

BOND Ready-to-Use ISH EBER Probe

Catalog No: PB0589

Leica Biosystems Newcastle Ltd
Balliol Business Park West
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.

Instruțiuni de utilizare

Citiți aceste instruțiuni 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

EBER Probe

Catalog No: PB0589

Intended Use

This reagent is for *in vitro* diagnostic use.

EBER Probe is intended for use in the qualitative identification of latent EBV infection¹⁻² in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue by *in situ* hybridization (ISH) using the automated BOND system (includes Leica BOND-MAX system and Leica BOND-III system).

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

Summary and Explanation

Epstein-Barr Virus (EBV) is a member of the Gamma Herpes Virus family. Over 90% of the adult population have been infected with EBV during their life resulting in lifelong EBV carrier status¹. Primary infection during childhood is usually asymptomatic but when primary infection occurs during adolescence or later it can cause self-limiting infectious mononucleosis³⁻⁴. EBV can establish both lytic infection as well as latent infection. During lytic infection, there is production of virus, lysis of the host cells and a broad expression of viral proteins. Lytic infection mainly occurs in certain epithelial cells as well as B-lymphocytes via the CD21 receptor⁵⁻⁶. Following primary infection, latency is established in resting memory B-lymphocytes where only a small portion of the viral genome is expressed, therefore avoiding destruction by the host immune response. Latent infection can also reactivate allowing the virus to spread.

Latent EBV infection is associated with several conditions including: Hodgkin's Lymphoma, B-cell Non Hodgkin's Lymphoma, nasopharyngeal carcinoma, lymphoproliferative disorders and lymphoma in the immunosuppressed, including transplant and AIDS patients, gastric cancer and some T-cell lymphomas⁷⁻¹².

Epstein Barr Virus encoded RNA (EBER) is abundantly expressed in latent EBV infection¹⁻². EBER transcripts are non-polyadenylated and remain untranslated. EBER detection by ISH is considered a sensitive method for the detection of latent EBV infection¹.

EBER Probe is used in the detection of EBER transcripts in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. The method is reproducible and should result in intense, brown nuclear staining of cells containing EBER transcripts.

Reagents Provided

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

Total volume = 5.5 mL

Dilution and Mixing

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

Materials Needed but not Provided

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

Storage and Stability

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

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

Return to 2–8 °C immediately after use.

Storage conditions other than those specified above must be verified by the user¹³.

Precautions

- This product is intended for *in vitro* diagnostic use.
- 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.
- Minimize microbial contamination of reagents or an increase in non-specific staining may occur.
- Retrieval, incubation times or temperatures other than those specified may give erroneous results. Any such change must be validated by the user.

Instructions for Use

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

Appropriate tissue and reagent controls should always be used. The protocol for the tissue and reagent controls should correspond to that of the RNA test probe.

Quality Control

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

Positive Tissue Control

Used to indicate correctly prepared tissues and proper staining techniques.

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

Negative Tissue Control

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

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

Reagent Controls

The use of negative and positive reagent control probes is recommended to interpret any EBER probe staining or its absence on each tissue sample.

Negative Reagent Control

It is recommended to use an RNA negative control probe that does not cross-hybridize with human sequences on a section of each patient specimen to evaluate non-specific staining and allow better interpretation of any staining in specific cells. The expected result is absence of staining.

Positive Reagent Control

It is recommended to use an RNA positive control probe that labels a ubiquitously expressed human transcript (e.g. U6) on 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 a positive control probe fails to demonstrate positive staining, any results with the test specimens should be considered invalid.

Patient Tissue

Examine patient specimens stained with EBER Probe last. Positive staining intensity should be assessed within the context of any staining seen with the negative and positive control probes.

Results Expected

Normal Tissues

No specific EBER mRNA staining was detected using PB0589 in a wide range of normal tissues. Faint staining was detected in epithelial cells of the thyroid, prostate, larynx, and esophagus, tubules of the kidney, secretory cells in the adrenal glands and Leydig cells. This staining does not interfere with staining interpretation. (Total number of normal cases evaluated = 98).

Abnormal Tissues

PB0589 stained 3/5 Hodgkin's lymphomas. No staining was seen in lung tumors (0/3), ovarian tumors (0/3), liver tumors (0/3), thyroid tumors (0/3), esophageal tumors (0/2), breast tumors (0/2), metastatic tumors of unknown origin (0/2), brain tumors (0/2), testicular tumors (0/2), skin tumors (0/2), a colon tumor (0/1), a stomach tumor (0/1), a rectal tumor (0/1), a tumor of the larynx (0/1) and a tumor of the thymus (0/1). (Total number of abnormal cases evaluated = 34).

PB0589 is recommended for the detection of EBER mRNA.

Product Specific Limitations

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

Troubleshooting

Reference 15 may aid in remedial action.

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

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

Further Information

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

References

1. Chang KL, Chen YY, Shibata D, et al. Description of an *in situ* hybridisation methodology for detection of Epstein-Barr virus RNA in paraffin-embedded tissues, with a survey of normal and neoplastic tissues. *Diagnostic Molecular Pathology*. 1992;1(4):246–255.
2. Ambinder RF, Mann RB. Epstein-Barr-encoded RNA *in situ* hybridization: diagnostic applications. *Hum Pathol*. Jun; 25(6):602–5, 1994.
3. Joncas J, Boucher J, Granger-Julien M, et al. Epstein-Barr virus infection in the neonatal period and in childhood. *CMAJ*. 1974;110:33–37.
4. Niederman JC, McCollum RW, Henle G, et al. Infectious mononucleosis: clinical manifestations in relation to EB virus antibodies. *JAMA*. 1968;203:205–209.
5. Sixbey JW, Vesterinen EH, Nedrud JG, et al. Replication of Epstein-Barr virus in human epithelial cells infected *in vitro*. *Nature* 1983;306:480–3.
6. Fingerth JD, Weis JJ, Tedder TF, et al. Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes in the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:4510–4.
7. Weiss LM, Movahed LA, Warnke RA, et al. Detection of Epstein Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's Disease. *NEJM*. 1989;302(8):502–506.
8. Hummel M, Agnostopolous I, Korbjuhn P, et al. Epstein Barr virus in B cell non Hodgkins lymphoma. *J Pathol*. 1995;175(3):263–271.
9. Brousset P, Bulet V, Chittal S, et al. Comparison of *in situ* hybridisation using different isotopic probes for detection of nasopharyngeal carcinoma and immunohistochemical correlation with anti-latent membrane protein antibody. *Lab Invest*. 1992;67(4):457–464.
10. Oudejans JJ, Jiwa M, van den Brule AJ, et al. Detection of heterogeneous Epstein-Barr virus gene expression patterns within individual post-transplant lymphoproliferative disorders. *Am J Pathol*. 1995;147(4):923–933.
11. Luo B, Wang Y, Xiao-Feng W, et al. Expression of Epstein-Barr virus genes in EBV-associated carcinomas. *World J Gastroenterol*. 2005;11(5):629–633.
12. Teramoto N, Sarker AB, Tonoyama Y, et al. Epstein-Barr virus infection in neoplastic and non-neoplastic cells of lymphoid malignancies. *Cancer*. 1996;77(11):2339–2347.
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. 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

30 April 2020

BOND Ready-to-Use ISH

EBER Probe

Référence: PB0589

Utilisation Prévue

Ce réactif est destiné au diagnostic *in vitro*.

EBER Probe est conçue pour l'identification qualitative de l'infection latente par le virus d'Epstein-Barr¹⁻² par hybridation *in situ* (ISH) automatisée BOND (qui comprend les systèmes Leica BOND-MAX et Leica BOND-III) sur tissu fixé à la formaline et enrobé de paraffine.

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

Résumé et Explications

Le virus d'Epstein-Barr (EBV) est un membre de la famille des virus de l'herpès gamma. Plus de 90 % de la population adulte a été infectée par l'EBV au cours de sa vie, ce qui se traduit par un statut porteur de l'EBV tout au long de la vie¹. La primo-infection pendant l'enfance est habituellement asymptomatique. Mais lorsque la primo-infection intervient durant l'adolescence ou plus tardivement, elle peut provoquer une mononucléose infectieuse à résolution spontanée³⁻⁴. L'EBV peut créer une infection lytique ou une infection latente. L'infection lytique s'accompagne d'une production de virus, de la lyse des cellules hôtes et d'une expression à grande échelle des protéines virales. L'infection lytique survient principalement dans certaines cellules épithéliales et aussi dans les lymphocytes B par l'intermédiaire du récepteur CD21⁵⁻⁸. Après la primo-infection, la latence est établie dans les lymphocytes B mémoires où seule une petite portion du génome viral est exprimée, évitant de ce fait la destruction par la réponse immunitaire de l'hôte. L'infection latente peut également se réactiver et permettre la dissémination du virus.

Parmi les affections associées à l'infection latente par l'EBV, citons le lymphome de Hodgkin, le lymphome non hodgkinien à cellules B, l'épithélioma du nasopharynx, les syndromes lymphoprolifératifs et le lymphome chez les personnes immunodéprimées, notamment les transplantés et les malades du sida, le cancer de l'estomac et certains lymphomes à cellules T⁷⁻¹². L'ARN encodé par le virus d'Epstein-Barr (EBER) est exprimé abondamment en cas d'infection latente par l'EBV¹⁻². Les transcrits ne sont pas polyadénylés et demeurent non traduits. La détection d'EBER par ISH est considérée comme une méthode sensible de détection de l'infection latente par l'EBV¹.

EBER Probe est utilisée dans la détection des transcrits d'EBER sur tissu fixé à la formaline et enrobé de paraffine. La méthode est reproductible et devrait se traduire par un marquage nucléaire marron intense des cellules contenant les transcrits d'EBER.

Réactifs Fournis

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

Volume total = 5,5 ml

Dilution et Mélange

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

Matériel Nécessaire Non Fourni

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

Conservation et Stabilité

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

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

Remettre à 2–8 °C immédiatement après usage.

Des conditions de stockage différentes de celles ci-dessus doivent être contrôlées par l'utilisateur¹³.

Précautions

- Ce produit est conçu pour le diagnostic *in vitro*.
- Pour obtenir une copie de la fiche technique des substances dangereuses, contactez votre distributeur local ou le bureau régional de Leica Biosystems, ou allez sur le site Web de Leica Biosystems, www.LeicaBiosystems.com.
- Les échantillons, avant et après fixation, et tous les matériels ayant été en contact avec eux, devraient être manipulés comme s'ils étaient à risque infectieux et éliminés avec les précautions 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 règlements fédéraux, nationaux et locaux pour l'élimination des composés potentiellement toxiques.
- Éviter une contamination microbienne des échantillons qui peut entraîner un marquage non spécifique.
- Des durées ou températures de révélation ou d'incubation autres que celles spécifiées peuvent donner des résultats erronés. Tout changement doit être validé par l'utilisateur.

Mode D'emploi

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

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

Contrôle de qualité

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

Contrôle positif du tissu

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

Contrôle négatif du tissu

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

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

Réactifs de contrôle

Il est recommandé d'utiliser des sondes avec réactifs de contrôle positif et négatif afin de pouvoir interpréter toute coloration ou absence de coloration de EBER Probe dans chaque échantillon de tissu.

Contrôle négatif du réactif

Il est recommandé d'utiliser une sonde de contrôle négatif RNA qui ne présente pas d'hybridation croisée avec des séquences humaines sur une coupe de chaque échantillon de patient, afin d'évaluer les colorations non spécifiques et de permettre une meilleure interprétation de toute coloration de cellules spécifiques. Le résultat attendu est l'absence de coloration.

Contrôle positif du réactif

Il est recommandé d'utiliser une sonde de contrôle positif RNA qui marque un ARN humain exprimé de manière ubiquitaire (par ex. U6) sur une coupe de chaque échantillon de patient afin de fournir des informations sur la préservation des acides nucléiques du tissu et de permettre à la sonde d'accéder aux acides nucléiques. Si la sonde de contrôle positif ne donne pas de coloration positive, tous les résultats des spécimens analysés doivent être considérés comme invalides.

Tissu du patient

Examinez en dernier lieu les échantillons de patient marqués à l'aide d'EBER Probe. L'intensité de la coloration positive doit être évaluée dans le contexte de la coloration observée avec les sondes de contrôle positif et négatif.

Résultats Attendus

Tissus sains

Aucune coloration spécifique de l'ARNm avec EBER n'a été détectée à l'aide de PB0589 dans un grand nombre de tissus normaux. Une légère coloration a été détectée dans les cellules épithéliales de la thyroïde, de la prostate, du larynx et de l'œsophage, des tubules du rein, des cellules sécrétrices dans les glandes surrénales et les cellules de Leydig. Cette coloration ne gêne pas l'interprétation de la coloration. (Nombre total de cas normaux évalués = 98).

Tissus tumoraux

PB0589 a coloré 3/5 lymphomes d'Hodgkin. Aucune coloration n'a été observée dans les tumeurs pulmonaires (0/3), tumeurs ovariennes (0/3), tumeurs du foie (0/3), tumeurs de la thyroïde (0/3), tumeurs de l'œsophage (0/2), tumeurs mammaires (0/2), tumeurs métastatiques d'origine inconnue (0/2), tumeurs du cerveau (0/2), tumeurs testiculaires (0/2), tumeurs de la peau (0/2), une tumeur du côlon (0/1), une tumeur de l'estomac (0/1), une tumeur rectale (0/1), une tumeur du larynx (0/1) et une tumeur du thymus (0/1). (Nombre total de cas anormaux évalués = 34).

PB0589 est recommandé pour la détection de l'ARNm avec EBER.

Limites Spécifiques du Produit

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

Dépannage

La référence 15 peut faciliter les mesures correctrices.

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

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

Informations Complémentaires

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

Références

1. Chang KL, Chen YY, Shibata D et al. Description of an *in situ* hybridisation methodology for detection of Epstein-Barr virus RNA in paraffin-embedded tissues, with a survey of normal and neoplastic tissues. *Diagnostic Molecular Pathology*. 1992;1(4):246–255.
2. Ambinder RF, Mann RB. Epstein-Barr-encoded RNA *in situ* hybridization: diagnostic applications. *Hum Pathol*. Jun; 25(6):602–5, 1994.
3. Joncas J, Boucher J, Granger-Julien M et al. Epstein-Barr virus infection in the neonatal period and in childhood. *CMAJ*. 1974;110:33–37.
4. Niederman JC, McCollum RW, Henle G et al. Infectious mononucleosis:clinical manifestations in relation to EB virus antibodies. *JAMA*. 1968;203:205–209.
5. Sixbey JW, Vesterinen EH, Nedrud JG et al. Replication of Epstein-Barr virus in human epithelial cells infected *in vitro*. *Nature* 1983;306:480–3.
6. Fingeroth JD, Weis JJ, Tedder TF et al. Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes in the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:4510–4.
7. Weiss LM, Movahed LA, Warnke RA et al. Detection of Epstein Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's Disease. *NEJM*. 1989;302(8):502–506.
8. Hummel M, Agnostopolous I, Korbjuhn P et al. Epstein Barr virus in B cell non Hodgkins lymphoma. *J Pathol*. 1995;175(3):263–271.
9. Brousset P, Bulet V, Chittal S et al. Comparison of *in situ* hybridisation using different isotopic probes for detection of nasopharyngeal carcinoma and immunohistochemical correlation with anti-latent membrane protein antibody. *Lab Invest*. 1992;67(4):457–464.
10. Oudejans JJ, Jiwa M, van den Brule AJ et al. Detection of heterogeneous Epstein-Barr virus gene expression patterns within individual post-transplant lymphoproliferative disorders. *Am J Pathol*. 1995;147(4):923–933.
11. Luo B, Wang Y, Xiao-Feng W et al. Expression of Epstein-Barr virus genes in EBV-associated carcinomas. *World J Gastroenterol*. 2005;11(5):629–633.
12. Teramoto N, Sarker AB, Tonoyama Y et al. Epstein-Barr virus infection in neoplastic and non-neoplastic cells of lymphoid malignancies. *Cancer*. 1996;77(11):2339–2347.
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. Wilkinson DG. The theory and practice of *in situ* hybridization. In: Wilkinson DG. (ed.) *In situ* Hybridization A practical approach. 2nd Edition. New York: Oxford University Press, 1998, pp.18–20.

Date de la Version

30 avril 2020

BOND Ready-to-Use ISH

EBER Probe

N. catalogo: PB0589

Uso Previsto

Reagente per uso diagnostico *in vitro*.

L'uso della EBER Probe è previsto per l'identificazione qualitativa dell'infezione latente da EBV¹⁻² in sezioni di tessuto fissate in formalina, incluse in paraffina attraverso l'ibridazione *in situ* (ISH, *In situ* Hybridization) con il sistema automatizzato BOND (include il sistema Leica BOND-MAX e il sistema Leica BOND-III).

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

Sintesi e Note Esplicative

Il virus di Epstein-Barr (EBV) appartiene alla famiglia dei gamma herpes virus. Nel corso della vita più del 90% della popolazione adulta viene infettata dall'EBV, acquisendo lo stato di portatore EBV per tutta la vita¹. L'infezione primaria nell'infanzia è di solito asintomatica, ma se la si contrae durante l'adolescenza o in seguito può provocare una mononucleosi infettiva autolimitante³⁻⁴. L'EBV può indurre tanto un'infezione litica quanto un'infezione latente. Durante l'infezione litica si assiste alla produzione di virus, alla lisi delle cellule dell'ospite e a un'ampia espressione di proteine virali. L'infezione litica interessa principalmente alcune cellule epiteliali, nonché i linfociti B, attraverso il recettore CD21⁵⁻⁶. In seguito all'infezione primaria si instaura la latenza nei linfociti B a memoria quiescenti, nei quali viene espressa solo una piccola parte del genoma virale, che quindi non viene distrutto dalla risposta immunitaria. È anche possibile la riattivazione dell'infezione latente con la conseguente diffusione del virus.

L'infezione latente da EBV si associa a diverse condizioni, tra le quali il linfoma di Hodgkin, il linfoma non Hodgkin a cellule B, il carcinoma nasofaringeo, i disordini linfoproliferativi e il linfoma in individui immunosoppressi compresi i pazienti trapiantati e quelli affetti da AIDS, il carcinoma gastrico e alcuni linfomi a cellule T⁷⁻¹².

L'EBER (Epstein Barr Virus encoded RNA) viene espresso in abbondanza nell'infezione latente da EBV¹⁻². I trascritti di EBER non sono poliadenilati e rimangono non tradotti. L'individuazione dell'EBER attraverso l'ISH è considerata un metodo sensibile per la rilevazione dell'infezione latente da EBV¹.

La EBER Probe viene utilizzata per l'individuazione dei trascritti di EBER in sezioni di tessuto fissate in formalina, incluse in paraffina. Il metodo è riproducibile e deve determinare una intensa colorazione marrone del nucleo delle cellule che contengono trascritti di EBER

Reagenti Forniti

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

Volume totale = 5,5 ml

Diluizione e Miscelazione

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

Materiali Necessari Ma Non Forniti

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

Conservazione e Stabilità

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

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

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

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

Precauzioni

- L'uso previsto del prodotto è per uso diagnostico *in vitro*.
- 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 pelle e le membrane mucose. Se un reagente o un campione viene a contatto con superfici sensibili, lavare abbondantemente con acqua. Consultare un medico.
- Consultare la normativa nazionale, regionale o locale vigente per lo smaltimento dei componenti potenzialmente tossici.
- Ridurre al minimo la contaminazione microbica dei reagenti per evitare il rischio di una colorazione non specifica.
- Tempi o temperature di incubazione diversi da quelli specificati possono fornire risultati erranei. Ogni eventuale modifica deve essere validata dall'utente.

Istruzioni per l'uso

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

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

Controllo di qualità

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

Controllo positivo del tessuto

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

Controllo negativo del tessuto

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

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

Reagenti di controllo

Si consiglia l'utilizzo di reagenti di controllo negativo e positivo per l'interpretazione della colorazione di qualsiasi sonda EBER o della sua assenza su ciascun campione di tessuto.

Controllo negativo del reagente

Si consiglia l'utilizzo di una sonda di controllo negativo per RNA che non porti a ibridazione incrociata con sequenze umane su una sezione di ogni campione del paziente per esaminare la colorazione non specifica e consentire una migliore interpretazione di qualsiasi colorazione in cellule specifiche. Il risultato atteso è l'assenza di colorazione.

Controllo positivo del reagente

Si consiglia l'utilizzo di una sonda di controllo positivo per RNA che identifichi un'unità di trascrizione umana espressa in modo molto diffuso (ad es. U6) su una sezione di ogni campione del paziente per ottenere informazioni sulla conservazione degli acidi nucleici nel tessuto nonché sull'accessibilità degli acidi nucleici alla sonda. Se la sonda di controllo positivo non mostra una colorazione positiva, i risultati ottenuti con i campioni del test devono essere considerati non validi.

Tessuto del paziente

I campioni del paziente colorati con EBER Probe devono essere esaminati per ultimi. L'intensità della colorazione positiva deve essere valutata nel contesto di qualsiasi colorazione osservata con le sonde di controllo negativo e positivo.

Risultati Attesi

Tessuti normali

Non è stata rilevata colorazione specifica di mRNA EBER utilizzando PB0589 in una vasta gamma di tessuti normali. È stata rilevata una colorazione indistinta nelle cellule epiteliali di tiroide, prostata, laringe ed esofago, tubuli renali, cellule secretive nelle ghiandole surrenali e cellule di Leydig. Tale colorazione non interferisce con l'interpretazione della colorazione. (Numero totale di casi normali esaminati = 98).

Tessuti neoplastici

PB0589 ha colorato 3/5 linfomi di Hodgkin. Non è stata riscontrata colorazione nei tumori ai polmoni (0/3), tumori alle ovaie (0/3), tumori al fegato (0/3), tumori tiroidei (0/3), tumori esofagei (0/2), tumori mammari (0/2), tumori metastatici di origine ignota (0/2), tumori al cervello (0/2), tumori testicolari (0/2), tumori della pelle (0/2), tumore del colon (0/1), tumore allo stomaco (0/1), tumore del retto (0/1), tumore della laringe (0/1) e tumore del timo (0/1). (Numero totale di casi anormali esaminati = 34).

PB0589 è consigliata per il rilevamento di mRNA EBER.

Limitazioni Specifiche del Prodotto

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

Individuazione e Risoluzione dei Problemi

Il riferimento bibliografico n. 15 può essere di aiuto per le azioni di rimedio.

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

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

Altre Informazioni

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

Bibliografia

1. Chang KL, Chen YY, Shibata D et al. Description of an *in situ* hybridisation methodology for detection of Epstein-Barr virus RNA in paraffin-embedded tissues, with a survey of normal and neoplastic tissues. *Diagnostic Molecular Pathology*. 1992;1(4):246–255.
2. Ambinder RF, Mann RB. Epstein-Barr-encoded RNA *in situ* hybridization: diagnostic applications. *Hum Pathol*. Jun; 25(6):602–5, 1994.
3. Joncas J, Boucher J, Granger-Julien M et al. Epstein-Barr virus infection in the neonatal period and in childhood. *CMAJ*. 1974;110:33–37.
4. Niederman JC, McCollum RW, Henle G et al. Infectious mononucleosis: clinical manifestations in relation to EB virus antibodies. *JAMA*. 1968;203:205–209.
5. Sixbey JW, Vesterinen EH, Nedrud JG et al. Replication of Epstein-Barr virus in human epithelial cells infected *in vitro*. *Nature* 1983;306:480–3.
6. Fingeroth JD, Weis JJ, Tedder TF et al. Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes in the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:4510–4.
7. Weiss LM, Movahed LA, Warnke RA et al. Detection of Epstein Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's Disease. *NEJM*. 1989;302(8):502–506.
8. Hummel M, Agnostopolous I, Korbjuhn P et al. Epstein Barr virus in B cell non Hodgkins lymphoma. *J Pathol*. 1995;175(3):263–271.
9. Brousset P, Bulet V, Chittal S et al. Comparison of *in situ* hybridisation using different isotopic probes for detection of nasopharyngeal carcinoma and immunohistochemical correlation with anti-latent membrane protein antibody. *Lab Invest*. 1992;67(4):457–464.
10. Oudejans JJ, Jiwa M, van den Brule AJ et al. Detection of heterogeneous Epstein-Barr virus gene expression patterns within individual post-transplant lymphoproliferative disorders. *Am J Pathol*. 1995;147(4):923–933.
11. Luo B, Wang Y, Xiao-Feng W et al. Expression of Epstein-Barr virus genes in EBV-associated carcinomas. *World J Gastroenterol*. 2005;11(5):629–633.
12. Teramoto N, Sarker AB, Tonoyama Y et al. Epstein-Barr virus infection in neoplastic and non-neoplastic cells of lymphoid malignancies. *Cancer*. 1996;77(11):2339–2347.
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. 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

30 aprile 2020

BOND Ready-to-Use ISH

EBER Probe

Bestellnr.: PB0589

Verwendungszweck

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

EBER Probe ist für den qualitativen Nachweis einer latenten EBV-Infektion^{1,2} in formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe mittels *In-situ*-Hybridisierung (ISH) mit dem automatischen BOND-System (bestehend aus dem Leica BOND-MAX-System und dem Leica BOND-III-System) vorgesehen.

