mikrobielle Kontaminationen sollten minimiert werden, da es sonst zu einer Zunahme unspezifischer Färbungen kommen kann.
- Andere als die angegebenen Enzymverdauungszeiten oder Temperaturen können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Diesbezügliche Änderungen müssen vom Anwender selbst getestet werden.

Gebrauchsanleitung

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) 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-Biotin Antibody, Stringency Wash Solution, BOND Polymer Refine Detection und BOND-Zusatzreagenzien optimiert entwickelt. ISH Protocol B ist das empfohlene Färbeprotokoll für HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) 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 Reagenzienkontrollen sollte dem für HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) 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 DNA Negative Control PB0731 anstelle HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) zu verwenden.

Positive Reagenzkontrolle

Verwenden Sie DNA Positive Control Probe PB0682 anstelle HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) 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 DNA Positive Control Probe keine positive Färbung nachweisen kann, sollten die mit den Testproben erzielten Ergebnisse als ungültig betrachtet werden.

Patientengewebe

Die mit HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) gefärbten Patientenproben müssen zuletzt untersucht werden. Eine positive Färbintensität ist im Kontext einer unspezifischen Hintergrundfärbung der DNA Negative Control PB0731 zu bewerten.

Erwartete Ergebnisse

Normale Gewebe

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) PB0829 zeigte keinerlei Färbung in einem breiten Spektrum von Gewebeproben. Eine schwache Färbung wurde in Epithelzellen der Prostata, Tubuli der Niere, sekretorischen Zellen der Nebenniere und des Magens, azinären Zellen des Pankreas und myeloischen Zellen der Milz beobachtet. Diese Färbung hat keinen Einfluss auf die Interpretation der

Färbungen. (Anzahl der insgesamt untersuchten Normalgewebeproben = 82).

Tumorgewebe

PB0829 färbte 8/15 oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen, 3/4 zervikalen intraepithelialen Neoplasien, III, 2/4 Zervixkarzinomen und 1/1 Condylomatum acuminatum. Bei Tumoren der Eierstöcke (0/3), Schilddrüse (0/3), Leber (0/2), Brust (0/2), Lunge (0/3), metastatischen Tumoren unbekanntem Ursprungs (0/2), Tumoren des Gehirns (0/2), Testikeln (0/2), Haut (0/2), einer zervikalen intraepithelialen Neoplasie, I/II (0/1) und je einem Tumor des Colons (0/1), Magens (0/1), Rektums (0/1) und Thymus (0/1) wurde keine Färbung nachgewiesen. (Anzahl der insgesamt untersuchten pathologischen Gewebeproben = 49).

PB0829 wird für die Bestimmung der HPV (Subtypen 16, 18, 31, 33, 51)-DNA empfohlen.

Produktspezifische Einschränkungen

HPV Probe (Subtypen 16, 18, 31, 33, 51) wurde von Leica Biosystems zur Verwendung mit dem Anti-Biotin Antibody, der Stringency Wash Solution, dem BOND Polymer Refine Detection und BOND-Zusatzreagenzien in formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Zervixgeweben 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 den Gewebearbeit und bei der Gewebefixierung und -verarbeitung variieren und müssen empirisch bestimmt werden. Darüber hinaus müssen die Konzentration und die Inkubationszeit des BOND Enzyme je nach Gewebeart, -verarbeitung und -fixierungsbedingungen angepasst werden. Bei der Optimierung der Vorbehandlungsbedingungen und Verfahrenszeiten sollten negative Reagenzkontrollen eingesetzt werden.

Die Sonden-Sets wurden unter stringenten Hybridisierungs- und Waschbedingungen nach der Hybridisierung optimiert, es sollte jedoch bei der Auswertung der Färbegergebnisse beachtet werden, dass es zwischen homologen Subtypen zu Kreuzhybridisierungen kommen kann¹⁶.

Fehlersuche

Maßnahmen zur Abhilfe beim Auftreten von Fehlern finden Sie in Referenz 15.

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 an 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.

Bibliografie

1. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, et al., 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, pp.17–27
2. Bosch FX, de Sanjosé S. 2003. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer—burden and assessment of causality. *Journal of the National Cancer Institute Monogr* 31 pp. 3–13
3. Hebner CM and Laimins LA., 2006. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Reviews in Medical Virology* 16, pp. 83–97
4. zur Hausen H., 1996 Papillomavirus infections—a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1288 pp. F55–78
5. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, et al., 2003. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *Journal of the National Cancer Institute* 95 pp. 1772–1783
6. Trottier H and Franco EL., 2006 The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* 24 pp. S1–15.
7. Herrero R., 2003. Chapter 7: Human papillomavirus and cancer of the upper aerodigestive tract. *Journal of the National Cancer Institute Monogr* 31 pp. 3–13
8. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ and Munoz N., 1999 Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology* 189 pp.12–19
9. Munoz N, Bosch FX, Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, Hammouda D, Shah KV and Meijer CJ., 2004 Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *International Journal of Cancer* 111 pp. 278–285
10. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ and International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. 2003 Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England Journal of Medicine* 348 pp. 518–527
11. Woodman CB, Collins SI and Young LS., 2007 The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7 pp. 11–22
12. Burns J, Graham AK, Frank C, Fleming KA, Evans MF, McGee JO. 1987 Detection of low copy human papilloma virus DNA and mRNA in routine paraffin sections of cervix by non-isotopic *in situ* hybridisation. *Journal of Clinical Pathology* 40:858–864.
13. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
14. 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.
15. Southern SA, Graham DA, Harrington CS, 1998. Discrimination of Human Papillomavirus Types in Low and High Grade Cervical Squamous Neoplasia by *In situ* Hybridization. *Diagnostic Molecular Pathology* 7 (2): 114–121.
16. 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, pp0,18–20.

Ausgabedatum

24 September 2018

BOND™ Ready-to-Use ISH HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51)

Catálogo N.º.: PB0829

Indicaciones de Uso

Este reactivo es para uso diagnóstico *in vitro*.

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) está destinada a utilizarse en la identificación cualitativa del ADN del Papilomavirus humano (HPV) en tejidos fijados en formalina e incrustados en parafina mediante hibridación *in situ* (ISH) usando el sistema automatizado BOND (incluye el sistema Leica BOND-MAX y el sistema Leica BOND-III). Esta sonda se enlaza a los cinco tipos de alto riesgo del HPV, 16, 18, 31, 33 y 51.

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

Hay más de 100 tipos conocidos de Papilomavirus humano (HPV), pero solamente se sabe de 40 que infecten el epitelio anogenital¹. El HPV es el virus de transmisión sexual más común, y se ha estimado que su prevalencia en mujeres es mayor del 20% en función de la región². El virus infecta las células basales del epitelio mediante microabrasiones, y se mantiene en el núcleo como un episoma de ADN bicatenario de, aproximadamente, 8 kb³. La activación de los genes tempranos del HPV, en particular E1, E2, E6 y E7, produce la replicación genómica viral y la proliferación celular persistente. En consecuencia, a diferencia del epitelio normal, las células infectadas por el HPV permanecen en el ciclo celular y retienen sus núcleos durante su migración desde la capa basal hasta las capas superficiales del epitelio. A medida que las células migran a las capas epiteliales superficiales se expresan los genes tardíos (L1 y L2), que codifican proteínas de la cápside. Estas proteínas se ensamblan para formar partículas virales encapsuladas maduras, que se desprenden de las capas superiores del epitelio.

Las infecciones por HPV se han asociado con diversas lesiones malignas y benignas, entre las que se incluyen verrugas genitales, cánceres anogenitales, cánceres de boca y cánceres de cabeza y cuello^{4,7}. La mayoría de subtipos importantes del HPV se han asociado con más del 95% de los cánceres cervicales^{8,9}. Como resultado, los subtipos de HPV se clasifican en general como de alto o de bajo riesgo, en función de la incidencia con la que se asocian a la transformación cervical maligna (alto riesgo) y al desarrollo de lesiones benignas (bajo riesgo)⁶. Hay 15 subtipos de HPV clasificados como de alto riesgo, entre ellos los 16, 18, 31, 33 y 51, pero los subtipos de HPV 16 y 18 son los que se asocian con más frecuencia a la carcinogénesis cervical, y se detectan hasta en el 71% de los cánceres cervicales^{9,10}. En la actualidad se acepta ampliamente que es necesaria una infección por HPV para la progresión del cáncer cervical; no obstante, hay otros eventos celulares, tales como el estado de integración del ADN de HPV y la carga viral, que también son factores clave asociados a la progresión del cáncer¹¹.

La ISH de ADN usando HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) se utiliza para la detección de ADN de HPV en tejido fijado con formalina e incrustado en parafina. El método es reproducible, y debe producir la tinción nuclear en marrón de las células que contienen ADN de HPV. Este patrón de tinción puede variar desde la detección de una señal de puntos, en particular en células epiteliales basales, a la detección de una señal nuclear difusa. También puede observarse tinción citoplásmica, que representa la detección de ARN de HPV¹².

Reactivos Suministrados

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) es una sonda de ADN que se suministra en solución de hibridación.

Volumen total = 6,25 mL

Dilución y Mezcla

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) está lista para usar. No es necesaria la reconstitución, mezcla, dilución o titulación de este reactivo.

Material Necesario pero No Suministrado

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

Conservación y Estabilidad

Debe conservarse 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 necesarias¹³.

Precauciones

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

HPV PROBE (SUBTYPES 16, 18, 31, 33, 51) H360D: Puede dañar al feto.

Contiene Formamida (<70%).

GHS08: Peligro para la salud.

Palabras de advertencia: Peligro.

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.

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

P308+313: EN CASO DE exposición manifiesta o presunta:

Consultar a un médico.

P314: Consultar a un médico en caso de malestar.

Limitado a usuarios profesionales.

- Si desea obtener una copia 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, www.LeicaBiosystems.com.
- Las muestras, antes y después de ser fijadas, y cualquier material en contacto con ellas, deben ser tratadas como sustancias capaces de transmitir infecciones y deben desecharse con las precauciones correspondientes¹⁴. No pipeteo nunca los reactivos con la boca, y evite el contacto de la piel y las mucosas con reactivos o muestras. Si los reactivos o las muestras entran en contacto con zonas sensibles, lávelas enseguida con abundante agua. 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 y temperaturas de incubación y digestión diferentes de los especificados pueden dar resultados erróneos. Cualquier cambio que se produzca deberá ser validado por el usuario.

Instrucciones de Uso

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) 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-Biotin Antibody, Stringency Wash Solution, BOND Polymer Refine Detection y reactivos auxiliares BOND. El protocolo de tinción recomendado para HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) es ISH Protocol B. 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 controles de tejidos y de reactivos debe corresponder al de HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51).

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 DNA Negative Control PB0731 en lugar de HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) 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 DNA Positive Control Probe PB0682 en lugar de HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) 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 DNA 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 HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) al final. La intensidad de la tinción positiva debe valorarse en el contexto de cualquier tinción de fondo no específica de DNA Negative Control PB0731.

Resultados Esperados

Tejidos normales

Con HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) PB0829, no se observó tinción en una amplia variedad de tejidos normales. Se detectó una ligera tinción en células epiteliales de la próstata, túbulos del riñón, células secretoras de las glándulas suprarrenales y del estomago, y en células acinares del páncreas y células mieloides del bazo. Esta tinción no afectó a la interpretación. (Número total de casos normales evaluados = 82).

Tejidos tumorales

El PB0829 tiñó 8/15 de los carcinomas de células escamosas, 3/4 de las neoplasias intraepiteliales cervicales III, 2/4 de los carcinomas cervicales y 1/1 condiloma acuminado. No se observó tinción en tumores ováricos (0/3), tumores de la tiroides (0/3), tumores hepáticos (0/3), tumores de mama (0/2), tumores de pulmón (0/2), tumores metastásicos de origen desconocido (0/2), tumores cerebrales (0/2), tumores testiculares (0/2), tumores de piel (0/2), una neoplasia intraepitelial cervical I/II (0/1), un tumor de colon (0/1), un tumor de estómago (0/1), un tumor rectal (0/1), y un tumor de timo (0/1). (Número total de casos anormales evaluados = 49).

Se recomienda PB0829 para detectar el ADN vírico de HPV (subtipos 16, 18, 31, 33, 51).

Limitaciones Específicas del Producto

HPV Probe (Subtipos 16, 18, 31, 33, 51) se ha optimizado en Leica Biosystems para su uso con Anti-Biotin Antibody, Stringency Wash Solution, BOND Polymer Refine Detection y reactivos auxiliares BOND en tejido cervical fijado con formalina e incrustado en parafina.

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 el tipo de tejido, en la fijación y en el procesado. Además, puede que sea necesario optimizar la concentración de BOND Enzyme y el tiempo de incubación en función del tipo de tejido, del procesado y de las condiciones de fijación. Se debe utilizar reactivos de control negativos a la hora de optimizar las condiciones de pretratamiento y los tiempos de protocolo.

Los juegos de sonda se han optimizado en estrictas condiciones de hibridación y lavado posterior a la hibridación; no obstante, en el momento de interpretar los resultados de la tinción debe considerarse la posibilidad de hibridación cruzada entre subtipos homólogos¹⁶.

Resolución de Problemas

La referencia 15 puede ayudar en las acciones correctoras.

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

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

Más Información

Para obtener más información sobre 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.

Bibliografía

1. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, et al., 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, pp. 17–27
2. Bosch FX, de Sanjosé S. 2003. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer—burden and assessment of causality. *Journal of the National Cancer Institute Monogr* 31 pp. 3–13
3. Hebner CM and Laimins LA., 2006. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Reviews in Medical Virology* 16, pp. 83–97
4. zur Hausen H., 1996 Papillomavirus infections—a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1288 pp. F55–78
5. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, et al., 2003. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *Journal of the National Cancer Institute* 95 pp. 1772–1783
6. Trottier H and Franco EL., 2006 The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* 24 pp. S1–15.
7. Herrero R., 2003. Chapter 7: Human papillomavirus and cancer of the upper aerodigestive tract. *Journal of the National Cancer Institute Monogr* 31 pp. 3–13
8. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ and Munoz N., 1999 Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology* 189 pp.12–19
9. Munoz N, Bosch FX, Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, Hammouda D, Shah KV and Meijer C.J., 2004 Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *International Journal of Cancer* 111 pp. 278–285
10. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ and International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. 2003 Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England Journal of Medicine* 348 pp. 518–527
11. Woodman CB, Collins SI and Young LS., 2007 The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7 pp. 11–22
12. Burns J, Graham AK, Frank C, Fleming KA, Evans MF, McGee JO. 1987 Detection of low copy human papilloma virus DNA and mRNA in routine paraffin sections of cervix by non-isotopic *in situ* hybridisation. *Journal of Clinical Pathology* 40:858–864.
13. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
14. 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.
15. Southern SA, Graham DA, Harrington CS, 1998. Discrimination of Human Papillomavirus Types in Low and High Grade Cervical Squamous Neoplasia by *In situ* Hybridization. *Diagnostic Molecular Pathology* 7 (2): 114–121.
16. 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

24 de septiembre de 2018

BOND™ Ready-to-Use ISH HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51)

Nº de Catálogo: PB0829

Utilização Prevista

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

A Sonda HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) destina-se a ser usada para a identificação qualitativa do ADN do Papilomavírus Humano (HPV) em tecidos fixos com formalina e embebidos em parafina por hibridização *in situ* (ISH) utilizando o sistema BOND automatizado (inclui o sistema Leica BOND-MAX e o sistema Leica BOND-III). Esta sonda liga-se aos cinco subtipos de alto risco do HPV, 16, 18, 31, 33 e 51.

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

Existem mais de 100 tipos conhecidos de Papilomavírus Humano (HPV), mas só aproximadamente 40 infectam o epitélio anogenital¹. O HPV é o vírus sexualmente transmitido mais frequente, tendo-se calculado que a prevalência da infecção por HPV é superior a 20%, dependendo da região². O vírus infecta as células basais do epitélio mediante micro-abrasões, mantendo-se no núcleo sob a forma de um epíssoma de ADN de dupla cadeia com aproximadamente 8 kb³. A activação dos genes precoces do HPV, em particular de E1, E2, E6 e E7, traduz-se em replicação do genoma viral e proliferação celular persistente. Por conseguinte, e ao contrário do que sucede no epitélio normal, as células infectadas pelo HPV permanecem no ciclo celular e conservam os seus núcleos ao longo da sua movimentação desde a camada basal até às camadas superficiais do epitélio. À medida que as células migram para as camadas superficiais do epitélio, ocorre expressão dos recentes tardios (L1 e L2), que codificam proteínas da cápside, e estes sofrem uma auto-montagem para formar partículas virais maduras encapsuladas, que se disseminam a partir das camadas superiores do epitélio.

As infecções por HPV foram associadas a várias lesões malignas e benignas, incluindo verrugas genitais, neoplasias anogenitais malignas e neoplasias malignas da cavidade oral, cabeça e pescoço⁴⁻⁷. Os subtipos de HPV mais notáveis estão associados a mais de 95% dos casos de cancro do colo do útero^{8,9}. Em consequência, os subtipos do HPV são classificados, de uma forma lata, como de alto ou baixo risco, dependendo da incidência com que se associam a transformação maligna do colo do útero (alto risco) e ao desenvolvimento de lesões benignas (baixo risco)⁸. Existem 15 subtipos de HPV classificados como de alto risco, incluindo o 16, 18, 31, 33 e 51, mas os subtipos 16 e 18 do HPV são os subtipos mais frequentemente associados à carcinogénese do colo do útero, sendo detectados em até 71% dos casos de cancro do colo do útero^{9,10}. Actualmente, aceita-se de forma consensual que é necessária infecção por HPV para a progressão do cancro do colo do útero; todavia, ocorrências celulares adicionais, tais como o estado de intergração do ADN do HPV e a carga viral, também constituem factores chave associados à progressão do cancro¹¹.

A ISH de ADN, utilizando a Sonda HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51), é utilizada para a detecção de ADN do HPV em tecidos fixos com formalina e embebidos em parafina. O método é reprodutível e deve originar uma coloração nuclear castanha das células contendo ADN do HPV. Este padrão de coloração pode variar entre a detecção de um sinal ponteadado, particularmente nas células basais do epitélio, e a detecção de um sinal nuclear difuso. Também se pode observar coloração citoplásmica, que representa a detecção de ARN do HPV¹².

Reagentes Fornecidos

A Sonda HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) consiste numa sonda de ADN fornecida numa solução de hibridização.

Volume total = 6.25 mL

Diluição e Mistura

Sonda HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) está pronta a utilizar. Não é necessária reconstituição, mistura, diluição ou titulação deste reagente.

Materiais Necessários mas Não Fornecidos

Consultar "Usar os reagentes BOND" na sua documentação do utilizador BOND para uma lista completa de materiais necessários para tratamento de amostras e coloração de hibridização *in situ* usando 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 utilizador¹³.

Precauções

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

HPV PROBE (SUBTYPES 16, 18, 31, 33, 51)

Contém Formamida (<70%).
GHS08: Perigo para a saúde.
Palavras-sinal: Perigo.

H360D: Pode afectar o nascituro.

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.

P280: Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/ protecção ocular/protecção facial.

P308+313: EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: consulte um médico.

P314: Em caso de indisposição, consulte um médico.

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 adequadas¹⁴. Nunca pipete reagentes com a boca e evite o contacto entre a pele e membranas mucosas com reagentes ou amostras. Se reagentes ou amostras entrarem em contacto com áreas sensíveis, lave 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 incubação para digestão enzimática diferentes dos especificados pode produzir resultados erróneos. Qualquer alteração deste tipo deve ser validada pelo utilizador.

Instruções de Utilização

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) foi desenvolvido para utilização no sistema automatizado BOND (inclui o sistema Leica BOND-MAX e o sistema Leica BOND-III) juntamente com Anti-Biotin Antibody, Stringency Wash Solution, BOND Polymer Refine Detection e reagentes auxiliares BOND. O protocolo de coloração recomendado para HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) é o ISH Protocol B. 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 HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51).

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 teciduais oferece frequentemente locais de controlo negativo, no entanto, isto deve ser verificado pelo utilizador.

Controlo negativo do reagente

Utilize DNA Negative Control PB0731 em vez de HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) 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 DNA Positive Control Probe PB0682 em vez de HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) 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 DNA Positive Control Probe não demonstrar uma coloração positiva, os resultados obtidos com as amostras do teste não devem ser considerados válidos.

Tecido do doente

Examine, no fim, as amostras do doente coradas com HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51). A intensidade da coloração positiva deve ser avaliada no contexto de qualquer coloração não específica de fundo de DNA Negative Control PB0731.

Resultados Esperados

Tecidos normais

Utilizando a sonda HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) PB0829 não foi observada coloração numa grande variedade de tecidos. Foi detetada uma coloração fraca em células epiteliais da próstata, túbulos renais, células secretoras nas glândulas adrenais e estômago, células acinares do pâncreas e células mieloides do baço. Esta coloração não interfere com a interpretação da coloração. (Número total de casos normais avaliados = 82).

Tecidos tumorais

O PB0829 colorou 8/15 carcinomas de células escamosas orofaríngeas, 3/4 neoplasias intraepiteliais do colo do útero de grau III, 2/4 carcinomas do colo do útero e 1/1 condiloma acuminado. Não foram observadas colorações em tumores ováricos (0/3), tumores da tireoide (0/3), tumores hepáticos (0/2), tumores mamários (0/2), tumores pulmonares (0/2), tumores metastáticos de origem desconhecida (0/2), tumores cerebrais (0/2), tumores testiculares (0/2), tumores da pele (0/2), uma neoplasia intraepitelial do colo do útero de grau I/II (0/1), um tumor do cólon (0/1), um tumor do estômago (0/1), um tumor do reto (0/1) e tumores do timo (0/1). (Número total de casos anormais avaliados = 49).

O PB0829 é recomendado para a detecção de ADN viral do VPH (vírus do papiloma humano, subtipos 16, 18, 31, 33, 51).

Limitações Específicas para o Produto

A Sonda HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) foi otimizada na Leica Biosystems para utilização com o Anti-Biotin Antibody, Stringency Wash Solution, BOND Polymer Refine Detection e reagentes auxiliares BOND em tecidos do colo do útero fixos com formalina e embebidos em parafina.

Utilizadores que se desviem dos procedimentos de teste recomendados devem assumir a responsabilidade pela interpretação dos resultados dos doentes nestas circunstâncias. Os tempos do protocolo podem variar, em virtude de variações ao nível do tipo de tecido, fixação e processamento. Para além disso, a concentração da BOND Enzyme e o tempo de incubação podem requerer optimização, dependendo do tipo de tecido, condições de processamento e de fixação. Os controlos de reagente negativos devem ser usados quando se optimizam as condições de pré-tratamento e os tempos do protocolo.

Os conjuntos de sondas foram optimizados utilizando condições estritas de hibridização e condições de lavagem após a hibridização, contudo, deve considerar-se a possibilidade de uma potencial hibridização cruzada entre subtipos homólogos quando se interpretarem os resultados da coloração¹⁶.

Resolução de Problemas

A Referência 15 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, Materiais Necessários, 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 sua documentação do utilizador BOND.

Bibliografia

1. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, et al., 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, pp.17–27
2. Bosch FX, de Sanjose S. 2003. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer—burden and assessment of causality. *Journal of the National Cancer Institute Monogr* 31 pp. 3–13
3. Hebner CM and Laimins LA., 2006. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Reviews in Medical Virology* 16, pp. 83–97
4. zur Hausen H., 1996 Papillomavirus infections—a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1288 pp. F55–78
5. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, et al., 2003. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *Journal of the National Cancer Institute* 95 pp. 1772–1783
6. Trottier H and Franco EL., 2006 The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* 24 pp. S1–15.
7. Herrero R., 2003. Chapter 7: Human papillomavirus and cancer of the upper aerodigestive tract. *Journal of the National Cancer Institute Monogr* 31 pp. 3–13
8. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ and Munoz N., 1999 Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology* 189 pp.12–19
9. Munoz N, Bosch FX, Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, Hammouda D, Shah KV and Meijer CJ., 2004 Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *International Journal of Cancer* 111 pp. 278–285
10. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ and International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. 2003 Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England Journal of Medicine* 348 pp. 518–527
11. Woodman CB, Collins SI and Young LS., 2007 The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7 pp. 11–22
12. Burns J, Graham AK, Frank C, Fleming KA, Evans MF, McGee JO. 1987 Detection of low copy human papilloma virus DNA and mRNA in routine paraffin sections of cervix by non-isotopic *in situ* hybridisation. *Journal of Clinical Pathology* 40:858–864.
13. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
14. 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.
15. Southern SA, Graham DA, Harrington CS, 1998. Discrimination of Human Papillomavirus Types in Low and High Grade Cervical Squamous Neoplasia by *In situ* Hybridization. *Diagnostic Molecular Pathology* 7 (2): 114–121.
16. 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

24 de Setembro de 2018

BOND™ Ready-to-Use ISH

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51)

Artikelnummer: PB0829

Användningsområde

Reagenset är avsett för *in vitro*-diagnostik.

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) är avsedd att användas för kvalitativ identifiering av Humant Papillomavirus(HPV)-DNA i formalinfixerad paraffinbäddad vävnad med *in situ* hybridisering (ISH) och med användning av det automatiserade systemet BOND (som innefattar systemen Leica BOND-MAX och Leica BOND-III). Denna sond binder till HPV-hög-risk-undertyperna 16, 18, 31, 33 och 51.

