



ZytoLight

SPEC EWSR1 Dual Color Break Apart Probe

REF Z-2096-50 Σ 5 (0.05 ml)

REF Z-2096-200 Σ 20 (0.2 ml)

Pro kvalitativní detekci translokací zahrnujících lidský gen EWSR1 v 22q12.2 fluorescenční *in situ* hybridizací (FISH)



Prostředek pro lékařskou in vitro diagnostiku
V souladu s EU nařízením 98/79/EC

1. Použití

ZytoLight SPEC EWSR1 Dual Color Break Apart Probe (PL55) je určen k použití pro kvalitativní detekci translokací zahrnujících lidský gen EWSR1 v 22q12.2 formalinem fixovaných, v parafínech zalitých vzorků jmetodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Průběh je určená k použití v kombinaci s ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Prod. No. Z-2028-5/-20).

Interpretace výsledků musí být prováděna kvalifikovaným patologem, v kontextu s klinickou historií pacienta a s ohledem na ostatní klinické a patologické nálezy.

2. Klinický význam

Translokace zahrnující chromozomální oblast 22q12.2 se vyskytují u 90–95% pacientů s Ewingovým sarkomem nebo periferními primitivními neuroektodermálními nádory (PNET). Ewingův sarkom je druhým nejčastějším, vysoce maligním kostním nádorem u dětí a mladých dospělých. Nejčastější translokace zahrnující oblast genu EWSR1 je t(11;22)(q24,3;q12.2) juxtapozice genu EWSR1 v 22q12.2 vedle lokusu FLI-1 (integrace viru leukémie 1) v 11q24.3. FLI-1 je členem transkripčních faktorů ETS. Méně často lze EWSR1 fúzovat s ERG, transkripčním faktorem úzce souvisejícím s FLI-1, ale umístěným v 21q22.2. Pro prognózu a vhodnou léčbu je důležité odlišit Ewingův sarkom / PNET od klasického neuroblastomu, Wilmsova nádoru a rhabdomyosarkomu. V kombinaci s histopatologickou diagnózou lze k potvrzení diagnózy Ewingova sarkomu / PNET použít detekci při eskupech EWSR1 pomocí FISH.

3. Princip testu

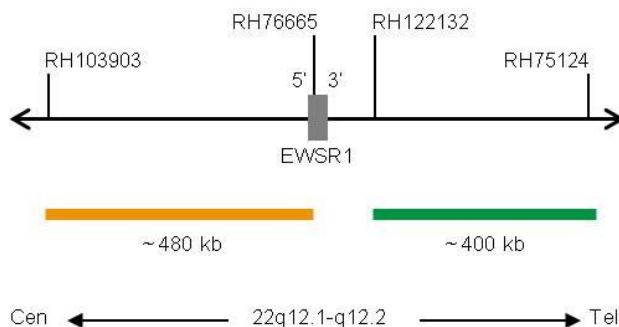
Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je technika, která umožňuje detekci a vizualizaci specifických sekvencí nukleových kyselin v buněčných preparátech. Fluorescenčně označené úseky DNA, tzv. FISH próby, a jejich komplementární cílové úseky DNA v preparátech jsou společně denaturovány a následně je umožněno jejich spárování v průběhu hybridizace. Poté jsou nespecifické a nenavázané fragmenty prób odstraněny pomocí důkladných oplachovacích kroků. Po dobarvení DNA pomocí DAPI jsou hybridizované úseky DNA vizualizovány pomocí fluorescenčního mikroskopu vybaveného excitačními a emisními filtry specifickými pro fluorochromy, se kterými byly FISH próby označeny.