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

Zusammenfassung und Erläuterung

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) ist ein Mitglied der Gamma-Herpesvirusfamilie. Mehr als 90% der erwachsenen Bevölkerung werden im Verlauf ihres Lebens mit dem EBV infiziert, was in einem lebenslangen EBV-Überträgerstatus resultiert¹. Die Primärinfektion im Kindesalter verläuft meist ohne Symptome. Wenn die Primärinfektion jedoch während der Adoleszenz oder später erfolgt, kann sie eine selbstlimitierende infektiöse Mononukleose auslösen^{3,4}. Das EBV kann sowohl eine lytische als auch eine latente Infektion verursachen. Bei einer lytischen Infektion kommt es zu einer Produktion von Viren, der Lyse von Wirtszellen und einer verbreiteten Expression von Virusproteinen. Eine lytische Infektion erfolgt überwiegend über den CD21-Rezeptor in bestimmten Epithelzellen sowie B-Zellen⁵⁻⁶. Nach der Primärinfektion verbleibt das Virus in latenter Form in ruhenden B-Gedächtniszellen, in denen nur ein geringer Teil des viralen Genoms exprimiert wird, wodurch die Zerstörung durch die Immunantwort des Wirts verhindert wird. Wenn die latente Infektion reaktiviert wird, kann das Virus sich verbreiten.

Eine latente EBV-Infektion ist mit mehreren Krankheitsbildern assoziiert, darunter: Hodgkin-Lymphom, Non-Hodgkin-B-Zell-Lymphom, Nasopharynxkarzinom, lymphoproliferative Krankheiten und Lymphome in immunsupprimierten Personen, darunter Transplantations- und AIDS-Patienten, Magenkrebs und einige T-Zell-Lymphome⁷⁻¹².

Während der latenten EBV-Infektion wird in hohem Maße vom Epstein-Barr-Virus kodierte RNA (Epstein Barr Virus encoded RNA, EBER) exprimiert^{1,2}. EBER-Transkripte sind nicht polyadenyliert und verbleiben untranslatiert. Der EBER-Nachweis mittels ISH wird als empfindliche Nachweismethode für eine latente EBV-Infektion angesehen¹.

EBER Probe wird für den Nachweis von EBER-Transkripten in formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe verwendet. Die Methode ist reproduzierbar und sollte zu einer intensiven braunen Färbung des Zellkerns von Zellen führen, die EBER-Transkripte enthalten.

Im Lieferumfang Enthaltene Reagenzien

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

Gesamtvolumen = 5,5 ml

Verdünnung und Mischung

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

Zusätzlich Benötigte Materialien

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

Aufbewahrung und Stabilität

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

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

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

Andere als die oben angegebenen Lagerungsbedingungen müssen vom Anwender selbst getestet werden¹³.

Vorsichtsmaßnahmen

- Dieses Produkt ist für die *In-vitro*-Diagnostik bestimmt.
- Ein Exemplar des Sicherheitsdatenblattes erhalten Sie von Ihrer örtlichen Vertriebsfirma, von der Regionalniederlassung von Leica Biosystems oder über die Webseite von Leica Biosystems unter www.LeicaBiosystems.com.
- Behandeln Sie Präparate vor und nach der Fixierung sowie sämtliche damit in Berührung kommenden Materialien so, als ob sie Infektionen übertragen könnten und entsorgen Sie sie mit den entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen¹⁴. Pipettieren Sie Reagenzien niemals mit dem Mund und vermeiden Sie den Kontakt von Haut oder Schleimhäuten mit Reagenzien oder Präparaten. Falls Reagenzien oder Präparate mit empfindlichen Bereichen in Kontakt kommen, spülen Sie diese mit reichlich Wasser. Holen Sie anschließend ärztlichen Rat ein.
- Beachten Sie bei der Entsorgung potentiell giftiger Bestandteile die behördlichen und örtlichen Vorschriften.
- Mikrobielle Kontaminationen sollten minimiert werden, da es sonst zu einer Zunahme unspezifischer Färbungen kommen kann.
- Die Verwendung anderer als die angegebenen Retrievals, Inkubationszeiten oder Temperaturen kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Diesbezügliche Änderungen müssen vom Anwender selbst getestet werden.

Gebrauchsanweisung

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

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

Qualitätskontrolle

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

Positive Gewebekontrolle

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

Negative Gewebekontrolle

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

Reagenzkontrollen

Die Verwendung negativer und positiver Reagenzkontrollsonden wird empfohlen, um jede EBER Probe-Färbung oder das Fehlen dieser auf den einzelnen Gewebeprobe zu interpretieren.

Negative Reagenzkontrolle

Es wird empfohlen, eine RNA-Negativkontrollsonde, die nicht mit humanen Sequenzen kreuzhybridisiert, auf einem Schnitt der einzelnen Patientenproben zu verwenden, um nichtspezifische Färbungen zu bewerten und eine bessere Interpretation von Färbungen in spezifischen Zellen zu ermöglichen. Das erwartete Ergebnis ist das Fehlen von Färbungen.

Positive Reagenzkontrolle

Es wird empfohlen, eine RNA-Positivkontrollsonde zu verwenden, die ein ubiquitär exprimiertes humanes Transkript (z. B. U6) auf einem Schnitt der einzelnen Patientenproben markiert, um Informationen über den Erhalt von Nukleinsäuren im Gewebe sowie die Verfügbarkeit von Nukleinsäuren für die Sonde zu liefern. Wenn eine positive Kontrollsonde keine positive Färbung aufweist, sind die mit Testproben erzielten Ergebnisse als ungültig zu betrachten.

Patientengewebe

Die mit der EBER Probe gefärbten Patientenproben sind zuletzt zu untersuchen. Die Intensität der positiven Färbung sollte im Kontext jeder mit den negativen und positiven Kontrollsonden erzielten Färbung interpretiert werden.

Erwartete Ergebnisse

Normale Gewebe

PB0589 zeigte an einem breiten Spektrum normaler Gewebe keine spezifische EBER-mRNA-Anfärbung. Eine schwache Färbung wurde in den Epithelzellen von Schilddrüse, Prostata, Larynx und Ösophagus, den Tubuli der Niere, den sekretorischen Zellen der Nebenniere und in Leydig-Zellen beobachtet. Diese Färbung hat keinen Einfluss auf die Interpretation der Färbungen. (Anzahl der insgesamt untersuchten Normalgewebeprobe = 98).

Tumorgewebe

PB0589 färbte 3/5 Hodgkin-Lymphomen. Bei Tumoren von Lunge (0/3), Eierstöcken (0/3), Leber (0/3), Schilddrüse (0/3), Ösophagus (0/2), Brust (0/2), metastatischen Tumoren unbekanntem Ursprungs (0/2), Tumoren von Gehirn (0/2), Testikeln (0/2), Haut (0/2) und je einem Tumor von Colon (0/1), Magen (0/1), Rektum (0/1), Larynx (0/1) und Thymus (0/1) wurde keine Färbung nachgewiesen. (Anzahl der insgesamt untersuchten pathologischen Gewebeprobe = 34).

PB0589 wird für die Bestimmung der EBER-mRNA empfohlen.

Produktspezifische Einschränkungen

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

Fehlersuche

Maßnahmen zur Abhilfe beim Auftreten von Fehlern finden Sie in Referenz 51.

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

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

Weitere Informationen

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

Referenzen

1. Chang KL, Chen YY, Shibata D et al. Description of an *in situ* hybridisation methodology for detection of Epstein-Barr virus RNA in paraffin-embedded tissues, with a survey of normal and neoplastic tissues. *Diagnostic Molecular Pathology*. 1992;1(4):246–255.
2. Ambinder RF, Mann RB. Epstein-Barr-encoded RNA *in situ* hybridization: diagnostic applications. *Hum Pathol*. Jun; 25(6):602–5, 1994.
3. Joncas J, Boucher J, Granger-Julien M et al. Epstein-Barr virus infection in the neonatal period and in childhood. *CMAJ*. 1974;110:33–37.
4. Niederman JC, McCollum RW, Henle G et al. Infectious mononucleosis:clinical manifestations in relation to EB virus antibodies. *JAMA*. 1968;203:205–209.
5. Sixbey JW, Vesterinen EH, Nedrud JG et al. Replication of Epstein-Barr virus in human epithelial cells infected *in vitro*. *Nature* 1983;306:480–3.
6. Fingeroth JD, Weis JJ, Tedder TF et al. Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes in the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:4510–4.
7. Weiss LM, Movahed LA, Warnke RA et al. Detection of Epstein Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's Disease. *NEJM*. 1989;302(8):502–506.
8. Hummel M, Agnostopolous I, Korbjuhn P et al. Epstein Barr virus in B cell non Hodgkins lymphoma. *J Pathol*. 1995;175(3):263–271.
9. Brousset P, Bulet V, Chittal S et al. Comparison of *in situ* hybridisation using different isotopic probes for detection of nasopharyngeal carcinoma and immunohistochemical correlation with anti-latent membrane protein antibody. *Lab Invest*. 1992;67(4):457–464.
10. Oudejans JJ, Jiwa M, van den Brule AJ et al. Detection of heterogeneous Epstein-Barr virus gene expression patterns within individual post-transplant lymphoproliferative disorders. *Am J Pathol*. 1995;147(4):923–933.
11. Luo B, Wang Y, Xiao-Feng W et al. Expression of Epstein-Barr virus genes in EBV-associated carcinomas. *World J Gastroenterol*. 2005;11(5):629–633.
12. Teramoto N, Sarker AB, Tonoyama Y et al. Epstein-Barr virus infection in neoplastic and non-neoplastic cells of lymphoid malignancies. *Cancer*. 1996;77(11)2339–2347.
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. Wilkinson DG. The theory and practice of *in situ* hybridization. In: Wilkinson DG. (ed.) *In situ* Hybridization A practical approach. 2nd Edition. New York: Oxford University Press, 1998, pp.18–20.

Datum der Herausgabe

30 April 2020

BOND Ready-to-Use ISH

EBER Probe

Catálogo N.º.: PB0589

Uso Propuesto

Este reactivo es para uso diagnóstico *in vitro*.

EBER Probe es para uso en la identificación de la infección latente por EBV ¹⁻² en tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina por hibridación *in situ* (ISH) usando el sistema automatizado BOND (incluye el sistema Leica BOND-MAX y el sistema Leica BOND-III).

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

Resumen y Explicación

El virus de Epstein-Barr (EBV) es un miembro de la familia de los herpesvirus gamma. Más del 90% de la población adulta resulta infectada por EBV durante su vida, y adquiere el estado de portador a largo plazo del EBV¹. La infección primaria durante la infancia suele ser asintomática, pero cuando esta infección primaria se produce durante la adolescencia o después, puede provocar mononucleosis infecciosa de remisión espontánea²⁻⁴. El EBV puede asentarse como infección lítica y como infección latente. Durante la infección lítica, hay producción de virus, lisis de las células que lo alojan y una amplia expresión de proteínas víricas. La infección lítica se presenta principalmente en ciertas células epiteliales, así como en linfocitos B a través del receptor CD21⁵⁻⁶. Después de la infección primaria, se establece la latencia en linfocitos B de memoria en reposo donde sólo se expresa una pequeña parte del genoma vírico, lo que evita su destrucción debido a la respuesta inmunitaria del huésped. La infección latente puede también reactivarse y permitir que se propague el virus.

La infección latente por EBV está asociada a varias enfermedades, entre las que se incluyen los siguientes: linfoma de Hodgkin, linfoma de células B no de Hodgkin, carcinoma nasofaríngeo, trastornos linfoproliferativos y linfoma en inmunosuprimidos, con pacientes sometidos a trasplantes y pacientes de SIDA, cáncer gástrico y algunos linfomas de células T⁷⁻¹².

En la infección latente por EBV se expresa abundante ARN codificado por este virus (EBER)¹⁻². Las transcripciones de EBER no son poliadeniladas y permanecen sin traducir. La detección de EBER mediante ISH se considera un método sensible para la detección de la infección latente por EBV¹.

EBER Probe se utiliza para detectar transcripciones de EBER en tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina. El método es reproducible y debe producir una tinción nuclear intensa, de color marrón, de las células que contienen transcripciones de EBER.

Reactivos Suministrados

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

Volumen total = 5,5 mL

Dilución y Mezcla

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

Materiales Necesarios Pero No Suministrados

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

Conservación y Estabilidad

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

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

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

Si las condiciones de conservación son diferentes de las especificadas, el usuario debe realizar las comprobaciones necesarias¹³.

Precauciones

- Este producto es para uso diagnóstico *in vitro*.
- Si desea obtener un ejemplar de la Hoja de datos de seguridad de los materiales, póngase en contacto con su distribuidor o con la oficina regional de Leica Biosystems, o visite la página Web de Leica Biosystems en www.LeicaBiosystems.com.
- Las muestras, antes y después de ser fijadas, y cualquier material en contacto con ellas, deben ser tratados como sustancias capaces de transmitir infecciones y deben ser eliminadas con las precauciones correspondientes¹⁴. No pipetee nunca los reactivos con la boca, y evite el contacto de la piel y las mucosas con reactivos o muestras. Si algún reactivo o alguna muestra entra en contacto con zonas sensibles, lávelas con agua abundante. Consulte a un médico.
- Consulte la normativa federal, nacional o local referente a la eliminación de sustancias potencialmente tóxicas.
- Minimice la contaminación microbiana de los reactivos, ya que puede producir un aumento de las tinciones inespecíficas.
- Los tiempos de exposición e incubación, y las temperaturas diferentes de las especificadas pueden dar resultados erróneos. Cualquier cambio que se produzca deberá ser validado por el usuario.

Instrucciones de Uso

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

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

Control de calidad

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

Control positivo de tejido

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

Control negativo de tejido

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

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

Controles de reactivo

Se recomienda el uso de sondas para controles de reactivo positivo para interpretar cualquier tinción de reactivo de sonda EBER, o su ausencia, en cada muestra de tejido.

Control negativo de reactivo

Se recomienda utilizar una sonda de control negativo para ARN que no realice una hibridación cruzada con secuencias humanas en una sección de cada preparación de paciente para evaluar la tinción inespecífica y permitir una mejor interpretación de cualquier tinción en células específicas. El resultado previsto es la ausencia de tinción.

Control positivo de reactivo

Se recomienda utilizar una sonda de control positivo para ARN que etiquete una transcripción humana expresada ampliamente (p. ej. U6) en una sección de cada preparación de paciente para ofrecer información sobre la preservación de ácidos nucleicos en el tejido, así como la accesibilidad de los ácidos nucleicos a la sonda. Si una sonda de control positivo no muestra tinción positiva, los resultados de las preparaciones de prueba deben considerarse no válidos.

Tejido del paciente

Examine las preparaciones de los pacientes teñidas con EBER Probe al final. La intensidad de la tinción positiva debería evaluarse dentro del contexto de cualquier tinción observada con las sondas de control positivo y negativo.

Resultados Esperados

Tejidos normales

Al emplear PB0589, en una amplia gama de tejidos sanos no se detectó tinción de ARNm específico de EBER. Se detectó una ligera tinción en células epiteliales de la glándula tiroidea, la próstata, la laringe y el esófago, y en los túbulos del riñón, las células secretoras de las glándulas suprarrenales y las células de Leydig. Esta tinción no afectó a la interpretación. (Número total de casos normales evaluados = 98).

Tejidos tumorales

PB0589 tiñó 3/5 linfomas de Hodgkin. No se observó tinción en los cánceres de pulmón (0/3), los cánceres ováricos (0/3), los cánceres hepáticos (0/3), los cánceres tiroideos (0/3), los cánceres esofágicos (0/2), los cánceres de mama (0/2), los cánceres metastásicos de origen desconocido (0/2), los tumores cerebrales (0/2), los tumores testiculares (0/2), los cánceres de piel (0/2), el cáncer de colon (0/1), el cáncer gástrico (0/1), el tumor rectal (0/1), el cáncer de laringe (0/1) y el cáncer de timo (0/1). (Número total de casos anormales evaluados = 34).

Se recomienda PB0589 para detectar el ARNm de EBER.

Limitaciones Específicas del Producto

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

Solución de Problemas

La referencia 15 puede ayudar en las acciones correctoras.

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

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

Para Obtener Más Información

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

Referencias

1. Chang KL, Chen YY, Shibata D et al. Description of an *in situ* hybridisation methodology for detection of Epstein-Barr virus RNA in paraffin-embedded tissues, with a survey of normal and neoplastic tissues. *Diagnostic Molecular Pathology*. 1992;1(4):246–255.
2. Ambinder RF, Mann RB. Epstein-Barr-encoded RNA *in situ* hybridization: diagnostic applications. *Hum Pathol*. Jun; 25(6):602–5, 1994.
3. Joncas J, Boucher J, Granger-Julien M et al. Epstein-Barr virus infection in the neonatal period and in childhood. *CMAJ*. 1974;110:33–37.
4. Niederman JC, McCollum RW, Henle G et al. Infectious mononucleosis: clinical manifestations in relation to EB virus antibodies. *JAMA*. 1968;203:205–209.
5. Sixbey JW, Vesterinen EH, Nedrud JG et al. Replication of Epstein-Barr virus in human epithelial cells infected *in vitro*. *Nature* 1983;306:480–3.
6. Fingerth JD, Weis JJ, Tedder TF et al. Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes in the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:4510–4.
7. Weiss LM, Movahed LA, Warnke RA et al. Detection of Epstein Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's Disease. *NEJM*. 1989;302(8):502–506.
8. Hummel M, Agnostopolous I, Korbjuhn P et al. Epstein Barr virus in B cell non Hodgkins lymphoma. *J Pathol*. 1995;175(3):263–271.
9. Brousset P, Bulet V, Chittal S et al. Comparison of *in situ* hybridisation using different isotopic probes for detection of nasopharyngeal carcinoma and immunohistochemical correlation with anti-latent membrane protein antibody. *Lab Invest*. 1992;67(4):457–464.
10. Oudejans JJ, Jiwa M, van den Brule AJ et al. Detection of heterogeneous Epstein-Barr virus gene expression patterns within individual post-transplant lymphoproliferative disorders. *Am J Pathol*. 1995;147(4):923–933.
11. Luo B, Wang Y, Xiao-Feng W et al. Expression of Epstein-Barr virus genes in EBV-associated carcinomas. *World J Gastroenterol*. 2005;11(5):629–633.
12. Teramoto N, Sarker AB, Tonoyama Y et al. Epstein-Barr virus infection in neoplastic and non-neoplastic cells of lymphoid malignancies. *Cancer*. 1996;77(11):2339–2347.
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. 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

30 de abril de 2020

BOND Ready-to-Use ISH

EBER Probe

Nº de catálogo: PB0589

Utilização Prevista

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

A EBER Probe destina-se a ser usada para a identificação qualitativa de infecção latente por EBV¹⁻² em tecidos fixos com formalina e incluídos em parafina por hibridização *in situ* (ISH) utilizando o sistema BOND (inclui o sistema Leica BOND-MAX e o sistema Leica BOND-III).

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

Resumo e Explicação

O Vírus de Epstein-Barr (EBV) é um membro da família de Vírus Herpes Gama. Mais de 90% da população adulta é infectada por EBV durante a sua vida, do que resulta um estado de portador vitalício de EBV¹. A infecção primária contraída durante a infância é habitualmente assintomática, mas quando a infecção primária ocorre durante a adolescência ou mais tarde, pode dar origem a uma mononucleose infecciosa auto-limitada³⁻⁴. O EBV pode estabelecer tanto infecção lítica como infecção latente. Durante a infecção lítica, existe produção do vírus, lise das células hospedeiras e uma ampla expressão de proteínas virais. A infecção lítica ocorre predominantemente nalgumas células epiteliais, bem como em linfócitos B, através do receptor CD21⁵⁻⁶. Após a infecção primária, é estabelecida latência nos linfócitos B de memória em repouso, onde é expressa apenas uma pequena parte do genoma viral, evitando-se assim a destruição pela resposta imune do hospedeiro. A infecção latente também se pode reactivar, permitindo a disseminação do vírus.

A infecção latente por EBV associa-se a várias doenças, incluindo: Linfoma de Hodgkin, linfoma não Hodgkin de linfócitos B, carcinoma nasofaríngeo, doenças linfoproliferativas e linfoma no imunossuprimido, incluindo doentes transplantados e com SIDA, cancro gástrico e alguns linfomas de linfócitos T⁷⁻¹².

O ARN codificado pelo Vírus de Epstein Barr (EBER) apresenta uma expressão abundante na infecção latente por EBV¹⁻². As cópias de EBER são não poliadeniladas e permanecem não transcritas. A detecção de EBER por ISH é considerada um método sensível para a detecção de infecção latente por EBV¹.

A EBER Probe é usada na detecção de cópias de EBER em tecidos fixos com formalina e incluídos em parafina. O método é reprodutível e deve originar uma coloração nuclear intensa e castanha de células contendo cópias de EBER.

Reagentes Fornecidos

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

Volume total = 5,5 mL

Diluição e Mistura

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

Materiais Necessários Mas Não Fornecidos

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

Armazenamento e Estabilidade

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

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

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

Condições de armazenamento diferentes das acima especificadas devem ser confirmadas pelo utilizador¹³.

Precauções

- Este produto destina-se a utilização diagnóstica *in vitro*.
- 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 e reagentes ou amostras. Se reagentes ou amostras entrarem em contacto com áreas sensíveis, lave-as com uma quantidade abundante de água. Consulte um médico.
- Consulte os regulamentos federais, estaduais e locais relativamente à eliminação de quaisquer componentes potencialmente tóxicos.
- Minimize a contaminação microbiana dos reagentes ou poderá ocorrer um aumento da coloração inespecífica.
- A utilização de tempos e temperaturas de recuperação e incubação diferentes dos especificados pode produzir resultados erróneos. Qualquer alteração deste tipo deve ser validada pelo utilizador.

Instruções de Utilização

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

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

Controlo de qualidade

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

Controlo positivo do tecido

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

Controlo negativo do tecido

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

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

Controlos de reagente

O uso das sondas de controlo de reagente negativo e positivo é recomendado para interpretar qualquer coloração de sonda EBER ou a sua ausência em cada amostra de tecido.

Controlo negativo do reagente

Recomenda-se a utilização de uma sonda de controlo negativo de RNA que não faça hibridação cruzada com sequências humanas numa secção de cada espécime de doente para avaliar a coloração não específica e permitir uma melhor interpretação de qualquer coloração em células específicas. O resultado esperado é a ausência de coloração.

Controlo positivo do reagente

Recomenda-se a utilização de uma sonda de controlo positivo de RNA que etiquete uma transcrição humana expressa omnipresentemente (por ex. U6) numa secção de cada espécime de doente para fornecer informações sobre a preservação de ácidos nucleicos bem como a acessibilidade de ácidos nucleicos às sondas. Se uma sonda de controlo positivo não demonstrar uma coloração positiva, quaisquer resultados obtidos com os espécimes de testes devem ser considerados inválidos.

Tecido do doente

Examinar os espécimes do doente coloridos com a sonda EBER Probe em último lugar. A intensidade da coloração positiva deve ser avaliada dentro do contexto de qualquer coloração vistas com as sondas de controlo negativo e positivo.

Resultados Esperados

Tecidos normais

Não foi detetada nenhuma coloração específica do ARNm EBER utilizando o PB0589 numa grande variedade de tecidos normais. Foi detetada uma coloração fraca em células epiteliais da tiróide, próstata, laringe e esófago, túbulos renais, células secretoras nas glândulas adrenais e células de Leydig. Esta coloração não interfere com a interpretação da coloração. (Número total de casos normais avaliados = 98).

Tecidos tumorais

O PB0589 corou 3/5 linfomas de Hodgkin. Não foram observadas colorações em tumores pulmonares (0/3), tumores ováricos (0/3), tumores hepáticos (0/3), tumores da tiróide (0/3), tumores esofágicos (0/2), tumores mamários (0/2), tumores metastáticos de origem desconhecida (0/2), tumores cerebrais (0/2), tumores testiculares (0/2), tumores da pele (0/2), um tumor do cólon (0/1), um tumor do estômago (0/1), um tumor do reto (0/1), um tumor da laringe (0/1) e tumores do timo (0/1). (Número total de casos anormais avaliados = 34).