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

Det finns över 100 kända typer av humant papillomavirus (HPV), men endast omkring 40 är kända för att infektera det anogenitala epitelet¹. HPV är det vanligaste sexuellt överförda viruset och HPV-förekomsten har uppskattats till att vara högre än 20 % beroende på region². Viruset infekterar de basala cellerna i epitelet via mikro-abrasioner och håller sig i kärnan som en ungefärligen 8 kb lång dubbelsträngad DNA-episom³. Aktivering av tidiga HPV-gener, i särskilt E1, E2, E6 och E7, resulterar i viral genom-replikation och innehållande cellulär proliferation. Därför, till skillnad från normalt epitel, förblir HPV-infekterade celler i cellcykeln och behåller sina kärnor genom hela rörelsen från de basala till de ytliga skikten i epitelet. Då cellerna migrerar till de ytliga epiteliala skikten, uttrycks de sena generna (L1 och L2), vilka kodar kapsidproteiner, och självbildas så att de formar mogna, inkapslade virala partiklar som sprids från de övre skikten av epitelet.

HPV har associerats med ett antal maligna och godartade lesioner, inklusive genitala vårtor, anogenitala cancer och orala huvud- och halscancer⁴⁻⁷. De mest framträdande HPV-undertyperna har associerats med över 95% av livmodercancererna^{8,9}. Följaktligen klassificeras HPV-undertyper i princip som av hög eller låg risk, beroende på deras associerade incidens med malign transformation (hög risk) och godartad lesionsutveckling (låg risk)⁸. Det finns 15 HPV-undertyper som klassificeras som av hög risk, omfattande 16, 18, 31, 33 och 51 men HPV-undertyperna 16 och 18 är de mest frekventa undertyperna associerade med livmoderhals-carcinogenes och detekteras i upp till 71% av livmoderhalscancerfallen^{9,10}. Det är nu allmänt accepterat att en HPV-infektion är nödvändig för utvecklande av livmoderhalscancer; emellertid är även fler cellulära händelser, såsom HPV-DNA-integrationsstatus och virusmängd, nyckelfaktorer förknippade med cancerutveckling¹¹.

DNA ISH med HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) används för detektering av HPV-DNA i formalinfixerad, paraffinbäddad vävnad. Metoden är reproducerbar och skall resultera i brun nukleär färgning av de flesta humana celler som innehåller HPV-DNA. Detta färgningsmönster kan variera från punktvis signaldetektering, särskilt i basala, epiteliala celler, till diffus, nukleär signaldetektering. Cytoplasmisk färgning kan också iaktas och representerar detekteringen av HPV-RNA¹².

Ingående Reagenser

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) är en DNA-probe som levereras i hybridiseringslösning.

Total volym = 6.25 ml

Spädning och Blandning

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) är färdig att använda. Denna reagens behöver varken rekonstitueras, blandas, spädas eller titreras.

Nödvändig 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 *in situ* hybridisering-färgning med BOND-systemet (som innefattar systemen Leica BOND-MAX och Leica BOND-III).

Förvaring och Stabilitet

Förvara vid 2–8 °C. Produkten är stabil under dessa förhållanden fram till utgångsdatum som anges på behållarens etikett.

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

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

Andra förvaringsbetingelser än de ovan angivna måste verifieras av användaren¹³.

Säkerhetsföreskrifter

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

HPV PROBE (SUBTYPES 16, 18, 31, 33, 51) H360D: Kan skada det ofödda barnet.
Innehåller Formamid (<70%).
GHS08: Hälsofara.
Signalord: Fara.

P201: Inhämta särskilda instruktioner före användning.
P202: Använd inte produkten innan du har läst och förställt säkerhetsanvisningarna.
P260: Inandas inte damm/rök/gaser/dimma/ångor/sprej.
P280: Använd skyddshandskar/skyddskläder/ ögonskydd/ ansiktsskydd.
P308+P313: Vid exponering eller misstanke om exponering Sök läkarhjälp.
P314: Sök läkarhjälp vid obehag.
Endast för yrkesmässig användning.

- Du kan få tag på ett säkerhetsdatablad genom att kontakta en lokal distributör eller Leica Biosystems regionkontor, eller besöka Leica Biosystems webbplats www.LeicaBiosystems.com.
- Prover, både före och efter fixering, samt all materiel som exponeras för dem, bör behandlas och avfallshanteras som potentiellt smittbärande material¹⁴. Munpipetter aldrig reagens och undvik att hud eller slemhinnor kommer i kontakt med reagens eller prover. Om reagens eller prover skulle komma i kontakt med känsliga områden bör du tvätta dig med rikliga mängder vatten. Kontakta läkare.
- Angående avfallshantering av potentiellt toxiska material hänvisar vi till gällande europeiska, nationella och lokala bestämmelser och förordningar.
- Minimera mikrobiologisk kontamination av reagenser, annars kan en ökad icke-specifik infärgning bli resultatet.
- Enzymnedbrytning, inkubationstider eller temperaturer som avviker mot de angivna kan ge felaktiga resultat. Varje sådan förändring måste valideras av användaren.

Bruksanvisning

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) har utvecklats för användning med det automatiska BOND-systemet (som innefattar systemen Leica BOND-MAX och Leica BOND-III) i kombination med Anti-Biotin Antibody, Stringency Wash Solution, BOND Polymer Refine Detection och BOND hjälpreagenser. Det rekommenderade färgningsprotokollet för HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) är ISH Protocol B. 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 HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51)-protokollet.

Kvalitetskontroll

Skillnader 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 enskilddegradering 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 vävnadsnitt upphov till negativa kontrollområden, men detta bör kontrolleras av användaren.

Negativ reagenskontroll

Använd DNA Negative Control PB0731 i stället för HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) på en begränsad del av varje patientprov för att utvärdera icke-specifik färgning och underlätta tolkningen av specifik infärgning av målet.

Positiv reagenskontroll

Använd DNA Positive Control Probe PB0682 i stället för HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) på en begränsad del av varje patientprov för information om bibehållande av nukleinsyror i vävnaden samt sondens tillgång till nukleinsyror. Om DNA Positive Control Probe inte uppvisar positiv färgning bör resultatet erhållna från testproverna anses vara ogiltiga.

Patientvävnad

Undersök patientprover färgade med HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) sist. Positiv färgningsintensitet bör utvärderas inom ramen för all ospecifik bakgrunds-färgning av DNA Negative Control PB0731.

Förväntade Resultat

Normala vävnader

Vid användning av HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) PB0829 observerades ingen färgning i ett stort antal normala vävnader. Svag färgning detekterades i epitelialceller i prostata, njurtubuli, sekretoriska celler i binjurar och magsäck, acinärceller från bukspottskörtel och myeloida celler från mjälte. Denna färgning interfererar inte med tolkning av färgningen. (Totalt antal utvärderade normalfall = 82).

Tumörvävnader

PB0829 färgade 8/15 orofarangeal skivepitelcancer, 3/4 cervikala intraepiteliala neoplasier III, 2/4 cervikala karcinomer och 1/1 spetsiga kondylomer. Ingen färgning sågs i äggstockstumörer (0/3), sköldkörteltumörer (0/3), leverstumörer (0/2), brösttumörer (0/2), lungtumörer (0/2), metastatiska tumörer av okänt ursprung (0/2), hjärntumörer (0/2), testikeltumörer (0/2), hudtumörer (0/2), en cervikal intraepitelial neoplasier I/II (0/1), en kolontumör (0/1), en magsäckstumör (0/1), en rektal tumör (0/1) samt en thymustumör (0/1). (Totalt antal utvärderade onormala fall = 49).

PB0829 rekommenderas för detektion av HPV (subtyper 16, 18, 31, 33, 51)-viralt DNA.

Produktspecifika Begränsningar

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) har optimerats vid Leica Biosystems för användning med Anti-Biotin Antibody, Stringency Wash Solution, BOND Polymer Refine Detection och BOND hjälpreagenser på formalinfixerad, paraffinbäddad livmoderhalsvävnad.

Användare som inte följer rekommenderade testprotokoll måste ta på sig ansvaret för att korrekt tolka patientresultat under dessa förhållanden. Protokolltiderna kan variera, till följd av variation i vävnadstyp, fixering och bearbetning. Dessutom kan BOND Enzymkoncentration och -inkubationstid behöva optimeras beroende på vävnadstyp, samt bearbetnings- och fixeringsförhållanden. Negativa reagenskontroller bör användas när man optimerar betingelserna för förbehandling och protokolltider.

Sonden har optimerats med stränga hybridiserings- och tvättvillkor efter hybridisering; emellertid bör potentiell korshybridisering mellan undertyper tas i beaktande när man tolkar färgningsresultatet¹⁶.

Felsökning

Referens 15 kan hjälpa till vid åtgärdande av problem.

Testprover skall kompletteras av 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 infärgningsresultat, Symbolförklaring för etiketter och Allmänna begränsningar i "Använda BOND-reagens" i BONDS användardokumentation.

Litteraturförteckning

1. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, et al., 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, pp.17–27
2. Bosch FX, de Sanjosé S. 2003. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer--burden and assessment of causality. *Journal of the National Cancer Institute Monogr* 31 pp. 3–13
3. Hebner CM and Laimins LA., 2006. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Reviews in Medical Virology* 16, pp. 83–97
4. zur Hausen H., 1996 Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1288 pp. F55–78
5. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, et al., 2003. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *Journal of the National Cancer Institute* 95 pp. 1772–1783
6. Trottier H and Franco EL., 2006 The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* 24 pp. S1–15.
7. Herrero R., 2003. Chapter 7: Human papillomavirus and cancer of the upper aerodigestive tract. *Journal of the National Cancer Institute Monogr* 31 pp. 3–13
8. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ and Munoz N., 1999 Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology* 189 pp.12–19
9. Munoz N, Bosch FX, Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, Hammouda D, Shah KV and Meijer CJ., 2004 Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *International Journal of Cancer* 111 pp. 278–285
10. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ and International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. 2003 Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England Journal of Medicine* 348 pp. 518–527
11. Woodman CB, Collins SI and Young LS., 2007 The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7 pp. 11–22
12. Burns J, Graham AK, Frank C, Fleming KA, Evans MF, McGee JO. 1987 Detection of low copy human papilloma virus DNA and mRNA in routine paraffin sections of cervix by non-isotopic *in situ* hybridisation. *Journal of Clinical Pathology* 40:858–864.
13. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
14. 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.
15. Southern SA, Graham DA, Harrington CS, 1998. Discrimination of Human Papillomavirus Types in Low and High Grade Cervical Squamous Neoplasia by *In situ* Hybridization. *Diagnostic Molecular Pathology* 7 (2): 114–121.
16. 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

24 september 2018

BOND™ Ready-to-Use ISH HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51)

Αρ. Καταλόγου: PB0829

Σκοπός Χρήσης

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

Ο ανιχνευτής HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) προορίζεται για χρήση για την ποσοτική ταυτοποίηση του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) DNA σε σταθεροποιημένο με φορμαλίνη εμποτισμένο με παραφίνη ιστό με επιτόπια υβριδοποίηση (ISH), χρησιμοποιώντας το αυτοματοποιημένο σύστημα BOND (περιλαμβάνει το σύστημα Leica BOND-MAX και το σύστημα Leica BOND-III). Αυτός ο ανιχνευτής δεσμεύεται στις πέντε υψηλούς κινδύνους υποδιαίρεσεις του HPV, 16, 18, 31, 33 και 51.

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.

Περιλήψη και Επεξήγηση

Υπάρχουν πάνω από 100 γνωστοί τύποι ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV), αλλά μόνο 40 περίπου είναι γνωστό ότι μολύνουν το πρωκτογεννητικό επιθήλιο¹. Το HPV είναι ο πιο συνήθης ιός που μεταδίδεται μέσω σεξουαλικής επαφής και ο επιπολασμός του HPV έχει εκτιμηθεί ότι είναι μεγαλύτερος από 20%, ανάλογα με τον τόπο². Ο ιός μολύνει τα βασικά κύτταρα του επιθηλίου μέσω μικροεκδορών και διατρηθεί μέσα στον πυρήνα περίπου σαν ένα δίκλωνο επίσωμα DNA 8 kb³. Η ενεργότητα στην πρώιμων γονιδίων HPV, ιδιαίτερα των E1, E2, E6 και E7, έχει ως αποτέλεσμα την ιογενή γονιδιακή αντιγραφή και τη συνεχή κυτταρική διάδοση. Επομένως, σε αντίθεση με το κανονικό επιθήλιο, τα μολυσμένα κύτταρα HPV παραμένουν μέσα στον κυτταρικό κύκλο και διατηρούν τους πυρήνες σε όλη τη διάρκεια της κίνησής τους από τα βασικά στα επιφανειακά στρώματα του επιθηλίου. Καθώς τα κύτταρα μεταναστεύουν στις επιφανειακές επιθηλιακές στοιβάδες των ώπιμων γονιδίων (L1 και L2), τα οποία κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες του καψιδίου, εκφράζονται και αυτοσυγκεντρώνονται για να σχηματίσουν ώριμα εγκλωβισμένα ιογενή σωματίδια που διαχέονται από τις άνω επιθηλιακές στοιβάδες.

Οι μολύνσεις του HPV έχουν συσχετιστεί με έναν αριθμό κακοήθων και καλοήθων βλαβών, μεταξύ των οποίων γεννητικά εξογκώματα, πρωκτογεννητικά κονδυλώματα και καρκίνους του στόματος, της κεφαλής και του λαιμού⁴⁻⁷. Οι περισσότερες σημαντικές υποδιαίρεσεις του HPV έχουν συσχετιστεί με πάνω από 95% τραχηλικούς τραχηλικούς καρκίνους^{8,9}. Ως εκ τούτου, οι υποδιαίρεσεις του HPV χαρακτηρίζονται ευρέως ως υψηλού ή χαμηλού κινδύνου, ανάλογα με το περιστατικό⁸ - τραχηλική κακοήγηση μετάπλαση (υψηλός κίνδυνος) και ανάπτυξη καλοήθους βλάβης (χαμηλού κινδύνου)⁸. Υπάρχουν 15 υποδιαίρεσεις του HPV που χαρακτηρίζονται ως χαμηλού κινδύνου, μεταξύ των οποίων οι 16, 18, 31, 33 και 51, αλλά οι υποδιαίρεσεις 16 και 18 του HPV είναι οι συχνότερες υποδιαίρεσεις που σχετίζονται με την τραχηλική καρκινογένεση και εντοπίζονται έως και στο 71% των τραχηλικών καρκίνων¹⁰. Είναι σήμερα ευρέως αποδεκτό ότι η μόλυνση HPV είναι απαραίτητη για την εξέλιξη του τραχηλικού καρκίνου. Εντούτοις, πρόσθετα κυτταρικά συμβάντα, όπως η ενσωμάτωση του DNA του HPV και το ιικό φορτίο, είναι επίσης βασικοί παράγοντες που σχετίζονται με εξέλιξη του καρκίνου¹¹.

Το DNA ISH, με χρήση ανιχνευτή HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του DNA του HPV σε σταθεροποιημένο με φορμαλίνη, εμποτισμένο με παραφίνη ιστό. Η μέθοδος είναι αναπαράγωγιμη και θα πρέπει να έχει ως αποτέλεσμα μια καφέ χρώση του πυρήνα των κυττάρων που περιέχουν DNA HPV. Αυτή η μορφή χρώσης μπορεί να διαφέρει από ανίχνευση διακοπτόμενου σήματος, ιδιαίτερα στα βασικά επιθηλιακά κύτταρα, έως ανίχνευση διάχυτου σήμα του πυρήνα. Μπορεί να επίσης είναι παρατηρηθεί κυτταροπλασματική χρώση, η οποία αντιπροσωπεύει την ανίχνευση του RNA του HPV¹².

Αντιδραστήρια Που Παρέχονται

Ο ανιχνευτής HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) είναι ένας ανιχνευτής DNA που παρέχεται σε διάλυμα υβριδοποίησης.

Συνολικός όγκος = 6.25 mL

Αραίωση και Ανάμειξη

Ο ανιχνευτής HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) είναι έτοιμος για χρήση. Δεν απαιτείται ανασύσταση, ανάμειξη, αραίωση ή τιλοδότηση αυτού του αντιδραστήριου.

Υλικά που Χρειάζονται αλλά Δεν Παρέχονται

Ανατρέξτε στην ενότητα "Χρήση των Αντιδραστηρίων BOND" στην τεκμηρίωση χρήσης της BOND για μια πλήρη λίστα των υλικών που απαιτούνται για την κατεργασία δειγμάτων και την επιτόπια χρώση υβριδοποίησης, χρησιμοποιώντας το σύστημα BOND (περιλαμβάνει το σύστημα Leica BOND-MAX και το σύστημα Leica BOND-III).

Φύλαξη και Σταθερότητα

Φύλαξη στους 2–8 °C. Το προϊόν είναι σταθερό κάτω από αυτές τις συνθήκες μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα του δοχείου.

Δεν υπάρχει καμία εμφανής ένδειξη που υποδηλώνει μόλυνση ή/και αστάθεια. Ταυτόχρονα με τον ιστό της εξέτασης πρέπει να αναλύονται κατάλληλοι θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες ιστού.

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

Συνθήκες φύλαξης εκτός από αυτές που καθορίζονται παραπάνω πρέπει να επαληθεύονται από τον χρήστη¹³.

Προφυλάξεις

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

HPV PROBE (SUBTYPES 16, 18, 31, 33, 51) H360D: Μπορεί να βλάψει το έμβρυο.

Περιέχει Φορμαμίδιο (<70%).
GHS08: Κίνδυνος για την υγεία.
Προειδοποιητές λέξεις:
Κίνδυνος.

P201: Εφοδιαστείτε με τις ειδικές οδηγίες πριν από τη χρήση.

P202: Μην το χρησιμοποιήσετε πριν διαβάσετε και κατανοήσετε τις οδηγίες προφυλάξης.

P260: Μην αναπνέετε σκόνη/αναθυμιάσεις/αέρια/σταγονίδια/ατμούς/εκνεφώματα

P280: Να φοράτε προστατευτικά γάντια/ προστατευτικά ενδύματα/μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/πρόσωπο.

P308+P313: ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ έκθεσης ή πιθανότητας έκθεσης: Συμβουλευθείτε/Επισκεφθείτε γιατρό.

P314: Συμβουλευθείτε/Επισκεφθείτε γιατρό εάν αισθανθείτε αδιαθεσία.

Μόνο για επαγγελματική χρήση.

- Αν θέλετε ένα αντίγραφο του Δελτίου Δεδομένων Ασφαλείας Υλικού επικοινωνήστε με τον αντιπρόσωπο ή το περιφερειακό γραφείο της Leica Biosystems, ή εναλλακτικά, επισκεφθείτε τον ιστότοπο της Leica Biosystems, www.LeicaBiosystems.com.
- Ο χειρισμός των δειγμάτων, πριν και μετά τη μονιμοποίηση και όλων των υλικών που εκτίθενται σε αυτά, θα πρέπει να γίνεται σαν να ήταν κανά να μεταδώσουν μόλυνση και θα πρέπει να απορρίπτονται λαμβάνοντας κατάλληλες προφυλάξεις¹⁴. Μην κάνετε ποτέ αναρρόφηση αντιδραστήριων με πιπέτα με το στόμα και αποφεύγετε την επαφή του δέρματος και των βλεννογόνων με αντιδραστήρια ή δείγματα. Αν αντιδραστήρια ή δείγματα έρθουν σε επαφή με ευαίσθητες περιοχές, πλύνετε με άφθονο νερό. Ζητήστε ιατρική συμβουλή.
- Συμβουλευτείτε τους μοσπονδιακούς, πολιτειακούς ή τοπικούς κανονισμούς για απόρριψη τυχόν δυνητικών τοξικών συστατικών.
- Ελαχιστοποιήστε τη μικροβιακή μόλυνση των αντιδραστήριων, διαφορετικά μπορεί να υπάρξει αύξηση σε μη ειδική χρώση.
- Χρόνοι ή θερμοκρασίες για την ενζυμική πέψη διαφορετικοί από τους καθορισμένους μπορούν να οδηγήσουν σε εσφαλμένα αποτελέσματα. Οποιαδήποτε τέτοια αλλαγή πρέπει να επικυρώνεται από τον χρήστη.

Οδηγίες χρήσης

Το HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) 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-Biotin Antibody, Stringency Wash Solution, BOND Polymer Refine Detection και η βοηθητικά αντιδραστήρια BOND. Το συστημένο πρωτόκολλο χρώσης για το HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) είναι το ISH Protocol B. 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 HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51).

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.

Θετικός μάρτυρας 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 αντιδραστήριων.

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 DNA Negative Control PB0731 αντί του HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) με μια τομή κάθε δείγματος ασθενούς, για να αξιολογήσετε τη μη ειδική χρώση και να επιτρέψετε την καλύτερη ερμηνεία της ειδικής χρώσης στο στόχο.

Θετικός μάρτυρας αντιδραστήριου

Χρησιμοποιήστε το DNA Positive Control Probe PB0682 αντί του HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) με μια τομή κάθε δείγματος ασθενούς, για να παράσχετε πληροφορίες σχετικά με τη διατήρηση νουκλεϊκών οξέων στον ιστό, καθώς και την προστελεασμότητα των νουκλεϊκών οξέων από τον ανιχνευτή. Εάν το DNA 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 HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) στο τέλος. Η ένταση της θετικής χρώσης θα πρέπει να εκτιμάται στο πλαίσιο τυχόν μη ειδικής χρώσης υποβάθρου του DNA Negative Control PB0731.

Αναμενόμενα Αποτελέσματα

Φυσιολογικοί ιστοί

Κατά τη χρήση του HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) PB0829 δεν παρατηρήθηκε χρώση σε μεγάλο εύρος φυσιολογικών ιστών. Ασθενής χρώση παρατηρήθηκε σε επιθηλιακά κύτταρα του προστάτη, των νεφρικών σωληναρίων, σε εκκρινικά κύτταρα των επινεφροειδίων και του στομάχου, κυψελιδικά κύτταρα του παγκρέατος και μυελοειδή κύτταρα του σπλήνα. Αυτή η χρώση δεν επηρεάζει

την ερμηνεία της χρώσης. (Συνολικός αριθμός φυσιολογικών περιστατικών που αξιολογήθηκαν = 82).

Νεοπλασματικό Ιστό

Κατά τη χρήση του PB0829 παρατηρήθηκε χρώση σε 8/15 ακανθοκυτταρικά καρκινώματα του στοματοφάρυγγα, 3/4 ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες III του τραχήλου της μήτρας, 2/4 καρκινώματα του τραχήλου της μήτρας και 1/1 οξυτενές κονδύλωμα. Δεν παρατηρήθηκε χρώση σε όγκους των ωοθηκών (0/3), όγκους του θυρεοειδούς (0/3), όγκους του ήπατος (0/2), όγκους του μαστού (0/2), όγκους των πνευμόνων (0/2), μεταστατικούς όγκους αγνώστου αιτιολογίας (0/2), όγκους του εγκεφάλου (0/2), όγκους των ορχέων (0/2), όγκους του δέρματος (0/2), μία ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία III του τραχήλου της μήτρας (0/1), έναν όγκο στο κόλον (0/1), έναν όγκο του στομάχου (0/1), έναν όγκο του ορθού (0/1) και έναν όγκο του θύμου αδένος (0/1). (Συνολικός αριθμός μη φυσιολογικών περιστατικών που αξιολογήθηκαν = 49).

Το PB0829 συνιστάται για την ανίχνευση DNA του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV, υπότυποι 16, 18, 31, 33, 51).

Ειδικό Περιορισμοί Του Προϊόντος

Ο ανιχνευτής HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) έχει βελτιστοποιηθεί στη Leica Biosystems για χρήση με Anti-Biotin Antibody, Stringency Wash Solution, BOND Polymer Refine Detection και βοηθητικά αντιδραστήρια BOND σε σταθεροποιημένο με φορμαλίνη, εμποτισμένο με παραφίνη τραχηλικό ιστό.

Οι χρήστες που παρεκκλίνουν από τις συνιστώμενες διαδικασίες εξέτασης πρέπει να αποδέχονται την ευθύνη για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων ασθενών κάτω από αυτές τις συνθήκες. Οι χρόνοι του πρωτοκόλλου μπορεί να διαφέρουν, λόγω της διαφοροποίησης στον τύπο, τη σταθεροποίηση και την επεξεργασία του ιστού. Επιπλέον, η συγκέντρωση και ο χρόνος επίωασης του BOND Enzyme μπορεί να απαιτεί βελτιστοποίηση, ανάλογα με τον τύπο και τις συνθήκες επεξεργασίας και σταθεροποίησης του ιστού. Για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών προκατεργασίας και των χρόνων πρωτοκόλλου θα πρέπει να χρησιμοποιούνται αντιδραστήρια αρνητικού ελέγχου.

Τα σετ ανιχνευτών έχουν βελτιστοποιηθεί χρησιμοποιώντας αυστηρότερες συνθήκες υβριδοποίησης και πλύσης μετά την υβριδοποίηση. Εντούτοις, κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων χρώσης, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η πιθανή υβριδοποίηση διασταύρωσης ανάμεσα στις ομόλογες υποδιαιρέσεις¹⁶.

Αντιμετώπιση Προβλημάτων

Η παραπομπή 15 μπορεί να βοηθήσει σε θεραπευτικές ενέργειες.

Τα δείγματα εξέτασης θα πρέπει να συμπληρώνονται με το κατάλληλο δείγμα ιστού και αντιδραστήριο ελέγχου.

Επικοινωνήστε με τον αντιπρόσωπο ή το περιφερειακό γραφείο της Leica Biosystems για να αναφέρετε ασυνήθιστη χρώση.