4. Potřebné reagensie

ZytoLight SPEC EWSR1 Dual Color Break Apart Probe se skládá z:

- ZyGreen (excitace 503 nm/ emise 528 nm) označené polynukleotidy (~10.0 ng/μl), s cílovými sekvencemi v 22q12.2* (chr22:29,779,841-30,179,900) distálně k bodu přerušení EWSR1 (viz Obr.1).
- ZyOrange (excitace 547 nm/ emise 572 nm) označené polynukleotidy (~4.5 ng/μl), s cílovými sekvencemi v 22q12.1-q12.2* (chr22:29,191,431-29,673,440) proximálně k bodu přerušení EWSR1 (viz Obr.1).
- Hybridizační pufr založený na formamidu

* V souladu s knihovnou lidského genomu GRCh37/hg19



Obr. 1: SPEC EWSR1 Mapa sondy (mimo měřítko)

ZytoLight SPEC EWSR1 Dual Color Break Apart Probe dostupný v ve dvou velikostech:

- Z-2096-50: 0.05 ml (5 reakcí po 10 μl každá)
- Z-2096-200: 0.2 ml (20 reakcí po 10 μl každá)

5. Vybavení, které je vyžadováno, ale není součástí dodávky

- ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Prod. No. Z-2028-5/-20)
- Pozitivní a negativní kontrolní vzorky
- Mikroskopická skříňka, pozitivně nabitá
- Vodní lázeň (37°C, 98°C)
- Hybridizér nebo vyhřívaná ploténka
- Hybridizér nebo vlhká komůrka v hybridizační troubě
- Pipety (10 μl, 25 μl)
- Stopky
- Barvicí nádoby nebo lázně
- Kalibrovaný teploměr
- Xylen
- Ethanol (alkohol)
- Deionizovaná nebo destilovaná voda
- Krycí skříňka (22 x 22 mm, 24 x 60 mm)
- Lepidlo, např. Fixogum Rubber Cement (Katalog.č. E-4005-50/-125) nebo podobné
- Fluorescenční mikroskop s odpovídajícím vybavením (400 - 1000x)
- Imerzní olej určený pro fluorescenční mikroskop
- Odpovídající sada filtrů

6. Skladování a zacházení

Skladujte při teplotě 2-8 °C, ve vzpřímené pozici, chráněné před sluncem. Používejte chráněné před sluncem. Vraťte do skladovacích podmínek

okamžitě po použití. Nepoužívejte reagenty po uplynutí doby expirace uvedené na štítku.

7. Varování a preventivní opatření

- Před použitím si přečtěte instrukce!
- Nepoužívejte reagenty po uplynutí doby expirace!
- Tento produkt obsahuje látky (v nízkých koncentracích a objemech), které jsou škodlivé pro zdraví a potenciálně infekční. Vyvarujte se přímého kontaktu s reagenty. Používejte přiměřené ochranné prostředky (jednorázové rukavice, ochranné brýle a laboratorní plášť).
- V případě kontaktu s kůží omyjte okamžitě velkými množství vody!
- Pro profesionální uživatele je na vyžádání dostupný bezpečnostní list.
- Nepoužívejte reagenty opakovaně.
- Vyvarujte se vzájemné kontaminace vzorů, neboť to může vést k chybným výsledkům.
- Průběh by neměla být po delší dobu vystavena světlu, speciálně ne silnému světlu, tzn., že všechny kroky by se měly provádět ve tmě a/nebo za použití tmavých, světlo nepropouštějících nádobek.

Rizika:

Složka určujícím riziko je formamid.



Nebezpečí

H351	Podezření na vyvolání rakoviny.
H360FD	Může poškodit reprodukční schopnost. Může poškodit plod v těle matky.
H373	Může způsobit poškození orgánů při prodloužené nebo opakované expozici.
P201	Před použitím si obzvláště přečtěte speciální instrukce.
P202	Nepoužívejte, dokud jste si nepřečetli všechny bezpečnostní pokyny a neporozuměli jim.
P260	Nevdechujte prach/dým/plyn/mlhu/páry/aerosoly.
P280	Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.
P308+P313	Při expozici nebo podezření na ni: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.
P405	Skladujte uzamčené.