O PB0589 é recomendado para a deteção de ARNm EBER.

Limitações Específicas do Produto

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

Resolução de Problemas

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

Bibliografia

1. Chang KL, Chen YY, Shibata D et al. Description of an *in situ* hybridisation methodology for detection of Epstein-Barr virus RNA in paraffin-embedded tissues, with a survey of normal and neoplastic tissues. *Diagnostic Molecular Pathology*. 1992;1(4):246–255.
2. Ambinder RF, Mann RB. Epstein-Barr-encoded RNA *in situ* hybridization: diagnostic applications. *Hum Pathol*. Jun; 25(6):602–5, 1994.
3. Joncas J, Boucher J, Granger-Julien M et al. Epstein-Barr virus infection in the neonatal period and in childhood. *CMAJ*. 1974;110:33–37.
4. Niederman JC, McCollum RW, Henle G et al. Infectious mononucleosis: clinical manifestations in relation to EB virus antibodies. *JAMA*. 1968;203:205–209.
5. Sixbey JW, Vestervinen EH, Nedrud JG et al. Replication of Epstein-Barr virus in human epithelial cells infected *in vitro*. *Nature* 1983;306:480–3.
6. Fingeroth JD, Weis JJ, Tedder TF et al. Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes in the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:4510–4.
7. Weiss LM, Movahed LA, Warnke RA et al. Detection of Epstein Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's Disease. *NEJM*. 1989;302(8):502–506.
8. Hummel M, Agnostopolous I, Korbjuhn P et al. Epstein Barr virus in B cell non Hodgkins lymphoma. *J Pathol*. 1995;175(3):263–271.
9. Brousset P, Bulet V, Chittal S et al. Comparison of *in situ* hybridisation using different isotopic probes for detection of nasopharyngeal carcinoma and immunohistochemical correlation with anti-latent membrane protein antibody. *Lab Invest*. 1992;67(4):457–464.
10. Oudejans JJ, Jiwa M, van den Brule AJ et al. Detection of heterogeneous Epstein-Barr virus gene expression patterns within individual post-transplant lymphoproliferative disorders. *Am J Pathol*. 1995;147(4):923–933.
11. Luo B, Wang Y, Xiao-Feng W et al. Expression of Epstein-Barr virus genes in EBV-associated carcinomas. *World J Gastroenterol*. 2005;11(5):629–633.
12. Teramoto N, Sarker AB, Tonoyama Y et al. Epstein-Barr virus infection in neoplastic and non-neoplastic cells of lymphoid malignancies. *Cancer*. 1996;77(11):2339–2347.
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. 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

30 de Abril de 2020

BOND Ready-to-Use ISH

EBER Probe

Artikelnummer: PB0589

Användningsområde

Reagenset är avsett för *in vitro*-diagnostik.

EBER Probe är avsett för användning vid kvalitativ identifikation av latent EBV-infektion¹⁻² i formalinfixerad, paraffinbäddad vävnad genom *in situ* hybridisering (ISH) i det automatiserade BOND-systemet (som innefattar systemen Leica BOND-MAX och Leica BOND-III).

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

Förklaring och Sammanfattning

Epstein-Barr-viruset (EBV) tillhör familjen gammaherpesvirus. Över 90 % av den vuxna befolkningen har någon gång haft en EBV-infektion, vilket resulterar i livslång status som EBV-bäare¹. Primär infektion under barndomen är vanligtvis asymtomatisk, men när primär infektion uppkommer under adolescensen eller senare kan den orsaka kroppsegen infektiös mononukleos³⁻⁴. EBV kan ge både lytisk infektion och latent infektion. Vid lytisk infektion produceras virus, lysis av värdcellerna och bred förekomst av virala proteiner. Lytisk infektion uppkommer huvudsakligen i vissa epitelceller, men även i B-lymfocyter via CD21-receptorn⁵⁻⁶. Efter den primära infektionen etableras latens i vilande B-lymfocytens minne då bara en liten del av den virala genuppsättningen visas och på så sätt undviker att förstöras av värdens immunrespons. Latent infektion kan även reaktiveras vilket gör att viruset sprids.

Latent EBV-infektion förknippas med ett antal sjukdomstillstånd såsom: Hodgkins lymfom, B-cells icke-Hodgkins lymfom, nasofarynxkarcinom, lymfoproliferativa störningar och lymfom hos immunosuppressiva individer, såsom transplantations- och AIDS-patienter, vid magsäckscancer och en del T-cells-lymfom⁷⁻¹².

Epstein-Barr-viruskodad RNA (EBER) förekommer rikligt vid latent EBV-infektion¹⁻². EBER-transkriptioner är icke-polyadenylerade och förblir otolkade. EBER-detektering med ISH är en känslig metod för att upptäcka latent EBV-infektion¹.

EBER Probe används vid detektering av EBER-transkriptioner i formalinfixerad, paraffinbäddad vävnad. Metoden är reproducerbar och bör resultera i en intensiv brun infärgning av kärnan i de celler som innehåller EBER-transkriptioner.

Ingående Reagens

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

Total volym = 5,5 ml

Spädning och Blandning

EBER Probe är färdig att användas. Reagenset behöver varken rekonstitueras, blandas, spädas eller titreras.

Nödvändigt Materiel Som Ej Medföljer

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

Förvaring och Stabilitet

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

Det finns inga uppenbara tecken som indikerar kontaminering och/eller instabilitet. Lämpliga positiva och negativa vävnadskontroller ska köras tillsammans 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.
- Du kan få tillgång till säkerhetsdatablad genom att kontakta en lokal distributör eller Leica Biosystems regionkontor. En annan möjlighet är Leica Biosystems webbsajt på www.LeicaBiosystems.com
- Prover, både före och efter fixeringen, och allt material som använts tillsammans med dem ska hanteras som infektiöst avfall enligt gängse praxis¹⁴. Pipettera aldrig reagenser med munnen och undvik att reagenser eller prover kommer i kontakt med hud och slemhinnor. Om reagenser eller prover kommer i kontakt med känsliga områden, skölj med stora mängder vatten. Sök läkarvård.
- Angående avfallshantering av potentiellt toxiska material hänvisar vi till gällande europeiska, nationella och lokala bestämmelser och förordningar.
- Minimera mikrobiologisk kontamination av reagens. Om detta inte görs kan det leda till en ökad icke-specifik infärgning.
- Återvinnande och andra inkubationstider eller temperaturer än de specificerade kan ge felaktiga resultat. Sådana förändringar ska valideras av användaren.

Instruktioner Vid Användning

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

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

Kvalitetskontroll

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

Positiv vävnadskontroll

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

Negativ vävnadskontroll

Bör undersökas efter den positiva vävnadskontrollen, för att bekräfta sondmärkningens specificitet gentemot målet.

Alternativt ger ofta den mängd olika celltyper som finns i de flesta vävnadssnitt upphov till negativa kontrollområden, men detta bör kontrolleras av användaren.

Reagenskontroller

Användning av sonder för negativa och positiva reagenskontroller rekommenderas för att tolka varje färgning av EBER-sonder eller frånvaro av färgning i varje vävnadsprov.

Negativ reagenskontroll

Det rekommenderas att man använder en RNA-sond för negativ kontroll som inte korshybridiserar med humana sekvenser för ett snitt av varje patientprov för att utvärdera icke-specifik färgning och möjliggöra bättre tolkning av eventuell färgning i specifika celler. Det förväntade resultatet är frånvaro av färgning.

Positiv reagenskontroll

Det rekommenderas att man använder en RNA-sond för positiv kontroll som etiketterar ett allmänt uttryckt humant transkript (t.ex. U6) för ett snitt i varje patientprov för att ge information om bevarande av nukleinsyror i vävnaden samt sondens tillgänglighet till nukleinsyror. Om den positiva kontrollsonden inte uppvisar positiv färgning bör alla resultat med testproverna anses vara ogiltiga.

Patientvävnad

Undersök patientprover färgade med EBER Probe sist. Positiv färgningsintensitet ska bedömas inom ramen för all färgning som observeras med de negativa och positiva kontrollsonderna.

Förväntade Resultat

Normala vävnader

Ingen specifik EBER mRNA-färgning detekterades med användning av PB0589 i flera olika normala vävnader. Svag färgning detekterades i epitelialceller i sköldkörteln, prostata, struphuvud samt matstrupe, njurgångar, sekretoriska celler i binjurarna samt Leydig-celler. Denna färgning interfererar inte med tolkning av färgningen. (Totalt antal utvärderade normalfall = 98).

Tumörvävnader

PB0589 färgade 3/5 Hodgkins lymfom. Ingen färgning sågs i lungtumörer (0/3), äggstockstumörer (0/3), levertumörer (0/3), sköldkörteltumörer (0/3), esofagealtumörer (0/2), brösttumörer (0/2), metastatiska tumörer av okänt ursprung (0/2), hjärntumörer (0/2), testikeltumörer (0/2), hudtumörer (0/2), en kolontumör (0/1), en magsäckstumör (0/1), en rektal tumör (0/1), en struphuvudstumör (0/1) samt en thymustumör (0/1). (Totalt antal utvärderade onormala fall = 34).

PB0589 rekommenderas för detektion av EBER mRNA.

Produktspecifika Begränsningar

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

Felsökning

Referens 15 kan vara till hjälp vid felsökningsåtgärd.

Testprover ska kompletteras med lämpliga vävnads- och reagenskontroller.

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

Mer Information

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

Referenser

1. Chang KL, Chen YY, Shibata D et al. Description of an *in situ* hybridisation methodology for detection of Epstein-Barr virus RNA in paraffin-embedded tissues, with a survey of normal and neoplastic tissues. *Diagnostic Molecular Pathology*. 1992;1(4):246–255.
2. Ambinder RF, Mann RB. Epstein-Barr-encoded RNA *in situ* hybridization: diagnostic applications. *Hum Pathol*. Jun; 25(6):602–5, 1994.
3. Joncas J, Boucher J, Granger-Julien M et al. Epstein-Barr virus infection in the neonatal period and in childhood. *CMAJ*. 1974;110:33–37.
4. Niederman JC, McCollum RW, Henle G et al. Infectious mononucleosis: clinical manifestations in relation to EB virus antibodies. *JAMA*. 1968;203:205–209.
5. Sixbey JW, Vesterinen EH, Nedrud JG et al. Replication of Epstein-Barr virus in human epithelial cells infected *in vitro*. *Nature* 1983;306:480–3.
6. Fingeroth JD, Weis JJ, Tedder TF et al. Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes in the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:4510–4.
7. Weiss LM, Movahed LA, Warnke RA et al. Detection of Epstein Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's Disease. *NEJM*. 1989;302(8):502–506.
8. Hummel M, Agnostopolous I, Korbjuhn P et al. Epstein Barr virus in B cell non Hodgkins lymphoma. *J Pathol*. 1995;175(3):263–271.
9. Brousset P, Bulet V, Chittal S et al. Comparison of *in situ* hybridisation using different isotopic probes for detection of nasopharyngeal carcinoma and immunohistochemical correlation with anti-latent membrane protein antibody. *Lab Invest*. 1992;67(4):457–464.
10. Oudejans JJ, Jiwa M, van den Brule AJ et al. Detection of heterogeneous Epstein-Barr virus gene expression patterns within individual post-transplant lymphoproliferative disorders. *Am J Pathol*. 1995;147(4):923–933.
11. Luo B, Wang Y, Xiao-Feng W et al. Expression of Epstein-Barr virus genes in EBV-associated carcinomas. *World J Gastroenterol*. 2005;11(5):629–633.
12. Teramoto N, Sarker AB, Tonoyama Y et al. Epstein-Barr virus infection in neoplastic and non-neoplastic cells of lymphoid malignancies. *Cancer*. 1996;77(11):2339–2347.
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. 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

30 april 2020

BOND Ready-to-Use ISH

EBER Probe

Αρ. καταλόγου: PB0589

Σκοπός Χρήσης

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

Το EBER Probe προορίζεται για χρήση στην ποιοτική ταυτοποίηση της λανθάνουσας EBV λοίμωξης^{1,2} σε μονιμοποιημένο με φορμόλη, ενσωματωμένο σε παραφίνη ιστό με *in situ* υβριδισμό (ISH) με χρήση του αυτοματοποιημένου συστήματος BOND (περιλαμβάνει το σύστημα Leica BOND-MAX και το σύστημα Leica BOND-III).

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

Περιλήψη και Επεξήγηση

Ο ιός Epstein-Barr (EBV) είναι μέλος της οικογένειας των γ ρηπιτοϊών. Πάνω από το 90% του ενήλικου πληθυσμού έχουν μολυνθεί με τον EBV κατά τη διάρκεια της ζωής τους, με αποτέλεσμα κατάσταση ισόβιου φορέα EBV¹. Η πρωτοπαθής λοίμωξη κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας είναι συνήθως ασυμπτωματική, αλλά όταν συμβεί πρωτοπαθής λοίμωξη κατά τη διάρκεια της εφηβείας ή αργότερα, μπορεί να προκαλέσει αυτεπιοριζόμενη λοίμωξη μονοκυττάρωση^{3,4}. Ο EBV μπορεί να εδραιώσει τόσο κυτταρολυτική λοίμωξη, όσο και λανθάνουσα λοίμωξη. Κατά τη διάρκεια της κυτταρολυτικής λοίμωξης, υπάρχει παραγωγή ιού, λύση των κυττάρων του ξενιστή και ευρεία έκφραση ιικών πρωτεϊνών. Κυτταρολυτική λοίμωξη συμβαίνει συνήθως σε ορισμένα επιθηλιακά κύτταρα, καθώς και σε B-λεμφοκύτταρα μέσω του υποδοχέα CD21⁵⁻⁸. Μετά από πρωτοπαθή λοίμωξη, εδραιώνεται λανθάνουσα κατάσταση σε ηρεμούντα B-λεμφοκύτταρα μνήμης, όπου εκφράζεται μόνον ένα μικρό τμήμα του ιικού γονιδιώματος, αποφεύγοντας επομένως την καταστροφή από την ανοσοαπόκριση του ξενιστή. Η λανθάνουσα λοίμωξη είναι δυνατόν επίσης να επανενεργοποιηθεί, επιτρέποντας την εξέλιξη του ιού.

Η λανθάνουσα EBV λοίμωξη σχετίζεται με διάφορες καταστάσεις, που περιλαμβάνουν: Λέμφωμα Hodgkin, B-κυτταρικό μη Hodgkin λέμφωμα, ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα, λεμφοεπιπλαστικές διαταραχές και λέμφωμα στους ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, συμπεριλαμβανομένων των ασθενών με μόσχευμα και AIDS, γαστρικό καρκίνο και μερικά T-κυτταρικά λεμφώματα⁷⁻¹².

Το κωδικοποιημένο από τον ιό Epstein Barr RNA (EBER) εκφράζεται άφθονα σε λανθάνουσα EBV λοίμωξη¹⁻². Τα μεταγραφώματα του EBER είναι μη πολυαδενυλιωμένα και παραμένουν μη μεταφραζόμενα. Η ανίχνευση του EBER με ISH θεωρείται μια ευσταθής μέθοδος για την ανίχνευση της λανθάνουσας EBV λοίμωξης¹.

Το EBER Probe χρησιμοποιείται στην ανίχνευση των μεταγραφωμάτων του EBER σε μονιμοποιημένο με φορμόλη, ενσωματωμένο σε παραφίνη ιστό. Η μέθοδος είναι αναπαραγωγίμη και πρέπει να έχει ως αποτέλεσμα έντονη, καστανή πυρηνική χρώση των κυττάρων που περιέχουν μεταγραφώματα του EBER.

Αντιδραστήρια Που Παρέχονται

Το EBER Probe είναι ένας συζευγμένος με φλουορεσκίνη ανιχνευτής ολιγονουκλεοτιδίων που παρέχεται σε διάλυμα υβριδισμού.

Συνολικός όγκος = 5,5 mL

Αραίωση και Ανάμιξη

Το EBER Probe είναι έτοιμο για χρήση. Δεν απαιτείται ανασύσταση, ανάμιξη, αραίωση ή πιλοδότηση του αντιδραστήριου αυτού.

Υλικά Που Απαιτούνται Αλλά Δεν Παρέχονται

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

Φύλαξη και Σταθερότητα

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

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

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

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

Προφυλάξεις

- Αυτό το προϊόν προορίζεται για διαγνωστική χρήση *in vitro*.
- Για να λάβετε ένα αντίτυπο του δελτίου δεδομένων ασφαλείας υλικού, επικοινωνήστε με τον τοπικό σας διανομέα ή τα περιφερειακά γραφεία της Leica Biosystems ή, εναλλακτικά, επισκεφθείτε τον ιστότοπο της Leica Biosystems, www.LeicaBiosystems.com.
- Τα δείγματα, πριν και μετά τη μονιμοποίηση, καθώς και όλα τα υλικά που εκτίθενται σε αυτά, πρέπει να υποβάλλονται σε χειρισμό ως δυνητικά μεταδοστές λοίμωξης και να απορρίπτονται με κατάλληλες προφυλάξεις¹⁴. Μην αναρροφάτε ποτέ με πιπέτα τα αντιδραστήρια ή με το στόμα και αποφεύγετε την επαφή του δέρματος και των βλεννογόνων με αντιδραστήρια ή δείγματα. Εάν τα αντιδραστήρια ή τα δείγματα έλθουν σε επαφή με ευαίσθητες περιοχές, πλύνετε με άφθονες ποσότητες νερού. Ζητήστε τη συμβουλή ιατρού.
- Συμβουλευτείτε τους τομοσπονδιακούς, πολιτειακούς ή τοπικούς κανονισμούς για απόρριψη τυχόν δυνητικών τοξικών συστατικών.
- Ελαχιστοποιήστε τη μικροβιακή μόλυνση των αντιδραστηρίων, διότι διαφορετικά ενδέχεται να αυξηθεί η μη ειδική χρώση.
- Ανάκτηση, χρόνοι ή θερμοκρασίες επίμαχης διαφορετικές από εκείνες που καθορίζονται ενδέχεται να δώσουν εσφαλμένα αποτελέσματα. Τυχόν τέτοια μεταβολή πρέπει να επικυρώνεται από το χρήστη.

Οδηγίες Χρήσης

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

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

Ποιοτικός έλεγχος

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

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 κατάλληλότερος από έναν ιστό με ισχυρή θετική χρώση για βέλτιστο ποιοτικό έλεγχο και για την ανίχνευση πολύ μικρών επιπέδων τυχόν αποδόμησης των αντιδραστηρίων.

Αρνητικός μάρτυρας ιστού

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

Έλεγχος μαρτύρων αντιδραστηρίου

Συνιστάται η χρήση ανιχνευτών ελέγχου μαρτύρων αντιδραστηρίου για την ερμηνεία τυχόν χρώσης ανιχνευτή EBER ή της αντίστοιχης απουσίας χρώσης σε κάθε ιστολογικό δείγμα.

Αρνητικός μάρτυρας αντιδραστηρίου

Συνιστάται η χρήση ανιχνευτή αρνητικού μάρτυρα RNA με τον οποίο δεν παρατηρείται διασταυρούμενη υβριδοποίηση με ανθρώπινες αλληλουχίες σε τμήμα κάθε δείγματος ασθενούς, προκειμένου να αξιολογείται η μη ειδική χρώση και να επιτρέπεται η καλύτερη ερμηνεία κάθε χρώσης σε συγκεκριμένα κύτταρα. Το αναμενόμενο αποτέλεσμα είναι η απουσία χρώσης.

Θετικός μάρτυρας αντιδραστηρίου

Συνιστάται η χρήση ανιχνευτή θετικού μάρτυρα RNA ο οποίος επισημαίνει ένα καθολικά εκφραζόμενο ανθρώπινο μεταγράφημα (π.χ. U6) σε τμήμα κάθε δείγματος ασθενούς, για την παροχή πληροφοριών σχετικά με τη διατήρηση των νουκλεϊκών οξέων καθώς και με την προσβασιμότητα των νουκλεϊκών οξέων στον ανιχνευτή. Εάν ο ανιχνευτής θετικού μάρτυρα δεν καταφέρει να αποδείξει θετική χρώση, τυχόν αποτελέσματα με τα υπό εξέταση δείγματα πρέπει να θεωρούνται άκυρα.

Ιστός ασθενούς

Εξετάστε τα δείγματα ασθενούς που έχουν χρωστεί τελευταία με EBER Probe. Η ένταση της θετικής χρώσης θα πρέπει να εκτιμάται στο πλαίσιο τυχόν χρώσης που παρατηρείται με τους ανιχνευτές αρνητικού και θετικού μάρτυρα.

Αναμενόμενα Αποτελέσματα

Φυσιολογικοί ιστοί

Κατά τη χρήση του PB0589 σε μεγάλο εύρος φυσιολογικών ιστών δεν παρατηρήθηκε ειδική χρώση mRNA με κωδικοποίηση για τον *Ιό Epstein-Barr* (EBER mRNA). Ασθενής χρώση παρατηρήθηκε σε επιθηλιακά κύτταρα του θυρεοειδή, του προστάτη, του λάρυγγα και του οισοφάγου, των νεφρικών σωληναρίων, σε εκκρινικά κύτταρα των επινεφριδίων και σε κύτταρα Leydig. Αυτή η χρώση δεν επηρεάζει την ερμηνεία της χρώσης. (Συνολικός αριθμός φυσιολογικών περιστατικών που αξιολογήθηκαν = 98).

Νεοπλασματικοί ιστοί

Κατά τη χρήση του PB0589 παρατηρήθηκε χρώση σε 3/5 λεμφώματα Hodgkin. Δεν παρατηρήθηκε χρώση σε όγκους των πνευμόνων (0/3), όγκους των ωοθηκών (0/3), όγκους του ήπατος (0/3), όγκους του θυρεοειδή (0/3), όγκους του οισοφάγου (0/2), όγκους του μαστού (0/2), μεταστατικούς όγκους ανώστου αιτιολογίας (0/2), όγκους του εγκεφάλου (0/2), όγκους των όρχεων (0/2), όγκους του δέρματος (0/2), έναν όγκο στο κόλον (0/1), έναν όγκο του στομάχου (0/1), έναν όγκο του ορθού (0/1), έναν όγκο του λάρυγγα (0/1) και έναν όγκο του θύμου αδένα (0/1). (Συνολικός αριθμός μη φυσιολογικών περιστατικών που αξιολογήθηκαν = 34).

Το PB0589 συνιστάται για την ανίχνευση EBER mRNA.

Ειδικό Περιορισμό Του Προϊόντος

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

Αντιμετώπιση Προβλημάτων

Η παραπομπή 15 ενδέχεται να βοηθήσει στην ενέργεια αποκατάστασης.

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

Για να αναφέρετε περιπτώσεις ασηνήσιατης χρώσης, επικοινωνήστε με τον τοπικό σας διανομέα ή τα περιφερειακά γραφεία της Leica Biosystems.

Πρόσθετες Πληροφορίες

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

Παραπομπές

1. Chang KL, Chen YY, Shibata D et al. Description of an *in situ* hybridisation methodology for detection of Epstein-Barr virus RNA in paraffin-embedded tissues, with a survey of normal and neoplastic tissues. *Diagnostic Molecular Pathology*. 1992;1(4):246–255.
2. Ambinder RF, Mann RB. Epstein-Barr-encoded RNA *in situ* hybridization: diagnostic applications. *Hum Pathol*. Jun; 25(6):602–5, 1994.
3. Joncas J, Boucher J, Granger-Julien M et al. Epstein-Barr virus infection in the neonatal period and in childhood. *CMAJ*. 1974;110:33–37.
4. Niederman JC, McCollum RW, Henle G et al. Infectious mononucleosis: clinical manifestations in relation to EB virus antibodies. *JAMA*. 1968;203:205–209.
5. Sixbey JW, Vesterinen EH, Nedrud JG et al. Replication of Epstein-Barr virus in human epithelial cells infected *in vitro*. *Nature* 1983;306:480–3.
6. Fingeroth JD, Weis JJ, Tedder TF et al. Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes in the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:4510–4.
7. Weiss LM, Movahed LA, Warnke RA et al. Detection of Epstein Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's Disease. *NEJM*. 1989;302(8):502–506.
8. Hummel M, Agnostopolous I, Korbjuhn P et al. Epstein Barr virus in B cell non Hodgkins lymphoma. *J Pathol*. 1995;175(3):263–271.
9. Brousset P, Bulet V, Chittal S et al. Comparison of *in situ* hybridisation using different isotopic probes for detection of nasopharyngeal carcinoma and immunohistochemical correlation with anti-latent membrane protein antibody. *Lab Invest*. 1992;67(4):457–464.
10. Oudejans JJ, Jiwa M, van den Brule AJ et al. Detection of heterogeneous Epstein-Barr virus gene expression patterns within individual post-transplant lymphoproliferative disorders. *Am J Pathol*. 1995;147(4):923–933.
11. Luo B, Wang Y, Xiao-Feng W et al. Expression of Epstein-Barr virus genes in EBV-associated carcinomas. *World J Gastroenterol*. 2005;11(5):629–633.
12. Teramoto N, Sarker AB, Tonoyama Y et al. Epstein-Barr virus infection in neoplastic and non-neoplastic cells of lymphoid malignancies. *Cancer*. 1996;77(11):2339–2347.
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. Wilkinson DG. The theory and practice of *in situ* hybridization. In: Wilkinson DG. (ed.) *In situ* Hybridization A practical approach. 2nd Edition. New York: Oxford University Press, 1998, pp.18–20.