Πρόσθετες Πληροφορίες

Μπορείτε να βρείτε περισσότερες πληροφορίες σχετικά με την επιτόπια υβριδοποίηση 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.

Βιβλιογραφία

1. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, et al., 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, pp.17–27
2. Bosch FX, de Sanjose S. 2003. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer—burden and assessment of causality. *Journal of the National Cancer Institute Monograph* 31 pp.3–13
3. Hebner CM and Laimins LA., 2006. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Reviews in Medical Virology* 16, pp.83–97
4. zur Hausen H., 1996 Papillomavirus infections—a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1288 pp. F55–78
5. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, et al., 2003. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *Journal of the National Cancer Institute* 95 pp.1772–1783
6. Trottier H and Franco EL., 2006 The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* 24 pp. S1–15.
7. Herrero R., 2003. Chapter 7: Human papillomavirus and cancer of the upper aerodigestive tract. *Journal of the National Cancer Institute Monograph* 31 pp.3–13
8. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ and Munoz N., 1999 Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology* 189 pp.12–19
9. Munoz N, Bosch FX, Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, Hammouda D, Shah KV and Meijer CJ., 2004 Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *International Journal of Cancer* 111 pp.278–285
10. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ and International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. 2003 Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England Journal of Medicine* 348 pp.518–527
11. Woodman CB, Collins SI and Young LS., 2007 The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7 pp.11–22
12. Burns J, Graham AK, Frank C, Fleming KA, Evans MF, McGee JO. 1987 Detection of low copy human papilloma virus DNA and mRNA in routine paraffin sections of cervix by non-isotopic *in situ* hybridisation. *Journal of Clinical Pathology* 40:858–864.
13. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 1763 February 28, 1992.
14. 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.
15. Southern SA, Graham DA, Harrington CS, 1998. Discrimination of Human Papillomavirus Types in Low and High Grade Cervical Squamous Neoplasia by *In situ* Hybridization. *Diagnostic Molecular Pathology* 7 (2):114–121.
16. Wilkinon DG. The theory and practice of *in situ* hybridization. In: Wilkinon DG. (ed.) *In situ* Hybridization A practical approach. 2nd Edition. New York: Oxford University Press, 1998, pp.18–20.

Ημερομηνία Έκδοσης

24 Σεπτεμβρίου 2015

BOND™ Ready-to-Use ISH HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51)

Katalognummer: PB0829

Tilsigtet Anvendelse

Dette reagens er beregnet til *in vitro* diagnostik.

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) er beregnet til brug ved kvalitativ identifikation af DNA fra Humant Papillomavirus (HPV) i formalinfikserede, paraffinindstøbte væv ved *in situ* hybridisering (ISH) vha. det automatiske BOND-system (bestående af Leica BOND-MAX-systemet og Leica BOND-III-systemet). Denne probe binder til fem højrisiko HPV-undertyper: 16, 18, 31, 33 og 51.

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

Resumé og Forklaring

Der er beskrevet flere end 100 typer Humant Papillomavirus (HPV), men det er kun omkring de 40 af dem, som man ved kan inficere det anogenitale epitelium¹. HPV er den mest almindelige seksuelt overførte virus, og prævalensen af HPV hos kvinder er estimeret til at være mere end 20%, dog afhængigt af område². Denne virus inficerer basalcellerne i epitelet gennem mikroskopiske læsioner og opretholdes i cellekernen som et ca. 8 kb dobbeltstrengt DNA-episom³. Aktivering af de tidlige HPV-gener, især E1, E2, E6 og E7, medfører replikation af viralt genom og vedvarende cellulær proliferation. HPV-inficerede celler vil derfor - modsat normalt epitelium - forblive i cellecyklus og stadig have cellekerne, selv om bevæger sig op fra de basale til de overfladiske lag i epitelet. Efterhånden som cellerne migrerer til de overfladiske epitellag, udtrykkes de sene gener (L1 og L2), som koder for capsid-proteiner, og samler sig for at danne modne, indkapslede, viruspartikler, der afstødes fra epitelets øverste lag.

HPV-infektioner er blevet sat i forbindelse med en række maligne og benigne forandringer, herunder genitale kondylomer, anogenitale cancerte og mundhule cancerte⁴⁻⁷. De mest fremherskende HPV-undertyper er sat i forbindelse med mere end 95% af cervixcancer^{8,9}. Som resultat heraf klassificeres HPV-undertyperne bredt som højrisiko eller lavrisiko, alt efter hvor hyppigt de er associeret med malign transformation i cervix (høj risiko) og udvikling af benigne forandringer (lav risiko)⁶. 15 HPV-undertyper er klassificeret som højrisiko, herunder 16, 18, 31, 33 og 51, men HPV-undertyperne 16 og 18 er de almindeligste undertyper, som er associeret med carcinogenese i cervix, og de findes i op til 71% af cervix-cancer^{8,10}. Det er nu alment accepteret, at infektion med HPV er nødvendig for udvikling af cervix-cancer, men flere cellulære begivenheder som fx HPV-DNA intergrationsstatus og virus-load er også væsentlige faktorer i forbindelse med cancerudvikling¹¹.

Der anvendes DNA ISH med HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) til detektion af HPV-DNA i formalinfikserede, paraffinindstøbte væv. Metoden er reproducerbar og skal medføre brun kernefarvning af celler indeholdende HPV-DNA. Farvningens mønster kan variere fra punktvise signaldetektion, især i basale epitelceller, til diffus nukleær signaldetektion. Der kan også observeres farvning i cytoplasma som tegn på detektion af HPV-RNA¹².

Leverede Reagenser

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) er en DNA-probe, som leveres i hybridiseringsopløsning.

Volumen i alt = 6.25 ml

Fortynding og Blanding

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) 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-brugervejledningen 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. Under disse forhold er produktet stabilt frem til udløbsdatoen, som er angivet på etiketten på beholderen.

Der er ingen klare tegn, som indikerer kontaminering og/eller instabilitet. Passende positive og negative vævskontroller bør køres samtidigt med testvæv.

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

Opbevaringsbetingelser, der adskiller sig fra de oven for specificerede, skal verificeres af brugeren¹³.

Forholdsregler

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

HPV PROBE (SUBTYPES 16, 18, 31, 33, 51)
Indeholder Formamid (<70%).
GHS08: Sundhedsfarer.
Signalord: Fare.

H360D: Kan skade det ufødte barn.

P201: Indhent særlige anvisninger før brug.
P202: Anvend ikke produktet, før alle advarsler er læst og forstået.
P260: Indånd ikke pulver/røg/gas/tåge/damp/spray.
P280: Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjensbeskyttelse/ansigtsbeskyttelse
P308+P313: VED eksponering eller mistanke om eksponering: Søg lægehjælp.
P314: Søg lægehjælp ved ubehag.
Må kun anvendes af professionelle brugere.

- En kopi af sikkerhedsdatabladet, Material Safety Data Sheet (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 materialer eksponeret for præparater, skal håndteres som værende i stand til at overføre infektion og skal bortskaffes efter passende forholdsregler¹⁴. 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 kontaminering af reagenser skal minimeres for at undgå en øget uspecifik farvning.
- Enzymnedbrydning og inkubationstider eller temperaturer, som afviger fra de specificerede, kan give fejlagtige resultater. Enhver af sådanne ændringer skal valideres af brugeren.

Brugsanvisning

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) er udviklet til brug for det automatiserede BOND system (bestående af Leica BOND-MAX-systemet og Leica BOND-III-systemet) i kombination med Anti-Biotin Antibody, Stringency Wash Solution, BOND Polymer Refine Detection og BOND-hjælpereagenser. Den anbefalede farvningsprotokol for HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) er ISH Protocol B. 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 HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51).

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 DNA Negative Control PB0731 i stedet for HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) på et snit af hver patientprøve for at vurdere uspecifik farvning og muliggøre bedre fortolkning af specifik farvning på målstedet.

Positiv reagenskontrol

Brug DNA Positive Control Probe PB0682 i stedet for HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) på et snit af hver patientprøve, for at undersøge holdbarheden af kernesyrerne og samtidig probens tilgængelighed til kernesyrerne. Hvis den DNA Positive Control Probe ikke udviser positiv farvning, må testresultatet fortolkes som ikke brugbart.

Patientvæv

Undersøg patientprøver farvet med HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) sidst. Intensiteten af positiv farvning skal bedømmes i sammenhæng med uspecifik baggrundsfarvning af DNA Negative Control PB0731.

Forventede Resultater

Normala væv

Ved anvendelse af HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) PB0829 observeredes ingen farvning i en lang række normale væv. Der blev detekteret svag farvning i epitelceller i prostata, tubuli i nyren, sekretoriske celler i binyrerne og mavesækken, acinære celler i pankreas og myeloide celler i milten. Denne farvning forstyrrer ikke tolkningen af farvningen. (Samlet antal evaluerede, normale tilfælde = 82).

Tumør væv

PB0829 farvede 8/15 orofarangeale pladecellekarcinomer, 3/4 cervikale intraepiteliale neoplasia III, 2/4 cervikale karcinomer og 1/1 condyloma acuminatum. Der observeredes ingen farvning i ovarietumorer (0/3), thyroideatumorer (0/3), levertumorer (0/2), brysttumorer (0/2), lungtumorer (0/2), metastatiske tumorer af ukendt oprindelse (0/2), hjernetumorer (0/2), testikeltumorer (0/2), hudtumorer (0/2), en cervikal intraepitelial neoplasia I/II (0/1), en colontumor (0/1), en mavetumor (0/1), en tumor i rectum (0/1) og en tumor i thymus (0/1). (Samlet antal evaluerede, abnorme tilfælde = 49).

PB0829 anbefales til detektion af HPV (ubdertyper 16, 18, 31, 33, 51)-virus-DNA.

Produktspecifikke Begrænsninger

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) er optimeret hos Leica Biosystems til brug med Anti-Biotin Antibody, Stringency Wash Solution, BOND Polymer Refine Detection og BOND hjælperagenser på formalinfixeret, paraffinindstøbt cervixvæv.

Brugere, som afviger fra anbefalede testprocedurer, må selv tage ansvaret for fortolkningen af patientresultater under disse betingelser. Protokoliderne kan variere på grund af variation i vævstypen, fikseringen og behandlingsprocessen. Derudover kan koncentrationen af og inkubationstiden for BOND Enzyme kræve optimering alt efter vævstype, behandlingsproces og forholdene ved fiksering. Der skal anvendes negative reagenskontroller ved optimering af forbehandlingsforhold og protokolider.

Probesættene er optimeret under nøje overholdte hybridiserings- og posthybridiserings-vaskeforhold, alligevel bør man ved fortolkning af farvningen overveje muligheden for kryds-hybridisering mellem homologe ubdertyper¹⁶.

Fejlfinding

Se reference 15 for hjælpeforanstaltninger.

Undersøgelsesprøverne bør suppleres med passende vævs- og reagenskontroller.

Kontakt venligst 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-brugervejledningen under overskrifterne Proceduremæssige principper, Nødvendige materialer, Præparatklargøring, Kvalitetskontrol, Analyseverifikation, Fortolkning af farvning, Nøgle til symboler på etiketter og Generelle begrænsninger.

Bibliografi

1. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, et al., 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, pp. 17–27
2. Bosch FX, de Sanjosé S. 2003. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer--burden and assessment of causality. *Journal of the National Cancer Institute Monogr* 31 pp. 3–13
3. Hebner CM and Laimins LA., 2006. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Reviews in Medical Virology* 16, pp. 83–97
4. zur Hausen H., 1996 Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1288 pp. F55–78
5. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, et al., 2003. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *Journal of the National Cancer Institute* 95 pp. 1772–1783
6. Trottier H and Franco EL., 2006 The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* 24 pp. S1–15.
7. Herrero R., 2003. Chapter 7: Human papillomavirus and cancer of the upper aerodigestive tract. *Journal of the National Cancer Institute Monogr* 31 pp. 3–13
8. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ and Munoz N., 1999 Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology* 189 pp.12–19
9. Munoz N, Bosch FX, Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, Hammouda D, Shah KV and Meijer CJ., 2004 Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *International Journal of Cancer* 111 pp. 278–285
10. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ and International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. 2003 Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England Journal of Medicine* 348 pp. 518–527
11. Woodman CB, Collins SI and Young LS., 2007 The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7 pp. 11–22
12. Burns J, Graham AK, Frank C, Fleming KA, Evans MF, McGee JO. 1987 Detection of low copy human papilloma virus DNA and mRNA in routine paraffin sections of cervix by non-isotopic *in situ* hybridisation. *Journal of Clinical Pathology* 40:858–864.
13. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 1763 February 28, 1992.
14. 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.
15. Southern SA, Graham DA, Harrington CS, 1998. Discrimination of Human Papillomavirus Types in Low and High Grade Cervical Squamous Neoplasia by *In situ* Hybridization. *Diagnostic Molecular Pathology* 7 (2): 114–121.
16. 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

24 september 2018

BOND™ Ready-to-Use ISH

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51)

Catalogusnummer.: PB0829

Beoogd gebruik

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

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) is bedoeld voor gebruik bij de kwalitatieve identificatie van DNA van humaan papillomavirus (HPV) 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). Deze probe bindt aan de vijf HPV-subtypen met hoog risico, 16, 18, 31, 33 en 51.

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

Samenvatting en uitleg

Er zijn meer dan 100 typen humaan papillomavirus (HPV) bekend, maar slechts van ongeveer 40 is bekend dat ze het anogenitale epitheel¹ infecteren. HPV is het meest voorkomende seksueel overdraagbare virus en de prevalentie van HPV wordt geschat op meer dan 20% afhankelijk van het gebied². Het virus infecteert de basale cellen van het epitheel via micro-abrasie en blijft achter in de celkern als een dubbelstrengs DNA episoom van ongeveer 8 kb³. De activering van de vroege genen van HPV, vooral E1, E2, E6 en E7, leidt tot virale genrePLICATIE en persistente celproliferatie. Cellen die met HPV zijn geïnfecteerd, blijven daarom in tegenstelling tot normaal epitheel in de celcyclus en hun celkernen blijven gedurende hun beweging van de basale naar de oppervlaktelagen van het epitheel in stand. Terwijl de cellen naar de oppervlaktelagen van het epitheel migreren, worden de late genen (L1 en L2) die voor capside-eiwitten coderen tot expressie gebracht en deze bouwen zichzelf op en vormen volwassen ingekapselde virale deeltjes die uit de bovenste lagen van het epitheel vrijkomen.

HPV-infecties worden geassocieerd met een aantal maligne en goedaardige laesies, waaronder genitale wratten, anogenitale tumoren en orale hoofd- en nek tumoren^{4,7}. De meeste duidelijke HPV-subtypen worden geassocieerd met meer dan 95% van de cervix tumoren^{8,9}. Als gevolg hiervan worden HPV-subtypen globaal ingedeeld als hoog of laag risico, afhankelijk van de incidentie waarmee ze worden geassocieerd met cervix maligne transformatie (hoog risico) en goedaardige ontwikkeling van laesies (laag risico)⁶. Er zijn 15 HPV-subtypen ingedeeld als hoog risico, waaronder 16, 18, 31, 33 en 51, maar HPV-subtypen 16 en 18 zijn het vaakst subtypen geassocieerd met carcinogenese van de cervix en worden gedetecteerd in maximaal 71% van alle cervix tumoren^{9,10}. Het is nu algemeen erkend dat een HPV-infectie nodig is voor de progressie van cervix tumoren. Aanvullende cellulaire gebeurtenissen, zoals de integratiestatus en virusbelasting van HPV-DNA vormen echter ook sleutelfactoren die worden geassocieerd met progressie van tumoren¹¹.

DNA ISH met behulp van HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) wordt gebruikt voor de detectie van HPV-DNA in met formaline gefixeerd, in paraffine ingebed weefsel. De methode is reproduceerbaar en moet resulteren in diepbruine kernkleuring van cellen die HPV-DNA bevatten. Dit kleurpatroon kan uiteenlopen van puntsgewijze signaaldetectie, vooral in basisepitheelcellen, tot diffuse kernsignaaldetectie. Er kan ook cytoplasmatische kleuring worden waargenomen. Dit geeft de detectie weer van HPV of HPV-RNA¹².

Bijgeleverde reagentia

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) is een DNA-probe geleverd in hybridisatieoplossing.

Totaal volume = 6,25 mL

Verdunnen en mengen

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) is klaar voor gebruik. Reconstrueren, mengen, verdunnen of titreren van dit reagens is niet vereist.

Benodigde, maar niet bijgeleverde materialen

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 terug bij een temperatuur van 2-8 °C. Afwijkende opslagomstandigheden moeten worden geverifieerd door de gebruiker¹³.

Voorzorgsmaatregelen

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

HPV PROBE (SUBTYPES 16, 18, 31, 33, 51)

Bevat Formamide (<70%).
GHS08: Gezondheidsgevaar.
Signaalwoorden: Gevaar.

H360D: Kan het ongeboren kind schaden.

P201: 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.

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

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

P314: Bij onwel voelen een arts raadplegen.

Alleen voor professionele gebruikers.

- Neem voor een 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, en alle materialen die eraan worden blootgesteld, moeten voor en na fixatie worden behandeld als potentiële overdragers van infectie en moeten met nachtneming van de juiste voorzorgsmaatregelen worden afgevoerd¹⁴. Reagentia mogen nooit met de mond worden gepipetteerd. Vermijd contact van de huid en slijmvliezen met reagentia en monsters. Als reagentia of monsters in contact komen met gevoelige gebieden, was deze gebieden dan met grote hoeveelheden water. Raadpleeg een arts.
- Raadpleeg de lokale of nationale wet- en regelgeving voor het verwerken 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.
- Andere incubatietijden of temperaturen voor enzymatische digestie dan de hier vermelde kunnen onjuiste resultaten opleveren. Dergelijke veranderingen moeten altijd door de gebruiker worden gevalideerd.

Gebruiksaanwijzing

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) is ontwikkeld voor gebruik met het automatische BOND-systeem (waaronder het Leica BOND-MAX-systeem en het Leica BOND-III-systeem) in combinatie met Anti-Biotin Antibody, Stringency Wash Solution en BOND Polymer Refine Detection. Het aanbevolen kleuringsprotocol voor HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) is ISH Protocol B. Het wordt aanbevolen enzymen voor te behandelen 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 HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51).

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

Wordt gebruikt om te bevestigen dat weefsels correct geprepareerd zijn en dat passende 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 de 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 celtypen die in de meeste weefselcoupes aanwezig zijn levert vaak negatieve controlelocaties op, maar dit moet wel worden geverifieerd door de gebruiker.

Negatieve reagenscontrole

Gebruik DNA Negative Control PB0731 in plaats van de HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) 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 DNA Positive Control Probe PB0682 in plaats van de HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) 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 DNA Positive Control Probe geen juiste positieve kleuring vertoont, moeten resultaten die met monsters zijn behaald als ongeldig worden beschouwd.

Patiëntenweefsel

Onderzoek patiëntmonsters gekleurd met HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) als laatste. De positieve kleuringsintensiteit moet worden geëvalueerd binnen de context van eventuele niet-specifieke achtergrondkleuring met de DNA Negative Control PB0731.

Forventede Resultater

Normale vœv

Met behulp van HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) PB0829 werd er geen kleuring waargenomen in een breed scala aan normale weefsels. Er werd een zwakke kleuring gedetecteerd in epitheelcellen van de prostaat, niertubuli, secretoire cellen in de bijnieren en maag, acinaire cellen van de pancreas en myeloïde cellen van de milt. Deze kleuring staat interpretatie van de kleuring niet in de weg. (Totaal aantal beoordeelde normale gevallen = 82).

Tumorvaev

PB0829 kleurde 8/15 orofaryngale plaveiselcelcarcinomen, 3/4 intraepithelie neoplasie III van de cervix, 2/4 carcinomen van de cervix en 1/1 condylomata acuminata. Er werd geen kleuring waargenomen in ovariumtumoren (0/3), schildkliertumoren (0/3), levertumoren (0/2), borsttumoren (0/2), longtumoren (0/2), gemetastaseerde tumoren van onbekende oorsprong (0/2), hersentumoren (0/2), testistumoren (0/2), huidtumoren (0/2), een intraepithelie neoplasie I/II van de cervix (0/1), een colontumor (0/1), een maagtumor (0/1), een rectumtumor (0/1) en een tumor van de thymus (0/1). (Totaal aantal beoordeelde afwijkende gevallen = 49).

PB0829 wordt aanbevolen voor de detectie van viraal DNA van HPV (subtypes 16, 18, 31, 33, 51).

Productspecifieke beperkingen

De HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) is door Leica Biosystems geoptimaliseerd voor gebruik met Anti-Biotin Antibody, Stringency Wash Solution, BOND Polymer Refine Detection en BOND-hulpmiddelreagentia bij met formaline gefixeerd, in paraffine ingebed cervixweefsel.

Gebruikers die afwijken van de aanbevolen testprocedures moeten verantwoordelijkheid nemen voor interpretatie van patiëntresultaten onder deze omstandigheden. De protocoltijden kunnen variëren wegens variatie van het weefseltype, de fixatie en de verwerking. Bovendien kan optimalisatie van de concentratie en incubatietijd van het BOND-enzym nodig zijn, afhankelijk van het weefseltype, de verwerking en de fixatiecondities. Negatieve controles voor de reagentia moeten worden gebruikt bij het optimaliseren van voorbehandelingscondities en protocoltijden.

De probesets zijn geoptimaliseerd onder strenge omstandigheden bij het wassen tijdens en na hybridisatie. Bij het interpreteren van de kleurresultaten dient echter rekening te worden gehouden met mogelijke kruishybridisatie tussen homologe subtypen16.

Probleemoplossing

Verwijzing 15 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.

Bibliografie

1. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, et al., 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, pp.,17–27
2. Bosch FX, de Sanjosé S. 2003. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer--burden and assessment of causality. *Journal of the National Cancer Institute Monogr* 31 pp. 3–13
3. Hebner CM and Laimins LA., 2006. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Reviews in Medical Virology* 16, pp. 83–97
4. zur Hausen H., 1996 Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1288 pp. F55–78
5. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, et al., 2003. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *Journal of the National Cancer Institute* 95 pp. 1772–1783
6. Trottier H and Franco EL., 2006 The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* 24 pp. S1–15.
7. Herrero R., 2003. Chapter 7: Human papillomavirus and cancer of the upper aerodigestive tract. *Journal of the National Cancer Institute Monogr* 31 pp. 3–13
8. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ and Munoz N., 1999 Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology* 189 pp.12–19
9. Munoz N, Bosch FX, Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, Hammouda D, Shah KV and Meijer CJ., 2004 Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *International Journal of Cancer* 111 pp. 278–285
10. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ and International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. 2003 Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England Journal of Medicine* 348 pp. 518–527
11. Woodman CB, Collins SI and Young LS., 2007 The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7 pp. 11–22
12. Burns J, Graham AK, Frank C, Fleming KA, Evans MF, McGee JO. 1987 Detection of low copy human papilloma virus DNA and mRNA in routine paraffin sections of cervix by non-isotopic *in situ* hybridisation. *Journal of Clinical Pathology* 40:858–864.
13. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
14. 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.
15. Southern SA, Graham DA, Harrington CS, 1998. Discrimination of Human Papillomavirus Types in Low and High Grade Cervical Squamous Neoplasia by *In situ* Hybridization. *Diagnostic Molecular Pathology* 7 (2): 114–121.
16. 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

24 september 2018

BOND™ Ready-to-Use ISH HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51)

Katalognummer: PB0829

Tiltenkt bruk

Denne reagensen er for *in vitro*-diagnostisk bruk.

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) er tiltenkt brukt for kvalitativ identifisering av Human Papillomavirus (HPV) DNA i formalinfiksert, parafininnstøpte vev ved *in situ* hybridisering (ISH) med det automatiske BOND systemet (herunder Leica BOND-MAX-systemet og Leica BOND-III-systemet). Denne sonden binder seg til fem høyrisiko HPV-undertyper, 16, 18, 31, 33 og 51.

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

Det er over 100 kjente typer av Human Papillomavirus (HPV), men kun 40 er kjent for å infisere det anogenitale epitelet¹. HPV er det vanligste seksuelt overførbare viruset og utbredelsen av HPV er estimert til å overstige 20% avhengig av region². Viruset infiserer basalcellene i epitelet via mikroskopiske rifter og vedlikeholdes i cellekjernen som et ca. 8 kb dobbeltrådet DNA-episom³. Aktivering av tidlige HPV-gener, spesielt E1, E2, E6 og E7, resulterer i en viral genomisk reproduksjon og vedvarende cellulær proliferasjon. Til forskjell fra normale epiteler, vil derfor HPV-infiserte celler forbli i cellesyklusen og opprettholde kjernene gjennom sin bevegelse fra basallaget til det overfladiske laget i epitelet. Etterhvert som cellene migrerer til de overfladiske lagene, vil de senere cellene (L1 og L2), som koder kapsinproteiner, komme til uttrykk og forme seg selv til å danne modne, innkapslede partikler som avspaltes fra de øvre lagene i epitelet.