8. Omezení

- Pouze pro *in vitro* diagnostiku.
- Pouze pro profesionální uživatele.
- Klinická interpretace jakéhokoliv pozitivního barvení nebo jeho chybění musí být hodnocena v kontextu klinické historie, morfologie, ostatních histopatologických kritérií a stejně tak i ostatních diagnostických testů. Je odpovědností kvalifikovaného patologa být obeznámený s FISH průběhy, reagenty, diagnostickými panely a metodami používanými k barvení preparátů. Barvení musí být prováděno v certifikované, licencované laboratoři pod dozorem patologa, který je odpovědný za prohlížení obarvených sklů a vyhodnocení odpovídajících pozitivních a negativních kontrol.
- Barvení preparátu, obzvláště intenzita a barvení pozadí závisí na zacházení se vzorkem před barvením. Neodpovídající fixace, mražení, tání, oplachování a sušení, var, krájení nebo kontaminace jinými vzorky nebo tekutinami může vést k artefaktům nebo falešným výsledkům. Nekonzistentní výsledky mohou být výsledkem variací ve fixaci a prosycovacích metodách, stejně tak jako nepravidelnostmi uvnitř vzorku.

- Průběh má být používán pouze pro detekci lokusů popsaných v odstavci 4.
- Barvení bylo validováno za použití metod popsaných v těchto instrukcích pro použití. Obměny těchto procedur mohou vést ke změnám barvení a mají být validovány uživatelem.

9. Interferující látky

Pokud jsou ve vzorku přítomny červené krvinky, mohou jevit autofluorescenci, která ztěžuje detekci hledaných signálů

Následující fixační tekutiny jsou nekompatibilní (nevhodné) pro FISH:

- Bouinův roztok
- B5 fixace
- Kyselá fixativa (např. kys. pikrová)
- Zenkerova fixační tekutina
- Alkoholy (pokud jsou používány samostatně)
- Chlorid rtuti
- Formaldehyd/zinkové fixativum
- Hollandovo fixativum
- Nepufrovaný formalin

10. Příprava vzorků

- Fixace v 10% neutrálním pufrovaném formalínu po dobu 24h při pokojové teplotě (18-25°C).
- Připravte tkáňové vzorky $\leq 0,5 \text{ m}^3$.
- Používejte parafin nejvyšší (prémiové) kvality.
- Prosycení by mělo být prováděno při teplotě nižší než 65°C.
- Připravte řezy o tloušťce 2-4 μm .
- Používejte pozitivně nabitá skla.
- Fixujte po dobu 2-16h při teplotě 50-60°C.

11. Příprava před použitím

Produkt je ready-to-use, tedy připraven k přímému použití. Není vyžadována žádná obnova, mísení nebo ředění. Před použitím přineste průběh do pokojové teploty (18-25 °C), chraňte před světlem. Před otevřením nádoby promíchejte krátce ve vortexu a stočte.

12. Pracovní postup

Příprava vzorku

Připravte vzorek podle instrukcí uvedených u [ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit](#).

Denaturace a hybridizace

1. Napípejte 10 μl průběhu na každý předpřipravený vzorek.
 2. Přikryjte vzorky krycím sklíčkem 22 mm x 22 mm (vyvarujte se vytvoření bublin) a zalepte krycí sklíčko.
- Doporučujeme použít speciální lepidlo např. Fixogum.*
3. Umístěte skla na horkou plotěnku nebo do hybridizéru a denaturujte vzorky 10 min při 75°C.
 4. Přeneste skla do vlhké komůrky nebo hybridizujte přes noc při 37 °C (např. v hybridizační troubě).

Je zcela zásadní, aby vzorky v průběhu hybridizačního kroku nevyschly.

Post-hybridizace

Posthybridizační kroky (oplach, dobarvení, fluorescenční mikroskopie) provádějte podle instrukcí uvedených v [ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit](#).

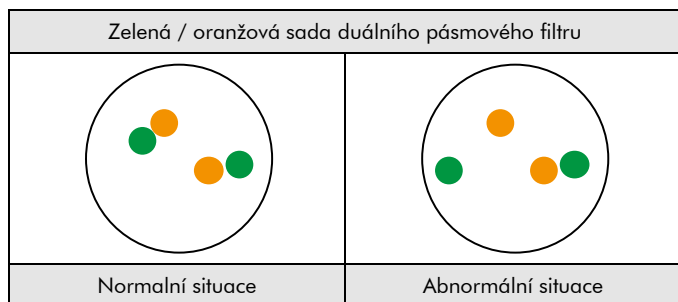
13. Interpretace výsledků

Při použití vhodných sad filtrů se hybridizační signály sondy objeví zeleně (distálně od bodu zlomu EWSR1) a oranžově (proximálně od bodu zlomu EWSR1).

