



ZytoFast

human Ig-kappa/Ig-lambda Probe

REF T-1017-400  40 (0,4 ml)

Für den simultanen qualitativen Nachweis von humaner Ig-kappa (κ) und Ig-lambda (λ) mRNA mittels chromogener *in-situ*-Hybridisierung (CISH)



In-vitro-Diagnostikum
gemäß EU Richtlinie 98/79/EC

1. Verwendungszweck

Die ZytoFast human Ig-kappa/Ig-lambda Probe (PF22) ist für den simultanen qualitativen Nachweis von humaner Ig-kappa (κ) und Ig-lambda (λ) Leichtketten-mRNA in Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Geweben wie beispielsweise Lymphomgeweben mittels chromogener *in-situ*-Hybridisierung (CISH) bestimmt.

Die Sonde ist für die Verwendung in Kombination mit dem ZytoFast human Ig-kappa/Ig-lambda CISH Kit (Prod. Nr. T-1005-40) oder dem ZytoFast human Ig-kappa/Ig-lambda Permanent CISH Kit (Prod. Nr. T-1105-40) vorgesehen.

Die Interpretation der Ergebnisse muss im Kontext mit der klinischen Anamnese unter Berücksichtigung weiterer klinischer und pathologischer Daten des Patienten durch einen qualifizierten Pathologen erfolgen.

2. Klinische Relevanz

B-Zellen (aka B-Lymphozyten) entwickeln sich aus lymphatischen Stammzellen im Knochenmark. Jeder B-Zellklon exprimiert ein einzigartiges Antikörper-Molekül, welches aus zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Ketten besteht, wobei letztere entweder vom κ - oder λ -Typ sind. Die Bestimmung des Kappa/Lambda-Quotienten ist zur Unterscheidung zwischen neoplastischen und reaktiven lymphatischen Proliferationen von Nutzen. Im Gegensatz zur monoklonalen Expression bei malignen Lymphomen, einer der häufigsten hämatologischen Erkrankungen der westlichen Bevölkerung, spiegelt die polyklonale Expression von κ - oder λ -Leichtketten eine reaktive Hyperplasie wieder. Während der Nachweis von Ig- κ und Ig- λ mittels Immunhistochemie häufig zu starker Hintergrundfärbung führt, erlaubt die *in-situ*-Hybridisierung durch nahezu Hintergrund-freie Signale eine sichere und einfache Analyse der Klonalität einer Lymphozyten-Population.

3. Prinzip der Methode

Die chromogene *in-situ*-Hybridisierung (CISH) erlaubt den Nachweis und die Visualisierung von spezifischen Nukleinsäuresequenzen in Zellpräparationen. Haptenmarkierte Nukleotid-Fragmente, sogenannte CISH-Sonden, und deren komplementäre Zielsequenzen in den Präparationen werden co-denaturiert und können anschließend während der Hybridisierung binden. Danach werden unspezifische und ungebundene Sondenfragmente durch Stringenzwaschschritte entfernt. Die Duplex-Bildung der markierten Sonde wird mittels Enzym-konjugierter Antikörper, welche gegen die Sonde gerichtet sind, sichtbar gemacht. Die enzymatische Reaktion mit den chromogenen Substraten führt anschließend zur Bildung von Farbpräzipitaten. Nach der Gegenfärbung des Zellkerns mit einer Zellkern-Färbung können die hybridisierten Sondenfragmente mit einem Lichtmikroskop visualisiert werden.

4. Enthaltene Komponenten

Die ZytoFast human Ig-kappa/Ig-lambda Probe (PF22) besteht aus:

- Digoxigenin-markierten Polynukleotiden ($\sim 1 \text{ ng}/\mu\text{l}$), die gegen mRNA, welche die konstanten Regionen der Ig-kappa Leichtketten codieren, gerichtet sind.
- Biotin-markierten Polynukleotiden ($\sim 1 \text{ ng}/\mu\text{l}$), die gegen mRNA, welche die konstanten Regionen der Ig-lambda Leichtketten codieren, gerichtet sind.