HPV-infeksjoner forbindes med et antall ondartede og godartede lesjoner, herunder kjønnsvorter, anogenital kreft og oralhode- og nakkekreft^{4,5}. Mest bemerkelsesverdig er det at HPV-undertyper er forbundet med mer enn 95% av tilfellene av livmorhalskreft^{6,9}. Som et resultat er HPV-undertyper grovt klassifisert som enten høy- eller lavrisiko, avhengig av hvilke tilfeller de er assosiert med ondartet livmorhalstransformasjon (høyrisiko) godartet lesjonsutvikling (lav risiko)⁶. Det finnes 15 HPV-undergrupper klassifisert som høyrisiko, herunder 16, 18, 31, 33 og 51, men HPV-undertyper 16 og 18 er de mest frekvente undertyper som forbindes med livmorhalskreft og oppdages i opp til 71 % av tilfellene av livmorhalskreft^{6,10}. Det er nå allment akseptert at en HPV-infeksjon er nødvendig for progresjon av livmorhalskreft; imidlertid er også andre cellulære hendelser, som for eksempel HPV DNA integrasjonsstatus og virusmengde, nøkkelfaktorer som forbindes med progresjonen av kreft¹¹.

DNA ISH ved hjelp av HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) anvendes for påvisning av HPV DNA i formalinfiksert, parafininnstøpte vev. Fremgangsmåten er reproduserbar og bør resultere i brun nukleær farging av celler inneholdende HPV DNA. Dette fargemønsteret kan variere fra punktuert signaldeteksjon, spesielt i basal epitelceller, til diffus nukleær signaldeteksjon. Cytoplasmisk farging kan også observeres og representerer oppdagelsen av HPV RNA¹².

Medfølgende reagenser

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) er en DNA-sonde levert i hybridiseringsoppløsning.

Samlet volum = 6,25 mL

Oppløsning og blanding

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) er klar til bruk. Rekonstituering, blanding, fortyning eller titrering av denne reagensen er ikke nødvendig.

Materialer som trengs, men som ikke følger med

Hensvis 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

Oppbevares ved 2–8 °C. Produktet er stabilt under disse forholdene inntil utløpsdatoen som er angitt på etiketten på beholderen.

Det er ingen åpenbare tegn som indikerer kontaminering og/eller ustabilitet. Egnede positive og negative vevskontroller skal kjøres samtidig som testvev.

Retureres til 2–8 °C umiddelbart etter bruk. Oppbevaringsbetingelser annet enn de som er oppgitt ovenfor må bekreftes av brukeren¹³.

Forholdsregler

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

HPV PROBE (SUBTYPES 16, 18, 31, 33, 51)

Inneholder Formamid (<70%).

GHS08: Helsefare.

Signalord: Fare.

H360D: Kan gi fosterskader.

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.

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

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

P314: Søk legehjelp ved ubehag.

Kun til yrkesmessig bruk.

- For å få en kopi av sikkerhetsdatabladet (MSDS) kan du ta kontakt med den lokale forhandleren eller regionkontoret til Leica Biosystems, eller alternativt gå til Leica Biosystems' nettside, www.LeicaBiosystems.com

- Prøver, før og etter fiksering, og alle materialer som er utsatt for dem, skal behandles som om de kan overføre smitte og avhendes med riktige forholdsregler¹⁴. 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.
- Følg nasjonale og lokale forskrifter for avhending av komponenter som kan være giftige.
- Reduser mikrobiell forurensning av reagensene, ellers kan en økning av ikke-spesifikk farging forekomme.
- Inkubasjonstiden for enzym inntak eller temperaturer andre enn de som er spesifisert kan gi feilaktige resultater. Enhver slik endring skal godkjennes av brukeren.

Bruksanvisninger

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) ble utviklet for bruk på det automatiserte BOND- systemet (herunder Leica BOND-MAX- systemet og Leica BOND-III-systemet) i kombinasjon med Anti-Biotin Antibody, Stringency Wash Solution og BOND Polymer Refine Detection. Den anbefalte fargingsprotokollen for HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) er ISH Protocol B. Enzymatisk forhåndsbehandling anbefales ved å bruke BOND Enzyme Pretreatment Kit, Enzyme 1, i 15 minutter.

Egnede vevs- og reagenskontroller bør alltid benyttes. Protokollen for vev- og reagenskontroller skal tilsvare HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51).

Kvalitetskontroll

Forskjeller i vevsbehandling og tekniske prosedyrer i brukerens laboratorier kan gi betydelig variasjon i resultatene, og det kan være nødvendig å foreta regelmessige kontroller på stedet i tillegg til prosedyrene angitt nedenfor.

Positiv vevskontroll

Brukes for å påvise korrekt vevspreparering og riktige fargingsteknikker.

Én positiv vevskontroll bør inkluderes for hvert sett med testbetingelser i hver fargerunde. Svakt positivt farget vev er mer egnet enn kraftig positivt farget vev til optimal kvalitetskontroll og påvisning av små nivåer reagensnedbrytning.

Negativ vevskontroll

Bør undersøkes etter den positive vevskontrollen for å sikre at sonden merker målet spesifikt.

Alternativt kan mengden av ulike celletyper tilstede i de fleste vevsseksjoner ofte gi negative kontrollområder, men dette bør verifiseres av brukeren.

Negativ reagenskontroll

Bruk DNA Negative Control PB0731 i stedet for HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) med en del av hver pasientprøve for å vurdere ikke-spesifikk farging og tillate bedre tolkning av spesifikk farging på målet.

Positiv reagenskontroll

Bruk DNA Positive Control Probe PB0682 i stedet for HPV probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) 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 DNA Positive Control Probe unnlater å demonstrere positiv farging, bør resultater med prøvene anses som ugyldige.

Pasientvev

Undersøke pasient prøver farget med HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) til slutt. Positiv fargeintensitet skal vurderes i sammenheng med hvilken som helst ikke-spesifikk bakgrunnsfarging av DNA Negative Control PB0731.

Forventede resultater

Normalt vev

Ved bruk av HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) PB0829, ble det ikke observert noen farging i et bredt spekter av vanlige vev. Svak farging ble oppdaget i epitelcellene i prostata, i tubuli i nyrene, sekretoriske celler i binyrene og magen, akinærceller i bukspyttkjertelen og myeloide celler i milten. Denne fargingen forstyrrer ikke fargingstolkning. (Totalt antall evaluerte normale tilfeller = 82).

Tumorvev

PB0829 farget 8/15 oropharyngeal plateepitelkarsinom, 3/4 cervical intraepitelial neoplasi grad III, 2/4 cervical karsinom og 1/1 condylomata acuminata. Ingen farging ble observert i eggstokksvulster (0/3), skjoldbruskkjertelsvulster (0/3), leversvulster (0/2), brystsvulster (0/2), lungesvulster (0/2), metastatiske svulster med ukjent opprinnelse (0/2), hjernetumorer (0/2), testikkelsvulster (0/2), hudtumorer (0/2), cervical intraepitelial neoplasi grad I/II (0/1), en svulst i tykktarmen (0/1), en magesvulst (0/1), en rektalsvulst (0/1), og svulst i brisselen (0/1). (Totalt antall evaluerte unormale tilfeller = 49).

PB0829 anbefales for oppdagelsen av HPV (subtyper 16, 18, 31, 33, 51) viralt DNA.

Produktspesifikke begrensninger

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) har blitt optimalisert ved Leica Biosystems for bruk med Anti-Biotin Antibody, Stringency Wash Solution, BOND Polymer Refine Detection og BOND tilhørende reagenser på formalinfiksert, cervikalt vev innstøpt i parafin.

Brukere som avviker fra anbefalte testprosedyrer må ta ansvar for tolkning av pasientresultater under disse omstendighetene. Protokolltidene kan variere på grunn av variasjon i vevstype, fiksering og behandling. I tillegg kan BOND Enzyme-konsentrasjon og inkubasjonstid kreve optimalisering avhengig av vevstype, behandling og fikseringsforhold. Negative reagenskontroller bør brukes når du optimaliserer førbehandlingsforhold og protokolltider.

Sondesettet er optimert under strenge vaskeforhold for hybridisering og etter-hybridisering, en bør imidlertid ta mulig krysshybridisering mellom homogene undertyper med i betraktningen under tolkningen av fargeresultatene ¹⁶.

Feilsøking

Referanse nr. 15 kan hjelpe til med opprettingstiltak.

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

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 vanlige begrensninger kan finnes i "Bruk av BOND-reagenser" i din BOND-brukerdokumentasjon.

Bibliografi

1. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, et al., 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, pp.,17–27
2. Bosch FX, de Sanjosé S. 2003. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer—burden and assessment of causality. *Journal of the National Cancer Institute Monogr* 31 pp. 3–13
3. Hebner CM and Laimins LA., 2006. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Reviews in Medical Virology* 16, pp. 83–97
4. zur Hausen H., 1996 Papillomavirus infections—a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1288 pp. F55–78
5. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, et al., 2003. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *Journal of the National Cancer Institute* 95 pp. 1772–1783
6. Trottier H and Franco EL., 2006 The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* 24 pp. S1–15.
7. Herrero R., 2003. Chapter 7: Human papillomavirus and cancer of the upper aerodigestive tract. *Journal of the National Cancer Institute Monogr* 31 pp. 3–13
8. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ and Munoz N., 1999 Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology* 189 pp.12–19
9. Munoz N, Bosch FX, Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, Hammouda D, Shah KV and Meijer CJ., 2004 Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *International Journal of Cancer* 111 pp. 278–285
10. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ and International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. 2003 Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England Journal of Medicine* 348 pp. 518–527
11. Woodman CB, Collins SI and Young LS., 2007 The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7 pp. 11–22
12. Burns J, Graham AK, Frank C, Fleming KA, Evans MF, McGee JO. 1987 Detection of low copy human papilloma virus DNA and mRNA in routine paraffin sections of cervix by non-isotopic *in situ* hybridisation. *Journal of Clinical Pathology* 40:858–864.
13. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
14. 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.
15. Southern SA, Graham DA, Harrington CS, 1998. Discrimination of Human Papillomavirus Types in Low and High Grade Cervical Squamous Neoplasia by *In situ* Hybridization. *Diagnostic Molecular Pathology* 7 (2): 114–121.
16. 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

24 september 2018

BOND™ Ready-to-Use ISH HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51)

Katalog No: PB0829

Kullanım Amacı

Bu reaktif, *in vitro* tanı kullanımı içindir.

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51), otomatik BOND sistemi kullanılarak (Leica BOND-MAX sistemini ve Leica BOND-III sistemini de içermektedir) *in situ* hibridizasyon (ISH) ile formalinde fikse edilmiş, parafine gömülü dokuda İnsan Papilloma Virüsü'nün kalitatif tanımlanması için kullanılmak üzere tasarlanmıştır. Bu prob, beş yüksek riskli HPV alt türü 16, 18, 31, 33 ve 51'e bağlanır.

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

Özet ve Açıklama

100'ün üzerinde bilinen İnsan Papilloma Virüsü (HPV) türü mevcuttur, fakat yalnızca yaklaşık 40 tanesinin anogenital epitelyum¹'i enfekte ettiği bilinmektedir. HPV en yaygın olarak cinsel yolla bulaşan virüstür ve kadınlarda HPV yaygınlık durumunun bölge²'ye bağlı olarak %20'den daha fazla olması beklenmektedir. Virüs, mikro abrazyon yoluyla epitelyumun bazal hücrelerini enfekte etmekte ve yaklaşık olarak 8 kb çift sarmallı DNA epizomu³ şeklinde nükleusda korunmaktadır. HPV erken genlerinin aktivasyonu, özellikle E1, E2, E6 ve E7, viral genomik replikasyon ve persistan hücresel proliferasyona neden olur. Bu nedenle, normal epitelyumdan farklı olarak HPV enfekte hücreleri hücre döngüsünde kalır ve bazaldan epitelyum yüzeyel katmanlarına kadar hareketleri boyunca çekirdeklerini korur. Hücreler, yüzeyel epitelyal katmanlara gittikçe, kapsid proteinlerini kodlayan geç genler (L1 ve L2) belirtilmiştir ve üst epitelyum katmanlarından dökülen olgun kapsülü viral partiküller oluşturmak üzere kendiliğinden yapılırlar.

HPV enfeksiyonları, genital siğiller, anogenital kanserler ve oral kafa ve boyun kanserleri⁴⁻⁷ dahil olmak üzere birkaç kötü ve iyi huylu lezyonla ilişkilendirilmiştir. En çok göze çarpan HPV alt türleri, %95'in üzerinde servikal kanserlerle^{8,9} ilişkilendirilmiştir. Sonuç olarak HPV alt türleri, ilişkilendirildikleri servikal kötü huylu dönüşüm (yüksek risk) ve iyi huylu lezyon gelişimine (düşük risk)⁶ bağlı olarak geniş ölçüde yüksek veya düşük riskli olarak sınıflandırılırlar. Yüksek riskli olarak sınıflandırılan 16, 18, 31, 33 ve 51 dahil olmak üzere 15 HPV alt türü sınıflandırılmıştır, ancak HPV alt türleri 16 ve 18 servikal kanser gelişimi ile en sık ilişkilendirilen alt türlerdir ve %71'e kadar bir oranla servikal kanserlerde^{9,10} saptanmaktadır. Artık HPV enfeksiyonunun servikal kanser gelişimi için gerekli olduğu geniş ölçüde kabul edilmektedir; bununla birlikte HPV DNA entegrasyon durumu ve virüs yükü gibi ek hücresel olaylar ayrıca kanser ilerlemesi¹¹ ile ilişkilendirilen ana etkenlerdir.

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) kullanarak DNA ISH, formalinde fikse edilmiş parafine gömülü dokuda HPV DNA saptaması için kullanılır. Yöntem tekrarlanabilir ve HPV DNA içeren hücrelerin kahverengi çekirdek boyaması ile sonuçlanmalıdır. Bu boyama şablonu, özellikle bazal epitelyal hücrelerde olmak üzere kesintili sinyal saptamadan yayılmış çekirdek sinyali saptamasına kadar farklılık gösterebilir. Sitoplazmik boyanma ayrıca gözlelenebilir ve HPV RNA¹² saptamasını temsil eder.

Sağlanan Reaktifler

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) hibridizasyon çözeltisinde sağlanan bir DNA probudur.

Toplam hacim = 6,25 mL

Seyreltme ve Karıştırma

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) kullanılmaya hazırdır. Bu reaktifin sulandırılması, karıştırılması, seyreltilmesi 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 kılavuzundaki "BOND Reaktiflerinin Kullanımı" bölümüne bakın.

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 belirtilenlerin dışındaki saklama koşulları mutlaka kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır¹³.

Önemler

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

HPV PROBE (SUBTYPES 16, 18, 31, 33, 51) H360D: Anne karnında çocuğa zarar verebilir.

Formamid içeriyor (<70%).
GHS08: Sağlık tehlikesi.
Isaret kelimesi: Tehlike.

P201: Kullanmadan önce özel talimatları alıniz.
P202: Kullanmadan önce tüm güvenlik talimatlarını okuyunuz ve anlayınız.
P260: Toz/duman/gaz/sis/buhar/aerosol solumayınız.
P280: koruyucu eldiven/koruyucu elbise/göz koruyucu/ yüz siperi kullanınız.
P308+313: Maruziyet veya etkilene HALİNDE: Tıbbi tavsiye / bakım alın.
P314: Kendinizi iyi hissetmemeniz halinde. 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 malzemeler enfeksiyon bulaştırabilen maddeler olarak ele alınmalı ve uygun önlemler alınarak imha edilmelidir¹⁴. 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 enzim sindirimi inkübasyon süreleri veya sıcaklıklar hatalı sonuçlara neden olabilir. Bu gibi değişiklikler kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır.

Kullanım Talimatları

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51), Anti-Biotin Antibody, Stringency Wash Solution 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. HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) için önerilen boyama protokolü, ISH Protocol B'dir. BOND Enzyme Pretreatment Kit, Enzyme 1 kullanılarak 15 dakika boyunca de enzim ön işlemi tavsiye edilir.

Her zaman uygun doku ve reaktif kontrolleri kullanılmalıdır. Doku ve reaktif kontrolleri protokolü, HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) 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 yorumlanması sağlamak için her hasta numunesinin bir kesiti ile HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) yerine DNA Negative Control PB0731'i kullanın.

Pozitif Reaktif Kontrolü

Dokudaki nükleik asitlerin korunması ve nükleik asitlerin proba ulaşabilirliği hakkında bilgi sağlamak için her hasta numunesinin bir kesiti ile HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) yerine DNA Positive Control Probe PB0682 kullanın. DNA Positive Control Probe'un pozitif boyama gösteremediği durumlarda, test numuneleri ile elde edilen sonuçlar geçersiz olarak kabul edilmelidir.

Hasta Dokusu

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) ile son boyalı hasta numunelerini inceleyin. Pozitif boyama yoğunluğu DNA Negative Control Probe PB0731'in spesifik olmayan arka plan boyaması bağlamında değerlendirilmelidir.

Öngörülen Sonuçlar

Normal Dokular

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) PB0829 kullanılarak geniş bir normal doku aralığında boyanma gözlenmemiştir. Epitelyal prostat hücrelerinde, böbrek tübüllerinde, böbreküstü bezlerindeki ve karındaki salgı hücrelerinde, pankreas asinar hücrelerinde ve dalak miyoloid hücrelerinde zayıf boyanma saptanmıştır. Bu boyama, boyamanın yorumlanmasını engellemektedir. (Değerlendirilen toplam normal vaka sayısı = 82).

Tümörlü Dokular

PB0829, 8/15 orofaringeal yapışkan hücre karsinomları, 3/4 servikal intraepiteryal neoplazii III, 2/4 servikal karsinomları ve 1/1 genital siğillerde boyama yapmıştır. Ovaryen tümörleri (0/3), tiroid tümörleri (0/3), karaciğer tümörleri (0/2), göğüs tümörleri (0/2), akciğer tümörleri (0/2), bilinmeyen nedenlerle meydana gelen metastatik tümörler (0/2), beyin tümörleri (0/2), servikal intraepiteryal neoplazii I/II (0/1), kolon tümörü (0/1), mide tümörü (0/1), rektal tümör (0/1) ve timüs tümöründe (0/1) boyama görülmemiştir. (Değerlendirilen toplam normal olmayan vaka sayısı = 49).

PB0829, HPV (alt tipleri 16, 18, 31, 33, 51) viral DNA'nın saptanması için tavsiye edilir.

Ürüne Özgü Sınırlamalar

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51), Leica Biosystems tarafından formalinde fikse edilmiş, parafine gömülü servikal doku üzerinde Anti-Biotin Antibody, Stringency Wash Solution, BOND Polymer Refine Detection ve BOND yardımcı reaktifleri ile kullanım için optimize edilmiştir.

Tavsiye edilen test prosedürlerine riayet etmeyen kullanıcılar bu koşullar altında hasta sonuçlarının yorumlanması ile ilgili sorumluluğu üstlenmelidir. Protokol süreleri doku tipi, fiksasyonundaki ve işlemesi nedeniyle farklılık gösterebilir. Ayrıca, BOND Enzyme

konsantrasyonu ve inkübasyon süresi doku tipine, işleme ve fiksasyon koşullarına bağlı olarak optimizasyon gerektirebilir. Ön işlem koşulları ve protokol süreleri optimize edilirken negatif reaktif kontrolleri kullanılmalıdır.

Prob setleri, zorlu hibridizasyon ve hibridizasyon sonrası yıkama koşulları kullanılarak optimize edilmiştir, ancak boyama sonuçları yorumlanırken homojen alt türler arasındaki potansiyel çapraz hibridizasyonun göz önüne alınması gerekir¹⁶.

Sorun Giderme

Referans 15 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 kılavuzundaki "BOND Reaktiflerinin Kullanımı" içinde Prosedür Prensipleri, Gerekli Malzemeler, Numunenin Hazırlanması, Kalite Kontrol, Miktar Tayini Doğrulaması, Boyamanın Yorumlanması, Etiket Üzerindeki Sembollerin Açıklaması ve Genel Sınırlamalar başlıkları altında bulunabilir.

Bibliyografya

1. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, et al., 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, pp.,17–27
2. Bosch FX, de Sanjosé S. 2003. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer—burden and assessment of causality. *Journal of the National Cancer Institute Monograph* 31 pp. 3–13
3. Hebner CM and Laimins LA., 2006. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Reviews in Medical Virology* 16, pp. 83–97
4. zur Hausen H., 1996 Papillomavirus infections—a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1288 pp. F55–78
5. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, et al., 2003. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *Journal of the National Cancer Institute* 95 pp. 1772–1783
6. Trottier H and Franco EL., 2006 The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* 24 pp. S1–15.
7. Herrero R., 2003. Chapter 7: Human papillomavirus and cancer of the upper aerodigestive tract. *Journal of the National Cancer Institute Monograph* 31 pp. 3–13
8. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ and Munoz N., 1999 Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology* 189 pp.12–19
9. Munoz N, Bosch FX, Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, Hammouda D, Shah KV and Meijer CJ., 2004 Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *International Journal of Cancer* 111 pp. 278–285
10. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ and International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. 2003 Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England Journal of Medicine* 348 pp. 518–527
11. Woodman CB, Collins SI and Young LS., 2007 The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7 pp. 11–22
12. Burns J, Graham AK, Frank C, Fleming KA, Evans MF, McGee JO. 1987 Detection of low copy human papilloma virus DNA and mRNA in routine paraffin sections of cervix by non-isotopic *in situ* hybridisation. *Journal of Clinical Pathology* 40:858–864.
13. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
14. 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.
15. Southern SA, Graham DA, Harrington CS, 1998. Discrimination of Human Papillomavirus Types in Low and High Grade Cervical Squamous Neoplasia by *In situ* Hybridization. *Diagnostic Molecular Pathology* 7 (2): 114–121.
16. 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

24 Eylül 2018

BOND™ Ready-to-Use ISH HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51)

Каталожен №: PB0829

Предназначение

Този реактив е за употреба *in vitro* диагностика.

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) е предназначен за качествена идентификация на ДНК на човешки папиломен вирус (HPV) във фиксирана с формалин, вградена в парафин тъкан чрез *in situ* хибридизация (ISH) с помощта на автоматизираната система BOND (включва системите Leica BOND-MAX и Leica BOND-III). Тази проба се свързва с петте високорискови подтипа HPV – 16, 18, 31, 33 и 51.

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

Съществуват над 100 известни типа човешки папиломен вирус (HPV), но само за около 40 от тях е известно, че инфектират аногениталния епител¹. HPV е най-разпространеният вирус, предаван по полов път, като разпространението му се оценява на повече от 20% в зависимост от региона². Вирусът инфектира базалните клетки на епитела чрез микроабразии и се поддържа в ядрата под формата на приблизително 8 kb двойно спирален ДНК епизом³. Активирането на първичните гени на HPV, по-конкретно на E1, E2, E6 и E7, води до вирусна геномна репликация и персистираща клетъчна пролиферация. Ето защо, за разлика от нормалния епител, заразените с HPV клетки остават в клетъчния цикъл и задържат своите ядра през движението им от базалните към повърхностните слоеве на епитела. Докато клетките мигрират към повърхностния епителен слой, дългите гени (L1 и L2), които закодират капсидни протеини, са изразени и се самоорганизира, за да формират зрели капсулирани вирусни частици, които се разпространяват от горните слоеве на епитела.

HPV инфекциите се свързват с редица злокачествени и доброкачествени лезии, включително генитални брадавици, аногенитален рак и рак на устата, главата и шията^{4,7}. Най-често срещаните подтипове HPV се свързват с над 95% от видовете рак на маточната шийка^{8,9}. В резултат на това подтиповете на HPV са най-общо класифицирани като високорискови и такива с нисък риск, в зависимост от честотата, с която се свързват със злокачествени трансформации на маточната шийка (висок риск) и развитието на лезии (нисък риск)⁸. Съществуват 15 подтипа HPV, класифицирани като високорискови, включително 16, 18, 31, 33 и 51, като подтипове HPV 16 и 18 най-често се асоциират с цервикална карциногенеза и се откриват в до 71% от случаите на рак на маточната шийка^{9,10}. Понастоящем широко се приема, че инфекция с HPV е необходимо условие за развитие на рак на маточната шийка; въпреки това обаче допълнителни клетъчни събития, като например състояние на интегриране на ДНК на HPV и вирусен товар, също са ключови фактори, свързани с развитие на рак¹¹.

ISH на ДНК с помощта на HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) се използва за откриване на ДНК на HPV във фиксирана с формалин, вградена в парафин тъкан. Методът е възпроизводим, а очакваният резултат е кафяво оцветяване на ядрата на клетките, съдържащи ДНК на HPV. Този тип оцветяване може да варира от пунктирано сигнално маркиране, особено при базалните епителни клетки, до дифузно нуклеарно сигнално маркиране. Цитоплазменото оцветяване може също така да бъде наблюдавано и представлява откриване на РНК на HPV¹².

Предоставени реактиви

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) е ДНК проба, доставена в разтвор за хибридизация.

Общ обем = 6,25 mL

Разреждане и смесване

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) е готов за употреба. Не се изисква възстановяване, смесване, разреждане или титриране на този реактив.

Необходими, но непредоставени материали

Вижте „Употреба на реактиви BOND“ във Вашата документация за потребителя на BOND за пълния списък с материали, необходими за третиране на сплесими и *in situ* оцветяване с хибридизация 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 потребителя¹³.

Предпазни мерки

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

HPV PROBE (SUBTYPES 16, 18, 31, 33, 51)

Съдържа формамид (<70%).

GHS08: Опасност за здравето.

Сигнални думи: Опасност.

H360D: Може да увреди плода.

P201: Преди употреба се снабдете със специални инструкции.
P202: Не използвайте, преди да сте прочели и разбрали всички предпазни мерки за безопасност.

P260: Не вдъшвайте прах/пушек/газ/дим/изпарения/аерозоли.

P280: Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице.

P308+313: При явна или предполагаема експозиция: Потърсете медицински съвет/помощ.

P314: При неразположение потърсете медицински съвет/помощ. Само за професионална употреба.