Normální situace: V interfázích normálních buněk nebo buněk bez translokace zahrnující genovou oblast EWSR1 se objevují dva zelené / oranžové fúzní signály (viz obrázek č.2).

Abnormální situace: Jedna oblast genu EWSR1 ovlivněná translokací je indikována jedním samostatným zeleným signálem a jedním samostatným oranžovým signálem (viz obrázek č.2).

Př překrývající se signály se mohou objevit jako žluté signály.



Obr. Č. 2 : Předpokládaný normální výsledek a abnormální jádra

Genomické aberace v důsledku malých delecí, duplikací nebo inverzí mohou vést k nenápadným signálům.

Jiná distribuce (rozmístění) signálů může být pozorována v některých abnormálních vzorcích, která může vést ve výsledku k jinému vzoru signálů, než jsou popsány výše, indikující variantní přestavby. Nečekané vzory signálů by měly být dále dovyšetřeny.

Vemte v potaz:

- Kvůli rozvolněnému chromatinu se mohou jednotlivé signály jevit jako malé shluky signálů. A proto dva nebo tři signály stejné velikosti, které jsou ve vzdálenosti, která je menší než průměr jednoho signálu, mají být počítány jako jeden signál.
- Nehodnoťte překrývající se jádra.
- Nepočítejte příliš natrávená jádra (rozpoznatelná podle přítomnosti tmavých oblastí uvnitř jader).
- Nepočítejte jádra se silnou autofluorescencí, která znesnadňuje rozpoznání signálů.
- Negativní nebo neočekávaný výsledek může být způsoben vícečetnými faktory, viz odst. 17.
- Za účelem správného hodnocení výsledků musí uživatel před použitím produktu provést validaci v souladu s národními a/nebo mezinárodními doporučeními.

14. Doporučené postupy kontroly kvality

Za účelem zajištění správných postupů má být ke každému testu přiřazena vnitřní a vnější kontrola. Pokud tyto kontroly selžou při demonstraci správného barvení, výsledky vzorku pacienta musí být hodnoceny jako invalidní.

Vnitřní kontrola: Nenádorové buňky uvnitř vzorku, ve kterých je patrný normální vzor signálů.

Externí kontrola: Ověřené (validované) pozitivní a negativní kontrolní vzorky.

15. Výkonnostní charakteristiky

Přesnost: Místo hybridizace sondy bylo hodnoceno na metafázových spreadech karyotypově normálního samce. Ve všech testovaných vzorcích hybridizovala sonda pouze na očekávané lokusy. Nebyly pozorovány žádné další signály nebo křížové hybridizace. Proto byla vypočítána přesnost na 100%.

Analytická citlivost: Pro analytické stanovení citlivosti byla sonda vyhodnocena na metafázových spreadech karyotypicky normálních samců. Všechna jádra ukázala očekávaný normální signál ve všech testovaných vzorcích. Analytická citlivost byla proto vypočtena na 100%.

Analytická specifita: Pro stanovení analytické specifity byla sonda vyhodnocena na metafázových spreadech karyotypicky normálních samců. Ve všech testovaných vzorcích hybridizovaly všechny signály pouze s očekávanými cílovými lokusy a žádnými jinými lokusy. Analytická specifita byla proto vypočtena na 100%.

16. Likvidace odpadů

Likvidace reagentů musí být provedena v souladu s lokálními zákony.

17. Řešení problémů

Jakákoliv odchylka od návodu k obsluze může vést k horším výsledkům barvení nebo k žádnému znečištění.