Die ZytoFast human Ig-kappa/Ig-lambda Probe ist verfügbar in einer Größe:

- T-1017-400: 0,4 ml (40 Reaktionen von je $10 \mu\text{l}$)

5. Benötigte, aber nicht bereitgestellte Materialien

- ZytoFast human Ig-kappa/Ig-lambda CISH Kit (Prod. Nr. T-1005-40) oder ZytoFast human Ig-kappa/Ig-lambda Permanent CISH Kit (Prod. Nr. T-1105-40)
- Positive und negative Kontrollproben
- Objektträger, positiv geladen
- Wasserbad (55°C , 98°C)
- Hybridizer oder Wärmeplatte
- Hybridizer oder Feuchtekammer im Hybridisierungssofen
- Verstellbare Pipetten ($10 \mu\text{l}$, $100 \mu\text{l}$, $1000 \mu\text{l}$)
- Küvetten oder Färbetröge
- Stoppuhr
- Kalibriertes Thermometer
- Ethanol oder denaturierter Alkohol
- Xylol
- Methanol 100%
- Wasserstoffperoxid (H_2O_2) 30%
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser
- Deckgläser ($22 \text{ mm} \times 22 \text{ mm}$, $24 \text{ mm} \times 32 \text{ mm}$)
- Naturkautschuk-Klebstoff, z.B. Fixogum Rubber Cement (Prod. Nr. E-4005-50/-125) oder Ähnliches
- Regelmäßig gewartetes Lichtmikroskop ($100\text{-}200\times$)

6. Lagerung und Handhabung

Bei $2\text{-}8^\circ\text{C}$ in aufrechter Position lagern. Unmittelbar nach Gebrauch wieder unter Lagerbedingungen aufbewahren. Keine Reagenzien nach Ablauf des auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatums verwenden. Das Produkt ist bei sachgemäßer Handhabung bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil.

7. Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Gebrauchsanweisung vor der Verwendung lesen!
- Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden!
- Dieses Produkt enthält Substanzen (in geringen Konzentrationen und Volumina), welche gesundheitsschädlich und potentiell infektiös sind. Jeder direkte Kontakt mit den Reagenzien muss vermieden werden. Entsprechende Schutzmaßnahmen (Verwendung von Einmalhandschuhen, Schutzbrille und Laborbekleidung) sind zu ergreifen!
- Sollten Reagenzien mit der Haut in Kontakt kommen, die betroffenen Stellen sofort mit viel Wasser abspülen!

- Ein Sicherheitsdatenblatt ist auf der Website verfügbar (www.zytovision.com).
- Die Reagenzien nicht wiederverwenden!
- Kreuzkontaminationen und mikrobakterielle Kontamination der Reagenzien vermeiden!
- Die Präparate dürfen während der Hybridisierungs- und Waschstreps nicht austrocknen!

8. Einschränkungen

- Für die Verwendung als In-vitro-Diagnostikum.
- Nur für die professionelle Anwendung.
- Die klinische Interpretation jeglicher positiven Färbung bzw. deren Abwesenheit muss im Kontext mit der klinischen Anamnese, Morphologie, anderer histopathologischer Kriterien sowie weiterer diagnostischer Tests erfolgen. Es obliegt der Verantwortung eines qualifizierten Pathologen, mit CISH Sonden, Reagenzien, Diagnose-Panels und den zur Erstellung von gefärbten Präparaten verwendeten Methoden vertraut zu sein. Die Färbung ist in einem zertifizierten, lizenzierten Labor unter Aufsicht eines Pathologen durchzuführen, der für die Auswertung der Färbepreparate und für die Sicherstellung der Eignung von positiven und negativen Kontrollen verantwortlich ist.
- Die Färbung der Präparate, insbesondere die Signalintensität und die Hintergrundfärbung, ist abhängig von der Behandlung und Prozessierung der Präparate vor der Färbung. Unsachgemäßes Fixieren, Einfrieren, Auftauen, Waschen, Trocknen, Erhitzen, Schneiden oder Kontamination mit anderen Präparaten oder Flüssigkeiten können Artefakte oder falsche Ergebnisse verursachen. Inkonsistente Ergebnisse können von Variationen bei Fixierungs- und Einbettungsverfahren sowie von inhärenten Unregelmäßigkeiten innerhalb des Präparates resultieren.
- Die Sonde ist nur für den Nachweis der Zielsequenzen, die in 4. „Enthaltene Komponenten“ beschrieben werden, zu verwenden.
- Die Leistung wurde unter Verwendung der in dieser Gebrauchsanweisung beschriebenen Verfahren validiert. Abweichungen von diesen Verfahren können die Leistung beeinflussen und müssen vom Anwender validiert werden.