Ημερομηνία Έκδοσης

30 Απριλίου 2020

BOND Ready-to-Use ISH

EBER Probe

Katalognummer: PB0589

Tilsigtet Anvendelse

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

EBER Probe er beregnet til anvendelse ved kvalitativ identifikation af latent EBV-infektion^{1,2} i formalinfixeret, paraffinindstøbt væv vha. *in situ*-hybridisering (ISH) med brug af det automatiske BOND-system (bestående af Leica BOND-MAX-systemet og Leica BOND-III-systemet).

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

Resumé og Forklaring

Epstein-Barr-virus (EBV) er et medlem af gamma-herpesvirus-gruppen. Over 90 % af den voksne befolkning inficeres med EBV i løbet af livet resulterende i livslang EBV-bærerstatus¹. Primær infektion i løbet af barndommen er i reglen symptomfri, men når primær infektion forekommer i ungdommen eller senere, kan den medføre selvbegrænsende infektiøs mononukleose³⁻⁴. EBV kan etablere såvel lytisk infektion som latent infektion. Under lytisk infektion, er der produktion af virus, lyses af værtscellerne og en udtalt ekspresion af virale proteiner. Lytisk infektion forekommer hovedsagelig i visse epiteliale celler samt B-lymfocytter via CD21-receptoren⁵⁻⁶. Efter primær infektion, etableres der latens hos hvilende memory-B-lymfocytter, hvor kun en lille del af det virale genom ekspreseres og derfor undgår destruktion forårsaget af værtens immunrespons. Latent infektion kan også reaktiveres og muliggøre spredning af virus.

Latent EBV-infektion associeres med adskillige sygdomme, herunder: Hodgkins lymfom, B-celle-non-Hodgkin-lymfom, nasofaryngealt karcinom, lymfoproliferative sygdomme og lymfom hos immunsupprimerede personer, herunder transplantations- og AIDS-patienter, ventrikelcancer og visse T-celle-lymfomer⁷⁻¹².

Epstein-Barr-virus-indkodet RNA (EBER) ekspreseres i rigelige mængder ved latent EBV-infektion^{1,2}. EBER-transkripter er ikke-polyadenylerede og forbliver utranslaterede. EBER-detektion vha. ISH anses for en følsom metode til detektion af latent EBV-infektion¹.

EBER Probe anvendes til detektion af EBER-transkripter i formalinfixeret, paraffinindstøbt væv. Metoden er reproducerbar og bør resultere i intens brun nukleær farvning af celler indeholdende EBER-transkripter.

Leverede Reagenser

EBER Probe er en fluoresceinkonjugeret oligonukleotidprobe leveret i hybridiseringsopløsning.

Totalt volumen = 5,5 ml

Fortynding og Blanding

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

Nødvendige Materialer, Der Ikke Medfølger

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

Opbevaring og Stabilitet

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

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

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

Opbevaringsforhold ud over de oven for specificerede skal verificeres af brugeren¹³.

Forholdsregler

- Dette produkt er beregnet til brug i *in vitro*-diagnostik.
- En kopi af sikkerhedsdatabladet (MSDS) kan fås ved henvendelse til den lokale distributør eller til Leica Biosystems' regionale kontor. Det kan tillige hentes på Leica Biosystems' hjemmeside www.LeicaBiosystems.com.
- Præparater, både før og efter fiksering, samt alle øvrige materialer, der eksponeres for disse, skal håndteres som værende i stand til at overføre infektion og skal bortskaffes under iagttagelse af passende 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 kontamination af reagenser skal minimeres for at undgå en øget ikke-specifik farvning.
- Genfindning, inkubationstider eller-temperaturer ud over de specificerede kan give fejlagtige resultater. Enhver ændring af denne art skal valideres af brugeren.

Brugsanvisning

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

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

Kvalitetskontrol

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

Positiv vævskontrol

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

Negativ vævskontrol

Skal undersøges efter den positive vævskontrol for at verificere specificiteten af mærkningen af proben 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.

Reagenskontroller

Brugen af negative og positive reagenskontrolsonder anbefales for fortolkningen af enhver EBER-sondefarvning, eller fraværet af den, på alle vævprøver.

Negativ reagenskontrol

Det anbefales at bruge RNA-negativ kontrolsonde, som ikke kryds-hybridiserer med menneskelige sekvenser, på et udsnit af menneskeprøven for at evaluere uspecifik farvning og for at muliggøre bedre fortolkning af farvning i specifikke celler. Det forventede resultat er mangel på farvning.

Positiv reagenskontrol

Det anbefales at bruge en RNA-positiv kontrolsonde, som mærker en allestedsnærværende udtrykt menneskekopi (f.eks. U6), på et udsnit af hver menneskeprøvepatient for at give oplysninger om bibeholdelsen af nukleinsyre i vævet, samt tilgængeligheden af nukleinsyre for sonden. Hvis en positiv kontrolsonde ikke kan vise positiv farvning, skal alle resultater af testen betragtes som ugyldige.

Patientvæv

Undersøg patientprøver farvet med EBER Probe sidst. Positiv farvningsintensitet skal vurderes inden for konteksten af enhver farvning, som ses med negative eller positive kontrolsonder.

Forventede Resultater

Normala væv

Ingen specifik EBER-mRNA-farvning blev påvist ved hjælp af PB0589 i en lang række af normale væv. Svag farvning blev påvist i epitelceller i thyreoidea, prostata, larynx og øsofagus, tubuli i nyren, sekretoriske celler i binyrerne og Leydig's celler. Denne farvning påvirker ikke tolkning af farvningen. (Samlet antal evaluerede, normale tilfælde = 98).

Tumorstoffer

PB0589 farvede 3/5 Hodgkin's lymfomer. Der blev ikke observeret farvning i lungetumorer (0/3), ovarietumorer (0/3), levertumorer (0/3), thyreoideatumorer (0/3), øsofagustumorer (0/2), brysttumorer (0/2), metastatiske tumorer af ukendt oprindelse (0/2), hjernetumorer (0/2), testikeltumorer (0/2), hudtumorer (0/2), en colontumor (0/1), en mavetumor (0/1), en tumor i rectum (0/1), en tumor i larynx (0/1) og en thymustumor (0/1). (Samlet antal evaluerede, abnorme tilfælde = 34).

PB0589 anbefales til påvisning af EBER-mRNA.

Produktspecifikke Begrænsninger

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

Fejlfinding

Reference 15 kan være til hjælp ved afhjælpende foranstaltninger.

Testprøver skal suppleres med de relevante vævs- og reagenskontroller.

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

Yderligere Oplysninger

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

Referencer

1. Chang KL, Chen YY, Shibata D et al. Description of an *in situ* hybridisation methodology for detection of Epstein-Barr virus RNA in paraffin-embedded tissues, with a survey of normal and neoplastic tissues. *Diagnostic Molecular Pathology*. 1992;1(4):246–255.
2. Ambinder RF, Mann RB. Epstein-Barr-encoded RNA *in situ* hybridization: diagnostic applications. *Hum Pathol*. Jun; 25(6):602–5, 1994.
3. Joncas J, Boucher J, Granger-Julien M et al. Epstein-Barr virus infection in the neonatal period and in childhood. *CMAJ*. 1974;110:33–37.
4. Niederman JC, McCollum RW, Henle G et al. Infectious mononucleosis: clinical manifestations in relation to EB virus antibodies. *JAMA*. 1968;203:205–209.
5. Sixbey JW, Vesterinen EH, Nedrud JG et al. Replication of Epstein-Barr virus in human epithelial cells infected *in vitro*. *Nature* 1983;306:480–3.
6. Fingerhuth JD, Weis JJ, Tedder TF et al. Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes in the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:4510–4.
7. Weiss LM, Movahed LA, Warnke RA et al. Detection of Epstein Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's Disease. *NEJM*. 1989;302(8):502–506.
8. Hummel M, Agnostopolous I, Korbjuhn P et al. Epstein Barr virus in B cell non Hodgkins lymphoma. *J Pathol*. 1995;175(3):263–271.
9. Brousset P, Bulet V, Chittal S et al. Comparison of *in situ* hybridisation using different isotopic probes for detection of nasopharyngeal carcinoma and immunohistochemical correlation with anti-latent membrane protein antibody. *Lab Invest*. 1992;67(4):457–464.
10. Oudejans JJ, Jiwa M, van den Brule AJ et al. Detection of heterogeneous Epstein-Barr virus gene expression patterns within individual post-transplant lymphoproliferative disorders. *Am J Pathol*. 1995;147(4):923–933.
11. Luo B, Wang Y, Xiao-Feng W et al. Expression of Epstein-Barr virus genes in EBV-associated carcinomas. *World J Gastroenterol*. 2005;11(5):629–633.
12. Teramoto N, Sarker AB, Tonoyama Y et al. Epstein-Barr virus infection in neoplastic and non-neoplastic cells of lymphoid malignancies. *Cancer*. 1996;77(11):2339–2347.
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. 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

30 april 2020

BOND Ready-to-Use ISH

EBER Probe

Catalogusnummer.: PB0589

Beoogd gebruik

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

EBER Probe is bedoeld voor gebruik bij de kwalitatieve identificatie van latente EBV-infectie^{1,2} in met formaline gefixeerd, in paraffine ingebed weefsel, door *in situ* hybridisatie (ISH) met gebruik van het automatische BOND systeem (waaronder het Leica BOND-MAX-systeem en het Leica BOND-III-systeem).

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

Samenvatting en uitleg

Epstein-Barr Virus (EBV) is lid van de familie van gamma-herpesvirussen. Meer dan 90% van de volwassenen wordt tijdens het leven geïnfecteerd met EBV, waarna zij voor de rest van hun leven drager zijn van EBV¹. Primaire infectie tijdens de jeugd verloopt gewoonlijk asymptomatisch, maar als zich een primaire infectie voordoet in de tienerjaren of daarna kan dit zelfbeperkende infectieuze mononucleose veroorzaken^{3,4}. EBV kan leiden tot zowel een lytische infectie als een latente infectie. Tijdens een lytische infectie treedt er virusproductie op, lysis van de gastheercellen en een brede expressie van virale eiwitten. Lytische infectie treedt hoofdzakelijk op in bepaalde epitheelcellen en in B-lymfocyten, via de CD21-receptor⁵⁻⁶. Na de primaire infectie is het virus latent aanwezig in rustende geheugen-B-lymfocyten. Slechts een klein deel van het virale genoom komt daar tot expressie, wat vernietiging door het immuunsysteem van de gastheer voorkomt. Een latente infectie kan ook worden gereactiveerd, waardoor het virus zich verspreidt.

Een latente EBV-infectie gaat gepaard met diverse aandoeningen, zoals: Hodgkin-lymfomen, non-Hodgkin-lymfomen in B-cellen, nasofarynxcarcinomen, lymfoproliferatieve syndromen en lymfomen bij patiënten met met immunodeficiëntie, onder wie transplantatiepatiënten en aidspatiënten, maagtumoren en bepaalde T-cellymfomen⁷⁻¹².

Met Epstein-Barr Virus gecodeerd RNA (EBER) komt in grote mate tot expressie bij latente EBV-infecties^{1,2}. EBER-transcripten zijn niet gepolyadenyleerd en blijven onvertaald. Detectie van EBER door ISH wordt beschouwd als een gevoelige methode voor de detectie van latente EBV-infectie¹.

EBER Probe wordt gebruikt bij de detectie van EBER-transcripten in met formaline gefixeerd, in paraffine ingebed weefsel. De methode is reproduceerbaar en zou moeten resulteren in diepbruine kernkleuring van cellen die EBER-transcripts bevatten.

Geleverde reagentia

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

Totaal volume = 5,5 mL

Verdunnen en mengen

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

Benodigde materialen die niet worden meegeleverd

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

Opslag en stabiliteit

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

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

Zet het product direct na gebruik weer 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.
- 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 infecties en met inachtname van de juiste voorzorgsmaatregelen worden afgevoerd¹⁴. Reagentia mogen nooit met de mond worden gepipetteerd. Vermijd contact van huid en slijmvliezen met reagentia of monsters. Als reagentia of monsters in contact komen met gevoelige gebieden, moet u deze gebieden wassen met een ruime hoeveelheid water. Neem contact op met een arts.
- Raadpleeg de richtlijnen van de lokale, provinciale of nationale overheid voor het afvoeren van potentieel giftige componenten.
- Minimaliseer de kans op microbiële contaminatie van reagentia. Als u dit niet doet, kan er een toename van niet-specifieke kleuring optreden.
- Terugwinning, incubatietijden of temperaturen die afwijken van de specificaties kunnen foutieve resultaten geven. Zulke veranderingen moeten worden gevalideerd door de gebruiker.

Gebruiksaanwijzing

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

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

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

Er dient één positieve weefselcontrole te worden opgenomen voor iedere set testcondities waarin de kleuring wordt uitgevoerd. Voor optimale kwaliteitscontrole en detectie van lichte degeneratie van 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 cellypen die in de meeste weefselcoupes aanwezig zijn levert vaak negatieve controlelocaties op, maar dit moet wel worden geverifieerd door de gebruiker.

Reagenscontroles

Het gebruik van negatieve en positieve reagenscontrolesondes wordt aanbevolen om eventuele EBER-sondekleding of de afwezigheid daarvan op elk weefselmonster te interpreteren.

Negatieve reagenscontrole

Het wordt aanbevolen om een RNA-negatieve controlesonde te gebruiken die niet kruislings met menselijke sequenties op een coupe van elk patiëntmonster hybridiseert om niet-specifieke kleuring te evalueren en een betere interpretatie van eventuele kleuring in specifieke cellen mogelijk te maken. Het verwachte resultaat is het uitblijven van kleuring.

Positieve controlereagens

Het wordt aanbevolen een RNA-positieve controlesonde te gebruiken die een universeel uitgedrukt menselijk transcript (bijv. U6) op een coupe van elk patiëntmonster labelt om informatie te geven over het behoud van nucleïnezuren in het weefsel en over de toegankelijkheid van nucleïnezuren voor de sonde. Als de positieve controlesonde geen positieve kleuring vertoont, moeten de resultaten die met testmonsters zijn verkregen als ongeldig worden beschouwd.

Patiëntweefsel

Bekijk patiëntmonsters gekleurd met EBER Probe als laatste. De intensiteit van de positieve kleuring moet worden beoordeeld in de context van elke kleuring die met de negatieve en positieve controlesondes wordt gezien.

Verwachte Resultaten

Normale weefsels

Er werd geen specifieke EBER mRNA-kleuring gedetecteerd bij gebruik van PB0589 op een breed scala aan normale weefsels. Er werd een zwakke kleuring gedetecteerd in epitheelcellen van schildklier, prostaat, larynx en slokdarm, niertubuli, secretoire cellen in de bijnieren en Leydigcellen. Deze kleuring staat interpretatie van de kleuring niet in de weg. (Totaal aantal beoordeelde normale gevallen = 98).

Tumorweefsels

PB0589 kleurde 3/5 Hodgkinlymfomen. Er werd geen kleuring waargenomen in longtumoren (0/3), ovariumtumoren (0/3), levertumoren (0/3), schildkliertumoren (0/3), slokdarmtumoren (0/2), borsttumoren (0/2), gemetastaseerde tumoren van onbekende oorsprong (0/2), hersentumoren (0/2), testistumoren (0/2), huidtumoren (0/2), een colontumor (0/1), een rectumtumor (0/1), een tumor van de larynx (0/1) en een tumor van de thymus (0/1). (Totaal aantal beoordeelde afwijkende gevallen = 34).

PB0589 wordt aanbevolen voor de detectie van mRNA van EBER.

Productspecifieke beperkingen

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

Probleemoplossing

Referentie 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.

Literatuurverwijzingen

1. Chang KL, Chen YY, Shibata D, et al. Description of an *in situ* hybridisation methodology for detection of Epstein-Barr virus RNA in paraffin-embedded tissues, with a survey of normal and neoplastic tissues. *Diagnostic Molecular Pathology*. 1992;1(4):246–255.
2. Ambinder RF, Mann RB. Epstein-Barr-encoded RNA *in situ* hybridization: diagnostic applications. *Hum Pathol*. Jun; 25(6):602–5, 1994.
3. Joncas J, Boucher J, Granger-Julien M, et al. Epstein-Barr virus infection in the neonatal period and in childhood. *CMAJ*. 1974;110:33–37.
4. Niederman JC, McCollum RW, Henle G, et al. Infectious mononucleosis: clinical manifestations in relation to EB virus antibodies. *JAMA*. 1968;203:205–209.
5. Sixbey JW, Vesterinen EH, Nedrud JG, et al. Replication of Epstein-Barr virus in human epithelial cells infected *in vitro*. *Nature* 1983;306:480–3.
6. Fingerth JD, Weis JJ, Tedder TF, et al. Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes in the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:4510–4.
7. Weiss LM, Movahed LA, Warnke RA, et al. Detection of Epstein Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's Disease. *NEJM*. 1989;302(8):502–506.
8. Hummel M, Agnostopolous I, Korbjuhn P, et al. Epstein Barr virus in B cell non Hodgkins lymphoma. *J Pathol*. 1995;175(3):263–271.
9. Brousset P, Bulet V, Chittal S, et al. Comparison of *in situ* hybridisation using different isotopic probes for detection of nasopharyngeal carcinoma and immunohistochemical correlation with anti-latent membrane protein antibody. *Lab Invest*. 1992;67(4):457–464.
10. Oudejans JJ, Jiwa M, van den Brule AJ, et al. Detection of heterogeneous Epstein-Barr virus gene expression patterns within individual post-transplant lymphoproliferative disorders. *Am J Pathol*. 1995;147(4):923–933.
11. Luo B, Wang Y, Xiao-Feng W, et al. Expression of Epstein-Barr virus genes in EBV-associated carcinomas. *World J Gastroenterol*. 2005;11(5):629–633.
12. Teramoto N, Sarker AB, Tonoyama Y, et al. Epstein-Barr virus infection in neoplastic and non-neoplastic cells of lymphoid malignancies. *Cancer*. 1996;77(11):2339–2347.
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. 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

30 april 2020

BOND Ready-to-Use ISH

EBER Probe

Katalognummer: PB0589

Tiltenkt bruk

Denne reagenten er for *in vitro* diagnostisk bruk.

EBER Probe er tiltenkt for bruk i kvalitativ identifikasjon av latent EBV infeksjon^{1,2} i formalinfiksert, paraffininnebygd vev ved *in situ* hybridisering (ISH) ved hjelp av automatiserte BOND-systemet (herunder Leica BOND-MAX-systemet og Leica BOND-III-systemet). Den kliniske tolkningen av eventuelle flekker eller dens fravær bør suppleres med morfologiske studier og forsvarlig kontroll og bør vurderes i sammenheng med pasientens kliniske historie og andre diagnostiske tester av en kvalifisert patolog.

Sammendrag og forklaring

Epstein-Barr virus (EBV) er et medlem av gamma herpesvirus-familien. Mer enn 90% av den voksne befolkningen har blitt infisert med EBV i løpet av deres levetid som resulterer i en livslang EBV-bærerstatus¹. Primær infeksjon i løpet av barndommen er vanligvis ingen symptomer, men når primær infeksjon oppstår i ungdomsårene eller senere kan det føre til selvbegrensende smittsomme mononukleose^{3,4}. EBV kan etablere både lytisk infeksjon så vel som latent infeksjon. Under lytisk infeksjon, er produksjon av virus, lysering av vertscellene, og en bred ekspresjon av virale proteiner. Lytisk infeksjon hovedsakelig forekommer i enkelte epitelceller samt B-lymfocytter via CD21 mottakere^{5,6}. Etter primærinfeksjonen har latens blitt etablert i hvilende hukommelse B-lymfocytter, hvor bare en liten del av det virale genom blir uttrykt, og således unngår ødeleggelse av vertens immunrespons. Latent infeksjon kan også gjenaktiveres og tillate at viruset sprer seg.

Latent EBV-infeksjon er forbundet med flere forhold, inkludert: Hodgkins lymfom, B-celle ikke-Hodgkins lymfom, nasofaryngeale karsinom, lymfoproliferativ sykdom og lymfom i immunsupprimerte, inkludert transplantasjon og AIDS-pasienter, magekreft og noen T-cellelymfomer⁷⁻¹².

Epstein Barr Virus kodet RNA (EBER) er rikelig uttrykt i latent EBV infeksjon^{1,2}. EBER transkripsjoner er nonpolyadenylated og forblir uoversatt. EBER påvisning av ISH regnes som en sensitiv metode for påvisning av latent EBV infeksjon¹.

EBER Probe brukes i deteksjon av EBER transkripsjoner i formalinfiksert, paraffininnebygd vev. Fremgangsmåten er reproducerbar og bør resultere i intens brun nukleær farging av celler inneholdende EBER-transkripter.

Reagens som følger med

EBER Probe er et fluorescein-konjugert oligonukleotid-sonde levert i hybridiseringsoppløsningen.

Samlet volum = 5,5 mL

Oppløsning og blanding

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

Materialer som trengs, men som ikke følger med

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

Oppbevaring og stabilitet

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

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

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

Oppbevaringsbetingelser annet enn de som er oppgitt ovenfor må bekreftes av brukeren¹³.

Forholdsregler

- Dette produktet er for *in vitro* diagnostisk bruk.
- For å få en kopi av HMS-databladet kontakt din lokale forhandler eller det regionale kontoret til Leica Biosystems eller alternativt, besøk 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.
- Søk råd hos føderale, statlige eller lokale forskrifter for avhending av alle potensielt giftige komponenter.
- Reduser mikrobiell forurensning av reagensene, eller en økning av ikke- spesifikk farging kan forekomme.
- Henting, inkubasjonstidene eller andre enn de som er spesifisert temperaturer kan gi feilaktige resultater. Enhver slik endring skal godkjennes av brukeren.

Bruksanvisninger

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

Passende vev- og reagenskontroller skal alltid brukes. Protokollen for vev og reagenskontroller skal tilsvare den til RNA testsonden.

Kvalitetskontroll

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

Positiv vevskontroll

Brukes til å angi riktig forberedt vev og riktig fargeteknikker.

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

Negativ vevskontroll

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

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

Reagenskontroller

Bruk av kontrollprober med negativ og positiv reagens er anbefalt for å tolke farge eller mangel på det fra EBER Probe på hver vevsprøve.

Negativ reagenskontroll

Det er anbefalt å bruke RNA-negativ kontrollprobe som ikke krysshybridiserer med menneskelige sekvenser på et snitt av hvert pasientprøvemateriale for å vurdere uspesifikk farging og tillate bedre tolkning av farging på spesifikke celler. Forventet resultat er mangel på farge.

Positiv reagenskontroll

Det er anbefalt å bruke RNA-positiv kontrollprobe som merker et allestedsnærværende menneskelig transkript (f.eks. U6) på et snitt av hvert pasientprøvemateriale for å gi informasjon om bevaring av nukleinsyrer i vevet, så vel som tilgjengeligheten av nukleinsyrer til sonden. Hvis en positiv kontrollprobe unnlater å demonstrere positiv farging, bør alle resultater med prøvene anses som ugyldige.

Pasientvev

Undersøke pasient prøver farget med EBER Probe til slutt. Positiv fargingsintensitet skal vurderes i lys av eventuell farging som observeres med negative og positive kontrollprober.

Forventede resultater

Normalt vev

Ingen spesifikk EBER mRNA farging ble oppdaget ved bruk av PB0589 i et vidt spekter av normale vev. Svak farging ble oppdaget i epitelceller i skjoldbruskkjertelen, prostata, strupehode og spiserør, tubuli i nyrene, sekresjonscellene i binyrene og Leydig-cellene. Denne fargingen forstyrrer ikke fargingstolkning. (Totalt antall evaluerte normale tilfeller = 98).