Slabé nebo vůbec žádné signály

Možná příčina	Řešení
Žádné dostupné cílové sekvence	Použijte vhodnou kontrolu.
Buňky nebo tkáň nebyly fixovány správně	Optimalizujte fixační čas nebo aplikujte postfixační kroky popsaných v kapitole 12 „Pracovní postup“ v návodu ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit
Nesprávná příprava teplem, natrávení, denaturace, hybridizace nebo teplota oplachu	Zkontrolujte teplotu u vše zařízení, u kterých je kalibrovaný teploměr
Proteolytická předběžná úprava není řádně provedena	Optimalizujte inkubační dobu pepsinu, Zvyšte nebo snižte.
Odpařování sondy	Při použití hybridizéru, je nutné použít mokré proužky / nádrže naplněné vodou. Při použití hybridizační pece, vlhké komoty, by mělo být krycí sklíčko zcela uzavřené, např. Fixogum, aby se zabránilo vysychání vzorků během hybridizace
Příliš nízká koncentrace promývacího pufru	Zkontrolujte koncentraci promývacího pufru
Staré odvodňovací roztoky	Připravte čerstvé odvodňovací roztoky.
Špatné nastavení fluorescenčního mikroskopu	Nastavte správně
Použití nesprávného setu filtrů	Použijte set filtrů, které jsou odpovídající fluochromům próby. <i>Trojité filtry poskytují méně světla v porovnání s jednoduchými nebo duálními filtry. Navíc signály se mohou při použití trojitého filtru jevit bledší.</i>
Poškození próby světlem	Hybridizační a promývací kroky provádějte ve tmě.

Zkřížené hybridizační signály, šum na pozadí

Možná příčina	Řešení
Nekompletní odparafinování	Používejte čerstvé roztoky; zkontrolovat délku odparafinování
Příliš silné natrávení	Zkraťte inkubaci s pepsinem.
Příliš velký objem próby na plochu vzorku	Snižte objem próby na řez, rozmístěte proužky po kapkách, abyste se vyhnuli příliš vysoké místní koncentraci.
Preparáty jsou vychladlé na pokojovou teplotu před hybridizací	Přeneste preparáty krátce do 37 °C
Příliš vysoká koncentrace promývacího pufru	Zkontrolujte koncentraci promývacího pufru.
Oplachovací teplota po hybridizaci je příliš nízká	Zkontrolujte teplotu a zvyšte ji, pokud je to nutné
Vysušení vzorků mezi jednotlivými kroky inkubace	Zabraňte vysušení pomocí přilepení krycího sklíčka a provádění inkubace ve vlhkém prostředí.

Poškozená morfologie

Možná příčina	Řešení
Buňky nebo tkáň nebyly fixovány správně	Optimalizujte fixační čas nebo aplikujte postfixační kroky popsaných v kapitole 12 „Pracovní postup“ v návodu ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit
Příprava natrávením není provedena správně	Optimalizujte dobu inkubace s pepsinem, zkratěte nebo prodlužte, je-li potřeba
Nedostatečné oschnutí preparátu na vzduchu před aplikací próby	Prodlužte osušení.

Překrývání jader

Možná příčina	Řešení
Nevhodná tloušťka tkáňových řezů	Připravte 2-4 μm microtomové řezy.

Vzorek uplavává ze sklíčka

Možná příčina	Řešení
Nevhodný povrch sklíčka	Použijte vhodná sklíčka.
Natrávením je příliš silné	Snižte inkubační dobu pepsinu

Slabé barvení

Možná příčina	Řešení
Nízká koncentrace roztoku DAPI	Používejte DAPI/DuraTect-Solution (ultra) (Prod. No. MT-0008-0.8)
Příliš krátká doba inkubace	Prodlužte dobu inkubace s DAPI.

18. Literatura

- Bridge RS, et al. (2006) *Mod Pathol* 19: 1-8.
- Delattre O, et al. (1992) *Nature* 359: 162-5.
- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Lee J, et al. (2005) *Cancer Genet Cytogenet* 159: 177-80.
- Rekhi B, et al. (2012) *Virchows Arch* 461: 687-97.
- Romeo S & Dei Tos AP (2010) *Virchows Arch* 456: 219-34.
- Sandberg AA & Bridge JA (2000) *Cancer Genet Cytogenet* 123: 1-26.
- Wilkinson DG: *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.
- Yang L, et al. (2012) *Human Pathology* 43: 1463-70.
- Zucman J, et al. (1993) *EMBO J* 12: 4481-7.

Naši experti jsou Vám k dispozici zodpovědět Vaše otázky. Prosím kontaktujte help@zytovision.com



ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/Německo
Telefon: +49 471 4832-300
Fax: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
Email: info@zytovision.com

Ochranná známka:

ZytoVision® a ZytoLight® jsou pod ochrannou známkou ZytoVision GmbH.