- За да получите копие на информационния лист за безопасност на материалите, се свържете с Вашия местен дистрибутор или регионален офис на Leica Biosystems, или посетете уеб сайта на Leica Biosystems www.LeicaBiosystems.com.
- Спесимените преди и след фиксация, както и всички материали, изложени на тяхното влияние, трябва да бъдат третиранни като способни да предадат инфекция и да бъдат изхвърлени, прилагайки съответните предпазни мерки¹⁴. Никога не пипетирайте реактиви с уста и избягвайте контакт на кожата и лигавиците с реактиви или спесимени. В случай че реактиви или спесимени влязат в контакт с чувствителни зони, да се измият 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 реактивите, иначе може да се появи увеличаване на неспецифичното оцветяване.
- Ензимна асимилация, инкубационни времена или температури, различни от посочените, могат да доведат до погрешни резултати. Всякакви подобни промени трябва да бъдат валидирани от потребителя.

Инструкции за употреба

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) е разработен за употреба с автоматизираната система BOND (включва система Leica BOND-MAX и система Leica BOND-II) в комбинация с Anti-Biotin Antibody, Stringency Wash Solution и BOND Polymer Refine Detection. Препоръчителният протокол за оцветяване за HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) е ISH Protocol B. Препоръчва се ензимно предварително третиране за 15 минути с помощта на BOND Enzyme Pretreatment Kit, Enzyme 1.

Винаги трябва да се използват подходящи контроли на тъкани и реактиви. Протоколът за контролите на тъкани и реактиви трябва да съответства на този за HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51).

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 пригответни 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 реактива.

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 реактива

Използвайте DNA Negative Control PB0731 вместо HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) със срез от всеки спесимен на пациента, за да направите оценка на неспецифичното оцветяване и да дадете по-добра интерпретация на специфичното оцветяване на прицелния елемент.

Позитивна контрола на реактива

Използвайте DNA Positive Control Probe PB0682 вместо HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) със срез от всеки спесимен на пациента, за да предоставите информация за запазването на нуклеиновите киселини в тъканта, както и за достъпността на нуклеиновите киселини за сондата. Ако DNA 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 с HPV probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51), трябва да се изследват последни. Наситеността на позитивното оцветяване трябва да бъде оценена в контекста на всяко неспецифично фоново оцветяване на DNA Negative Control PB0731.

Очаквани резултати

Нормални тъкани

При използване на HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) PB0829 не се наблюдава оцветяване при широк набор от нормални тъкани. Бледото оцветяване се открива при епителни клетки от простата, бъбречни каналчета, секреторни клетки от надбъбречната жлеза и стомаха, ацинарни клетки от панкреаса и миелоидни клетки от далака. Това оцветяване не засяга

интерпретирането на оцветяването. (Общ брой на оценените нормални случаи = 82).

Абнормни тъкани

PB0829 оцветява 8/15 орофарингеални плоскоклетъчни карцинома, 3/4 цервикални интраепителни неоплазии III, 2/4 цервикални карцинома и 1/1 генитални брадавици (condylomata acuminata). Не се наблюдава оцветяване при тумори на яйчниците (0/3), тумори на щитовидната жлеза (0/3), тумори на черния дроб (0/2), тумори на млечната жлеза (0/2), белодробни тумори (0/2), метастатични тумори с неизвестна етиология (0/2), мозъчни тумори (0/2), тумори на тестисите (0/2), кожни тумори (0/2), цервикална интраепителна неоплазия I/II (0/1), тумор на ободното черво (0/1), тумор на стомаха (0/1), ректален тумор (0/1) и тумор на тимуса (0/1). (Общ брой на оценените абнормни случаи = 49).

PB0829 се препоръчва за откриване на вирусна ДНК на HPV (подтипове 16, 18, 31, 33, 51).

Специфични ограничения на продукта

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) е оптимизиран от Leica Biosystems за употреба с Anti-Biotin Antibody, Stringency Wash Solution, BOND Polymer Refine Detection и спомагателни реактиви BOND върху фиксирана с формалин, вградена в парафин цервикална тъкан.

Потребителите, които се отклоняват от препоръчаните процедури за тестване, трябва да поемат отговорност за интерпретацията на резултатите на пациентите при тези обстоятелства. Времетраенето по протокол може да варира поради вариации в типа на тъканта, фиксацията и обработката. В допълнение концентрацията и времето за инкубация при BOND Enzуте може да изискват оптимизация в зависимост от типа тъкан, условията за обработка и фиксация. Трябва да се използват негативни контроли на реагентите при оптимизиране на условията за предварително третиране и времетраенето на протоколите.

Наборите проби са оптимизирани, използвайки стриктни условия на промивка по време на хибридизация и и след нея, но потенциалната кръстосана хибридизация между хомологичните подтипове трябва да се отчита при интерпретиране на резултатите от оцветяването¹⁶.

Отстраняване на неизправности

Референция 14 може да подпомогне при коригиращи действия.

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

Свържете се с Вашия местен дистрибутор или регионалния 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 сплесмен“, „Контрол на качеството“, „Потвърждаване на анализа“, „Интерпретация на оцветяването“, „Легенда на символите на етикетите“ и „Общи ограничения“.

Библиография

1. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, et al., 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, pp. 17–27
2. Bosch FX, de Sanjose S. 2003. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer—burden and assessment of causality. *Journal of the National Cancer Institute Monogr* 31 pp. 3–13
3. Hebner CM and Laimins LA., 2006. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Reviews in Medical Virology* 16, pp. 83–97
4. zur Hausen H., 1996 Papillomavirus infections—a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1288 pp. F55–78
5. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, et al., 2003. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *Journal of the National Cancer Institute* 95 pp. 1772–1783
6. Trottier H and Franco EL., 2006 The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* 24 pp. S1–15.
7. Herrero R., 2003. Chapter 7: Human papillomavirus and cancer of the upper aerodigestive tract. *Journal of the National Cancer Institute Monogr* 31 pp. 3–13
8. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ and Munoz N., 1999 Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology* 189 pp. 12–19
9. Munoz N, Bosch FX, Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, Hammouda D, Shah KV and Meijer CJ., 2004 Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *International Journal of Cancer* 111 pp. 278–285
10. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ and International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. 2003 Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England Journal of Medicine* 348 pp. 518–527
11. Woodman CB, Collins SI and Young LS., 2007 The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7 pp. 11–22
12. Burns J, Graham AK, Frank C, Fleming KA, Evans MF, McGee JO. 1987 Detection of low copy human papilloma virus DNA and mRNA in routine paraffin sections of cervix by non-isotopic *in situ* hybridisation. *Journal of Clinical Pathology* 40:858–864.
13. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 1763 February 28, 1992.
14. 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.
15. Southern SA, Graham DA, Harrington CS, 1998. Discrimination of Human Papillomavirus Types in Low and High Grade Cervical Squamous Neoplasia by *In situ* Hybridization. *Diagnostic Molecular Pathology* 7 (2): 114–121.
16. 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

24 Септември 2018

BOND™ Ready-to-Use ISH HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51)

Katalógusszám: PB0829

Alkalmazási terület

Ez a reagens *in vitro* diagnosztikai használatra szolgál.

A HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) próba a humán papillomavírus (HPV) 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. Ez a próba öt magas kockázatú HPV-altípushoz kötődik: 16, 18, 31, 33 és 51.

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 humán papillomavírusnak (HPV) több mint 100 ismert típusa ismert, de csak körülbelül 40 fertőzi meg az anogenitális epitheliumot¹. A HPV a szexuális úton leggyakrabban terjesztett vírus, és a HPV prevalenciája a becslések szerint régiótól függően több mint 20%². A vírus az epithelium bazális sejteit fertőzi meg mikrosérüléseken keresztül, és hozzávetőleg 8000 bázispárból álló kettős szálú DNS-epizómaként a sejtmagban marad fenn³. A korai HPV gének, különösen az E1, E2, E6 és E7 aktiválásának hatására a vírusgenom replikálódik, és tartós sejtproliferáció következik be. A HPV-fertőzött sejtek tehát a normális epitheliumtól eltérően benne maradnak a sejtciklusban, és megőrzik sejtmagjukat, miközben az epithelium bazális rétege felől a felületes rétegekbe vándorolnak. Miközben a sejtek a felületes hámrétegekbe vándorolnak, megtörténik a kapszidfehérjéket kódoló késői gének (L1 és L2) expressziója és összeszerelődése, ezáltal érett, tokkal rendelkező vírusrészesecskék keletkeznek, amelyek a hám felső rétegeiről lesodroznak.

A HPV-fertőzés számos rosszindulatú és jóindulatú elváltozást előidézhet, ezek közé tartozik a genitális szemölcs, az anogenitális rosszindulatú daganatok, valamint a szájrégi és fej-nyaki daganatok⁴⁻⁷. A méhnyakrákos esetek több mint 95%-ának hátterében a legjelentősebb HPV-altípusok állnak^{8,9}. Következésképp a HPV-altípusokat széles körben magas, illetve alacsony kockázatúként osztályozzák attól függően, hogy mekkora az incidenciájuk a méhnyak malignus transzformációjában (magas kockázat), illetve a jóindulatú elváltozások kialakulásában (alacsony kockázat)⁶. 15 HPV-altípust osztályoznak magas kockázatúként, beleértve a 16-os, 18-as, 31-es, 33-as és 51-es altípust, és a 16-os és a 18-as altípust hozzájuk leggyakrabban összefüggésbe a méhnyaki karcinogenezissel, ezek a méhnyakrákos esetek 71%-ánál kimutathatók¹⁰. Jelenleg széleskörűen elfogadott, hogy HPV-fertőzés szükséges a méhnyakrák progressziójához, azonban további sejti események, például a HPV DNS-integrációs státusza és a vírusrethelzés is kulcsfontosságú a rák progressziójában¹¹.

A HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) próbával végzett DNS ISH a HPV DNS kimutatására szolgál formalinban fixált, paraffinba ágyazott szövetben. A módszer reprodukálható, és barna magfestődést eredményez a HPV DNS-t tartalmazó sejtekben. Ez a festődési mintázat az elsősorban bazális hámsejtekben észlelhető pontszerű jeldetektálás és a diffúz nukleáris jeldetektálás között változhat. A citoplazma festődése szintén megfigyelhető, és HPV RNS jelenlétét jelzi¹².

Biztosított reagensek

A HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) egy hibridizáló oldatban található DNS-próba.

Teljes mennyiség = 6,25 ml

Hígítás és elegyítés

A HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) 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 kell¹³.

Övintézkedések

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

HPV PROBE (SUBTYPES 16, 18, 31, 33, 51)

Formamidot tartalmaz (<70%).

GHS08: Egészségi veszély.

Jelzőszók: Veszély.

H360D: Károsíthatja a születendő gyermeket.

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.

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

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

P314: Rosszullét esetén orvosi ellátást kell kérni.

Kizárólag szakemberek általi felhasználásra.

- 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 fertőzőesek terjesztésére képes anyagként kell kezelni, és megfelelő körülményekkel kell ártalmatlanítani¹⁴. 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 enzim es emésztési inkubációs idők és hőmérsékletek hibás eredményekhez vezethetnek. A felhasználónak minden ilyen jellegű változtatást validálnia kell.

Használati útmutató

A HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) próba automata BOND rendszerrel (így a Leica BOND-MAX rendszerrel vagy a Leica BOND-III rendszerrel) és az Anti-Biotin Antibody antitesttel, a Stringency Wash Solution mosóoldattal és a BOND Polymer Refine Detection kittel való együttes használatra lett kifejlesztve. A HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) próbához javasolt festési protokoll az ISH Protocol B. Az enzim es előkezeléshez a BOND Enzyme Pretreatment Kit, Enzyme 1 oldat 15 percig tartó alkalmazása javasolt.

Mindig kell megfelelő szövet- és reagenskontrollokat alkalmazni. A szövet- és reagenskontrollokhoz tartozó protokollnak meg kell felelnie a HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) próba 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 körülménygyűttes esetében 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 specifikitását 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 célsejtokban létrejövő specifikus festődés jobb értelmezéséhez a HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) próba helyett alkalmazza a DNA Negative Control PB0731 készítményt minden betegminta esetén egy metszetenél.

Pozitív reagenskontroll

A nukleinsavak szöveti megtartottságával, valamint a nukleinsavak próba általi hozzáférhetőségével kapcsolatos információk szerzéséhez a HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) próba helyett alkalmazza a DNA Positive Control Probe PB0682 készítményt minden betegminta esetén egy metszetenél. Ha a DNA Positive Control Probe nem mutat pozitív festődést, a vizsgált minták eredményeit érvénytelennek kell tekinteni.

Betegszövet

A HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) próbával festett betegmintákat vizsgálja meg utolsóként. A pozitív festődés intenzitását a DNA Negative Control PB0731 esetleges nem specifikus háttérfestődésének viszonylatában értékelje.

Várható eredmények

Normál szövetek

A HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) PB0829 alkalmazásával számos különböző szöveten nem volt festődés megfigyelhető. A prosztata hámsejtjeiben, a vesetubulusokban, a mellékvese és a gyomor szekretoros sejtjeiben, a hasnyálmirigy acináris sejtjeiben és a lép myeloid sejtjeiben halvány festődés volt észlelhető. A festődés nem zavarja meg a festés értelmezését. (Vizsgált normál esetek összesített száma = 82).

Kóros szövetek

A PB0829 8/15 garati laphámsejtes karcinómát, 3/4 méhnyaki intraepitheliális neoplázia III-at, 2/4 méhnyaki karcinómát és 1/1 condylomata acuminatát festett meg. Nem volt festődés észlelhető petefészek-daganatok (0/3), pajzsmirigydaganatok (0/3), májdaganatok (0/2), emlődaganatok (0/2), tüdődaganatok (0/2), ismeretlen eredetű metasztázisú daganatok (0/2), agydaganatok (0/2), heredaganatok (0/2), bőrdaganatok (0/2), méhnyaki intraepitheliális neoplázia I/II (0/1), vastagbél-daganat (0/1), gyomordaganat (0/1), vérébdaganat (0/1) és a csecsemőmirigy tumora (0/1) esetén. (Vizsgált kóros esetek összesített száma = 49).

A PB0829 a HPV (16-os, 18-as, 31-es, 33-as és 51-es altípus) vírus DNS-ének detektálására ajánlott.

Termékspecifikus korlátozások

A HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) próbát a Leica Biosystems az Anti-Biotin Antibody antitesttel, a Stringency Wash Solution mosóoldattal, a BOND Polymer Refine Detection kittel és a BOND segédreagenssel való használatra optimalizálta formalinban fixált, paraffinba ágyazott méhnyakszövethez.

A tesztelési eljárásoktól való eltérés esetén a felhasználó felelőssége a betegeredmények értelmezése az adott körülmények között. A protokollok végrehajtásához szükséges idő a szövettípus, a fixálás és a feldolgozás eltérései miatt változhat. Ezenkívül a szövettípustól, valamint a fixálási és feldolgozási körülményektől függően szükség lehet a BOND Enzyme koncentrációjának és az inkubációs időnek az optimalizálására. Az előkezelési körülmények és a protokollidők optimalizálásakor negatív reagenskontrollokat kell használni.

A próbakészleteket szigorú hibridizációs és poszthibridizációs mosási körülmények alkalmazásával optimalizálták, azonban a festési eredmények értelmezésénél számolni kell a homológ altípusok közötti esetleges kereszthibridizáció lehetőségével¹⁶.

Hibaelhárítás

A 14. 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.

Szakirodalom

1. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, et al., 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, pp.,17–27
2. Bosch FX, de Sanjosé S. 2003. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer—burden and assessment of causality. *Journal of the National Cancer Institute Monogr* 31 pp. 3–13
3. Hebner CM and Laimins LA., 2006. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Reviews in Medical Virology* 16, pp. 83–97
4. zur Hausen H., 1996 Papillomavirus infections—a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1288 pp. F55–78
5. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, et al., 2003. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *Journal of the National Cancer Institute* 95 pp. 1772–1783
6. Trottier H and Franco EL., 2006 The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* 24 pp. S1–15.
7. Herrero R., 2003. Chapter 7: Human papillomavirus and cancer of the upper aerodigestive tract. *Journal of the National Cancer Institute Monogr* 31 pp. 3–13
8. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ and Munoz N., 1999 Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology* 189 pp.12–19
9. Munoz N, Bosch FX, Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, Hammouda D, Shah KV and Meijer CJ., 2004 Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *International Journal of Cancer* 111 pp. 278–285
10. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ and International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. 2003 Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England Journal of Medicine* 348 pp. 518–527
11. Woodman CB, Collins SI and Young LS., 2007 The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7 pp. 11–22
12. Burns J, Graham AK, Frank C, Fleming KA, Evans MF, McGee JO. 1987 Detection of low copy human papilloma virus DNA and mRNA in routine paraffin sections of cervix by non-isotopic *in situ* hybridisation. *Journal of Clinical Pathology* 40:858–864.
13. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 1763 February 28, 1992.
14. 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.
15. Southern SA, Graham DA, Harrington CS, 1998. Discrimination of Human Papillomavirus Types in Low and High Grade Cervical Squamous Neoplasia by *In situ* Hybridization. *Diagnostic Molecular Pathology* 7 (2): 114–121.
16. 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

24 szeptember 2018

BOND™ Ready-to-Use ISH HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51)

Nr. catalog: PB0829

Utilizare prevăzută

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

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) este prevăzută pentru utilizare în identificarea calitativă a ADN-ului Papilomavirusului Uman (HPV) în țesut fixat cu formalină și încorporat în parafină, prin hibridizare *in situ* (ISH) utilizând sistemul automatizat BOND (include sistemul Leica BOND-MAX și sistemul Leica BOND-III). Proba se leagă la cele cinci subtipuri HPV de risc ridicat, 16, 18, 31, 33 și 51.

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

Rezumat și explicație

Există peste 100 de tipuri cunoscute de Papilomavirus Uman (HPV), dar numai 40 dintre acestea sunt cunoscute ca infectând epiteliul anogenital¹. HPV este cel mai comun virus cu transmitere sexuală, iar prevalența HPV a fost estimată ca fiind peste 20%, în funcție de regiune². Virusul infectează celulele bazale ale epitelului prin microabraziuni și este menținut în nucleu aproximativ ca un epizom de 8 kb de ADN dublu³. Activarea genelor timpurii HPV, în mod specific E1, E2, E6 și E7, duce la replicarea genomului viral și proliferare celulară persistentă. Prin urmare, spre deosebire de epiteliul normal, celulele infectate cu HPV rămân în ciclul celular și își păstrează nucleii prin mișcare din straturile bazale în cele superficiale ale epitelului. Pe măsură ce celulele migrează spre straturile superficiale ale epitelului, genele târzii (L1 și L2), care codifică proteinele capsidice, sunt exprimate și se autoasamblează pentru a forma particule virale mature încapsulate care sunt îndepărtate din straturile superioare ale epitelului.

Infecțiile cu HPV au fost asociate cu mai multe leziuni maligne și benigne, care includ veruci genitale, cancere anogenitale și canceruri ale gurii, capului și gâtului⁴⁻⁷. Cele mai notabile sub-tipuri de HPV au fost asociate cu peste 95% din cancerurile cervicale^{8,9}. Ca urmare, sub-tipurile HPV sunt clasificate în general în cele cu risc ridicat și risc scăzut, în funcție de incidența cu care sunt asociate cu transformarea malignă (risc ridicat) și dezvoltarea de leziuni benigne (risc redus)⁶. Există 15 subtipuri de HPV clasificate ca fiind de risc ridicat, care includ 16, 18, 31, 33 și 51, dar subtipurile HPV 16 și 18 sunt cele mai frecvente subtipuri asociate cu carcinogeneza cervicală și sunt detectate în până la 71% din cancerele de col uterin^{9,10}. Este acum larg acceptat faptul că o infecție cu HPV este necesară pentru evoluția cancerului de col uterin; anumite evenimente celulare, cum ar fi starea de integrare a ADN-ului HPV și încărcătura virală sunt de asemenea factori cheie asociați cu evoluția cancerului¹¹.

ISH de ADN utilizând HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) este utilizată în detectarea ADN-ului HPV în țesut fixat cu formalină și încorporat în parafină. Metoda este reproductibilă și ar trebui să ducă la o colorație nucleară intensă cafenie a celulelor care conțin ADN HPV. Acest model de colorare poate varia de la detecția de semnale punctuale, în special în celulele epiteliale bazale, la detecția de semnal nuclear difuz. Poate fi, de asemenea, observată colorarea citoplasmică, reprezentând detectarea ARN-ului HPV¹².

Reactivi furnizați

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) este o probă de ADN furnizată în soluție de hibridizare.

Volum total = 6,25 ml.

Diluare și amestecare

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) 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 utilizator¹³.

Precauții

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

HPV PROBE (SUBTYPES 16, 18, 31, 33, 51)

Conține formamidă (<70%).

GHS08: Pericol pentru sănătate.

Cuvinte de avertizare: Pericol.

H360D: Poate dăuna fătului.

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.

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

P308+313: În caz de expunere sau de posibilă expunere: Consultați medicul.

P314: Consultați medicul, dacă nu vă simțiți bine.

Numai pentru utilizatori profesioniști.

- Pentru a obține o copie a fișei tehnice de securitate a materialului, 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 adecvate¹⁴. 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 la deșeurii a oricăror componente cu potențial toxic.
- Reduceți la minim contaminarea microbiană a reactivilor, în caz contrar poate apărea o creștere a colorației nespecifice.
- Timpii de incubație la digestia enzimatică sau temperaturile care diferă de valorile specificate pot genera rezultate eronate. Orice astfel de modificare trebuie validată de către utilizator.

Instrucțiuni de utilizare

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) a fost dezvoltată pentru utilizarea pe sistemul automat BOND (care include sistemul Leica BOND-MAX și sistemul Leica BOND-III) în combinație cu Anti-Biotin Antibody, Stringency Wash Solution și BOND Polymer Refine Detection. Protocolul de colorație recomandat pentru HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) este ISH Protocol B. 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 HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51).

Controlul calității

Diferențele în ceea ce privește procesarea țesutului și procedurile tehnice în laboratorul utilizatorului pot cauza o variabilitate semnificativă a rezultatelor, necesitând efectuarea cu regularitate 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 colorație pozitivă slabă este mai adecvat decât un țesut cu colorație 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 DNA Negative Control PB0731 în locul HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) 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 DNA Positive Control Probe PB0682 în locul HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) 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 DNA Positive Control Probe nu demonstrează colorația pozitivă, rezultatele obținute cu speciunile testate trebuie considerate nevalide.

Țesutul pacientului

Examinați probele pacientului colorate cu HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) ultimele. Intensitatea colorației pozitive trebuie evaluată în contextul oricărei colorații de fundal nespecifice a DNA Negative Control Probe PB0731.

Rezultate așteptate**Țesuturi normale**

La utilizarea HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) PB0829 nu s-a observat vreo colorare la o varietate de țesuturi normale. A fost detectată o colorare vagă în celulele epiteliale ale prostatei, tubulele renale, celulele secretoare din glandele suprarenale și stomac, celulele acinare ale pancreasului și celulele mioide ale splinei. Această colorare nu afectează interpretarea colorării. (Numărul total al cazurilor normale evaluate = 82).

Tesuturi anormale

PB0829 a colorat 8/15 carcinoame orofaringiene cu celule scuamoase, 3/4 neoplazii intraepiteliale cervicale III, 2/4 carcinoame de col uterin și 1/1 condylomata acuminata. Nu s-a observat colorare la tumori ovariene (0/3), tumori tiroidiene (0/3), tumori hepatice (0/2), tumori mamare (0/2), tumori pulmonare (0/2), tumori metastatice de origine necunoscută (0/2), tumori cerebrale (0/2), tumori testiculare (0/2), tumori de piele (0/2), o neoplazie intraepitelială cervicală I/1 (0/1), o tumoare de colon (0/1), o tumoare gastrică (0/1), o tumoare rectală (0/1) și o tumoare a timusului (0/1). (Numărul total al cazurilor anormale evaluate = 49).

PB0829 este recomandată pentru detectarea ADN-ului viral HPV (subtipurile 16, 18, 31, 33, 51).

Restricții specifice produsului

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) a fost optimizată la Leica Biosystems pentru utilizarea cu Anti-Biotin Antibody, Stringency Wash Solution, BOND Polymer Refine Detection și reactivii auxiliari BOND pe țesut cervical fixat cu formalină și încorporat în parafină.

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 din cauza variațiilor tipului de țesut, fixării și procesării. În plus, concentrația Enzimei BOND și timpul de incubație pot necesita o optimizare în funcție de tipul de țesut, condițiile de prelucrare și fixare. Atunci când se optimizează condițiile de pretratare și timpii protocolului, trebuie să fie utilizați reactivi de control negativ.

Seturile de probe au fost optimizate utilizând condiții stringente de spălare la hibridizare și după hibridizare, dar trebuie luat în considerare potențialul de hibridizare încrucișată între sub-tipurile omoloage la interpretarea rezultatelor colorării¹⁶.

Rezolvarea problemelor

Referința 14 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.