Tumorvev

PB0589 farget 3/5 Hodgkins lymfomaer. Ingen farging ble observert i lungesvulster (0/3), ovarietumorer (0/3), leversvulster (0/3), skjoldbruskkjertelsvulster (0/3), spiserørsvulster (0/2), brystsvulster (0/2), metastatiske svulster med ukjent opprinnelse (0/2), hjernesvulster (0/2), testikkelsvulster (0/2), hudkreft (0/2), en kolonsvulst (0/1), en magesvulst (0/1), en rektal tumor (0/1), en svulst i strupehodet (0/1), og en tumor i brisselen (0/1). (Totalt antall evaluerte unormale tilfeller = 34).

PB0589 anbefales for oppdagelse av EBER mRNA.

Produktspesifikke begrensninger

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

Feilsøking

Referanse 15 kan hjelpe i forbedringstiltak.

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

Videre informasjon

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

Referanser

1. Chang KL, Chen YY, Shibata D, et al. Description of an *in situ* hybridisation methodology for detection of Epstein-Barr virus RNA in paraffin-embedded tissues, with a survey of normal and neoplastic tissues. *Diagnostic Molecular Pathology*. 1992;1(4):246–255.
2. Ambinder RF, Mann RB. Epstein-Barr-encoded RNA *in situ* hybridization: diagnostic applications. *Hum Pathol*. Jun; 25(6):602–5, 1994.
3. Joncas J, Boucher J, Granger-Julien M, et al. Epstein-Barr virus infection in the neonatal period and in childhood. *CMAJ*. 1974;110:33–37.
4. Niederman JC, McCollum RW, Henle G, et al. Infectious mononucleosis: clinical manifestations in relation to EB virus antibodies. *JAMA*. 1968;203:205–209.
5. Sixbey JW, Vesterinen EH, Nedrud JG, et al. Replication of Epstein-Barr virus in human epithelial cells infected *in vitro*. *Nature* 1983;306:480–3.
6. Fingerth JD, Weis JJ, Tedder TF, et al. Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes in the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:4510–4.
7. Weiss LM, Movahed LA, Warnke RA, et al. Detection of Epstein Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's Disease. *NEJM*. 1989;302(8):502–506.
8. Hummel M, Agnostopolous I, Korbjuhn P, et al. Epstein Barr virus in B cell non Hodgkins lymphoma. *J Pathol*. 1995;175(3):263–271.
9. Brousset P, Bulet V, Chittal S, et al. Comparison of *in situ* hybridisation using different isotopic probes for detection of nasopharyngeal carcinoma and immunohistochemical correlation with anti-latent membrane protein antibody. *Lab Invest*. 1992;67(4):457–464.
10. Oudejans JJ, Jiwa M, van den Brule AJ, et al. Detection of heterogeneous Epstein-Barr virus gene expression patterns within individual post-transplant lymphoproliferative disorders. *Am J Pathol*. 1995;147(4):923–933.
11. Luo B, Wang Y, Xiao-Feng W, et al. Expression of Epstein-Barr virus genes in EBV-associated carcinomas. *World J Gastroenterol*. 2005;11(5):629–633.
12. Teramoto N, Sarker AB, Tonoyama Y, et al. Epstein-Barr virus infection in neoplastic and non-neoplastic cells of lymphoid malignancies. *Cancer*. 1996;77(11):2339–2347.
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. 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

30 april 2020

BOND Ready-to-Use ISH

EBER Probe

Katalog No: PB0589

Kullanım Amacı

Bu reaktif, *in vitro* tanı kullanımı içindir.

EBER Probe otomatik BOND sistemi kullanılarak (Leica BOND-MAX sistemini ve Leica BOND-III sistemini de içermektedir) *in situ* hibridizasyon (ISH) yoluyla formalinde fikse edilmiş parafine gömülü dokudaki latent EBV enfeksiyonunun¹⁻² kalitatif tanımlanmasında kullanılmak üzere tasarlanmıştır.

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

Özet ve Açıklama

Epstein-Barr Virüsü (EBV) Gamma Herpes Virüsü ailesinin bir üyesidir. Yetişkin popülasyonunun %90'ından fazlası yaşam boyu EBV taşıyıcılığı durumu ile sonuçlanacak şekilde EBV enfeksiyonu kapmıştır¹. Çocuklukta primer enfeksiyon genellikle asemptomatiktir fakat primer enfeksiyon ergenlik döneminde veya sonrasında meydana geldiğinde kendi kendine sınırlayıcı enfeksiyöz mononükleozu neden olabilir³⁻⁴. EBV hem litik enfeksiyona hem de latent enfeksiyona neden olabilir. Litik enfeksiyonda virüs üretimi, konak hücre lizisi ve geniş bir viral protein ekspresyonu meydana gelir. Litik enfeksiyon öncelikli olarak bazı epitelial hücrelerde ve CD21 reseptörü üzerinden B-lenfositlerde meydana gelir⁵⁻⁶. Primer enfeksiyonu takiben, sadece viral genomun küçük bir kısmının eksprese edildiği dinlenme belediği B lenfositlerinde latensi ortaya çıkararak konak immün yanıt ile yıkım önlenir. Latent enfeksiyon aynı zamanda virüsün yayılmasına izin verecek şekilde reaktiftir.

Latent EBV enfeksiyonu şunları içeren bazı durumlarla ilişkilidir: Hodgkin Lenfoma, B-hücreli Non Hodgkin Lenfoma, nazofaringeal karsinoma, transplant ve AIDS dahil olmak üzere immüno-suprese hastalarda lenfoproliferatif bozukluklar ve lenfoma, gastrik kanser ve bazı T-hücreli lenfomalar⁷⁻¹².

Epstein Barr Virüsü ile kodlanan RNA (EBER) yüksek derecede latent EBV enfeksiyonunda eksprese edilir¹⁻². EBER transkriptleri nonpoliadenitlidir ve çevrilmeden kalır. ISH ile EBER saptama, latent EBV enfeksiyonunun saptanması için hassas bir yöntem olarak kabul edilir¹.

EBER Probe formalinde fikse edilmiş parafine gömülü dokudaki EBER transkriptlerinin saptanmasında kullanılır. Yöntem tekrarlanabilir ve EBER transkriptlerini içeren hücrelerin yoğun, kahverengi çekirdek boyaması ile sonuçlanmalıdır.

Sağlanan Reaktifler

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

Toplam hacim = 5,5 mL

Seyreltme ve Karıştırma

EBER Probe kullanıma 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 dokümantasyonundaki "BOND Reaktiflerinin Kullanımı" bölümüne bakınız.

Saklama ve Stabilité

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 kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır¹³.

Önlemler

- Bu ürün *in vitro* tanı kullanımı için tasarlanmıştır.
- 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 membranları ile temastan kaçının. Reaktiflerin veya numunelerin hassas bölgelerle temas etmesi halinde, bol su ile yıkayın. Tıbbi yardım alın.
- Toksik olma potansiyeli olan bileşenleri imha etmek için Federal, Devlet veya yerel düzenlemeleri takip edin.
- Reaktiflerin mikrobiyal kontaminasyonunu en aza indirin, aksi halde spesifik olmayan boyamada bir artış meydana gelebilir.
- Belirtilenlerin dışındaki geri alma, inkübasyon süreleri veya sıcaklıklar hatalı sonuçlara neden olabilir. Bu gibi değişiklikler kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır.

Kullanım Talimatları

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

Her zaman uygun doku ve reaktif kontrolleri kullanılmalıdır. Doku ve reaktif kontrolleri için prosedür RNA test probu prosedürlerine 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.

Reaktif Kontrolleri

Her doku numunesinde her türlü EBER Probe boyanmasını ya da boyanma olmamasını yorumlamak için negatif ve pozitif reaktif kontrol problemlerinin kullanılması önerilmektedir.

Negatif Reaktif Kontrolü

Spesifik olmayan boyamayı değerlendirmek ve spesifik hücrelerdeki boyanmanın daha iyi yorumlanmasını sağlamak için her hasta numunesinin bir kesitinde insan dizilişleriyle çapraz hibridize olmayan bir RNA negatif kontrol probunun kullanılması önerilmektedir. Beklenen sonuç, boyanmanın olmamasıdır.

Pozitif Reaktif Kontrolü

Dokudaki nükleik asitlerin korunması ve nükleik asitlerin proba ulaşabilirliği hakkında bilgi sağlamak için her hasta numunesinin bir kesiti üzerinde yaygın biçimde eksprese olan insan transkriptini (ör U6) etiketleyen bir RNA pozitif kontrol probunun kullanılması önerilmektedir. Pozitif kontrol probunun pozitif boyama gösteremediği durumlarda, test numuneleri ile elde edilen tüm sonuçlar geçersiz olarak kabul edilmelidir.

Hasta Dokusu

EBER Probe ile boyanmış en son hasta numunelerini inceleyin. Pozitif boyama yoğunluğu, negatif ve pozitif kontrol problemleri ile görülen boyamalar bağlamında değerlendirilmelidir.

Öngörülen Sonuçlar

Normal Dokular

PB0589 kullanıldığında çok sayıda normal dokuda spesifik EBER mRNA boyaması saptanmamıştır. Tiroid epitelial hücreleri, prostat, larinks ve özofagus, böbrek tübülleri, böbreküstü bezlerindeki salgı hücreleri ve Leydig hücrelerinde soluk boyama saptanmıştır. Bu boyama, boyamanın yorumlanmasını engellemektedir. (Değerlendirilen toplam normal vaka sayısı = 98).

Tümörlü Dokular

PB0589 3/5 Hodgkin lenfomalarını boyamıştır. Akciğer tümörleri (0/3), ovaryen tümörleri (0/3), karaciğer tümörleri (0/3), tiroid tümörleri (0/3), özofagus tümörleri (0/2), göğüs tümörleri (0/2), bilinmeyen nedenlerle meydana gelen metastatik tümörler (0/2), beyin tümörleri (0/2), testiküler tümörler (0/2), cilt tümörleri (0/2), kolon tümörü (0/1), mide tümörü (0/1), rektal tümör (0/1), larinks tümörü (0/1) ve timus tümöründe (0/1) boyama görülmemiştir. (Değerlendirilen toplam normal olmayan vaka sayısı = 34).

PB0589 EBER mRNA'nın saptanması için tavsiye edilir.

Ürüne Özgü Sınırlamalar

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

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 dokümantasyonundaki "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.

Referanslar

1. Chang KL, Chen YY, Shibata D, et al. Description of an *in situ* hybridisation methodology for detection of Epstein-Barr virus RNA in paraffin-embedded tissues, with a survey of normal and neoplastic tissues. *Diagnostic Molecular Pathology*. 1992;1(4):246–255.
2. Ambinder RF, Mann RB. Epstein-Barr-encoded RNA *in situ* hybridization: diagnostic applications. *Hum Pathol*. Jun; 25(6):602–5, 1994.
3. Joncas J, Boucher J, Granger-Julien M, et al. Epstein-Barr virus infection in the neonatal period and in childhood. *CMAJ*. 1974;110:33–37.
4. Niederman JC, McCollum RW, Henle G, et al. Infectious mononucleosis: clinical manifestations in relation to EB virus antibodies. *JAMA*. 1968;203:205–209.
5. Sixbey JW, Vesterinen EH, Nedrud JG, et al. Replication of Epstein-Barr virus in human epithelial cells infected *in vitro*. *Nature* 1983;306:480–3.
6. Fingerth JD, Weiss JJ, Tedder TF, et al. Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes in the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:4510–4.
7. Weiss LM, Movahed LA, Warnke RA, et al. Detection of Epstein Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's Disease. *NEJM*. 1989;302(8):502–506.
8. Hummel M, Agnostopolous I, Korbjuhn P, et al. Epstein Barr virus in B cell non Hodgkins lymphoma. *J Pathol*. 1995;175(3):263–271.
9. Brousset P, Bulet V, Chittal S, et al. Comparison of *in situ* hybridisation using different isotopic probes for detection of nasopharyngeal carcinoma and immunohistochemical correlation with anti-latent membrane protein antibody. *Lab Invest*. 1992;67(4):457–464.
10. Oudejans JJ, Jiwa M, van den Brule AJ, et al. Detection of heterogeneous Epstein-Barr virus gene expression patterns within individual post-transplant lymphoproliferative disorders. *Am J Pathol*. 1995;147(4):923–933.
11. Luo B, Wang Y, Xiao-Feng W, et al. Expression of Epstein-Barr virus genes in EBV-associated carcinomas. *World J Gastroenterol*. 2005;11(5):629–633.
12. Teramoto N, Sarker AB, Tonoyama Y, et al. Epstein-Barr virus infection in neoplastic and non-neoplastic cells of lymphoid malignancies. *Cancer*. 1996;77(11):2339–2347.
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. 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

30 Nisan 2020

BOND Ready-to-Use ISH

EBER Probe

Каталожен №: PB0589

Предназначение

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

EBER Probe е предназначен за качествена идентификация на латентна инфекция с вируса на Епщайн-Бар¹⁻² 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).

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

Вирусът на Епщайн-Бар (EBV) е част от семейството на гама-херпес вирусите. Над 90% от населението в зряла възраст е било инфектирано с EBV в живота си, като в резултат на това става доживотен носител на EBV¹. Първична инфекция по време на детството обикновено протича безсимптомно, а първична инфекция в следпубертетна възраст или по-късно може да доведе до самоограничаваща се инфекциозна мононуклеоза³⁻⁴. EBV може да доведе както до литична инфекция, така и до латентна инфекция. По време на литична инфекция се наблюдава продуциране на вируса, лизиране на клетките гостоприемници и широка експресия на вирусни протеини. Литична инфекция възниква основно в определени епителни клетки, както и в В-лимфоцитите чрез CD21 рецептора⁵⁻⁶. След първична инфекция латентността се установява в В-лимфоцитите на паметта, където е изразена само малка част от вирусния геном, като по този начин се избягва унищожаване от имунния отговор на гостоприемника. Латентната инфекция може също така да се реактивира, позволявайки на вируса да се разпространи.

Латентната инфекция с EBV се асоциира с няколко състояния, включително: лимфом на Ходжкин, В-клетъчен неходжкинов лимфом, назофарингеален карцином, лимфопролиферативни заболявания и лимфом при имunosупресирани лица, включително трансплантирани пациенти и пациенти със СПИН, рак на стомаха и някои Т-клетъчни лимфоми⁷⁻¹². Кодирана с вируса на Епщайн-Бар РНК (EBER) е широко изразена при латентна инфекция с EBV¹⁻². Транскриптите на EBER не са полиаденилирани и остават нетранслируеми. Откриване на EBER чрез ISH се счита за чувствителен метод за откриване на латентна инфекция с EBV¹.

EBER Probe се използва за откриване на транскрипти на EBER във фиксирана с формалин, вградена в парафин тъкан. Методът е възпроизводим, а очакваният резултат е наситено кафяво оцветяване на ядрата на клетките, съдържащи транскрипти на EBER.

Предоставени реактиви

EBER Probe е конюгирана с флуоресцин олигонуклеотидна проба, доставена в разтвор за хибридизация.

Общ обем = 5,5 mL

Разреждане и смесване

EBER Probe 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 спесимени 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 етикетата 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.
- 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 третирани 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.
- Извличането, инкубационните времена или температури, различни от посочените, могат да доведат до погрешни резултати. Всякакви подобни промени трябва да бъдат валидирани от потребителя.

Инструкции за употреба

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

Винаги трябва да се използват подходящи контроли на тъкани и реактиви. Протоколът за контролите на тъкани и реактиви трябва да съответства на този за РНК тестова проба.

Качествен контрол

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

Позитивна тъканна контрола

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

Една позитивна тъканна контрола трябва да бъде включена за всеки сет с тестови условия при всяка серия проби за оцветяване. Тъкан със слабо позитивно оцветяване е по-подходяща от тъкан със силно позитивно оцветяване за оптимален качествен контрол и за откриване на по-малки нива на деградация на 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 тъкани срези, често предлага места за негативна контрола, но това трябва да се провери от потребителя.

Контроли на реагентите

Препоръчва се използването на проби с негативна и позитивна контрола на реагента за интерпретиране на всяко оцветяване на EBER проба или на неговата липса за всяка тъканна проба.

Негативна контрола на реагента

Препоръчва се използване на РНК проба с негативна контрола, при която няма кръстосано хибридиране с човешки секвенции, със срез от всеки спесимен на пациента, за да се направи оценка на неспецифичното оцветяване и да се позволи по-добро интерпретиране на всяко оцветяване в конкретни клетки. Очакваният резултат е липса на оцветяване.

Позитивна контрола на реагента

Препоръчва се използване на РНК проба с позитивна контрола, която белязва експресиран навсякъде човешки транскрипт (напр. U6), със срез от всеки спесимен на пациента, за да се осигури информация за запазването на нуклеиновите киселини в тъканта, както и за достъпността на нуклеиновите киселини за пробата. Ако проба с позитивна контрола не показва позитивно оцветяване, резултатите от спесимените, включени в теста, трябва да се считат за невалидни.

Тъкан от пациента

Спесимените на пациенти, оцветени с EBER Probe, трябва да се изследват последни. Наситеността на позитивното оцветяване трябва да бъде оценена в контекста на всяко оцветяване, което се наблюдава с пробите с негативна и позитивна контрола.

Очаквани резултати

Нормални тъкани

Не се открива специфично оцветяване на мРНК с EBER с използване на PB0589 при широк набор от нормални тъкани. Бледото оцветяване се открива при епителни клетки на щитовидната жлеза, простатата, ларинкса и хранопровода, бъбречните каналчета, секреторните клетки в надбъбречната жлеза и клетките на Лейдиг. Това оцветяване не засяга интерпретирането на оцветяването. (Общ брой на оценените нормални случаи = 98).

Абнормни тъкани

PB0589 оцветява 3/5 лимфома на Ходжкин. Не се наблюдава оцветяване при белодробни тумори (0/3), тумори на яйчниците (0/3), тумори на черния дроб (0/3), тумори на щитовидната жлеза (0/3), тумори на хранопровода (0/2), тумори на млечната жлеза (0/2), метастатични тумори с неизвестна етиология (0/2), мозъчни тумори (0/2), тумори на тестисите (0/2), кожни тумори (0/2), тумор на ободното черво (0/1), тумор на стомаха (0/1), ректален тумор (0/1), тумор на ларинкса (0/1) и тумор на тимуса (0/1). (Общ брой на оценените абнормни случаи = 34).

PB0589 се препоръчва за откриване на мРНК с EBER.

Специфични ограничения на продукта

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

Отстраняване на неизправности

Референция 15 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 реактиви BOND можете да намерите в „Употреба на реактиви BOND“ във Вашата документация за потребителя на BOND под заглавията „Принцип на процедурата“, „Необходими материали“, „Приготвяне на спесимен“, „Контрол на качеството“, „Потвърждаване на анализа“, „Интерпретация на оцветяването“, „Легенда на символите на етикетите“ и „Общи ограничения“.

Използвана литература

1. Chang KL, Chen YY, Shibata D, et al. Description of an *in situ* hybridisation methodology for detection of Epstein-Barr virus RNA in paraffin-embedded tissues, with a survey of normal and neoplastic tissues. *Diagnostic Molecular Pathology*. 1992;1(4):246–255.
2. Ambinder RF, Mann RB. Epstein-Barr-encoded RNA *in situ* hybridization: diagnostic applications. *Hum Pathol*. Jun; 25(6):602–5, 1994.
3. Joncas J, Boucher J, Granger-Julien M, et al. Epstein-Barr virus infection in the neonatal period and in childhood. *CMAJ*. 1974;110:33–37.
4. Niederman JC, McCollum RW, Henle G, et al. Infectious mononucleosis: clinical manifestations in relation to EB virus antibodies. *JAMA*. 1968;203:205–209.
5. Sixbey JW, Vesterinen EH, Nedrud JG, et al. Replication of Epstein-Barr virus in human epithelial cells infected *in vitro*. *Nature* 1983;306:480–3.
6. Fingeroth JD, Weis JJ, Tedder TF, et al. Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes in the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:4510–4.
7. Weiss LM, Movahed LA, Warnke RA, et al. Detection of Epstein Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's Disease. *NEJM*. 1989;302(8):502–506.
8. Hummel M, Agnostopolous I, Korbjuhn P, et al. Epstein Barr virus in B cell non Hodgkins lymphoma. *J Pathol*. 1995;175(3):263–271.
9. Brousset P, Bulet V, Chittal S, et al. Comparison of *in situ* hybridisation using different isotopic probes for detection of nasopharyngeal carcinoma and immunohistochemical correlation with anti-latent membrane protein antibody. *Lab Invest*. 1992;67(4):457–464.
10. Oudejans JJ, Jiwa M, van den Brule AJ, et al. Detection of heterogeneous Epstein-Barr virus gene expression patterns within individual post-transplant lymphoproliferative disorders. *Am J Pathol*. 1995;147(4):923–933.
11. Luo B, Wang Y, Xiao-Feng W, et al. Expression of Epstein-Barr virus genes in EBV-associated carcinomas. *World J Gastroenterol*. 2005;11(5):629–633.
12. Teramoto N, Sarker AB, Tonoyama Y, et al. Epstein-Barr virus infection in neoplastic and non-neoplastic cells of lymphoid malignancies. *Cancer*. 1996;77(11):2339–2347.
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. 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

30 Април 2020

BOND Ready-to-Use ISH

EBER Probe

Katalógusszám: PB0589

Alkalmazási terület

Ez a reagens *in vitro* diagnosztikai használatra szolgál.

Az EBER Probe próba a látens EBV-fertőzés¹⁻² kvalitatív azonosítására szolgál formalinban fixált, paraffinba ágyazott szövetben, *in situ* hibridizáció (ISH) útján, automata BOND rendszer (így a Leica BOND-MAX rendszer vagy a Leica BOND-III rendszer) használatával.

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

Összefoglalás és magyarázat

Az Epstein-Barr-vírus (EBV) a gamma-herpeszvírus családba tartozik. A felnőtt populáció több mint 90%-a megfertőződik az EBV-vel élete során, ezzel élethosszig tartó EBV-hordozóvá válik¹. A gyermekkori elsődleges fertőzés jellemzően tünetmentes, de ha az elsődleges fertőzés serdülőkorban vagy később történik, az önkorlátozó fertőző mononukleózist okozhat³⁻⁴. Az EBV lítikus fertőzést és látens fertőzést is okozhat. Lítikus fertőzés alatt vírus termelődik, a gazdasejt lizál, és a vírusfehérjék széleskörűen expresszálódnak. Lítikus fertőzés elsősorban bizonyos hámsejtekben, valamint B-limfocitákban következik be a CD21 receptoron keresztül⁵⁻⁶. Az elsődleges fertőzést követően a látencia a nyugalmi állapotú B-memóriasejtekben alakul ki, ahol a vírusgenomnak csak kis része fejeződik ki, így a vírust nem pusztítja el a gazdaszervezet immunválasza. A látens fertőzés képes reaktiválódni, amitől a vírus terjedhet.

A látens EBV-fertőzést számos betegséggel összefüggésbe hozták, többek között: Hodgkin-limfóma, B-sejtes non-Hodgkin-limfóma, nazofaringeális karcinóma, immunszuppresszált személyeknél, beleértve szövetátültetésen átesett és AIDS-betegeknél limfoproliferatív zavarok és limfóma, gyomorrák és egyes T-sejtes limfómák⁷⁻¹².

Az Epstein-Barr-vírus kódolt RNS-e (EBER) nagy mennyiségben expresszálódik a látens EBV-fertőzés alatt¹⁻². Az EBER-transzkriptumok nem poliadeniláltak, és nem esnek át transzláción. Az EBER-detektálás ISH-val érzékeny módszernek számít a látens EBV-fertőzés detektálásában¹.

Az EBER Probe próba az EBER-transzkriptumok kimutatására szolgál formalinban fixált, paraffinba ágyazott szövetben. A módszer reprodukálható, és intenzív, barna magfestődést eredményez az EBER-transzkriptumokat tartalmazó sejtekben.

Biztosított reagens

Az EBER Probe egy hibridizáló oldatban található, fluoreszceninnel konjugált oligonukleotid próba.

Teljes mennyiség = 5,5 ml

Hígítás és elegyítés

Az EBER Probe használatra kész. Nem szükséges a reagens feloldása, elegyítése, hígítása vagy titrálása.