Bibliografie

1. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, et al., 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, pp.,17–27
2. Bosch FX, de Sanjosé S. 2003. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer—burden and assessment of causality. *Journal of the National Cancer Institute Monogr* 31 pp. 3–13
3. Heber CM and Laimins LA., 2006. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Reviews in Medical Virology* 16, pp. 83–97
4. zur Hausen H., 1996 Papillomavirus infections—a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1288 pp. F55–78
5. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, et al., 2003. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *Journal of the National Cancer Institute* 95 pp. 1772–1783
6. Trottier H and Franco EL., 2006 The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* 24 pp. S1–15.
7. Herrero R., 2003. Chapter 7: Human papillomavirus and cancer of the upper aerodigestive tract. *Journal of the National Cancer Institute Monogr* 31 pp. 3–13
8. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ and Munoz N., 1999 Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology* 189 pp.12–19
9. Munoz N, Bosch FX, Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, Hammouda D, Shah KV and Meijer CJ., 2004 Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *International Journal of Cancer* 111 pp. 278–285
10. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ and International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. 2003 Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England Journal of Medicine* 348 pp. 518–527
11. Woodman CB, Collins SI and Young LS., 2007 The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7 pp. 11–22
12. Burns J, Graham AK, Frank C, Fleming KA, Evans MF, McGee JO. 1987 Detection of low copy human papilloma virus DNA and mRNA in routine paraffin sections of cervix by non-isotopic *in situ* hybridisation. *Journal of Clinical Pathology* 40:858–864.
13. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
14. 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.
15. Southern SA, Graham DA, Harrington CS, 1998. Discrimination of Human Papillomavirus Types in Low and High Grade Cervical Squamous Neoplasia by *In situ* Hybridization. *Diagnostic Molecular Pathology* 7 (2): 114–121.
16. 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

24 septembrie 2018

BOND™ Ready-to-Use ISH HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51)

Номер по каталогу: PB0829

Назначение

Этот реактив предназначен для диагностики *in vitro*.

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) предназначен для качественного определения ДНК вируса папилломы человека (HPV) в фиксированных формалином и залитых в парафин образцах тканей путем гибридизации *in situ* (in situ hybridization) (ISH) с использованием автоматизированной системы BOND (включающей систему Leica BOND-MAX и Leica BOND-III). Этот зонд связывается с пятью подтипами 16, 18, 31, 33 и 51 HPV высокого риска.

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

Существует более 100 известных типов вируса папилломы человека (HPV), но известно лишь около 40, которые заражают аногенитальный эпителий¹. HPV является наиболее распространенным вирусом, передающимся половым путем, и распространенность HPV, по оценкам, на 20 % выше в зависимости от региона². Вирус заражает базальные клетки эпителия через микроссадины и оставляет в ядрах клеток приблизительно 8kb эписомы, представляющей собой двуцепочечную ДНК³. Активация ранних генов HPV, в частности E1, E2, E6 и E7, приводит к репликации вирусных геномов и стойкой клеточной пролиферации. Таким образом, в отличие от нормального эпителия, клетки, инфицированные HPV, остаются в клеточном цикле и сохраняют ядра во время движения от базального к поверхностным слоям эпителия. По мере того, как клетки мигрируют к поверхностным слоям эпителия, поздние гены (L1 и L2), которые кодируют белки капсида, экспрессируются и самособираются для формирования зрелых инкапсулированных вирусных частиц, которые распространяются через верхние слои эпителия.

HPV-инфекции ассоциируются с рядом злокачественных и доброкачественных новообразований, включая генитальные бородавки, развитие рака в аногенитальной области, а также рака полости рта, головы и шеи^{4,7}. Наиболее известные подтипы HPV ассоциируются с риском развития рака шейки матки, превышающим 95 %^{8,9}. Как результат, подтипы HPV в общих чертах классифицируются на характеризующиеся высоким или низким риском в зависимости от частоты возникновения патологии, которая с ними ассоциируется: опухольная трансформация клеток шейки матки — высокий риск, развитие доброкачественных опухолей — низкий риск⁶. Существует 15 подтипов HPV, классифицированных как подтипы высокого риска, в том числе 16, 18, 31, 33 и 51, а подтипы 16 и 18 HPV являются наиболее распространенными подтипами, связанными с канцерогенезом шейки матки, их обнаруживают в до 71 % случаев рака шейки матки^{8,10}. В настоящее время общепризнано, что инфекция HPV необходима для развития рака шейки матки; однако дополнительные клеточные изменения, такие как статус заражения ДНК HPV и вирусная нагрузка, также являются ключевыми факторами, связанными с развитием рака¹¹.

DNA ISH используют с HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) для обнаружения ДНК HPV в фиксированных формалином и залитых в парафин образцах тканей. Данный метод является воспроизводимым и должен приводить к коричневому окрашиванию клеток, содержащих ДНК с HPV. Этот характер окрашивания может меняться от обнаружения прерывистого сигнала, особенно в случае базальных эпителиальных клеток, до детекции диффузного ядерного сигнала. Цитоплазматическое окрашивание также может наблюдаться и демонстрировать обнаружение РНК вируса папилломы человека (HPV)¹².

Реактивы, входящие в комплект поставки

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) представляет собой ДНК-зонд, поставляемый в растворе для гибридизации.

Общий объем = 6,25 мл

Разведение и смешивание

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) 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 иммуногистохимического окрашивания *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, используемые 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 пользователем¹³.

Меры предосторожности

- Этот продукт предназначен для диагностики *in vitro*.

HPV PROBE (SUBTYPES 16, 18, 31, 33, 51)

Содержит формамид (Formamide) (<70%).
GHS08: Опасность для здоровья человека.
Сигнальное слово: Опасно.

H360D: Может нанести вред нерожденному ребенку.

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.

P280: Используйте защитные перчатки, защитную одежду, защиту глаз и лица.

P308+313: В случае воздействия или обеспокоенности: обратитесь за медицинской помощью.

P314: Обратитесь за медицинской помощью/консультацией, если вы отмечаете ухудшение самочувствия.

Только для профессионального использования.

- Для получения копии паспорта безопасности химической продукции (Material Safety Data Sheet) обратитесь к местному дистрибьютору или в региональный офис компании Leica Biosystems. В качестве альтернативы 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 способными к передаче инфекции и утилизировать, соблюдая соответствующие меры предосторожности¹⁴. 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.
- Минимизируйте микробную контаминацию реактивов, чтобы не усиливать неспецифическое окрашивание.
- Продолжительность или температура инкубации, предполагающие ферментативное расщепление, отличные от указанных параметров, могут привести к ошибочным результатам. Любые подобные изменения должны быть валидированы пользователем.

Инструкция по применению

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) был разработан для использования в автоматизированной системе BOND (включающей системы BOND-MAX и BOND-III компании Leica) в сочетании с антителами к биотину Anti-Biotin Antibody, раствором отмывки жесткости Stringency Wash Solution и системой обнаружения BOND Polymer Refine Detection. Рекомендуемым протоколом иммуногистохимического окрашивания для HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) является ISH Protocol В. Предварительную ферментативную обработку 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 HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51).

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 внутрилабораторных 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 HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51), используйте DNA Negative Control PB0731 (ДНК PB0731, который служит в качестве отрицательного контроля).

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 HPV probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51), предназначенного для испытаний, используйте DNA Positive Control Probe PB0682, который служит в качестве положительного контроля. Если DNA Positive Control Probe (ДНК-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 HPV probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51), в последнюю очередь. Интенсивность положительного окрашивания следует оценивать с учетом любого неспецифического фонового окрашивания DNA Negative Control PB0731 (ДНК, представляющей собой отрицательный контроль PB0731).

Ожидаемые результаты

Нормальные ткани

При использовании зонда HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) PB0829 окрашивания не наблюдалось в широком диапазоне нормальных изучаемых тканей. Слабое окрашивание обнаруживалось в эпителиальных клетках простаты, канальцах почек, секреторных клетках надпочечников и желудка, ацинарных клетках поджелудочной железы, а также миелоидных клетках селезенки. Данное окрашивание не должно препятствовать интерпретации окрашивания. (Общее число исследованных нормальных тканей = 82).

Патологически измененные ткани

PB0829 продемонстрировал окрашивание для следующих случаев: орофарингеальные плоскоклеточные карциномы (8/15), интраэпителиальная цервикальная неоплазия III (3/4), карциномы шейки матки (2/4) и остроконечные кондиломы (1/1). При следующих случаях окрашивания не наблюдалось: опухоли яичников (0/3), опухоли щитовидной железы (0/3), опухоли печени (0/2), опухоли молочной железы (0/2), опухоли легкого (0/2), метастатические опухоли неизвестного происхождения (0/2), опухоли головного мозга (0/2), опухоли яичка (0/2), опухоли кожи (0/2), интраэпителиальная цервикальная неоплазия I/II (0/1), опухоли толстой кишки (0/1), опухоли желудка (0/1), опухоли прямой кишки (0/1) и опухоли тимуса (0/1). (Общее число исследованных патологически измененных образцов = 49).

PB0829 рекомендуется для обнаружения HPV (подтипы 16, 18, 31, 33, 51) вирусного ДНК.

Ограничения, специфичные для этого продукта

Зонд HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) оптимизирован компанией Leica Biosystems для применения с Anti-Biotin Antibody, Stringency Wash Solution, BOND Polymer Refine Detection и дополнительными реактивами BOND для фиксированных формалином и залитых в парафин тканей.

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 из-за разнообразия типов тканей, способов их обработки и фиксации. Более того, в зависимости от типа тканей, условий обработки и фиксации может потребоваться оптимизация продолжительности инкубации и концентрации реактива BOND Enzyme. В ходе оптимизации условий предварительной обработки и продолжительности выполнения протокола следует использовать реактивы, представляющие собой отрицательный контроль.

Набор зондов был оптимизирован с использованием жестких условий гибридизации и постгибридизационной промывки, однако при интерпретации результатов следует принимать во внимание возможность кросс-гибридизации между гомологичными подтипами¹⁰.

Поиск и устранение неполадок

Источник (14) 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 литературы

1. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, et al., 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, pp. 17–27
2. Bosch FX, de Sanjosé S. 2003. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer—burden and assessment of causality. *Journal of the National Cancer Institute Monogr* 31 pp. 3–13
3. Hebner CM and Laimins LA., 2006. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Reviews in Medical Virology* 16, pp. 83–97
4. zur Hausen H., 1996 Papillomavirus infections—a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1288 pp. F55–78
5. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, et al., 2003. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *Journal of the National Cancer Institute* 95 pp. 1772–1783
6. Trottier H and Franco EL., 2006 The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* 24 pp. S1–15.
7. Herrero R., 2003. Chapter 7: Human papillomavirus and cancer of the upper aerodigestive tract. *Journal of the National Cancer Institute Monogr* 31 pp. 3–13
8. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ and Munoz N., 1999 Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology* 189 pp. 12–19

9. Munoz N, Bosch FX, Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, Hammouda D, Shah KV and Meijer CJ., 2004 Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *International Journal of Cancer* 111 pp. 278–285
10. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ and International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. 2003 Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England Journal of Medicine* 348 pp. 518–527
11. Woodman CB, Collins SI and Young LS., 2007 The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7 pp. 11–22
12. Burns J, Graham AK, Frank C, Fleming KA, Evans MF, McGee JO. 1987 Detection of low copy human papilloma virus DNA and mRNA in routine paraffin sections of cervix by non-isotopic *in situ* hybridisation. *Journal of Clinical Pathology* 40:858–864.
13. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
14. 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.
15. Southern SA, Graham DA, Harrington CS, 1998. Discrimination of Human Papillomavirus Types in Low and High Grade Cervical Squamous Neoplasia by *In situ* Hybridization. *Diagnostic Molecular Pathology* 7 (2): 114–121.
16. 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

24 Сентябрь 2018

BOND™ Ready-to-Use ISH HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51)

Nr katalogowy: PB0829

Przeznaczenie

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

Preparat HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) jest przeznaczony do ilościowego oznaczania DNA wirusa brodawczaka ludzkiego (HPV) w utrwalonej formaliną tkance zatopionej w parafinie przez hybridyzację *in situ* (ISH) przy użyciu automatycznego systemu BOND (w tym systemów Leica BOND-MAX i Leica BOND-III). Sonda ta wiąże się z podtypami 16, 18, 31, 33 i 51 HPV wysokiego ryzyka.

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

Istnieje ponad 100 znanych typów wirusa brodawczaka ludzkiego (HPV), ale tylko około 40 infekuje nabłonek odbytu i narządów płciowych¹. HPV jest najczęstszym wirusem przenoszonym drogą płciową, a częstość występowania HPV szacuje się na ponad 20% w zależności od regionu². Wirus infekuje podstawne komórki nabłonka poprzez mikro-otarcia i jest przechowywany w jądrze w postaci około 8 kb epizomu dwuniciowego DNA³. Aktywacja genów wczesnych wirusa HPV, w szczególności E1, E2, E6 i E7, powoduje wirusową replikację genomu i trwałą proliferację komórkową. Dlatego w przeciwieństwie do normalnego nabłonka komórki zakażone HPV pozostają w cyklu komórkowym i zachowują swoje jądra przez cały czas przemieszczania się z podstawnej do powierzchniowej warstwy nabłonka. Gdy komórki migrują do powierzchniowych warstw nabłonka, późne geny (L1 i L2), które kodują białka kapsydu, ulegają ekspresji i samoorganizują się, tworząc dojrzałe otorebkowane cząstki wirusa, które są uwalniane z górnych warstw nabłonka.

Zakażenia HPV powodują wiele zmian złośliwych i łagodnych, w tym brodawki narządów płciowych, raka odbytu oraz raka jamy ustnej i szyi⁴⁻⁷. Najbardziej znaczące podtypy HPV powodują ponad 95% przypadków raka szyjki macicy^{8,9}. Dlatego podtypy HPV są ogólnie klasyfikowane jako czynniki wysokiego lub niskiego ryzyka, w zależności od częstotliwości powodowania zmian złośliwych szyjki macicy (wysokie ryzyko) i łagodnych zmian chorobowych (niskie ryzyko)⁶. Istnieje 15 podtypów HPV wysokiego ryzyka, w tym 16, 18, 31, 33 i 51, z czego podtypy HPV 16 i 18 są najczęściej związane z karcynogenezą szyjki macicy i są wykrywane w aż 71% przypadków raka szyjki macicy^{9,10}. Obecnie powszechnie uważa się, że w przypadku progresji raka szyjki macicy musiało dojść do zarażenia wirusem HPV. Jednak dodatkowe zdarzenia komórkowe, takie jak integracja DNA z HPV oraz obciążenie wirusem są również kluczowymi czynnikami związanymi z progresją nowotworu¹¹.

Preparat DNA ISH wykorzystujący HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) służy do wykrywania HPV DNA w utrwalonej w formalinie tkance zatopionej w parafinie. Metoda jest powtarzalna i jej efektem powinno być brązowe barwienie jądra komórkowego zawierającego DNA HPV. Ten wzór barwienia może różnić się od przerywanej detekcji sygnału, szczególnie w podstawnych komórkach nabłonka, powodując rozproszenie detekcji sygnału jądrowego. Można również zaobserwować wybarwienie cytoplazmatyczne - oznacza ono wykrycie RNA wirusa HPV¹².

Odczynniki znajdujące się w zestawie

Preparat HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) to sonda DNA dostarczana w roztworze do hybridyzacji.

Łączna objętość = 6,25 ml

Rozcieńczanie i mieszanie.

Preparat HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) 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 użytkownika¹³.

Środki ostrożności

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

HPV PROBE (SUBTYPES 16, 18, 31, 33, 51)

Zawiera formamid (<70%).

GHS08: Zagrożenie dla zdrowia.

Słowa sygnalizujące:
Niebezpieczeństwo.

H360D: Może działać szkodliwie na dziecko w łonie matki

P201: Przed użyciem zapoznać się ze specjalnymi środkami ostrożności.

P202: Nie używać przed zapoznaniem się i zrozumieniem wszystkich środków bezpieczeństwa.

P260: Nie wdychać pyłu/dymu/gazu/mgły/par/rozpylonej cieczy.

P280: Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy.

P308+P313: W przypadku narażenia lub styczności: Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.

P314: W przypadku złego samopoczucia zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.

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 preparatami przed utrwaleniem i po utrwaleniu, 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.¹⁴ 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 przemyć miejsce kontaktu dużą ilością wody. Należy zasięgnąć porady lekarza.
- Wszelkie potencjalnie toksyczne składniki należy utylizować zgodnie z krajowymi lub lokalnymi przepisami.
- Należy chronić odczynniki przed skażeniem drobnoustrojami, ponieważ może ono doprowadzić do zwiększonego barwienia niespecyficznego.
- Zastosowanie czasów inkubacji trawienia enzymatycznego lub temperatur innych niż podano w instrukcji może spowodować błędne wyniki. Wszelkie zmiany tego typu muszą zostać zweryfikowane przez użytkownika.

Instrukcja stosowania

Preparat HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) został opracowany z myślą o zastosowaniu w automatycznym systemie BOND (obejmującym systemy Leica BOND-MAX i Leica BOND-III) w połączeniu z Anti-Biotin Antibody, Stringency Wash Solution i BOND Polymer Refine Detection. Zalecany protokół barwienia dla HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) to ISH Protocol B. Zalecana jest wstępną obróbka enzymatyczna 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 HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51).

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 DNA Negative Control PB0731 zamiast HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) na każdym skrawku z próbki pobranej od pacjenta.

Pozytywna kontrola odczynnika

Aby otrzymać informacje o zachowaniu kwasów nukleinowych w tkance, a także o możliwości znakowania kwasów nukleinowych przez sondę, należy użyć DNA Positive Control Probe PB0682 zamiast HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) na każdym skrawku z próbki pobranej od pacjenta. Jeśli DNA 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 HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) należy badać jako ostatnie. Intensywność barwienia pozytywnego należy oceniać w kontekście ewentualnego niespecyficznego barwienia tła odczynnika DNA Negative Control PB0731.

Oczekiwane wynikiTkanki prawidłowe

Przy zastosowaniu HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) PB0829 w wielu tkankach nie stwierdzono barwienia. Słabe barwienie stwierdzono w komórkach nabłonka gruczołu krokowego, kanałkach nerkowych, komórkach wydzielniczych w nadnerczach i łożądku, komórkach zrakowych trzustki i komórkach mieloidalnych śledziony. Taki rodzaj barwienia nie zakłóca interpretacji. (Łączna liczba

ocenionych prawidłowych przypadków = 82).

Tkanki patologiczne

PB0829 wybarwił 8/15 raków płaskonabłonkowych, 3/4 śródnabłonkowe neoplazje szyjki macicy, 2/4 raki szyjki macicy i 1/1 kłykcinek kończystą. Nie stwierdzono barwienia guzów jajnika (0/3), guzów tarczycy (0/3), guzów wątroby (0/2), guzów sutka (0/2), guzów płuc (0/2), guzów przerzutowych nieznanego pochodzenia (0/2) guzów mózgu (0/2), guzów jąder (0/2), nowotworów skóry (0/2), śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy I/II (0/1), guzów okrężnicy (0/1), guzów żołądka (0/1), guzów odbytnicy (0/1) i guzów gruciszy (0/1). (Łączna liczba ocenionych nieprawidłowych przypadków = 49).

Zaleca się stosowanie PB0829 do wykrywania DNA wirusa HPV (podtypy 16, 18, 31, 33, 51)

Szczegółne ograniczenia dla produktu

Preparat HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) został zoptymalizowany w Leica Biosystems pod kątem stosowania z Anti-Biotin Antibody, Stringency Wash Solution, BOND Polymer Refine Detection i preparatami pomocniczymi BOND na utrwalonej w formalinie tkance szyjki macicy zatopionej w parafinie.

W tych okolicznościach użytkownicy, którzy postępują niezgodnie z zalecanymi procedurami testowymi muszą wziąć odpowiedzialność za interpretację wyników chorego. Czasy protokołów mogą się różnić ze względu na różnice w typie tkanki, utrwalaniu i przetwarzaniu. Ponadto stężenie BOND Enzyme i czas inkubacji mogą wymagać optymalizacji w zależności od rodzaju tkanki, warunków przetwarzania i utrwalania. Podczas optymalizacji obróbki wstępnej i czasów protokołów należy stosować negatywną kontrolę odczynników.

Zestawy sond zostały zoptymalizowane w restrykcyjnym procesie hybrydyzacji i przepłukiwania po hybrydyzacji. Jednak podczas interpretacji wyników barwienia należy uwzględnić możliwość hybrydyzacji krzyżowej pomiędzy podtypami homologicznymi¹⁶.

Rozwiązywanie problemów

Odnośnik 14 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 fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* przy użyciu odczynników BOND opisanej w działach „Zasady postępowania”, „Wymagane materiały”, „Przygotowanie próbek”, „Kontrola Jakości”, „Weryfikacja testu”, „Interpretacja barwienia”, „Objaśnienie symboli na etykietach” i „Ograniczenia ogólne” można znaleźć w punkcie „Stosowanie odczynników BOND” w dokumentacji użytkownika systemu BOND.

Bibliografia

1. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, et al., 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, pp.,17–27
2. Bosch FX, de Sanjosé S. 2003. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer—burden and assessment of causality. *Journal of the National Cancer Institute Monogr* 31 pp. 3–13
3. Hebner CM and Laimins LA., 2006. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Reviews in Medical Virology* 16, pp. 83–97
4. zur Hausen H., 1996 Papillomavirus infections—a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1288 pp. F55–78
5. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, et al., 2003. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *Journal of the National Cancer Institute* 95 pp. 1772–1783
6. Trottier H and Franco EL., 2006 The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* 24 pp. S1–15.
7. Herrero R., 2003. Chapter 7: Human papillomavirus and cancer of the upper aerodigestive tract. *Journal of the National Cancer Institute Monogr* 31 pp. 3–13
8. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ and Munoz N., 1999 Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology* 189 pp.12–19
9. Munoz N, Bosch FX, Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, Hammouda D, Shah KV and Meijer C.J., 2004 Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *International Journal of Cancer* 111 pp. 278–285
10. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders P.J, Meijer CJ and International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. 2003 Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England Journal of Medicine* 348 pp. 518–527
11. Woodman CB, Collins SI and Young LS., 2007 The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7 pp. 11–22
12. Burns J, Graham AK, Frank C, Fleming KA, Evans MF, McGee JO. 1987 Detection of low copy human papilloma virus DNA and mRNA in routine paraffin sections of cervix by non-isotopic *in situ* hybridisation. *Journal of Clinical Pathology* 40:858–864.
13. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
14. 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.
15. Southern SA, Graham DA, Harrington CS, 1998. Discrimination of Human Papillomavirus Types in Low and High Grade Cervical Squamous Neoplasia by *In situ* Hybridization. *Diagnostic Molecular Pathology* 7 (2): 114–121.
16. 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

24 września 2018

BOND™ Ready-to-Use ISH HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51)

Katalogška št.: PB0829

Predvidena uporaba

Ta reagent je namenjen diagnostični uporabi *in vitro*.

Sonda HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) je namenjena za uporabo v kvalitativni identifikaciji DNA humanega papilomskega virusa (HPV) 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). Ta sonda se veže na pet podvrst z visokim tveganjem: 16, 18, 31, 33 in 51.

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

Obstaja več kot 100 vrst humanih papiloma virusov (HPV), vendar jih samo 40 povzroča okužbo anogenitalnega epitelija¹. HPV je najpogostejši spolno prenosljivi virus in razširjenost HPV pri ženskah je ocenjena na več kot 20 % v odvisnosti od regije². Virus okuži bazalne celice epitelija preko mikroabrazij. Ohranja se v jedru kot približno 8 kb dolg epizom dvoverižne DNA³. Aktivacija zgodnjih genov HPV, zlasti E1, E2, E6 in E7 povzroči virusno genomsko replikacijo in vztrajno celično proliferacijo. Celice, okužene s HPV, zato za razliko od normalnih epiteljskih celic, ostanejo v celičnem ciklu in ohranijo svoja jedra med potovanjem od bazalnih do površinskih plasti epitelija. Ko celice potujejo do površinskih plasti epitelija, se izražata pozna gena (L1 in L2), ki kodirata kapsidne proteine. Ti se samosestavljajo in tvorijo zrele virusne delce s kapsido, ki se sproščajo iz zgornjih plasti epitelija.

Okužbe z virusom HPV so povezane z različnimi malignimi in benignimi lezijami, vključno z bradavicami na spolovilih, anogenitalnimi raki in rakom v ustih, glavi in vratu⁴⁻⁷. Najbolj pomembni podtipi HPV so bili povezani z več kot 95 % raka materničnega vratu^{8,9}. Posledično so podtipi HPV na splošno razvrščeni kot visoko- ali nizkotvegani, odvisno od pojavnosti razvoja maligne transformacije materničnega vratu (visokotvegani) in benigne lezije (nizkotvegani)⁸. Obstaja 15 podvrst virusa HPV, ki so opredeljene z visokim tveganjem, vključno s 16, 18, 31, 33 in 51, vendar pa sta podvrsti virusa HPV 16 in 18 najpogostejši podvrsti, ki ju povezujemo s karcinogenezo materničnega vratu, in sta zaznani pri do 71 % raka materničnega vratu^{9, 10}. Splošno sprejeto dejstvo je, da je za napredovanje raka materničnega vratu potrebna okužba z virusom HPV. Poleg tega pa so dodatni celični dogodki, kot sta status integracije DNA virusa HPV in virusna obremenitev, prav tako ključni dejavniki, povezani z napredovanjem raka¹¹.

DNA ISH z uporabo sonde HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) se uporablja pri zaznavanju HPV DNA v tkivu, fiksiranem s formalinom in vstavljenem v parafin. Ta metoda je ponovljiva in bi morala povzročiti rjavo barvanje jedra celic, ki vsebujejo DNA HPV. Vzorec obarvanja se lahko razlikuje od točkovnega signala, zlasti v bazalnih epiteljskih celicah, do difuznega jedrskega signala. Prav tako lahko opazimo obarvanje citoplazeme, kar je posledica zaznavanja RNA HPV¹².

Priloženi reagenti

Sonda HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) je sonda DNA, dobavljena v raztopini hibridizacije.

Skupna prostornina = 6,25 ml.

Redčenje in mešanje

Sonda HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) 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 navedenih¹³.

Previdnosti ukrepi

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

Sonda HPV PROBE (SUBTYPES 16, 18, 31, 33, 51)

Vsebuje formamid (< 70%).
GHS08: Nevarno za zdravje.
Signalne besede: Nevarno.

H360D: Lahko škoduje nerojenemu otroku.

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.
P280: Nositi zaščitne rokavice/zaščitno obleko/zaščito za oči/zaščito za obraz.
P308+313: Pri izpostavljenosti ali sumu izpostavljenosti: Poiščite zdravniško pomoč/oskrbo.
P314: Ob slabem počutju poiščite zdravniško pomoč/oskrbo.
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.¹⁴ 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. Poiščite zdravniško pomoč.
- Sledite zveznim, državnim ali lokalnim predpisom za odstranjevanje katerih koli morebitno strupenih sestavin.
- Pazite, da ne pride do mikrobnе okužbe reagentov, drugače se lahko pojavi nespecifično obarvanje.
- Če uporabite čas ali temperature inkubacije encimskega razkroja, ki se razlikujejo od navedenih, lahko pridobite napačne rezultate. Uporabnik mora validirati morebitne spremembe.

Navodila za uporabo

Sonda HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) je bila razvita za uporabo na avtomatiziranem sistemu BOND (vključuje sistem Leica BOND-MAX in sistem Leica BOND-III) skupaj s sistemom Anti-Biotin Antibody, Stringency Wash Solution in BOND Polymer Refine Detection. Priporočen protokol za barvanje za sondo HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) je ISH Protocol B. Priporočen način encimatske predobdelave 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 HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51).

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 boljše razlago specifičnega obarvanja uporabite kontrolni reagent DNA Negative Control PB0731 namesto testne sonde HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) z eno rezino vsakega vzorca bolnika.

Pozitivni kontrolni reagent

Da preverite ohranjenost nukleinskih kislin v tkivu ter dostopnost nukleinskih kislin sondi, uporabite kontrolni reagent DNA Positive Control Probe PB0682 namesto sonde HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) z eno rezino vsakega vzorca bolnika. Če sonda DNA Positive Control Probe ne kaže pozitivnega obarvanja, morate rezultate vzorcev šteti za neveljavne.

Bolnikovo tkivo

Nazadnje preglejte bolnikove vzorce, obarvane s sondo HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51). Intenzivnost pozitivnega obarvanja morate oceniti v kontekstu morebitnega nespecifičnega obarvanja ozadja v kontrolnem vzorcu z izdelkom DNA Negative Control PB0731.

Pričakovani rezultati

Normalna tkiva

S sondo HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) PB0829 niso opazili obarvanja številnih drugih tkiv. Šibko obarvanje so ugotovili v epitelijskih celicah prostate, v tubulih ledvic, sekretornih celicah v nadledvičnih žlezah in želodcu, acinarnih celicah trebušne slinavke in mieloidnih celicah vranice. To obarvanje ne vpliva na interpretacijo obarvanja. (Skupno število ocenjenih normalnih primerov = 82).

Neormalna tkiva

PB0829 je obarval 8/15 orofarangealnih skvamoznih karcinomov, 3/4 interepitelnih neoplazij III materničnega vratu, 2/4 karcinomov

materničnega vratu in 1/1 genitalno bradavico. Obarvanja niso opazili v tumorjih na jajčnikih (0/3), tumorjih ščitnice (0/3), tumorjih jeter (0/2), tumorjih dojke (0/2), tumorjih pljuč (0/2), metastatskih tumorjih neznanega izvora (0/2), možganskih tumorjih (0/2), tumorjih testisov (0/2), tumorjih kože (0/2), intraepitelnih neoplazijah I/II materničnega vratu (0/1), tumorju debelega črevesa (0/1), tumorju želodca (0/1), tumorju rektuma (0/1), in tumorju priželjca (0/1). (Skupno število ocenjenih anomalnih primerov = 49).

PB0829 je priporočen za zaznavanje virusne DNA HPV (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51).

Specifične omejitve izdelka

Sondo HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) je podjetje Leica Biosystems optimiziralo za uporabo skupaj s sistemi Anti-Biotin Antibody, Stringency Wash Solution, BOND Polymer Refine Detection in pomožnim reagentom BOND v tkivu, fiksiranem s formalinom in vstavljenem v parafin.

Uporabniki, ki odstopijo od priporočenih preizkusnih postopkov, morajo prevzeti odgovornost za razlago bolnikovih rezultatov pod temi pogoji. Trajanje protokola se lahko spremeni glede na vrsto tkiva, fiksacijo in obdelavo. Poleg tega bo morda treba optimizirati koncentracijo encima BOND Enzyme in čas inkubacije glede na vrsto tkiva, obdelavo in pogoje pri fiksaciji. Pri optimizaciji pogojev predhodne obdelave in trajanja protokola morate uporabiti negativne kontrolne reagente.

Kompleti sond so bili optimizirani z uporabo strogih pogojev hibridizacije in izpiranja po hibridizaciji, vendar je pri razlagi rezultatov barvanja treba upoštevati možno križno hibridizacijo med homolognimi podtipi¹⁶.

Odravljane težav

Referenca 14 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.

Literatura

1. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, et al., 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, pp.,17–27
2. Bosch FX, de Sanjosé S. 2003. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer—burden and assessment of causality. *Journal of the National Cancer Institute Monogr* 31 pp. 3–13
3. Hebner CM and Laimins LA., 2006. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Reviews in Medical Virology* 16, pp. 83–97
4. zur Hausen H., 1996 Papillomavirus infections—a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1288 pp. F55–78
5. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, et al., 2003. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *Journal of the National Cancer Institute* 95 pp. 1772–1783
6. Trottier H and Franco EL., 2006 The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* 24 pp. S1–15.
7. Herrero R., 2003. Chapter 7: Human papillomavirus and cancer of the upper aerodigestive tract. *Journal of the National Cancer Institute Monogr* 31 pp. 3–13
8. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ and Munoz N., 1999 Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology* 189 pp.12–19
9. Munoz N, Bosch FX, Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, Hammouda D, Shah KV and Meijer CJ., 2004 Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *International Journal of Cancer* 111 pp. 278–285
10. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ and International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. 2003 Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England Journal of Medicine* 348 pp. 518–527
11. Woodman CB, Collins SI and Young LS., 2007 The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7 pp. 11–22
12. Burns J, Graham AK, Frank C, Fleming KA, Evans MF, McGee JO. 1987 Detection of low copy human papilloma virus DNA and mRNA in routine paraffin sections of cervix by non-isotopic *in situ* hybridisation. *Journal of Clinical Pathology* 40:858–864.
13. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
14. 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.
15. Southern SA, Graham DA, Harrington CS, 1998. Discrimination of Human Papillomavirus Types in Low and High Grade Cervical Squamous Neoplasia by *In situ* Hybridization. *Diagnostic Molecular Pathology* 7 (2): 114–121.
16. 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

24 september 2018

BOND™ Ready-To-Use ISH

HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51)

Kat. č.: PB0829

Zamýšlené použití

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

Sonda HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) je určena k použití při kvalitativním stanovení DNA lidského papilomaviru (HPV) 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). Tato sonda se váže k pěti velmi rizikovým podtypům HPV – 16, 18, 31, 33 a 51.

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

Je známo více než 100 typů lidských papilomavirů (HPV), ale pouze přibližně 40 z nich napadá anogenitální epitel¹. HPV je nejčastější sexuálně přenosný virus a jeho prevalence se odhaduje na více než 20 % v závislosti na regionu². Virus infikuje bazální buňky epitelu prostřednictvím mikroabraze a je uchovávan v jádru jako přibližně 8kb epizom dvouvláknové DNA³. Aktivace časných genů HPV, zejména E1, E2, E6 a E7, vede k replikaci virového genomu a přetrvávající buněčné proliferaci. Proto na rozdíl od normálního epitelu zůstávají HPV infikované buňky v buněčném cyklu a zachovávají svá jádra v průběhu celého pohybu od bazálních o povrchové vrstvy epitelu. Při migraci buněk do povrchových vrstev epitelu jsou exprimovány pozdní geny (L1 a L2), které kódují proteiny kapsidy a samostatně vytvářejí zralé zapouzdřené částice virů, které jsou odlučovány z povrchových vrstev epitelu.

HPV jsou spojovány s množstvím maligních a benigních lézí, včetně genitálních vředů, anogenitální rakoviny a orální rakoviny hlavy a krku^{4,7}. Nejvýznamnější podtypy HPV jsou spojovány s více než 95 % rakoviny děložního hrdla^{8,9}. V důsledku toho jsou podtypy HPV klasifikovány jako vysoké či nízkorizikové, v závislosti na incidenci jsou spojovány s cervikální maligní transformací (vysoké riziko) a rozvojem benigní léze (nízké riziko)⁶. 15 podtypů HPV, včetně podtypu 16, 18, 31, 33, a 51, je klasifikováno jako vysoce rizikových, ale podtypy HPV 16 a 18 jsou nejčastěji se objevující podtypy v souvislosti s karcinogenezi děložního hrdla a jsou zjištěny až u 71 % případů rakoviny děložního hrdla^{9,10}. V dnešní době se už široce přijímá, že k progresi rakoviny děložního hrdla je nutná infekce HPV, nicméně další buněčné události, jako je stav integrace DNA HPV a virová zátěž, jsou také klíčové faktory spojené s progresí rakoviny¹¹.

DNA hybridizace *in situ* (ISH) využívající sondu HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) detekuje DNA HPV ve tkáni fixované formalínem a zalité v parafínu. Tato metoda je reprodukovatelná a měla by vést k hnědému zbarvení jader buněk, které obsahují DNA HPV. Tento vzor barvení může kolísat od přerušované detekce signálu, zejména u bazálních epitelálních buněk, po difúzní nukleární detekci signálu. Rovněž může být pozorováno cytoplazmatické barvení, které reprezentuje detekci HPV RNA¹².

Dodávané reagenция

Sonda HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) je DNA sonda dodávaná v hybridizačním roztoku.

Celkový objem = 6,25 ml

Ředění a míchání

Sonda HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) je připravena k použití. Rekonstituce, míchání, ředění ani titrace této reagenция 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) je uveden v bodě „Použití reagenция 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 indukující 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 uživatel¹³ validovat.

Bezpečnostní opatření

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

HPV PROBE (SUBTYPES 16, 18, 31, 33, 51)
Obsahuje formalid (< 70%).
GHS08: Ohrožení zdraví.
Signální slova: Nebezpečí.

H360D: Může poškodit plod v těle matky.

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.
P280: Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.
P308+P313: Při expozici nebo podezření na ni: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.
P314: Nečliňte-li se dobře, vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.
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 opatření¹⁴. Nikdy reagencie nepipetujte ústy a zabraňte kontaktu reagenční a vzorků s kůží a sliznicemi. Pokud se reagencie nebo vzorky dostanou do kontaktu s citlivými oblastmi, omyjte je velkým množstvím vody. Vyhleďte lékařskou pomoc.
- Údaje o likvidaci jakýchkoli potenciálně toxických komponent prostudujte ve federálních, státních nebo místních nařízeních.
- Minimalizujte mikrobiální kontaminaci reagencií, mohlo by dojít ke zvýšení výskytu nespecifického barvení.
- Doby enzymatické digesce, inkubační doby nebo teploty jiné než specifikované mohou vést k chybným výsledkům. Všechny takové změny musí být uživatelem validovány.

Návod k použití

Sonda HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) byla vyvinuta k použití v automatickém systému BOND (včetně systému Leica BOND-MAX a systému Leica BOND-III) v kombinaci se soupravou Anti-Biotin Antibody, Stringency Wash Solution a BOND Polymer Refine Detection. Doporučený protokol o barvení pro sondu HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) je protokol ISH Protocol B. Enzymatická předběžná úprava je doporučena 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 protokolu sondy HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51).

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.

Positivní 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 reagence je vhodnější tkáň se slabým pozitivním barvením než tkáň se silným pozitivním barvením.

Negativní tkáňová kontrola

Musí být vyšetřena po pozitivní tkáňové kontrole k ověření specificity 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 DNA Negative Control PB0731 namísto sondy HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51).

Positivní 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 DNA Positive Control Probe PB0682 namísto sondy HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51). Pokud sonda DNA Positive Control Probe nevykazuje pozitivní barvení, musí být výsledky testovaných vzorků považovány za neplatné.

Tkáň pacienta

Nakonec vyšetříte vzorky pacienta barvené pomocí sondy HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51). Intenzita pozitivního barvení musí být zhodnocena v kontextu se vším nespecifickým barvením pozadí u sondy DNA Negative Control Probe PB0731.

Očekávané výsledky

Normální tkáně

Při použití sondy HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) PB0829 nebylo barvení pozorováno u širokého spektra normálních tkání. Slabé barvení bylo detekováno u epitelálních buněk prostaty, ledvinových tubulů, sekrečních buněk nadledvin a žaludku, acinárních buněk pankreatu a myeloidních buněk sleziny. Toto barvení neinterferuje s interpretací barvení. (Celkový počet normálních vyšetřovaných tkání = 82).

Abnormální tkáně

Sonda PB0829 obarvila 8/15 orofaryngeálních dlaždicobuněčných karcinomů, 3/4 cervikálních intraepitelálních neoplázií III, 2/4 cervikálních karcinomů a 1/1 condylomata acuminata. Žádné barvení nebylo pozorováno u ovariálních nádorů (0/3), nádorů štítné žlázy (0/3), nádorů jater (0/2), nádorů prsu (0/2), nádorů plic (0/2) metastatických nádorů neznámého původu (0/2), nádorů mozku (0/2), testikulárních nádorů (0/2), nádorů kůže (0/2), cervikální intraepitelální neoplázie I/II (0/1), nádoru tlustého střeva (0/1), nádoru žaludku (0/1), rektálního nádoru (0/1) a nádoru thymu (0/1). (Celkový počet vyšetřených abnormálních tkání = 49).

Sonda PB0829 je doporučena k detekci virové DNA HPV (podtypů 16, 18, 31, 33, 51).

Omezení specifická pro tento produkt

Sonda HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) byla optimalizována společností Leica Biosystems pro použití se soupravou Anti-Biotin Antibody, Stringency Wash Solution, BOND Polymer Refine Detection a pomocnými reagenciemi BOND na cervikální tkáni fixované formalínem a zalité v parafínu.

Uživatelé, kteří se při vyšetření odchýlí od doporučeného postupu, musí za těchto okolností přijmout odpovědnost za interpretaci výsledků u pacienta. Doby uvedené v protokolu se mohou lišit kvůli odlišnému typu tkáně, fixace a zpracování. Dále mohou koncentrace enzymu BOND Enzyme a doba inkubace vyžadovat optimalizaci v závislosti na typu tkáně, zpracování a podmínkách fixace. Při optimalizaci podmínek předběžné úpravy a dob v protokolu musí být použity reagentie pro negativní kontrolu.

Soupravy sond byly optimalizovány pomocí stringentní hybridizace a post hybridizačních promývacích podmínek, avšak při interpretaci výsledků barvení je třeba vzít v úvahu potenciální křížovou hybridizaci mezi homologními podtypy¹⁶.

Řešení problémů

Odkaz 14 může napomoci při provádění nápravných opatření.

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

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

Další informace

Další informace o hybridizaci *in situ* reagentiemi 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 reagentií BOND“.

Literatura

1. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, et al., 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, pp.,17–27
2. Bosch FX, de Sanjosé S. 2003. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer--burden and assessment of causality. *Journal of the National Cancer Institute Monogr* 31 pp. 3–13
3. Hebner CM and Laimins LA., 2006. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Reviews in Medical Virology* 16, pp. 83–97
4. zur Hausen H., 1996 Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1288 pp. F55–76
5. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, et al., 2003. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *Journal of the National Cancer Institute* 95 pp. 1772–1783
6. Trottier H and Franco EL., 2006 The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* 24 pp. S1–15.
7. Herrero R., 2003. Chapter 7: Human papillomavirus and cancer of the upper aerodigestive tract. *Journal of the National Cancer Institute Monogr* 31 pp. 3–13
8. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ and Munoz N., 1999 Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology* 189 pp.12–19
9. Munoz N, Bosch FX, Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, Hammouda D, Shah KV and Meijer CJ., 2004 Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *International Journal of Cancer* 111 pp. 278–285
10. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ and International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. 2003 Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England Journal of Medicine* 348 pp. 518–527
11. Woodman CB, Collins SI and Young LS., 2007 The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7 pp. 11–22
12. Burns J, Graham AK, Frank C, Fleming KA, Evans MF, McGee JO. 1987 Detection of low copy human papilloma virus DNA and mRNA in routine paraffin sections of cervix by non-isotopic *in situ* hybridisation. *Journal of Clinical Pathology* 40:858–864.
13. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
14. 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.
15. Southern SA, Graham DA, Harrington CS, 1998. Discrimination of Human Papillomavirus Types in Low and High Grade Cervical Squamous Neoplasia by *In situ* Hybridization. *Diagnostic Molecular Pathology* 7 (2): 114–121.
16. 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

24 září 2018

BOND™ Ready-to-Use ISH HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51)

Katalógové č.: PB0829

Zamýšľané použitie

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

Sonda HPV Probe (Subtypy 16, 18, 31, 33, 51) je určená na kvalitatívne stanovenie DNA ľudského papilomavírusu (HPV) v tkanive zaliatom do parafínu a fixovanom formalínom prostredníctvom hybridizácie *in situ* (ISH) použitím automatizovaného systému BOND (vrátane systému Leica BOND-MAX a Leica BOND-III). Táto sonda sa viaže na päť vysokorizikových subtypov HPV – 16, 18, 31, 33 a 51.

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

Existuje viac ako 100 typov ľudského papilomavírusu (HPV), ale len o 40 z nich sa vie, že spôsobujú infekciu anogenitálneho epitelu¹. HPV je najznámejší pohlavne prenosný vírus a odhaduje sa, že prevalencia HPV je v závislosti od regiónu vyššia ako 20 %². Vírus infikuje bazálne bunky epitelu cez mikroodreniny a zachová sa v jadre približne ako epizóm veľkosti 8 kb s dvojitoú špirálou DNA³. Aktivácia skorých génov HPV, konkrétne E1, E2, E6 a E7, spôsobuje replikáciu vírusových genómov a nepretržitú bunkovú proliferáciu. Bunky infikované vírusom HPV preto na rozdiel od normálneho epitelu zostávajú v bunkovom cykle a uchovávajú si jadro aj počas prechodu z bazálnych do povrchových vrstiev epitelu. Ako bunky prestupujú do povrchových epitelových vrstiev, exprimujú sa neskoré gény (L1 a L2), ktoré kódujú proteíny kapsidu a samy sa usporiadajú tak, aby vytvorili zrelé zapuzdrené vírusové častice, ktoré sa odľúpa z horných vrstiev epitelu.

Infekcie vírusom HPV sa spájajú s niekoľkými malígnymi a benignými léziami, ako sú napríklad genitálne bradavice, anogenitálne onkologické ochorenia a onkologické ochorenia úst, hlavy a krku⁴⁻⁷. Najvýznamnejšie subtypy HPV súvisia s viac ako 95 % nádorov krčka^{8,9}. Subtypy HPV sa preto bežne klasifikujú ako vysokorizikové alebo nízkorizikové v závislosti od incidencie ich spojitosti s malígnou transformáciou krčka (vysokorizikové) a vznikom benígnej lézie (nízkorizikové)⁸. Existuje 15 subtypov HPV, ktoré sú klasifikované ako vysokorizikové, vrátane subtypu 16, 18, 31, 33 a 51, pričom subtypy 16 a 18 sú najčastejšie subtypy asociované s cervikálnou karcinogenezou a detegujú sa až v 71 % prípadov rakoviny krčka matrice^{8,10}. V súčasnosti existuje rozšírený názor, že infekcia HPV je potrebná z hľadiska progresie rakoviny krčka matrice. S progresiou rakoviny krčka matrice sú však spojené aj kľúčové faktory, ktorými sú ďalšie bunkové udalosti, ako napríklad stav integrácie DNA HPV a vírusová záťaž¹¹.

ISH DNA pomocou sondy HPV Probe (Subtypy 16, 18, 31, 33, 51) sa používa na detekciu DNA HPV v tkanive zaliatom do parafínu a fixovanom formalínom. Metóda je reprodukovateľná a mala by viesť k hneďému nukleárnemu zafarbeniu buniek obsahujúcich DNA HPV. Tento vzor zafarbenia sa môže líšiť od výraznejšej detekcie signálu, a to najmä v bazálnych epitelových bunkách, kde sa rozptyľuje detekcia signálu v jadre. Pozorovať možno aj zafarbenie cytoplazmy, čo predstavuje detekciu RNA HPV¹².

Dodané činidlá

Sonda HPV Probe (Subtypy 16, 18, 31, 33, 51) je sonda DNA dodávaná v hybridizačnom roztoku.

Celkový objem = 6,25 ml

Riedenie a miešanie

Sonda HPV Probe (Subtypy 16, 18, 31, 33, 51) je pripravená na okamžité použitie. Rekonštitúcia, miešanie, riedenie ani titrácia tohto činidla nie sú potrebné.

Potrebný nedodaný materiál

Úplný zoznam materiálov potrebných na prípravu 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.

Ukladnenie 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 alebo nestabilitu. Súčasne s testovaným tkanivom treba analyzovať aj kontroly s pozitívnym aj negatívnym tkanivom.

Okamžite po použití vráťte do teploty 2 – 8 °C.

Iné než vyššie uvedené podmienky skladovania si vyžadujú validáciu používateľom¹³.

Bezpečnostné opatrenia

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

SONDA HPV PROBE (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51)

Obsahuje formamid (<70%).

GHS08: Nebezpečný pre zdravie.

Signálne slová:

Nebezpečenstvo.

H360D: Môže poškodiť nenarodené dieťa.

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.

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

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

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

Určené iba pre odborníkov.

- Materiálový bezpečnostný list 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 opatrení¹⁴. 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 nespecifického zafarbenia.
- Nedodržanie predpísaných inkubačných dôb alebo teplôt enzymatického zahustenia môže viesť k nesprávnym výsledkom. Všetky takéto zmeny si vyžadujú validáciu používateľom.

Návod na použitie

Sonda HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) bola vytvorená na použitie v automatizovanom systéme BOND (zahŕňa systémy Leica BOND-MAX a Leica BOND-III) v spojitosti s protilátkou Anti-Biotin Antibody, roztokom Stringency Wash Solution a so systémom BOND Polymer Refine Detection. Odporúčaný protokol farbenia pre sondu HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) je ISH Protocol B. Na enzymatickú predprípravu 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 protokolom pre sondu HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51).

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.

Pozitívna 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 pre optimálnu kontrolu kvality a na detekciu slabšej degradácie činidla vhodnejšie než tkanivo so silným pozitívnym farbením.

Negatívna kontrola tkanivom

Nutné vyšetriť po pozitívnej kontrole tkanivom s cieľom overiť špecifickosť 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 nespecifického zafarbenia použite kontrolu DNA Negative Control PB0731 miesto sondy HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) s rezom jednotlivých vzoriek pacienta, čo umožní lepšiu interpretáciu špecifického farbenia cieľa.

Pozitívna kontrola činidlom

Použitie sondy DNA Positive Control Probe PB0682 namiesto sondy HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) s časťou vzorky jednotlivých pacientov poskytne informácie o zachovaní nukleových kyselín v tkanive, ako aj o dostupnosti nukleových kyselín pre sondu. Ak sonda DNA Positive Control Probe nebude vykazovať pozitívne zafarbenie, výsledky testovaných vzoriek je nutné považovať za neplatné.

Tkanivo pacienta

Pacientske vzorky zafarbené sondou HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) preskúmajte ako posledné. Intenzitu pozitívneho farbenia je nutné vyhodnotiť v kontexte prípadného nespecifického zafarbenia sondy DNA Negative Control Probe PB0731 na pozadí.

Očakávané výsledky

Normálne tkanivá

Pri použití sondy HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) PB0829 nebolo pozorované žiadne zafarbenie na širokej škále rôznych tkanív. Slabé zafarbenie bolo zistené v epitelových bunkách prostaty, tubuloch obličky, sekrečných bunkách nadobličiek a žalúdka, acinárnych bunkách pankreasu a myeloidných bunkách sleziny. Toto zafarbenie nemá vplyv na interpretáciu farbenia. (Celkový počet normálnych vyšetrených prípadov = 82).

Abnormálne tkanivá

Sonda PB0829 zafarbila 8/15 orofaryngeálnych skvamocelulárnych karcinómov, 3/4 cervikálnych intraepitelových neoplázií III. stupňa, 2/4 cervikálnych karcinómov a 1/1 condylomata acuminata. Zafarbenie nebolo pozorované pri nádoroch vaječníka (0/3), nádoroch štítnej žľazy (0/3), nádoroch pečene (0/2), nádoroch prsníka (0/2), nádoroch pľúc (0/2), metastatických nádoroch neznámeho pôvodu (0/2), nádoroch mozgu (0/2), nádoroch semenníka (0/2), nádoroch kože (0/2), cervikálnej intraepitelovej neoplázií I/II. stupňa (0/1), nádore hrubého čreva (0/1), nádore žalúdka (0/1), nádore konečníka (0/1) a nádore detskej žľazy (0/1). (Celkový počet abnormálnych vyšetrených prípadov = 49).

Sonda PB0829 sa odporúča na detekciu vírusovej DNA HPV (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51).