Szükséges, de nem biztosított anyagok

A minta kezeléséhez és a BOND rendszerrel (így a Leica BOND-MAX rendszerrel vagy a Leica BOND-III rendszerrel) végzett *in situ* hibridizációs festéshez szükséges anyagok teljes listáját lásd a BOND felhasználói dokumentáció „BOND reagens használat” 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.
- Az anyagbiztonsági adatlap igényléséhez forduljon a Leica Biosystems helyi forgalmazójához vagy regionális irodájához, vagy keresse fel a Leica Biosystems weboldalát a www.LeicaBiosystems.com címen.
- A mintákat fixálás előtt és után, valamint a velük érintkező összes anyagot fertőzések terjesztésére képes anyagként kell kezelni, és megfelelő körültekintéssel kell ártalmatlanítani¹⁴. Soha ne pipettázza szájjal a reagenset, továbbá kerülje a bőr és a nyálkahártyák érintkezését a reagenssel és a mintákkal. Ha a reagens 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 reagens mikrobiális szennyeződését, különben megnövekedhet a nem specifikus festődés.
- A megadottaktól eltérő feltárási körülmények, inkubációs idők és hőmérsékletek hibás eredményekhez vezethetnek. A felhasználónak minden ilyen jellegű változtatást validálnia kell.

Használati útmutató

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

Mindig kell megfelelő szövet- és reagenskontrollokat alkalmazni. A szövet- és reagenskontrollokhoz tartozó protokollnak meg kell felelnie az RNS vizsgálati 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.

Poszítív szövetkontroll

A megfelelő szövet-előkészítés és festési technikák ellenőrzésére használatos.

Minden tesztelési körülménygyűtes 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 specificitását ellenőrizni lehessen.

Ezenkívül a legtöbb szövetmetszetben jelen lévő különböző sejttypusok gyakran használhatók negatív kontrollként, de ezeket a felhasználónak kell ellenőriznie.

Reagenskontrollok

Minden egyes szövetminta esetében negatív és pozitív reagenskontroll próbák használata javasolt bármely EBER-próba festődésének vagy annak hiányának értelmezéséhez.

Negatív reagenskontroll

A nem specifikus festődés kiértékeléséhez és a specifikus sejtekben létrejövő festődés jobb értelmezéséhez olyan RNA negatív kontroll próba használata javasolt, amely nem keresztibridizál a humán szekvenciákkal az egyes betegminták metszetein. A várt eredmény a festődés hiánya.

Poszítív reagenskontroll

A nukleinsavak szöveti megtartottságával, valamint a nukleinsavak próba általi hozzáférhetőségével kapcsolatos információk kinyeréséhez olyan RNA pozitív kontroll próba használata javasolt, amely mindenütt expresszálódó humán transzkriptumokat (pl. U6) jelöl meg az egyes betegminták metszetein. Ha a pozitív kontroll próba nem mutat pozitív festődést, a vizsgált minták minden eredményét érvénytelennek kell tekinteni.

Betegszövet

Az EBER Probe próbával festett betegmintákat vizsgálja meg utolsóként. A pozitív festődés intenzitását a negatív és pozitív kontroll próbáknál látható festődés viszonylatában értékelje.

Várható eredmények

Normál szövetek

A PB0589 alkalmazásával számos normál szöveten nem volt specifikus EBER mRNS-festődés megfigyelhető. Halvány festődés volt észlelhető a pajzsmirigy, prosztata, gége és nyelöcső hámszejtei, a vesetubulusok, a mellékvesék szekretoros sejtei és a Leydig-sejtek esetén. A festődés nem zavarja meg a festés értelmezését. (Vizsgált normál esetek összesített száma = 98).

Kóros szövetek

A PB0589 3/5 Hodgkin-limfómát festett meg. Nem volt festődés észlelhető tüdődaganatok (0/3), petefészek-daganatok (0/3), májdaganatok (0/3), pajzsmirigydaganatok (0/3), nyelöcsődaganatok (0/2), emlődaganatok (0/2), ismeretlen eredetű metasztatikusan daganatok (0/2), agydaganatok (0/2), heredaganatok (0/2), bőrdaganatok (0/2), vastagbél-daganat (0/1), gyomordaganat (0/1), végbél-daganat (0/1), gégedaganat (0/1) és a csecsemőmirigy tumora (0/1) esetén. (Vizsgált kóros esetek összesített száma = 34).

A PB0589 az EBER mRNS detektálására ajánlott.

Termékspecifikus korlátozások

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

Hibaelhárítás

A 15. 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 reagenssel végzett *in situ* hibridizációra vonatkozó további információkat a BOND felhasználói dokumentáció „BOND reagens használata” című részében talál a következő szakaszokban: Az eljárás elve, Szükséges anyagok, A minták előkészítése, Minőség-ellenőrzés, A teszt ellenőrzése, A festődés értelmezése, A címkéken szereplő szimbólumok magyarázata és Általános korlátozások.

Irodalomjegyzék

1. Chang KL, Chen YY, Shibata D, et al. Description of an *in situ* hybridisation methodology for detection of Epstein-Barr virus RNA in paraffin-embedded tissues, with a survey of normal and neoplastic tissues. *Diagnostic Molecular Pathology*. 1992;1(4):246–255.
2. Ambinder RF, Mann RB. Epstein-Barr-encoded RNA *in situ* hybridization: diagnostic applications. *Hum Pathol*. Jun; 25(6):602–5, 1994.
3. Joncas J, Boucher J, Granger-Julien M, et al. Epstein-Barr virus infection in the neonatal period and in childhood. *CMAJ*. 1974;110:33–37.
4. Niederman JC, McCollum RW, Henle G, et al. Infectious mononucleosis: clinical manifestations in relation to EB virus antibodies. *JAMA*. 1968;203:205–209.
5. Sixbey JW, Vesterinen EH, Nedrud JG, et al. Replication of Epstein-Barr virus in human epithelial cells infected *in vitro*. *Nature* 1983;306:480–3.
6. Fingeroth JD, Weis JJ, Tedder TF, et al. Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes in the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:4510–4.
7. Weiss LM, Movahed LA, Warnke RA, et al. Detection of Epstein Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's Disease. *NEJM*. 1989;302(8):502–506.
8. Hummel M, Agnostopolous I, Korbjuhn P, et al. Epstein Barr virus in B cell non Hodgkins lymphoma. *J Pathol*. 1995;175(3):263–271.
9. Brousset P, Bulet V, Chittal S, et al. Comparison of *in situ* hybridisation using different isotopic probes for detection of nasopharyngeal carcinoma and immunohistochemical correlation with anti-latent membrane protein antibody. *Lab Invest*. 1992;67(4):457–464.
10. Oudejans JJ, Jiwa M, van den Brule AJ, et al. Detection of heterogeneous Epstein-Barr virus gene expression patterns within individual post-transplant lymphoproliferative disorders. *Am J Pathol*. 1995;147(4):923–933.
11. Luo B, Wang Y, Xiao-Feng W, et al. Expression of Epstein-Barr virus genes in EBV-associated carcinomas. *World J Gastroenterol*. 2005;11(5):629–633.
12. Teramoto N, Sarker AB, Tonoyama Y, et al. Epstein-Barr virus infection in neoplastic and non-neoplastic cells of lymphoid malignancies. *Cancer*. 1996;77(11):2339–2347.
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. 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

30 április 2020

BOND Ready-to-Use ISH

EBER Probe

Nr. catalog: PB0589

Utilizare prevăzută

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

EBER Probe este prevăzută pentru utilizare în identificarea calitativă a infecției EBV¹⁻² latente în țesut fixat cu formalină și încorporat în parafină, prin hibridizare *in situ* (ISH) utilizând sistemul automatizat BOND (care include sistemul Leica BOND-MAX și sistemul Leica BOND-III).

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

Rezumat și explicație

Virusul Epstein-Barr (EBV) face parte din familia gamaherpesvirus. Peste 90% din populația adultă a fost infectată cu EBV în timpul vieții, ceea ce îi conferă statutul de purtător EBV pe viață¹. Infecția primară în timpul copilăriei este de obicei asimptomatică, dar când infecția primară se produce în timpul adolescenței sau mai târziu poate cauza mononucleoză infecțioasă autolimitantă^{3,4}. EBV poate produce atât infecție litică cât și infecție latentă. În timpul infecției litice, se produce virus, liza celulelor gazdă și o expresie largă a proteinelor virale. Infecția litică se produce în principal în anumite celule epiteliale, precum și în limfocitele B prin intermediul receptorului CD21⁵⁻⁶. După infecția primară, latența se stabilește în limfocitele B cu memorie în repaus, unde doar o mică parte a genomului viral este exprimată, evitând astfel distrugerea de către răspunsul imun al gazdei. Infecția latentă poate de asemenea să se reactiveze, permițând răspândirea virusului.

O infecție EBV latentă este asociată cu mai multe afecțiuni, care includ: Limfom Hodgkin, Limfom Non Hodgkin cu celule B, carcinom nasofaringian, afecțiuni limfoproliferative și limfom la pacienți imunosuprimați, inclusiv pacienți de transplant și de SIDA, cancer gastric și unele limfoame cu celule T⁷⁻¹².

ARN-ul codificat al virusului Epstein Barr (EBER) este exprimat abundent în infecția EBV latentă¹⁻². Transcripțiile EBER sunt non-poliadenilate și rămân netranslate. Detectia EBER prin ISH este considerată o metodă sensibilă pentru detectarea infecției EBV latente¹.

EBER Probe este utilizată în detectarea transcripțiilor EBER în țesut fixat cu formalină și încorporat în parafină. Metoda este reproductibilă și ar trebui să ducă la o colorație nucleară intensă a celulelor care conțin transcripții EBER.

Reactivi furnizați

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

Volum total = 5,5 ml.

Diluare și amestecare

EBER Probe este gata de utilizare. Reconstituirea, amestecarea, diluarea sau tirarea 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 speciemenelor 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*.
- 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 minimum contaminarea microbiană a reactivilor, în caz contrar poate apărea o creștere a colorației nespecifice.
- Timpii sau temperaturile de recuperare, incubație care diferă de valorile specificate pot genera rezultate eronate. Orice astfel de modificare trebuie validată de către utilizator.

Instrucțiuni de utilizare

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

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

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.

Reactivi de control

Utilizarea probelor de reactivi de control negative și pozitive este recomandată pentru a interpreta orice colorație a probelor EBER Probe sau absența acestora pe fiecare eșantion de țesut.

Reactivul de control negativ

Se recomandă utilizarea unei probe de control negativ RNA care nu prezintă hibridizare încrucișată cu secvențele umane pe o secțiune a fiecărui specimen de la pacient, pentru a evalua colorația nespecifică și a permite o mai bună interpretare a oricărei colorații în celulele specifice. Rezultatul așteptat este absența colorației.

Reactivul de control pozitiv

Se recomandă utilizarea unei probe de control pozitiv RNA care etichetează o transcripție umană ubicuitară (de ex., U6) într-o secțiune din specimenul fiecărui pacient, pentru a furniza informații despre conservarea acizilor nucleici în țesut, precum și accesibilitatea acizilor nucleici pentru probă. Dacă o probă de control pozitiv nu demonstrează colorația pozitivă, rezultatele obținute cu speciemenele testate trebuie considerate nevalide.

Țesutul pacientului

Examinați speciemenele pacientului colorate cu EBER Probe ultimele. Intensitatea de colorație pozitivă trebuie evaluată în contextul oricărei colorații vizualizate cu probele de control negativ și pozitiv.

Rezultate așteptate

Tesuturi normale

Nu a fost detectată colorație EBER mRNA utilizând PB0589 într-o varietate de țesuturi normale. A fost detectată o colorare vagă în celulele epiteliale ale tiroidei, prostatei, laringelui și esofagului, tubulelor renale, celulelor secretoare din glandele suprarenale și celulele Leydig. Această colorare nu afectează interpretarea colorării. (Numărul total al cazurilor normale evaluate = 98).

Tesuturi anormale

PB0589 a colorat 3/5 limfoame Hodgkin. Nu s-a observat colorare la tumori pulmonare (0/3), tumori ovariene (0/3), tumori hepatice (0/3), tumori tiroidiene (0/3), tumori esofagiene (0/2), tumori mamare (0/2), tumori metastatice de origine necunoscută (0/2), tumori cerebrale (0/2), tumori testiculare (0/2), tumori de piele (0/2), o tumoră de colon (0/1), o tumoră gastrică (0/1), o tumoră rectală (0/1), o tumoră a laringelui (0/1) și o tumoră a timusului (0/1). (Numărul total al cazurilor anormale evaluate = 34).

PB0589 este recomandat pentru detectarea EBER mRNA.

Restricții specifice produsului

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

Rezolvarea problemelor

Referința 15 poate ajuta la acțiunile de remediere.

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

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

Informații suplimentare

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

Referințe

1. Chang KL, Chen YY, Shibata D, et al. Description of an *in situ* hybridisation methodology for detection of Epstein-Barr virus RNA in paraffin-embedded tissues, with a survey of normal and neoplastic tissues. *Diagnostic Molecular Pathology*. 1992;1(4):246–255.
2. Ambinder RF, Mann RB. Epstein-Barr-encoded RNA *in situ* hybridization: diagnostic applications. *Hum Pathol*. Jun; 25(6):602–5, 1994.
3. Joncas J, Boucher J, Granger-Julien M, et al. Epstein-Barr virus infection in the neonatal period and in childhood. *CMAJ*. 1974;110:33–37.
4. Niederman JC, McCollum RW, Henle G, et al. Infectious mononucleosis: clinical manifestations in relation to EB virus antibodies. *JAMA*. 1968;203:205–209.
5. Sixbey JW, Vesterinen EH, Nedrud JG, et al. Replication of Epstein-Barr virus in human epithelial cells infected *in vitro*. *Nature* 1983;306:480–3.
6. Fingerth JD, Weis JJ, Tedder TF, et al. Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes in the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:4510–4.
7. Weiss LM, Movahed LA, Warnke RA, et al. Detection of Epstein Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's Disease. *NEJM*. 1989;302(8):502–506.
8. Hummel M, Agnostopolous I, Korbjuhn P, et al. Epstein Barr virus in B cell non Hodgkins lymphoma. *J Pathol*. 1995;175(3):263–271.
9. Brousset P, Bulet V, Chittal S, et al. Comparison of *in situ* hybridisation using different isotopic probes for detection of nasopharyngeal carcinoma and immunohistochemical correlation with anti-latent membrane protein antibody. *Lab Invest*. 1992;67(4):457–464.
10. Oudejans JJ, Jiwa M, van den Brule AJ, et al. Detection of heterogeneous Epstein-Barr virus gene expression patterns within individual post-transplant lymphoproliferative disorders. *Am J Pathol*. 1995;147(4):923–933.
11. Luo B, Wang Y, Xiao-Feng W, et al. Expression of Epstein-Barr virus genes in EBV-associated carcinomas. *World J Gastroenterol*. 2005;11(5):629–633.
12. Teramoto N, Sarker AB, Tonoyama Y, et al. Epstein-Barr virus infection in neoplastic and non-neoplastic cells of lymphoid malignancies. *Cancer*. 1996;77(11):2339–2347.
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. 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

30 aprilie 2020

BOND Ready-to-Use ISH

EBER Probe

Номер по каталогу: PB0589

Назначение

Этот реактив предназначен для диагностики *in vitro*.

EBER Probe предназначен для качественного определения скрытой ВЭБ инфекции^{1,2} в фиксированных формалином и залитых в парафин образцах тканей путем гибридизации *in situ* (in situ hybridization (ISH)) с использованием автоматизированной системы BOND (включающей системы Leica BOND-MAX и Leica BOND-III).

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

Краткое изложение и пояснение

Вирус Эпштейна-Барра (ВЭБ) относится к семейству гаммагерпесвирусов. Более 90% взрослого населения были инфицированы ВЭБ в течение жизни, что привело к пожизненному статусу носителя ВЭБ¹. Первичная инфекция в детском возрасте обычно протекает бессимптомно, но когда первичная инфекция возникает в подростковом возрасте или позже, она может вызвать самоограничивающийся инфекционный мононуклеоз^{3,4}. ВЭБ может привести как к литической инфекции, так и латентной инфекции. Во время литической инфекции происходит продуцирование вируса, лизис клеток-хозяев и широкая экспрессия вирусных белков. Литическая инфекция происходит главным образом в некоторых эпителиальных клетках, а также в В-лимфоцитах, действуя через рецептор CD21^{5,6}. После первичной инфекции латентность устанавливается в В-лимфоцитах памяти, где наблюдается экспрессия лишь небольшой части вирусного генома, таким образом, избегая разрушения, вызванного иммунным ответом хозяина. Латентная инфекция также может активироваться повторно, позволяя вирусу распространяться.

Латентная инфекция ВЭБ связана с несколькими состояниями, в том числе: лимфома Ходжкина, неходжкинская лимфома В-клеток, назофарингеальная карцинома, лимфопролиферативные заболевания и лимфома у пациентов с ослабленным иммунитетом, в том числе пациентов, перенесших трансплантацию и пациентов со СПИД, раком желудка и некоторыми Т-клеточными лимфомами⁷⁻¹².

РНК (EBER), кодированная вирусом Эпштейна-Барра, чрезмерно выражена в латентной ВЭБ-инфекции^{1,2}. Транскрипты EBER не полиаденилированы и остаются нетранслируемыми. Определение EBER, используя ISH, считается чувствительным методом для обнаружения латентной ВЭБ-инфекции¹.

EBER Probe используют при обнаружении транскриптов EBER в фиксированных формалином и залитых в парафин образцах тканей. Данный метод является воспроизводимым и должен приводить к интенсивному, коричневому ядерному окрашиванию клеток, содержащих транскрипты EBER.

Реактивы, входящие в комплект поставки

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

Общий объем = 5,5 мл

Разведение и смешивание

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

Необходимые материалы, не входящие в комплект поставки

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

Хранение и стабильность

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

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

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

Условия хранения, отличающиеся от указанных выше, должны быть верифицированы пользователем¹³.

Меры предосторожности

- Этот продукт предназначен для диагностики *in vitro*.
- Для получения копии паспорта безопасности химической продукции обратитесь к местному дистрибьютору или в региональный офис компании Leica Biosystems либо посетите веб-сайт компании Leica Biosystems: www.LeicaBiosystems.com
- С образцами (до и после фиксации) и всеми материалами, на которые они воздействуют, следует обращаться как с потенциально 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.

- Сводите к минимуму микробное загрязнение реактивов во избежание усиления неспецифического окрашивания.
- Нарушение указанных в инструкции правил демаскировки, времени инкубации и термической обработки может привести к ошибочным результатам. Любые подобные изменения должны быть валидированы пользователем.

Инструкция по применению

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

Всегда следует использовать ткани и реактивы, представляющие собой соответствующие контроли. Протокол, в котором применяются ткани и реактивы, являющиеся контроли, должен соответствовать тому, который проводится с использованием РНК-зонда, предназначенного для испытаний.

Контроль качества

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

Положительный контроль ткани

Применяется для проверки правильности подготовки тканей и методов окрашивания.

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

Отрицательный контроль ткани

Это испытание следует выполнять после исследования ткани, использующейся 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.

Контроли реактивов

Для интерпретации любого окрашивания при помощи зондов EBER или его отсутствия в каждом образце ткани рекомендуется использовать зонды отрицательного и положительного контроля реактивов.

Отрицательный контроль реактива

Для оценки неспецифического окрашивания и лучшей интерпретации любого окрашивания специфических клеток при исследовании срезов каждого образца, взятого у пациента, рекомендуется использовать РНК-зонды используемые в качестве отрицательного контроля, которые не проявляют перекрестной гибридизации с последовательностями человека. Ожидаемый результат — это отсутствие окрашивания.

Реактив, представляющий собой положительный контроль

Для получения информации о сохранности нуклеиновых кислот в тканях, так же как и возможности их достичь с помощью зонда, при исследовании срезов каждого образца, взятого у пациента, рекомендуется использовать РНК-зонд, используемые в качестве положительного контроля, маркирующий выраженный транскрипт человека (например, U6). Если зонд, используемый 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 EBER Probe, в последнюю очередь. Интенсивность положительного окрашивания следует оценивать с учетом любого окрашивания, наблюдаемого при использовании зондов отрицательного или положительного контроля.

Ожидаемые результаты

Нормальные ткани

При использовании PB0589 не было обнаружено неспецифическое окрашивание EBER мРНК на выборке нормальных тканей. Слабое окрашивание может обнаруживаться в эпителиальных клетках щитовидной железы, простаты, гортани и пищевода, канальцев почек, секреторных клетках надпочечников, а также клетках Лейдига. Данное окрашивание не должно препятствовать интерпретации окрашивания. (Общее число исследованных нормальных тканей = 98).

Патологически измененные ткани

PB0589 окрашивал в 3/5 случаев лимфомы Ходжкина. Окрашивания не наблюдалось при следующих нозологиях : опухоли легкого (0/3), опухоли яичников (0/3), опухоли печени (0/3), опухоли щитовидной железы (0/3), опухоли пищевода (0/2), опухоли молочной железы (0/2), метастатические опухоли неизвестного происхождения (0/2), опухоли головного мозга (0/2), опухоли яичка (0/2), опухоли кожи (0/2), опухоли толстой кишки (0/1), опухоли желудка (0/1), опухоли прямой кишки (0/1), опухоли гортани (0/1) и опухоли тимуса (0/1). (Общее число исследованных патологически измененных образцов = 34).

PB0589 рекомендуется использовать для обнаружения EBER мРНК.

Ограничения, специфичные для этого продукта

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

Поиск и устранение неполадок

Источник (15) может помочь в принятии мер по устранению неполадок.

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

Дополнительная информация

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

Список источников

1. Chang KL, Chen YY, Shibata D, et al. Description of an *in situ* hybridisation methodology for detection of Epstein-Barr virus RNA in paraffin-embedded tissues, with a survey of normal and neoplastic tissues. *Diagnostic Molecular Pathology*. 1992;1(4):246–255.
2. Ambinder RF, Mann RB. Epstein-Barr-encoded RNA *in situ* hybridization: diagnostic applications. *Hum Pathol*. Jun; 25(6):602–5, 1994.
3. Joncas J, Boucher J, Granger-Julien M, et al. Epstein-Barr virus infection in the neonatal period and in childhood. *CMAJ*. 1974;110:33–37.
4. Niederman JC, McCollum RW, Henle G, et al. Infectious mononucleosis: clinical manifestations in relation to EB virus antibodies. *JAMA*. 1968;203:205–209.
5. Sixbey JW, Vesterinen EH, Nedrud JG, et al. Replication of Epstein-Barr virus in human epithelial cells infected *in vitro*. *Nature* 1983;306:480–3.
6. Fingerroth JD, Weis JJ, Tedder TF, et al. Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes in the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:4510–4.
7. Weiss LM, Movahed LA, Warnke RA, et al. Detection of Epstein Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's Disease. *NEJM*. 1989;302(8):502–506.
8. Hummel M, Agnostopolous I, Korbjuhn P, et al. Epstein Barr virus in B cell non Hodgkins lymphoma. *J Pathol*. 1995;175(3):263–271.
9. Brousset P, Bulet V, Chittal S, et al. Comparison of *in situ* hybridisation using different isotopic probes for detection of nasopharyngeal carcinoma and immunohistochemical correlation with anti-latent membrane protein antibody. *Lab Invest*. 1992;67(4):457–464.
10. Oudejans JJ, Jiwa M, van den Brule AJ, et al. Detection of heterogeneous Epstein-Barr virus gene expression patterns within individual post-transplant lymphoproliferative disorders. *Am J Pathol*. 1995;147(4):923–933.
11. Luo B, Wang Y, Xiao-Feng W, et al. Expression of Epstein-Barr virus genes in EBV-associated carcinomas. *World J Gastroenterol*. 2005;11(5):629–633.
12. Teramoto N, Sarker AB, Tonoyama Y, et al. Epstein-Barr virus infection in neoplastic and non-neoplastic cells of lymphoid malignancies. *Cancer*. 1996;77(11):2339–2347.
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. 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

30 Апрель 2020

BOND Ready-to-Use ISH

EBER Probe

Nr katalogowy: PB0589

Przeznaczenie

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

Preparat EBER Probe jest przeznaczony do ilościowego oznaczenia utajonej infekcji wirusem EBV^{1,2} w utrwalonej formaliną tkance zatopionej w parafinie przez hybrydizację *in situ* (ISH) przy użyciu automatycznego systemu BOND (w tym systemów Leica BOND-MAX i Leica BOND-III).