Špecifické obmedzenia pre tento výrobok

Sonda HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) bola v spoločnosti Leica Biosystems optimalizovaná na použitie s protilátkou Anti-Biotin Antibody, roztokom Stringency Wash Solution, so systémom BOND Polymer Refine Detection a pomocnými činidlami BOND v cervikálnom tkanive zaliatom do parafínu a fixovanom formalínom.

Používatelia, ktorí sa odchýlia od odporúčaných testovacích postupov, musia akceptovať zodpovednosť za interpretáciu výsledkov pacienta za týchto okolností. Časy podľa protokolov sa môžu líšiť z dôvodu odlišností v type tkaniva, fixácie a spracovania. Okrem toho koncentrácia a doba inkubácie produktu BOND Enzyme si môže vyžadovať optimalizáciu v závislosti od typu tkaniva, podmienok spracovania a fixácie. Pri optimalizácii podmienok predprípravy a časov podľa protokolov je potrebné použiť činidlá negatívnej kontroly.

Súpravy sond boli optimalizované v prísnych podmienkach umývania počas hybridizácie a po hybridizácii, pri interpretácii výsledkov zafarbenia však treba zväziť možnosť krížovej hybridizácie homológnych podtypov¹⁶.

Riešenie problémov

Pri náprave môže byť nápomocná referencia 14.

Testovacie vzorky majú doplniť vhodné kontrolné tkanivá a kontrolné činidlá.

Neobvyklé 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“.

Literatúra

1. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, et al., 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, pp.,17–27
2. Bosch FX, de Sanjosé S. 2003. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer—burden and assessment of causality. *Journal of the National Cancer Institute Monogr* 31 pp. 3–13
3. Hebner CM and Laimins LA., 2006. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Reviews in Medical Virology* 16, pp. 83–97
4. zur Hausen H., 1996 Papillomavirus infections—a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1288 pp. F55–78
5. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, et al., 2003. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *Journal of the National Cancer Institute* 95 pp. 1772–1783
6. Trottier H and Franco EL., 2006 The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* 24 pp. S1–15.
7. Herrero R., 2003. Chapter 7: Human papillomavirus and cancer of the upper aerodigestive tract. *Journal of the National Cancer Institute Monogr* 31 pp. 3–13
8. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ and Munoz N., 1999 Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology* 189 pp.12–19
9. Munoz N, Bosch FX, Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, Hammouda D, Shah KV and Meijer CJ., 2004 Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *International Journal of Cancer* 111 pp. 278–285
10. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ and International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. 2003 Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England Journal of Medicine* 348 pp. 518–527
11. Woodman CB, Collins SI and Young LS., 2007 The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7 pp. 11–22
12. Burns J, Graham AK, Frank C, Fleming KA, Evans MF, McGee JO. 1987 Detection of low copy human papilloma virus DNA and mRNA in routine paraffin sections of cervix by non-isotopic *in situ* hybridisation. *Journal of Clinical Pathology* 40:858–864.
13. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 1763 February 28, 1992.
14. 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.
15. Southern SA, Graham DA, Harrington CS, 1998. Discrimination of Human Papillomavirus Types in Low and High Grade Cervical Squamous Neoplasia by *In situ* Hybridization. *Diagnostic Molecular Pathology* 7 (2): 114–121.
16. 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

24 septembra 2018

BOND™ Ready-to-Use ISH HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) رقم الدليل: PB0829

الاستعمال المستهدف

هذا الكاشف مخصص للاستعمال في أغراض التشخيص في المختبرات.

يتمثل الغرض من مسبار (HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51 باستخدامه في التحديد النوعي للحمض النووي الريبي منقوص الأكسجين (DNA) لفيروس الورم الحليمي البشري (HPV) في النسيج المثبت بالفورمالين، والمضمن في البرافين، عن طريق التهجين في الموضوع باستخدام نظام BOND الال (يشمل نظامي Leica BOND-MAX و Leica BOND-III). يرتبط هذا المسبار بالأنواع الفرعية 16، 18، 31، 33، 51 الخمسة لفيروس الورم الحليمي البشري عالية المخاطر.

ينبغي أن يستكمل التفسير السريري لوجود أي تلوّخ أو غيابها من خلال الدراسات المورفولوجية والخصائص الصحية، وينبغي تقييم ذلك في سياق التاريخ السريري للمريض وغيره من الاختبارات التشخيصية التي يجريها أخصائي مؤهل في علم الأمراض.

الملخص والشرح

هناك أكثر من 100 نوع من فيروس الورم الحليمي البشري المعروف (HPV)، ولكن من المعروف أن حوالي 40 منها فقط يسبب الظهارة الشرجية التناسلية¹. ويعد فيروس الورم الحليمي البشري أكثر الفيروسات المنتقلة جنسياً ويُقدّر انتشار فيروس الورم الحليمي البشري بأكثر من 20% حسب المنطقة. يسبب الفيروس الخلايا القاعدية للظهارة عن طريق مسحات صغيرة ويتم الاحتفاظ به في الفؤاة بنسبة تقرب من 8 كيلو بايت ضعف بصيوع الحامض النووي القياسي². إن تنشيط الجينات المبكرة لفيروس الورم الحليمي البشري، وبخاصة E1، E2، E6 و E7، يؤدي إلى تكرار الجينوم الفيروسي والتكاثر الخلوي المستمر. لذلك، على عكس الظهارة الطبيعية، تظل الخلايا المصابة بفيروس الورم الحليمي البشري (HPV) في دورة الخلية وتحقق بنواها طوال حركتها من القاعدة إلى الطبقات السطحية للظهارة. مع انتقال الخلايا إلى الطبقات السطحية للظهارة، يتم التعبير عن الجينات (L1 و L2)، التي تقوم بترميز البروتينات القفصية، وفي وقت متأخر وتتجمع ذاتياً لتشكيل جزيئات الفيروس المغلفة الناضجة التي يتم طرحها من الطبقات العلوية للظهارة.

لقد ارتبطت عدوى فيروس الورم الحليمي البشري (HPV) بعدد من الآفات الخبيثة والحميدة، بما في ذلك التآليل التناسلية، وأمراض السرطان الأنفية وأمراض سرطان عنق الرحم والرقبة³⁻⁴. يرتبط معظم أنواع فيروس الورم الحليمي البشري (HPV) الأكثر شهرة بأكثر من 95% من حالات الإصابة بسرطان عنق الرحم^{5,6}. ونتيجة لذلك، يتم تصنيف الأنواع الفرعية لفيروس الورم الحليمي البشري (HPV) على نطاق واسع بأنها عالية أو منخفضة المخاطر، على حسب ارتباطها بالتحول الخبيث في عنق الرحم (عالية المخاطر) وتطوير الآفات الحميدة (منخفضة المخاطر)⁶. هناك 15 نوعاً من أنواع فيروس الورم الحليمي البشري المصنفة على أنها عالية المخاطر، بما في ذلك 16، 18، 31، 33، 35، 39، 45، 51، 56، 59، 68، 73، 82، 84، 89، 91، 92، 93، 94، 95، 96، 97، 98، 99، 101، 102، 103، 104، 105، 106، 107، 108، 109، 110، 111، 112، 113، 114، 115، 116، 117، 118، 119، 120، 121، 122، 123، 124، 125، 126، 127، 128، 129، 130، 131، 132، 133، 134، 135، 136، 137، 138، 139، 140، 141، 142، 143، 144، 145، 146، 147، 148، 149، 150، 151، 152، 153، 154، 155، 156، 157، 158، 159، 160، 161، 162، 163، 164، 165، 166، 167، 168، 169، 170، 171، 172، 173، 174، 175، 176، 177، 178، 179، 180، 181، 182، 183، 184، 185، 186، 187، 188، 189، 190، 191، 192، 193، 194، 195، 196، 197، 198، 199، 200، 201، 202، 203، 204، 205، 206، 207، 208، 209، 210، 211، 212، 213، 214، 215، 216، 217، 218، 219، 220، 221، 222، 223، 224، 225، 226، 227، 228، 229، 230، 231، 232، 233، 234، 235، 236، 237، 238، 239، 240، 241، 242، 243، 244، 245، 246، 247، 248، 249، 250، 251، 252، 253، 254، 255، 256، 257، 258، 259، 260، 261، 262، 263، 264، 265، 266، 267، 268، 269، 270، 271، 272، 273، 274، 275، 276، 277، 278، 279، 280، 281، 282، 283، 284، 285، 286، 287، 288، 289، 290، 291، 292، 293، 294، 295، 296، 297، 298، 299، 300، 301، 302، 303، 304، 305، 306، 307، 308، 309، 310، 311، 312، 313، 314، 315، 316، 317، 318، 319، 320، 321، 322، 323، 324، 325، 326، 327، 328، 329، 330، 331، 332، 333، 334، 335، 336، 337، 338، 339، 340، 341، 342، 343، 344، 345، 346، 347، 348، 349، 350، 351، 352، 353، 354، 355، 356، 357، 358، 359، 360، 361، 362، 363، 364، 365، 366، 367، 368، 369، 370، 371، 372، 373، 374، 375، 376، 377، 378، 379، 380، 381، 382، 383، 384، 385، 386، 387، 388، 389، 390، 391، 392، 393، 394، 395، 396، 397، 398، 399، 400، 401، 402، 403، 404، 405، 406، 407، 408، 409، 410، 411، 412، 413، 414، 415، 416، 417، 418، 419، 420، 421، 422، 423، 424، 425، 426، 427، 428، 429، 430، 431، 432، 433، 434، 435، 436، 437، 438، 439، 440، 441، 442، 443، 444، 445، 446، 447، 448، 449، 450، 451، 452، 453، 454، 455، 456، 457، 458، 459، 460، 461، 462، 463، 464، 465، 466، 467، 468، 469، 470، 471، 472، 473، 474، 475، 476، 477، 478، 479، 480، 481، 482، 483، 484، 485، 486، 487، 488، 489، 490، 491، 492، 493، 494، 495، 496، 497، 498، 499، 500، 501، 502، 503، 504، 505، 506، 507، 508، 509، 510، 511، 512، 513، 514، 515، 516، 517، 518، 519، 520، 521، 522، 523، 524، 525، 526، 527، 528، 529، 530، 531، 532، 533، 534، 535، 536، 537، 538، 539، 540، 541، 542، 543، 544، 545، 546، 547، 548، 549، 550، 551، 552، 553، 554، 555، 556، 557، 558، 559، 560، 561، 562، 563، 564، 565، 566، 567، 568، 569، 570، 571، 572، 573، 574، 575، 576، 577، 578، 579، 580، 581، 582، 583، 584، 585، 586، 587، 588، 589، 590، 591، 592، 593، 594، 595، 596، 597، 598، 599، 600، 601، 602، 603، 604، 605، 606، 607، 608، 609، 610، 611، 612، 613، 614، 615، 616، 617، 618، 619، 620، 621، 622، 623، 624، 625، 626، 627، 628، 629، 630، 631، 632، 633، 634، 635، 636، 637، 638، 639، 640، 641، 642، 643، 644، 645، 646، 647، 648، 649، 650، 651، 652، 653، 654، 655، 656، 657، 658، 659، 660، 661، 662، 663، 664، 665، 666، 667، 668، 669، 670، 671، 672، 673، 674، 675، 676، 677، 678، 679، 680، 681، 682، 683، 684، 685، 686، 687، 688، 689، 690، 691، 692، 693، 694، 695، 696، 697، 698، 699، 700، 701، 702، 703، 704، 705، 706، 707، 708، 709، 710، 711، 712، 713، 714، 715، 716، 717، 718، 719، 720، 721، 722، 723، 724، 725، 726، 727، 728، 729، 730، 731، 732، 733، 734، 735، 736، 737، 738، 739، 740، 741، 742، 743، 744، 745، 746، 747، 748، 749، 750، 751، 752، 753، 754، 755، 756، 757، 758، 759، 760، 761، 762، 763، 764، 765، 766، 767، 768، 769، 770، 771، 772، 773، 774، 775، 776، 777، 778، 779، 780، 781، 782، 783، 784، 785، 786، 787، 788، 789، 790، 791، 792، 793، 794، 795، 796، 797، 798، 799، 800، 801، 802، 803، 804، 805، 806، 807، 808، 809، 810، 811، 812، 813، 814، 815، 816، 817، 818، 819، 820، 821، 822، 823، 824، 825، 826، 827، 828، 829، 830، 831، 832، 833، 834، 835، 836، 837، 838، 839، 840، 841، 842، 843، 844، 845، 846، 847، 848، 849، 850، 851، 852، 853، 854، 855، 856، 857، 858، 859، 860، 861، 862، 863، 864، 865، 866، 867، 868، 869، 870، 871، 872، 873، 874، 875، 876، 877، 878، 879، 880، 881، 882، 883، 884، 885، 886، 887، 888، 889، 890، 891، 892، 893، 894، 895، 896، 897، 898، 899، 900، 901، 902، 903، 904، 905، 906، 907، 908، 909، 910، 911، 912، 913، 914، 915، 916، 917، 918، 919، 920، 921، 922، 923، 924، 925، 926، 927، 928، 929، 930، 931، 932، 933، 934، 935، 936، 937، 938، 939، 940، 941، 942، 943، 944، 945، 946، 947، 948، 949، 950، 951، 952، 953، 954، 955، 956، 957، 958، 959، 960، 961، 962، 963، 964، 965، 966، 967، 968، 969، 970، 971، 972، 973، 974، 975، 976، 977، 978، 979، 980، 981، 982، 983، 984، 985، 986، 987، 988، 989، 990، 991، 992، 993، 994، 995، 996، 997، 998، 999، 1000.

يُستخدم DNA ISH باستخدام مسبار (HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51 للكشف عن الحمض النووي (DNA) لفيروس الورم الحليمي البشري في النسيج المثبت بالفورمالين، والمضمن بالبارافين. تعد هذه الطريقة قابلة للتكاثر ويجب أن ينتج عنها تلوّخ نووي بني للخلايا المحتوية على الحمض النووي (DNA) لفيروس الورم الحليمي البشري. يمكن لهذا النمط من التلوّخ أن يختلف عن النمط المتاحصل عليه من الكشف المنضبط، خاصة في الخلايا الظهارية القاعدية، وذلك لنشر الكشف عن الإشارات النووية. يمكن أيضاً ملاحظة التلوّخ الهلوي، وهو يمثل الكشف عن HPV RNA¹².

الكواشف المتوفرة

يعد مسبار (HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51 مسبار حمض نووي DNA تم تزويده في محلول التهجين.

الحجم الكلي = 6.25 مل

التخفيف والخلط

(HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51 جاهز للاستعمال. لا يلزم إعادة تشكيل هذا الكاشف، أو خلطه، أو تخفيفه، أو معايرته.

المواد المطلوبة لكنها غير متوفرة

ارجع إلى "استعمال كواشف BOND" في وثائق مستخدم BOND التي يوزعها للحصول على قائمة كاملة بالمواد المطلوبة لمعالجة العينات والتلوّخ التهجين في الموضوع 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 حاجة واضحة تشير إلى التلوث وأو عدم الاستقرار. ينبغي تشغيل ضوابط النسخ الإيجابي والسلبى الملائمة في نفس الوقت الذي يجري فيه اختبار النسخ.

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

يجب التحقق من ظروف التخزين بمعرفة المستخدم بخلاف الظروف المحددة أعلاه¹³.

الاحتياطات

هذا الكاشف مخصص للاستعمال في أغراض التشخيص في المختبرات.

H360D: قد يضر الطفل الذي لم يولد بعد.
HPV PROBE (SUBTYPES
16, 18, 31, 33, 51)
يحتوي على الفورماميد (>70%).
GHS08: خطر على الصحة.
كلمات الإشارة: خطر.

P201: حصل على تعليمات خاصة قبل الاستخدام.
P202: لا تباد في التعامل حتى تقرأ جميع احتياطات السلامة وتقمها.
P260: لا تستنشق الغبار/الدخان/الضباب/الأبخرة/الرذاذ.
P280: ارتداء قفازات واقية / ملابس واقية / حماية العين / حماية الوجه
P308+P313: في حالة التعرض أو المخاوف: حصل على المشورة الطبية/
الاهتمام الطبي.
P314: حصل على المشورة الطبية/الاهتمام الطبي إذا شعرت أنك لست على ما يرام.
مفصّل على المتخصصين المتخصصين.

للحصول على نسخة من صحيفة بيانات السلامة للمواد، اتصل بالموزع 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 وبعد، وكذلك مع جميع المواد التي تتعرض لها كما لو كانت قادرة على نقل العدوى، وينبغي التخلص منها مع اتخاذ الاحتياطات السلمية¹⁴. لا تمس الكواشف مطلقاً عن طريق الفم، وتجنب احتكاك الجلد والأغشية المخاطية بالكواشف أو العينات. إذ كانت الكواشف أو العينات تحتك بمناطق حساسة، فغسل تلك المناطق بكميات وفيرة من الماء. اطلب المشورة الطبية.

- راجع اللوائح الفيدرالية، أو لوائح الولاية، أو اللوائح المحلية للتخلص من أي مكونات سامة محتملة.
- قلل من التلوث الميكروبي للكاشف وإلا قد تحدث زيادة في التلطيخ غير المحدد.
- قد تؤدي ظروف هضم الإنزيم أو أوقات الحضانة ودرجات الحرارة بخلاف تلك الظروف المحددة إلى الحصول على نتائج خاطئة. أي تغيير كهذا يجب التحقق منه من جانب المستخدم.

إرشادات الاستعمال

تم تطوير مسبار (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) HPV Probe لاستخدامه في نظام BOND الآلي (يشمل نظامي Leica BOND-MAX و Leica BOND-III) بالاقتران مع التلوث الميكروبي للكاشف وإلا قد تحدث زيادة في التلطيخ غير المحدد. BOND Polymer Refine Detection و Stringency Wash Solution و Anti-Biotin Antibody. يوصى بالمعالجة الإنزيمية باستخدام BOND Enzyme 1 بروتوكول التلوين الموصى به لمسبار HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) هو ISH Protocol B. يوصى بالمعالجة الإنزيمية باستخدام BOND Enzyme 1 بروتوكول مسبار HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) بدقة.

ينبغي دائماً استخدام الأنسجة وضوابط الكاشف المناسبة. يجب أن يتوافق بروتوكول الأنسجة وضوابط الكاشف مع بروتوكول مسبار HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51).

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.

ضابط النسيج الإيجابي

يُستخدم للإشارة إلى الأنسجة التي تم إعدادها بصورة صحيحة وأساليب التلطيخ السليمة.

يجب تضمين نسيج إيجابي واحد لكل مجموعة من ظروف الاختبار في كل عملية تلطيخ. يكون النسيج ذو التلطيخ الإيجابي الضعيف ملائماً بصورة أكبر من النسيج ذي التلطيخ الإيجابي القوي، وذلك بغرض ضبط الجودة المثلى والكشف عن مستويات طفيفة من تدهور الكاشف.

ضابط النسيج السلبي

ينبغي فحصه بعد ضابط النسيج الإيجابي للتحقق من خصوصية وضع تسميات المسبار نحو الهدف..

وبدلاً عن 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.

ضابط الكاشف السلبي

استخدم DNA Negative Control PB0731 بدلاً من مسبار HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) مع قطاع من كل عينة من المرضى لتقييم التلطيخ غير المحدد والسماح بتفسير التلطيخ الممدد عند الهدف بشكل أفضل.

ضابط الكاشف الإيجابي

استخدم DNA Positive Control Probe PB06829 بدلاً من مسبار HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) مع قطاع من كل عينة من المرضى لتوفير معلومات حول حفظ الأحماض النووية في النسيج وكذلك إمكانية وصول الأحماض النووية إلى المسبار. إذا فشل DNA Positive Control Probe في إظهار التلطيخ الإيجابي، فينبغي اعتبار نتائج عينات الاختبار غير صحيحة.

نسيج المريض

افحص عينات المرضى الملطخة بـ (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) HPV Probe أخيراً. ينبغي تقييم كثافة التلطيخ الإيجابي في سياق أي تلطيخ غير محدد بالخلفية بخصوص DNA Negative Control PB0731.

النتائج المتوقعة

الأنسجة العادية

باستخدام PB0829 HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51)، لم يُلاحظ وجود أي تلوين في مجموعة كبيرة من الأنسجة الطبيعية. تم كشف تلطيخ خافت في الخلايا الظهارية من البروستات، وأنابيب الكلى، والخلايا الإفرازية في الغدد الكظرية والمعدة، وخلايا أسيتار في البنكرياس وخلايا نخاع في الطحال. لا يتعارض هذا التلطيخ مع تفسير التلطيخ. (إجمالي عدد الحالات العادية التي تم تقييمها = 82).

الأنسجة غير العادية

لمطخ 8/15 PB0829 من سرطان الخلايا الحرشفية خارج الجمجمة، و 3/4 من تكون الورم داخل الظهارة بعنق الرحم III، و 2/4 من سرطان عنق الرحم، و 1/1 من ثليل الأورام اللحمية. لم تتم ملاحظة وجود أي تلطيخ في أورام المبيض (0/3)، وأورام الغدة الدرقية (0/3)، وأورام الكبد (0/2)، وأورام الثدي (0/2)، وأورام الرئة (0/2)، والأورام الغليظة من أصل غير معروف (0/2)، وأورام المخ (0/2)، وأورام الخصية (0/2)، وأورام الجلد (0/2)، وتكون ورم داخل الظهارة بعنق الرحم (0/1) I / II، وورم القولون (0/1)، وورم المعدة (0/1)، وورم المستقيم (0/1)، وورم الغدة الصعترية (0/1). (إجمالي عدد الحالات غير العادية التي تم تقييمها = 49).

يوصى باستخدام PB0829 للكشف عن فيروس الورم الحليمي البشري (الأصناف الفرعية 16، 18، 31، 33، 51).

القيود الخاصة بالمنتج

تم تحسين HPV Probe (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) في Leica Biosystems للاستخدام مع Anti-Biotin Antibody و Stringency Wash Solution، و BOND Polymer Refine Detection، وكواشف BOND المساعدة في أنسجة عنق الرحم المثبتة بالفورمالين، والمضمنة بالبارافين.

على المستخدمين الذين يبدون عن إجراءات الاختبار الموصى بها قبول تحمل المسؤولية عن تفسير نتائج المرضى في ظل هذه الظروف. قد تختلف أوقات البروتوكول بسبب اختلاف نوع النسيج والتثبيت والمعالجة. بالإضافة إلى ذلك، قد يحتاج تركيز BOND Enzyme ووقت الحضانة إلى التحسين على حسب نوع النسيج، وظروف المعالجة، والتثبيت. ينبغي استعمال ضوابط الكواشف السلبية عند تحسين ظروف ما قبل المعالجة وأوقات البروتوكول.

تم تحسين مجموعات المسبارات باستخدام التهجين الصارم وتوفير ظروف الغسيل بعد التهجين؛ ومع ذلك، ينبغي دراسة التهجين المستعرض المحتمل بين الأنواع الفرعية المتمثلة عند تفسير نتائج التلطيخ¹⁶.

اكتشاف المشكلات وحلها

قد يساعد المرجع رقم 14 في الحصول على إجراء علاجي.

ينبغي استكمال عينات الاختبار بضوابط النسيج والكواشف الملائمة.

اتصل بالموزع المحلي لديك أو بمكتب Leica Biosystems الإقليمي للإبلاغ عن أي تلطيخ غير اعتيادي.

يمكن العثور على المزيد من المعلومات حول التهجين في الموضوع باستخدام كواشف BOND، تحت العناوين التالية: مبدأ الإجراء، المواد المطلوبة، إعداد العينة، ضبط الجودة، التحقق من صحة الفحص، تفسير النتائج، مفتاح الرموز المدونة على الملصقات، والقيود العامة، وذلك في قسم «استعمال كواشف BOND» في وثائق مستخدم BOND التي بحوزتك.

قائمة المراجع

1. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, et al., 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, pp.,17–27
2. Bosch FX, de Sanjosé S. 2003. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer--burden and assessment of causality. *Journal of the National Cancer Institute Monogr* 31 pp. 3–13
3. Hebner CM and Laimins LA., 2006. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Reviews in Medical Virology* 16, pp. 83–97
4. zur Hausen H., 1996 Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1288 pp. F55–78
5. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, et al., 2003. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *Journal of the National Cancer Institute* 95 pp. 1772–1783
6. Trottier H and Franco EL., 2006 The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* 24 pp. S1–15.
7. Herrero R., 2003. Chapter 7: Human papillomavirus and cancer of the upper aerodigestive tract. *Journal of the National Cancer Institute Monogr* 31 pp. 3–13
8. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ and Munoz N., 1999 Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology* 189 pp.12–19
9. Munoz N, Bosch FX, Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, Hammouda D, Shah KV and Meijer CJ., 2004 Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *International Journal of Cancer* 111 pp. 278–285
10. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ and International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. 2003 Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England Journal of Medicine* 348 pp. 518–527
11. Woodman CB, Collins SI and Young LS., 2007 The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7 pp. 11–22
12. Burns J, Graham AK, Frank C, Fleming KA, Evans MF, McGee JO. 1987 Detection of low copy human papilloma virus DNA and mRNA in routine paraffin sections of cervix by non-isotopic *in situ* hybridisation. *Journal of Clinical Pathology* 40:858–864.
13. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
14. 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.
15. Southern SA, Graham DA, Harrington CS, 1998. Discrimination of Human Papillomavirus Types in Low and High Grade Cervical Squamous Neoplasia by *In situ* Hybridization. *Diagnostic Molecular Pathology* 7 (2): 114–121.
16. 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.

تاريخ الإصدار

24 سبتمبر 2018

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