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

Podsumowanie i objaśnienie

Wirus Epsteina-Barr (EBV) należy do rodziny wirusów Gamma Herpes. Ponad 90% dorosłej populacji zostało w ciągu całego życia zakażone wirusem EBV, czego skutkiem jest nosicielstwo EBV trwające przez całe życie¹. Pierwotna infekcja w dzieciństwie przebiega zazwyczaj bezobjawowo, jednak jeśli wystąpi w okresie dojrzewania lub później, może powodować samoograniczającą się mononukleozę zakaźną^{3,4}. Zakażenie EBV może występować w postaci litycznej, jak i utajonej. Podczas infekcji litycznej dochodzi do produkcji wirusa, lizy komórek gospodarza i szerokiej ekspresji białek wirusowych. Infekcja lityczna występuje przede wszystkim w niektórych komórkach nabłonka, a także limfocytach B poprzez receptor CD21^{5,6}. Po pierwotnym zakażeniu utajenie polega na tym, że w limfocytach B pamięci immunologicznej dochodzi do ekspresji jedynie niewielkiej części genomu wirusowego, co pozwala uniknąć zniszczenia przez odpowiedź immunologiczną gospodarza. Infekcja utajona może również reaktywować się, umożliwiając rozprzestrzenianie się wirusa.

Utajona infekcja EBV może powodować niektóre choroby, w tym: Chłoniaka Hodgkina, chłoniaka niezarnicznego z limfocytów B, raka nosogardzieli, zaburzeń limfoproliferacyjnych i chłoniaka w immunosupresji, w tym u pacjentów z przeszczepem i AIDS, rakiem żołądka i niektórymi chłoniakami z limfocytów T^{7,12}.

Podczas ukrytej infekcji EBV dochodzi do obfitej ekspresji zakodowanego RNA wirusa Epsteina-Barr (EBER)^{1,2}. Transkrypty EBER nie są poladenowane i nie podlegają translacji. Wykrywanie EBER przez ISH (hybrydizację *in situ*) jest uważane za czułą metodę wykrywania utajonego zakażenia EBV¹.

Preparat EBER Probe służy do wykrywania transkryptów EBER w utrwalonej w formalinie tkance zatopionej w parafinie. Metoda jest powtarzalna i jej efektem powinno być intensywne, brązowe barwienie jądrowe komórek zawierających transkrypty EBER.

Odczynniki znajdujące się w zestawie

Preparat EBER Probe to skoniugowana z fluoresceiną sonda oligonukleotydowa dostarczana w roztworze do hybrydizacji. Łączna objętość = 5,5 ml

Rozcieńczanie i mieszanie.

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

Wymagane materiały niedołączone do zestawu

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

Przechowywanie i trwałość

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

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

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

Przechowywanie w warunkach innych od wskazanych powyżej wymaga weryfikacji użytkownika¹³.

Środki ostrożności

- Test jest przeznaczony do stosowania w diagnostyce *in vitro*.
- Aby otrzymać egzemplarz karty charakterystyki, należy skontaktować się z lokalnym dystrybutorem lub regionalnym biurem Leica Biosystems lub odwiedzić stronę internetową Leica Biosystems, www.LeicaBiosystems.com
- Z preparatami przed utwaleniem i po utwaleniu, jak również ze wszystkimi materiałami, które mają z nimi styczność, należy obchodzić się tak, jak z materiałami potencjalnie zakaźnymi i należy je utylizować, zachowując odpowiednie środki ostrożności.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.
- Chronić odczynniki przed skażeniem drobnoustrojami, ponieważ może ono doprowadzić do zwiększonego barwienia niespecyficznego.
- Zastosowanie czasów odzyskiwania, inkubacji lub temperatur innych niż podano w instrukcji może spowodować błędne wyniki. Wszelkie zmiany tego typu muszą zostać zweryfikowane przez użytkownika.

Instrukcja stosowania

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

Zawsze należy stosować odpowiednie kontrole tkanek i odczynników. Protokół kontroli tkanek i odczynników powinien odpowiadać protokołowi z sondy do badań RNA.

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.

Kontrole odczynników

Zaleca się stosowanie sond do pozytywnych i negatywnych kontroli odczynników, aby zinterpretować barwienie przy pomocy sondy EBER lub jego brak na każdej próbce tkanki.

Negatywna kontrola odczynnika

Zaleca się stosowanie sondy kontroli negatywnej RNA, która nie tworzy hybrydy z sekwencjami ludzkimi, na skrawku każdej próbki pobranej od pacjenta w celu oceny barwienia niespecyficznego i umożliwienia lepszej interpretacji każdego zabarwienia w określonych komórkach. Oczekiwany rezultatem jest brak barwienia.

Pozytywna kontrola odczynnika

Aby uzyskać informacje o zachowaniu kwasów nukleinowych w tkance, a także o możliwości znakowania kwasów nukleinowych przez sondę, należy użyć sondy kontroli pozytywnej RNA, która znacząco wszechobecnie wyrażany transkrypt ludzki (np. U6), na każdym skrawku z próbki pobranej od pacjenta. Jeśli sonda kontroli pozytywnej nie wykaże odpowiedniego barwienia pozytywnego, wyniki testu przeprowadzonego na próbkach pobranych od pacjenta należy uznać za nieważne.

Tkanka pacjenta

Próbki pacjenta barwione EBER Probe należy badać jako ostatnie. Należy ocenić intensywność barwienia pozytywnego każdego zaobserwowanego barwienia za pomocą sondy kontroli negatywnej i pozytywnej.

Oczekiwane wyniki

Tkanki prawidłowe

Nie wykryto specyficznego barwienia mRNA EBER przy użyciu PB0589 w szerokim zakresie normalnych tkanek. Słabe wybarwienie stwierdzono w komórkach nabłonka tarczycy, prostaty, krtani i przełyku, kanalikach nerkowych, komórkach wydzielniczych w nadnerczach i komórkach Leydiga. Taki rodzaj barwienia nie zakłóca interpretacji. (Łączna liczba ocenionych prawidłowych przypadków = 98).

Tkanki patologiczne

PB0589 zabarwiło 3/5 chłoniaki nieziarnicze. Nie stwierdzono barwienia guzów płuc (0/3), guzów jajnika (0/3), guzów wątroby (0/3), guzów tarczycy (0/3), guzów przełyku (0/2), guzów sutka (0/2), guzów przerzutowych o nieznanym pochodzeniu (0/2), guzów mózgu (0/2), guzów jąder (0/2), nowotworów skóry (0/2), guzów okrężnicy (0/1), guzów żołądka (0/1), guza odbytnicy (0/1), guza krtani (0/1) ani guza gruczołu (0/1). (Łączna liczba ocenionych nieprawidłowych przypadków = 34).

Zaleca się stosowanie PB0589 do wykrywania mRNA EBER.

Szczegółne ograniczenia dla produktu

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

Rozwiązywanie problemów

Odnosnik 15 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 hybridyzacji *in situ* przy użyciu odczynników BOND opisanej w rozdziałach „Zasady postępowania”, „Wymagane materiały”, „Przygotowanie próbek”, „Kontrola jakości”, „Weryfikacja testu”, „Interpretacja barwienia”, „Objaśnienie symboli na etykietach” i „Ograniczenia ogólne” można znaleźć w rozdziale „Stosowanie odczynników BOND” w dokumentacji użytkownika systemu BOND.

Literatura

1. Chang KL, Chen YY, Shibata D, et al. Description of an *in situ* hybridisation methodology for detection of Epstein-Barr virus RNA in paraffin-embedded tissues, with a survey of normal and neoplastic tissues. *Diagnostic Molecular Pathology*. 1992;1(4):246–255.
2. Ambinder RF, Mann RB. Epstein-Barr-encoded RNA *in situ* hybridization: diagnostic applications. *Hum Pathol*. Jun; 25(6):602–5, 1994.
3. Joncas J, Boucher J, Granger-Julien M, et al. Epstein-Barr virus infection in the neonatal period and in childhood. *CMAJ*. 1974;110:33–37.
4. Niederman JC, McCollum RW, Henle G, et al. Infectious mononucleosis: clinical manifestations in relation to EB virus antibodies. *JAMA*. 1968;203:205–209.
5. Sixbey JW, Vesterinen EH, Nedrud JG, et al. Replication of Epstein-Barr virus in human epithelial cells infected *in vitro*. *Nature* 1983;306:480–3.
6. Fingeroth JD, Weis JJ, Tedder TF, et al. Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes in the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:4510–4.
7. Weiss LM, Movahed LA, Warnke RA, et al. Detection of Epstein Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's Disease. *NEJM*. 1989;302(8):502–506.
8. Hummel M, Agnostopolous I, Korbjuhn P, et al. Epstein Barr virus in B cell non Hodgkins lymphoma. *J Pathol*. 1995;175(3):263–271.
9. Brousset P, Bulet V, Chittal S, et al. Comparison of *in situ* hybridisation using different isotopic probes for detection of nasopharyngeal carcinoma and immunohistochemical correlation with anti-latent membrane protein antibody. *Lab Invest*. 1992;67(4):457–464.
10. Oudejans JJ, Jiwa M, van den Brule AJ, et al. Detection of heterogeneous Epstein-Barr virus gene expression patterns within individual post-transplant lymphoproliferative disorders. *Am J Pathol*. 1995;147(4):923–933.
11. Luo B, Wang Y, Xiao-Feng W, et al. Expression of Epstein-Barr virus genes in EBV-associated carcinomas. *World J Gastroenterol*. 2005;11(5):629–633.
12. Teramoto N, Sarker AB, Tonoyama Y, et al. Epstein-Barr virus infection in neoplastic and non-neoplastic cells of lymphoid malignancies. *Cancer*. 1996;77(11):2339–2347.
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. 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

30 kwietnia 2020

BOND Ready-to-Use ISH

EBER Probe

Kataloška št.: PB0589

Predvidena uporaba

Ta reagent je namenjen diagnostični uporabi *in vitro*.

Sonda EBER Probe je namenjena za uporabo v kvalitativni identifikaciji latentne okužbe z EBV¹⁻², ki se veže na specifična zaporedja nukleotidov v tkivu, fiksiranem s formalinom in vstavljenem v parafin, s hibridizacijo (ISH) *in situ* z uporabo avtomatiziranega sistema BOND (vključuje sistem Leica BOND-MAX in sistem Leica BOND-III).

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

Povzetek in razlaga

Virus Epstein-Barr (EBV) je član družine virusov Gama Herpes. Več kot 90 % odrasle populacije se v svojem življenju okuži z virusom EBV, kar povzroči vseživljenjsko stanje nosilca¹. Primarna okužba v otroštvu je običajno asimptomatska, če pa se primarna okužba zgodi v času adolescence ali kasneje, lahko povzroči samoomejevalno infekcijsko mononukleozo³⁻⁴. EBV lahko vzpostavi litično in latentno okužbo. Pri litični okužbi pride do nastanka virusa, lize gostiteljskih celic in izražanja virusnih beljakovin. Litična okužba se večinoma pojavlja v določenih epiteljskih celicah in v B-limfocitih prek receptorja CD21⁵⁻⁶. Po primarni okužbi se pojavi latentna okužba pri spominskih B-limfocitih v mirovanju, kjer je izražen le majhen delež virusnega genoma, zaradi česar ne pride do uničenja z imunskim odzivom gostitelja. Latentna okužba se lahko tudi ponovno aktivira, kar omogoča širjenje virusa.

Latentna okužba z EBV je povezana s številnimi stanji, vključno: z Hodgkinovim limfomom, B-celičnim ne Hodgkinovim limfomom, nazofaringealnim karcinomom, limfoproliferativnimi motnjami in limfomom pri imunsko oslabljenih osebah, vključno pacienti z AIDS-om, pacientih z rakom na želodcu in z nekaterimi T-celičnimi limfomi⁷⁻¹².

RNA, kodirana z virusom Epstein-Bar (EBER), je obilno izražena pri latentni okužbi z EBV¹⁻². Transkripti EBER so nepoliadenirani in ostanejo neprevedeni. Zaznavanje EBER z ISH velja za občutljivo metodo zaznavanja latentne okužbe z EBV¹.

Sonda EBER Probe se uporablja pri zaznavanju transkriptov EBER v tkivu, fiksiranem s formalinom in vstavljenem v parafin. Ta metoda je ponovljiva in bi morala povzročiti intenzivno rjavo barvanje jedra celic, ki vsebujejo transkripte EBER.

Priloženi reagenti

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

Skupna prostornina = 5,5 ml.

Redčenje in mešanje

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

Potrebni materiali, ki niso priloženi

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

Shranjevanje in stabilnost

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

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

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

Uporabnik mora potrditi ustreznost pogojev shranjevanja, če se ti razlikujejo od zgoraj navedenih¹³.

Previdnosti ukrepi

- Ta izdelek je namenjen za diagnostično uporabo *in vitro*.
- 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 mikrobné okužbe reagentov, saj lahko povzroči nespecifično barvanje.
- Če uporabite čas ali temperature razkrivanja in inkubacije, ki se razlikujejo od navedenih, lahko pridobite napačne rezultate. Uporabnik mora validirati morebitne spremembe.

Navodila za uporabo

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

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

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.

Kontrolni reagenti

Uporaba sond negativnih in pozitivnih kontrolnih reagentov se priporoča za razlago vseh obarvanj sonde EBER Probe ali odsotnost obarvanja pri posameznem vzorcu tkiva.

Negativni kontrolni reagent

Za razlago nespecifičnega barvanja in boljšo razlago kakršnega koli obarvanja v določenih celicah se priporoča uporaba sonde za negativno kontrolo RNA, ki ne povzroči navzkrižnih hibridov s humanim zaporedjem na rezini vzorca posameznega bolnika. Pričakovani rezultat je odsotnost obarvanja.

Pozitivni kontrolni reagent

Za zagotovitev informacij o ohranjenosti nukleinskih kislin v tkivu ter dostopnosti nukleinskih kislin sondi se priporoča uporaba sonde za pozitivno kontrolo RNA, ki označuje vsenavzoči izražen humani transkript (npr. U6) na rezini vzorca posameznega bolnika. Če sonda pozitivne kontrole ne kaže pozitivnega obarvanja, morate vse rezultate testnih vzorcev šteti za neveljavne.

Bolnikovo tkivo

Nazadnje preglejte bolnikove vzorce, obarvane s sondo EBER Probe. Intenzivnost pozitivnega obarvanja morate oceniti v kontekstu morebitnega obarvanja, opaženega pri sondah negativnih in pozitivnih kontrol.

Pričakovani rezultati

Normalna tkiva

Z uporabo PB0589 pri širokem naboru normalnih tkiv ni bilo zaznano nobeno specifično obarvanje EBER mRNA. Šibko obarvanje so ugotovili v epitelijških celicah ščitnice, prostate, grla in požiralnika, v tubulih ledvic, sekretornih celicah v nadledvičnih žlezah in Leydigovih celicah. To obarvanje ne vpliva na interpretacijo obarvanja. (Skupno število ocenjenih normalnih primerov = 98).

Nenormalna tkiva

PB0589 je obarval Hodgkinov limfom 3/5. Obarvanja niso opazili v pljučnih tumorjih (0/3), tumorjih na jajčnikih (0/3), tumorjih jeter (0/3), tumorjih ščitnice (0/3), tumorjih požiralnika (0/2), tumorjih dojke (0/2), metastatskih tumorjih neznanega izvora (0/2), možganskih tumorjih (0/2), tumorjih testisov (0/2), tumorjih kože (0/2), tumorju debelega črevesa (0/1), tumorju želodca (0/1), tumorju rektuma (0/1), tumorju grla (0/1) in tumorju priželjca (0/1). (Skupno število ocenjenih anomalnih primerov = 34).

PB0589 je priporočen za zaznavanje EBER mRNA.

Specifične omejitve izdelka

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

Odravljanje težav

Referenca 15 lahko pomaga pri ukrepanju za odpravljanju napake.

Testne vzorce morajo spremljati ustrezne kontrole za tkiva in reagente.

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

Dodatne informacije

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

Viri

1. Chang KL, Chen YY, Shibata D, et al. Description of an *in situ* hybridisation methodology for detection of Epstein-Barr virus RNA in paraffin-embedded tissues, with a survey of normal and neoplastic tissues. *Diagnostic Molecular Pathology*. 1992;1(4):246–255.
2. Ambinder RF, Mann RB. Epstein-Barr-encoded RNA *in situ* hybridization: diagnostic applications. *Hum Pathol*. Jun; 25(6):602–5, 1994.
3. Joncas J, Boucher J, Granger-Julien M, et al. Epstein-Barr virus infection in the neonatal period and in childhood. *CMAJ*. 1974;110:33–37.
4. Niederman JC, McCollum RW, Henle G, et al. Infectious mononucleosis: clinical manifestations in relation to EB virus antibodies. *JAMA*. 1968;203:205–209.
5. Sixbey JW, Vesterinen EH, Nedrud JG, et al. Replication of Epstein-Barr virus in human epithelial cells infected *in vitro*. *Nature* 1983;306:480–3.
6. Fingerth JD, Weis JJ, Tedder TF, et al. Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes in the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:4510–4.
7. Weiss LM, Movahed LA, Warnke RA, et al. Detection of Epstein Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's Disease. *NEJM*. 1989;302(8):502–506.
8. Hummel M, Agnostopolous I, Korbjuhn P, et al. Epstein Barr virus in B cell non Hodgkins lymphoma. *J Pathol*. 1995;175(3):263–271.
9. Brousset P, Bulet V, Chittal S, et al. Comparison of *in situ* hybridisation using different isotopic probes for detection of nasopharyngeal carcinoma and immunohistochemical correlation with anti-latent membrane protein antibody. *Lab Invest*. 1992;67(4):457–464.
10. Oudejans JJ, Jiwa M, van den Brule AJ, et al. Detection of heterogeneous Epstein-Barr virus gene expression patterns within individual post-transplant lymphoproliferative disorders. *Am J Pathol*. 1995;147(4):923–933.
11. Luo B, Wang Y, Xiao-Feng W, et al. Expression of Epstein-Barr virus genes in EBV-associated carcinomas. *World J Gastroenterol*. 2005;11(5):629–633.
12. Teramoto N, Sarker AB, Tonoyama Y, et al. Epstein-Barr virus infection in neoplastic and non-neoplastic cells of lymphoid malignancies. *Cancer*. 1996;77(11):2339–2347.
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. 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

30 april 2020

BOND Ready-To-Use ISH

EBER Probe

Kat. č.: PB0589

Zamýšlené použití

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

Sonda EBER Probe je určena k použití při kvalitativním stanovení latentní EBV infekce¹⁻² ve tkáni fixované formalinem a zalité v parafínu hybridizací *in situ* (ISH) pomocí automatického systému BOND (včetně Leica BOND-MAX a Leica BOND-III systému).

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

Virus Epstein-Barrové (EBV) je součástí rodiny gama herpetických virů. Více než 90 % dospělé populace bylo infikováno EBV virem během jejich života, což vede k celoživotnímu přenášení EBV¹. Primární infekce během dětství je obvykle asymptomatická, když ale k primoinfekci dojde během dospívání nebo později, může to způsobit přechodnou infekční mononukleózu²⁻⁴. EBV může navodit jak lymfickou, tak latentní infekci. Během lymfické infekce dochází k produkci viru, lýze hostitelských buněk a široké expresi virových proteinů. K lymfické infekci dochází především v určitých epitelových buňkách stejně jako v B-lymfocytech přes receptor CD21⁵⁻⁶. Následně po primoinfekci je ustanovena v klidových paměťových B-lymfocytech latence, kde je exprimována pouze malá část virového genomu, čímž se zabrání zničení hostitelskou imunitní odpovědí. Latentní infekce se může také znovu aktivovat, což umožní šíření viru.

Latentní EBV infekce je spojena s několika stavy, včetně: Hodgkinova lymfomu, B-buněčného non-hodgkinova lymfomu, karcinomu nosohltanu, lymfoproliferativních poruch a lymfomů u imunosuprimovaných pacientů, včetně transplantovaných pacientů a pacientů s AIDS, rakoviny žaludku a některých T-buněčných lymfomů⁷⁻¹².

Netranslatované řetězce RNA viru Epstein-Barrové (EBER) jsou hojně exprimovány v latentní EBV infekci¹⁻². EBER transkripty nejsou polyadenylovány a zůstávají netranslatovány. Detekce EBER hybridizací *in situ* (ISH) se považuje za citlivou metodu detekce latentní EBV infekce¹.

Sonda EBER Probe se využívá k detekci EBER transkriptů ve tkáni fixované formalinem a zalité v parafínu. Tato metoda je reprodukovatelná a měla by vést k intenzivnímu hnědému zbarvení jader buněk, které obsahují EBER transkripty.

Dodávané reagenzie

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

Celkový objem = 5,5 ml

Ředění a míchání

Sonda EBER Probe je připravena k použití. Rekonstituce, míchání, ředění ani titrace této reagenzie 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 Leica BOND-MAX a Leica BOND-III systému) je uveden v bodě „Použití reagenzií BOND“ v uživatelské dokumentaci BOND.

Skladování a stabilita

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

Neexistují zjevné známky indikující kontaminaci nebo 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*.
- Výštk bezpečnostního listu materiálu získáte od místního distributora nebo oblastní kanceláře společnosti Leica Biosystems, nebo můžete navštívit webové stránky Leica Biosystems: www.LeicaBiosystems.com
- Se zvoře, 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 reagenzie nepipetujte ústy a zabraňte kontaktu reagenzií a vzorků s kůží a sliznicemi. Pokud se reagenzie 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 reagenzií, mohlo by dojít ke zvýšení výskytu nespecifického barvení.
- Získávání, inkubační doby nebo teploty jiné než specifikované mohou vést k chybným výsledkům. Všechny takové změny musí být uživatelem validovány.

Návod k použití

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

Vždy se musí použít příslušné tkáňové a reagenční kontroly. Protokol tkáňové a reagenční kontroly musí odpovídat kontrolám RNA testovací sondy.

Kontrola jakosti

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

Pozitivní tkáňová kontrola

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

V každém barvicím cyklu musí být použita jedna pozitivní tkáňová kontrola pro každý soubor testovacích podmínek. Pro optimální kontrolu jakosti a k detekci menšího stupně degradace 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.

Kontroly reagenცი

K interpretaci jakéhokoliv barvení sondy EBER nebo jeho nepřítomnosti na každém vzorku tkáně se doporučuje použití sond negativních nebo pozitivních reagenčních kontrol.

Negativní reagenční kontrola

K vyhodnocení nespecifického barvení a aby se umožnila lepší interpretace jakéhokoliv barvení ve specifických buňkách, se doporučuje používat sondu negativní kontroly RNA, která křížově nehybridizuje s lidskými sekvencemi na řezu z každého vzorku pacienta. Očekávaným výsledkem je nepřítomnost barvení.

Pozitivní reagenční kontrola

K získání informací o konzervaci nukleových kyselin ve tkáni a přístupnosti nukleových kyselin pro sondu se doporučuje používat na řezu z každého vzorku pacienta sondu pozitivní kontroly RNA, která označuje všudypřítomně exprimovaný lidský transkript (např. U6). Pokud sonda pozitivní kontroly nevykazuje pozitivní barvení, musí být jakékoliv výsledky testovaných vzorků považovány za neplatné.

Tkáň pacienta

Nakonec vyšetřete vzorky pacienta barvené pomocí sondy EBER Probe. Intenzitu pozitivního barvení je třeba posuzovat v kontextu jakéhokoliv barvení viděného pomocí sond pozitivních a negativních kontrol.

Očekávané výsledky

Normální tkáně

V širokém rozsahu normálních tkání nebylo detekováno žádné specifické EBER mRNA barvení při použití sondy PB0589. Slabé barvení bylo detekováno u epitelálních buněk štítné žlázy, prostaty, hrtanu a jícnu, ledvinových tubulů, sekrečních buněk nadledvin a Leydigových buněk. Toto barvení neinterferuje s interpretací barvení. (Celkový počet normálních vyšetřovaných tkání = 98).

Abnormální tkáně

Sonda PB0589 barvila 3/5 Hodgkinových lymfomů. Žádné barvení nebylo pozorováno u nádorů plic (0/3), ovariálních nádorů (0/3), nádorů jater (0/3), nádorů štítné žlázy (0/3), nádorů jícnu (0/2), nádorů prsu (0/2), metastatických nádorů neznámého původu (0/2), nádorů mozku (0/2), testikulárních nádorů (0/2), nádorů kůže (0/2), nádoru tlustého střeva (0/1), nádoru žaludku (0/1), rektálního nádoru (0/1), nádoru hrtanu (0/1) a nádoru thymu (0/1). (Celkový počet vyšetřených abnormálních tkání = 34).

Sonda PB0589 je doporučena k detekci EBER mRNA.

Omezení specifická pro tento produkt

Sonda EBER Probe byla společností Leica Biosystems optimalizována pro použití s protilátkami proti fluoresceinu, soupravou BOND Polymer Refine Detection a s pomocnými reagenциemi BOND. 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 v důsledku odchylek při fixaci tkání a účinnosti enzymatické digesce a musí být stanoveny empiricky. Při optimalizaci podmínek při získávání a dob v protokolu musí být použita sonda RNA Negative Control Probe.

Řešení problémů

Odkaz 15 může napomoci při provádění nápravných opatření.

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

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

Další informace

Další informace o hybridizaci *in situ* reagenциemi 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 reagenცი BOND“.

Literatura

1. Chang KL, Chen YY, Shibata D, et al. Description of an *in situ* hybridisation methodology for detection of Epstein-Barr virus RNA in paraffin-embedded tissues, with a survey of normal and neoplastic tissues. *Diagnostic Molecular Pathology*. 1992;1(4):246–255.
2. Ambinder RF, Mann RB. Epstein-Barr-encoded RNA *in situ* hybridization: diagnostic applications. *Hum Pathol*. Jun; 25(6):602–5, 1994.
3. Joncas J, Boucher J, Granger-Julien M, et al. Epstein-Barr virus infection in the neonatal period and in childhood. *CMAJ*. 1974;110:33–37.
4. Niederman JC, McCollum RW, Henle G, et al. Infectious mononucleosis: clinical manifestations in relation to EB virus antibodies. *JAMA*. 1968;203:205–209.
5. Sixbey JW, Vesterinen EH, Nedrud JG, et al. Replication of Epstein-Barr virus in human epithelial cells infected *in vitro*. *Nature* 1983;306:480–3.
6. Fingeroth JD, Weis JJ, Tedder TF, et al. Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes in the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:4510–4.
7. Weiss LM, Movahed LA, Warnke RA, et al. Detection of Epstein Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's Disease. *NEJM*. 1989;302(8):502–506.
8. Hummel M, Agnostopolous I, Korbjuhn P, et al. Epstein Barr virus in B cell non Hodgkins lymphoma. *J Pathol*. 1995;175(3):263–271.
9. Brousset P, Bulet V, Chittal S, et al. Comparison of *in situ* hybridisation using different isotopic probes for detection of nasopharyngeal carcinoma and immunohistochemical correlation with anti-latent membrane protein antibody. *Lab Invest*. 1992;67(4):457–464.
10. Oudejans JJ, Jiwa M, van den Brule AJ, et al. Detection of heterogeneous Epstein-Barr virus gene expression patterns within individual post-transplant lymphoproliferative disorders. *Am J Pathol*. 1995;147(4):923–933.
11. Luo B, Wang Y, Xiao-Feng W, et al. Expression of Epstein-Barr virus genes in EBV-associated carcinomas. *World J Gastroenterol*. 2005;11(5):629–633.
12. Teramoto N, Sarker AB, Tonoyama Y, et al. Epstein-Barr virus infection in neoplastic and non-neoplastic cells of lymphoid malignancies. *Cancer*. 1996;77(11):2339–2347.
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. 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

30 duben 2020

BOND Ready-to-Use ISH

EBER Probe

Katalógové č.: PB0589

Zamýšľané použitie

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

Sonda EBER Probe je určená na kvalitatívne stanovenie latentnej infekcie EBV¹⁻² 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).

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

Epstein-Barrovej vírus (EBV) patrí do skupiny gamma-Herpes vírusov. Počas svojho života sa EBV nainfikovalo viac ako 90 % dospeljej populácie, v dôsledku čoho sa stala celoživotným prenášačom EBV¹. V detstve je primárna infekcia spravidla asymptomatická, ale ak sa objaví počas dospievania alebo v neskoršom období, môže spôsobiť infekčnú mononukleózu³⁻⁴, ktorá spontánne vymizne. EBV môže vyvolať tak lytickú, ako aj latentnú infekciu. V priebehu lytickej infekcie dochádza k produkcii vírusu, lýze hostiteľských buniek a rozsiahlej expresii vírusových bielkovín. Lytická infekcia sa vyskytuje najmä v určitých epiteliových bunkách, ale prostredníctvom receptora CD21⁵⁻⁶ aj v B-lymfocytoch. Po primárnej infekcii dochádza k rozvoju latencie vo zvyšných pamätových B-lymfocytoch, kde sa exprimuje len malá časť vírusového genómu, aby sa zabránilo zničeniu reakciou hostiteľského imunitného systému. Latentná infekcia sa môže takisto reaktívovať, čím dochádza k šíreniu vírusu.

Latentná infekcia EBV je asociovaná s niekoľkými ochoreniami vrátane: Hodgkinovho lymfómu, non-Hodgkinovho B-bunkového lymfómu, nazofaryngeálneho karcinómu, lymfoproliferatívnych ochorení a lymfómu u imunosupresívnych pacientov vrátane pacientov po transplantácii, pacientov s AIDS, karcinómu žalúdka a niektorých T-bunkových lymfómoch⁷⁻¹².

RNA zakódovaná v Epstein-Barrovej víruse (EBER) je nadmerne exprimovaná v latentnej infekcii EBV¹⁻². Transkripty EBER sú nepolyadenylované a zostávajú netranslatované. Detekcia EBER pomocou ISH sa považuje za citlivú metódu detekcie latentnej infekcie EBV¹.

Sonda EBER Probe sa používa na detekciu transkriptov EBER v tkanive zaliatom do parafínu a fixovanom vo formalíne. Metóda je reprodukovateľná a mala by viesť k intenzívnemu hnedému nukleárnemu zafarbeniu buniek obsahujúcich transkripty EBER.

Dodané činidlá

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

Celkový objem = 5,5 ml

Riedenie a miešanie

Sonda EBER 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*.
- 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. Vyhladajte 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 dôb záchytu, inkubačných dôb alebo teplôt môže viesť k nesprávnym výsledkom. Všetky takéto zmeny si vyžadujú validáciu používateľom.

Návod na použitie

Sonda EBER Probe bola vytvorená na použitie v automatizovanom systéme BOND (zahŕňa systémy Leica BOND-MAX a Leica BOND-III) v spojitosti s protilátkou proti fluorescenciu a so systémom BOND Polymer Refine Detection. Odporúčaný protokol farbenia pre sondu EBER Probe je ISH Protocol A. Na zachytenie enzýmov sa odporúča použiť súpravu BOND Enzyme Pretreatment Kit, Enzyme 1, po dobu 15 minút.

Vždy sa musia používať vhodné kontroly tkanivom a činidlom. Protokol pre kontroly tkanivom a činidlom musí zodpovedať protokolom pre testovacie sondy RNA.

Kontrola kvality

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

Positívna kontrola tkanivom

Identifikuje správne pripravené tkanivá a správne techniky zafarbenia.

Každá súprava testových podmienok v každom cykle zafarbenia musí obsahovať jednu pozitívnu kontrolu tkanivom. Tkanivo so slabým pozitívnym farbením je 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.

Kontroly činidlom

Na interpretáciu akéhokoľvek zafarbenia pomocou sondy EBER alebo jeho absencie sa v prípade každej vzorky tkaniva odporúča použitie sond pozitívnej a negatívnej kontroly činidlom.

Negatívna kontrola činidlom

Na posúdenie nešpecifického zafarbenia a pre lepšiu interpretáciu akéhokoľvek zafarbenia v špecifických bunkách sa odporúča použiť sondu negatívnej kontroly RNA, ktorá nespôsobuje krížovú hybridizáciu s ľudskými sekvenciami na reze vzorky jednotlivých pacientov. Očakávaným výsledkom je absencia zafarbenia.

Positívna kontrola činidlom

Na poskytnutie informácií o zachovaní nukleových kyselín v tkanive, ako aj o dostupnosti nukleových kyselín pre sondu sa odporúča použiť sondu pozitívnej kontroly RNA, ktorá označuje všadeprítomne exprimovaný ľudský transkript (napr. U6) na reze vzorky jednotlivých pacientov. Ak sonda pozitívnej kontroly nebude vykazovať pozitívne zafarbenie, všetky výsledky testovaných vzoriek je nutné považovať za neplatné.

Tkanivo pacienta

Pacientske vzorky zafarbené sondou EBER Probe preskúmajte ako posledné. Intenzitu pozitívneho zafarbenia treba posúdiť v rámci kontextu akéhokoľvek zafarbenia spozorovaného pomocou sond negatívnej a pozitívnej kontroly.

Očakávané výsledky

Normálne tkanivá

Pri použití sondy PB0589 nebolo pozorované žiadne zafarbenie mRNA EBER na širokej škále rôznych tkanív. Slabé zafarbenie bolo zistené v epiteliových bunkách štítnej žľazy, prostaty, hrtanu a pažeráka, tubuloch obličky, sekrečných bunkách nadobličiek a Leydigových bunkách. Toto zafarbenie nemá vplyv na interpretáciu farbenia. (Celkový počet normálnych vyšetrených prípadov = 98).

Abnormálne tkanivá

Sonda PB0589 zafarbila 3/5 Hodgkinových lymfómov. Zafarbenie nebolo pozorované pri nádoroch pľúc (0/3), nádoroch vaječníka (0/3), nádoroch pečene (0/3), nádoroch štítnej žľazy (0/3), nádoroch pažeráka (0/2), nádoroch prsníka (0/2), metastatických nádoroch neznámeho pôvodu (0/2), nádoroch mozgu (0/2), nádoroch semenníka (0/2), nádoroch kože (0/2), nádore hrubého čreva (0/1), nádore žalúdka (0/1), nádore konečníka (0/1), nádore hrtanu (0/1) a nádore detskej žľazy (0/1). (Celkový počet abnormálnych vyšetrených prípadov = 34).

Sonda PB0589 sa odporúča na detekciu mRNA EBER.

Špecifické obmedzenia pre tento výrobok

Sonda EBER Probe bola v spoločnosti Leica Biosystems optimalizovaná na použitie s protilátkou proti fluorescenciu, so systémom BOND Polymer Refine Detection a pomocnými činidlami BOND. Používatelia, ktorí sa odchýlia od odporúčaných testovacích postupov, musia akceptovať zodpovednosť za interpretáciu výsledkov pacienta za týchto okolností. Časy podľa protokolu sa môžu líšiť z dôvodu odchýlok vo fixácii tkaniva a účinnosti enzymatického zhusťenia a musia sa zistiť empiricky. Pri optimalizácii podmienu zachytu a časov podľa protokolov je potrebné použiť sondu RNA Negative Control Probe.

Riešenie problémov

Pri náprave môže byť nápomocná referencia 15.

Testovacie vzorky majú doplniť vhodné kontrolné tkanivá a kontrolné činidlá.

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

Ďalšie informácie

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

Referencie

1. Chang KL, Chen YY, Shibata D, et al. Description of an *in situ* hybridisation methodology for detection of Epstein-Barr virus RNA in paraffin-embedded tissues, with a survey of normal and neoplastic tissues. *Diagnostic Molecular Pathology*. 1992;1(4):246–255.
2. Ambinder RF, Mann RB. Epstein-Barr-encoded RNA *in situ* hybridization: diagnostic applications. *Hum Pathol*. Jun; 25(6):602–5, 1994.
3. Joncas J, Boucher J, Granger-Julien M, et al. Epstein-Barr virus infection in the neonatal period and in childhood. *CMAJ*. 1974;110:33–37.
4. Niederman JC, McCollum RW, Henle G, et al. Infectious mononucleosis: clinical manifestations in relation to EB virus antibodies. *JAMA*. 1968;203:205–209.
5. Sixbey JW, Vesterinen EH, Nedrud JG, et al. Replication of Epstein-Barr virus in human epithelial cells infected *in vitro*. *Nature* 1983;306:480–3.
6. Fingerth JD, Weis JJ, Tedder TF, et al. Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes in the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:4510–4.
7. Weiss LM, Movahed LA, Warnke RA, et al. Detection of Epstein Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's Disease. *NEJM*. 1989;302(8):502–506.
8. Hummel M, Agnostopolous I, Korbjuhn P, et al. Epstein Barr virus in B cell non Hodgkins lymphoma. *J Pathol*. 1995;175(3):263–271.
9. Brousset P, Bulet V, Chittal S, et al. Comparison of *in situ* hybridisation using different isotopic probes for detection of nasopharyngeal carcinoma and immunohistochemical correlation with anti-latent membrane protein antibody. *Lab Invest*. 1992;67(4):457–464.
10. Oudejans JJ, Jiwa M, van den Brule AJ, et al. Detection of heterogeneous Epstein-Barr virus gene expression patterns within individual post-transplant lymphoproliferative disorders. *Am J Pathol*. 1995;147(4):923–933.
11. Luo B, Wang Y, Xiao-Feng W, et al. Expression of Epstein-Barr virus genes in EBV-associated carcinomas. *World J Gastroenterol*. 2005;11(5):629–633.
12. Teramoto N, Sarker AB, Tonoyama Y, et al. Epstein-Barr virus infection in neoplastic and non-neoplastic cells of lymphoid malignancies. *Cancer*. 1996;77(11):2339–2347.
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. 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

30 apríl 2020

BOND الجاهزة للاستعمال في عمليات التهجين في الموضع (ISH)

EBER Probe

رقم الدليل: PB0589

الاستعمال المستهدف

هذا الكاشف مخصص للاستعمال في أعراض التشخيص في المختبرات.

يتمثل الغرض من مسبار EBER Probe في الاستعمال في التحديد النوعي لعدي فيروس إيبشتاين-بار الكامنة 1-2 في النسيج المثبت بالفورمالين، والمضمن في البارافين عن طريق التهجين في الموضع (ISH) وذلك باستخدام نظام BOND الألي (ويشمل نظام Leica BOND-MAX ونظام Leica BOND-III).

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

الملخص والشرح

بعد فيروس إيبشتاين-بار (EBV) عضوًا في عائلة فيروس هيريس جاما. وقد أصيب أكثر من 90 ٪ من الفئات البالغة بغير فيروس إيبشتاين-بار خلال حياتهم، مما أدى إلى حدوث حالة نادرة فيروس إيبشتاين-بار الدائم¹. عادةً ما تكون العدوى الأولية أثناء الطفولة دون أعراض، ولكن عندما تحدث العدوى الأولية خلال فترة المراهقة أو في وقت لاحق، يمكن أن تتسبب في الإصابة بداء كثرة الوحدات المعدي ذاتي الشفاء²⁻⁴. يمكن أن يسبب فيروس إيبشتاين-بار عدوى انتحالية وكذلك عدوى كامنة. وخلال العدوى الانتحالية، يتم إنتاج الفيروس، وتحتل الخلايا المضيئة، ومقدار كبير من البروتينات الفيروسيّة. تحدث العدوى الانتحالية بشكل رئيسي في بعض الخلايا الظهارية وكذلك الخلايا اللمفاوية البائية عبر مستقبل CD21⁵⁻⁶. عقب العدوى الأولية، ينشأ الكمون في المُمُغَوِّاتِ البَيَّةِ المتبقية بالذاكرة حيث يتم التعبير عن جزء صغير فقط من الجينوم الفيروسي، وبالتالي تجنب التدمير من خلال الاستجابة المناعية للمضيف. يمكن أيضًا أن تنشط العدوى الكامنة مجددًا مما يسمح للفيروس بالانتشار.

ترتبط عدوى EBV الكامنة بعدة ظروف بما في ذلك: لمُغَمَّةُ هودجكين، ولمُغَمَّةُ غير هودجكين للخلايا البائية، والسرطان اللُّعْمَوِيُّ الأَثْفِي، واضطرابات تكاثرية لمفوية ولمغومة في المرضى الذين لديهم مناعة مثبطة، بما في ذلك مرضى الزرع ومرضى الإيدز، وسرطان المعدة، وبعض الأورام اللمفاوية للخلايا التائية⁷⁻¹². يتم التعبير عن فيروس إيبشتاين-بار المشفر (EBER) RNA بوفرة في عدوى فيروس EBV الكامنة¹⁴. وتعتبر مسجلات EBER غير متعددة الأقطاب ولا تزال غير مشفرة للبروتينات. يعتبر الكشف عن فيروس إيبشتاين-بار عن طريق التهجين في الموضع طريقة حساسة للكشف عن عدوى فيروس إيبشتاين-بار الكامنة¹⁵.

يُستخدَمُ EBER Probe في الكشف عن نسخ EBER في الأنسجة المثبتة بالفورمالين، والمضمنة بالبارافين. تعد هذه الطريقة قابلة للتكاثر ويجب أن ينتج عنها تلوين قوي بني مكثف للخلايا المحتوية على نسخ EBER.

الكواشف المتوفرة

بعد EBER Probe مسبارًا قليل التوكليوتيد مترافق الفلوريسين يتم تزويده في محلول تهجين.

الحجم الكلي = 5.5 مل

التخفيف والخلط

EBER Probe جاهز للاستعمال. لا يلزم إعادة تشكيل هذا الكاشف، أو خلطه، أو تعفيفه، أو معايرته.

المواد المطلوبة لكنها غير متوفرة

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

التخزين والاستقرار

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

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

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

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

الاحتياطات

- هذا المنتج مخصص للاستعمال في أعراض التشخيص في المختبرات.
- للحصول على نسخة من صحيفة بيانات سلامة المواد، 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 وبعده، وكذلك مع جميع المواد التي تتعرض لها كما لو كانت قادرة على نقل العدوى، وينبغي التخلص منها مع اتخاذ الاحتياطات السلمية¹⁴. لا تلمس الكواشف مطلقًا عن طريق الفم، وتجنب احتكاك الجلد والأغشية المخاطية بالكواشف أو العينات. إذا كانت الكواشف أو العينات تحتك بمناطق حساسة، فغسل هذه المناطق بكميات وفيرة من الماء. اطلب المشورة الطبية.
- راجع اللوائح الفيدرالية، أو لوائح الولاية، أو اللوائح المحلية للتخلص من أي مكونات سامة محتملة.
- قَالَ التلوث الميكروبي للكواشف وإلا قد تحدث زيادة في التلوين غير المحدد.
- قد تؤدي ظروف الاسترجاع، أو أوقات الحضانة، أو درجات الحرارة بخلاف تلك الظروف المحددة إلى الحصول على نتائج خاطئة. أي تغيير كهذا يجب التحقق منه من جانب المستخدم.

إرشادات الاستعمال

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

ينبغي دائمًا استخدام الأنسجة وضوابط الكواشف المناسبة. يجب أن يتوافق بروتوكول الأنسجة وضوابط الكواشف مع بروتوكول مسبار اختبار الحامض النووي الريبسي (RNA).

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

يُستخدَمُ للإشارة إلى الأنسجة التي تم إعدادها بصورة صحيحة وأساليب التلوين السلمية.

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

ضابط النسيج السليبي

ينبغي فحصه بعد ضابط النسيج الإيجابي للتحقق من خصوصية وضع تسميات المسبار نحو الهدف..
وبديلاً عن ذلك، هناك مجموعة متنوعة من مختلف أنواع الخلايا الموجودة في معظم قطاعات النسيج توفر في كثير من الأحيان مواقع التحكم السليبي، ولكن يجب التحقق من هذا من جانب المستخدم.

ضوابط الكاشف

يوصى باستخدام مسابير ضابط الكاشف الإيجابي والسليبي لتفسير أي تلوين على مجس EBER أو غيابه على كل عينة من الأنسجة.

ضابط الكاشف السليبي

يوصى باستخدام مسبار ضابط الكشف السليبي RNA والذي لا يختلط مع التسللات البشرية على قطاع من عينة مريض لتقييم التلوين غير المحدد والسماح بتفسير أفضل لأي تلوين في خلايا محددة. تكون النتيجة المتوقعة هي غياب التلوين.

ضابط الكاشف الإيجابي

يوصى باستخدام مسبار ضابط الكشف الإيجابي RNA الذي يسمى نسخة بشرية معبرة في كل مكان (مثلاً U1) على قطاع من كل عينة من المرضى لتوفير معلومات حول حفظ الأحماض النووية في النسيج وكذلك إمكانية وصول الأحماض النووية إلى المسبار. إذا فشل مسبار ضابط الكشف الإيجابي في إظهار التلوين الإيجابي، فينبغي اعتبار نتائج عينات الاختبار غير صحيحة.

نسيج المريض

فحص عينات المرضى الملطخة بمسبار EBER Probe في النهاية. يجب تقييم شدة التلوين الإيجابي في سياق أي تلوين يتم مشاهدته في مسابير الضابط الإيجابية والسلبية.

النتائج المتوقعة

الأنسجة العادية

لم يتم الكشف عن أي تلوين EBER mRNA مع استخدام PB0589 في مجموعة كبيرة من الأنسجة الطبيعية. تم كشف تلوين خافت في الخلايا الظهارية بالغدة الدرقية، والبروستاتا، والحنجرة، والمريء، وانايب الكلى، والخلايا الإفرازية في الغدة الكظرية وخلايا لاينغ. لا يتعارض هذا التلوين مع تفسير التلوين. (إجمالي عدد الحالات العادية التي تم تقييمها = 98).

الأنسجة غير العادية

لطخ 3/5 PB0589 من الأورام الغلافوية الهودجكينية. لم تتم ملاحظة وجود أي تلوين في أورام الرئة (0/3)، وأورام المبيض (0/3)، وأورام الكبد (0/3)، وأورام الغدة الدرقية (0/3)، وأورام المريء (0/2)، وأورام الثدي (2 / 0)، والأورام الليفية من أصل غير معروف (0/2)، وأورام المخ (0/2)، وأورام الخصية (0/2)، وأورام الجلد (0/2)، وورم القولون (0/1)، وورم المعدة (0/1)، وورم المستقيم (0/1)، وورم الحنجرة (0/1) وورم الغدة الصغرى (0/1). (إجمالي عدد الحالات غير العادية التي تم تقييمها = 34).

يوصى باستخدام PB0589 للكشف عن ERNA mRNA.

القيود الخاصة بالمنتج

تم تحسين مسبار

EBER Probe في Leica Biosystems لاستخدامه مع Anti-Fluorescein Antibody، و BOND Polymer Refine Detection، وكواشف BOND المساعدة. على المستخدمين الذين يحددون عن إجراءات الاختبار الموصى بها قبول تحمل المسؤولية عن تفسير نتائج المرضى في ظل هذه الظروف. قد تختلف أوقات البروتوكول بسبب الاختلاف في تثبيت الأنسجة وعالية هضم الإنزيمات، ويجب تحديد ذلك تجريبياً. ينبغي استعمال RNA Negative Control Probe عند تحسين ظروف الاسترجاع وأوقات البروتوكول.

اكتشاف المشكلات وحلها

قد يساعد المرجع رقم 15 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 تلوين غير اعتيادي.

المزيد من المعلومات

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

مرجع

1. Chang KL, Chen YY, Shibata D, et al. Description of an *in situ* hybridisation methodology for detection of Epstein-Barr virus RNA in paraffin-embedded tissues, with a survey of normal and neoplastic tissues. *Diagnostic Molecular Pathology*. 1992;1(4):246–255.
2. Amfinder RF, Mann RB. Epstein-Barr-encoded RNA *in situ* hybridization: diagnostic applications. *Hum Pathol*. Jun; 25(6):602–5, 1994.
3. Joncas J, Boucher J, Granger-Julien M, et al. Epstein-Barr virus infection in the neonatal period and in childhood. *CMAJ*. 1974;110:33–37.
4. Niederman JC, McCollum RW, Henle G, et al. Infectious mononucleosis:clinical manifestations in relation to EB virus antibodies. *JAMA*. 1968;203:205–209.
5. Sixbey JW, Vesterinen EH, Nedrud JG, et al. Replication of Epstein-Barr virus in human epithelial cells infected *in vitro*. *Nature* 1983;306:480–3.
6. Fingerth JD, Weis JJ, Tedder TF, et al. Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes in the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:4510–4.
7. Weiss LM, Movahed LA, Warnke RA, et al. Detection of Epstein Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's Disease. *NEJM*. 1989;302(8):502–506.
8. Hummel M, Agnostopolous I, Korbjuhn P, et al. Epstein Barr virus in B cell non Hodgkins lymphoma. *J Pathol*. 1995;175(3):263–271.
9. Brousset P, Bulet V, Chittal S, et al. Comparison of *in situ* hybridisation using different isotopic probes for detection of nasopharyngeal carcinoma and immunohistochemical correlation with anti-latent membrane protein antibody. *Lab Invest*. 1992;67(4):457–464.
10. Oudejans JJ, Jiwa M, van den Brule AJ, et al. Detection of heterogeneous Epstein-Barr virus gene expression patterns within individual post-transplant lymphoproliferative disorders. *Am J Pathol*. 1995;147(4):923–933.
11. Luo B, Wang Y, Xiao-Feng W, et al. Expression of Epstein-Barr virus genes in EBV-associated carcinomas. *World J Gastroenterol*. 2005;11(5):629–633.

12. Teramoto N, Sarker AB, Tonoyama Y, et al. Epstein-Barr virus infection in neoplastic and non-neoplastic cells of lymphoid malignancies. *Cancer*. 1996;77(11):2339–2347.
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. 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
30 أبريل 2020

Leica Biosystems Newcastle Ltd 
Balliol Business Park West
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