9. Störsubstanzen

Folgende Fixierungen sind nicht kompatibel mit ISH:

- Bouin Fixierung
- B5 Fixierung
- Saure Fixiermittel (z.B. Pikrinsäure)
- Zenker Fixierung
- Alkohole (bei alleiniger Verwendung)
- Quecksilberchlorid
- Formaldehyd/Zink Fixiermittel
- Hollande Fixierung
- Ungepuffertes Formalin

10. Vorbereitung der Präparate

Empfehlungen:

- Bei jedem Vorbereitungsschritt Kreuzkontaminationen der Präparate vermeiden, da diese zu fehlerhaften Ergebnissen führen können.
- Fixierung in 10% neutral gepuffertem Formalin für 24h bei Raumtemperatur (18-25°C).
- Probengröße $\leq 0,5 \text{ cm}^3$.
- Qualitativ hochwertiges Paraffin verwenden.
- Das Einbetten sollte bei Temperaturen unter 65°C erfolgen.
- 3-5 μm dicke Mikrotomschnitte anfertigen.
- Positiv geladene Objektträger verwenden.
- Für 2-16h bei 50-60°C fixieren.

11. Vorbereitung der Reagenzien

Das Produkt ist gebrauchsfertig. Kein Rekonstituieren, Mischen oder Verdünnen ist notwendig. Die Sonde vor der Anwendung auf Hybridisierungstemperatur (55°C) bringen und kurz mischen.

12. Durchführung

Vorbehandlung der Präparate

Die Präparatevorbehandlung (wie Entparaffinierung, Proteolyse) ist wie in der Gebrauchsanweisung des ZytoFast human Ig-kappa/Ig-lambda CISH Kits oder des ZytoFast human Ig-kappa/Ig-lambda Permanent CISH Kits beschrieben durchzuführen.

Denaturierung und Hybridisierung

1. 10 μl der Sonde auf jedes der vorbehandelten Präparate pipettieren.
2. Die Präparate mit 22 mm x 22 mm Deckgläsern abdecken (Einschluss von Luftbläschen vermeiden) und das Deckglas versiegeln.

Wir empfehlen die Verwendung von Naturkautschuk-Klebstoff (z.B. Fixogum) zum Versiegeln.

3. Die Objektträger auf einer Wärmeplatte oder in einem Hybridizer platzieren und die Proben für 5 min bei 75°C denaturieren.
4. Die Objektträger in eine Feuchteammer überführen und für 2 h bei 55°C hybridisieren (z.B. in einem Hybridisierungsöfen).

Es ist essentiell, dass die Präparate während des Hybridisierungsschritts nicht austrocknen.

Post-Hybridisierung

Die Post-Hybridisierung (Waschen, Detektion, Gegenfärbung, Eindecken, Mikroskopie) gemäß der Gebrauchsanweisung des jeweiligen ZytoFast human Ig-kappa/Ig-lambda CISH Kit.

13. Interpretation der Ergebnisse

Bei Verwendung des ZytoFast human Ig-kappa/Ig-lambda CISH Kits (Prod. Nr. T-1005-40) erscheinen die Hybridisierungssignale der Digoxigenin-markierten κ -Polynukleotide als hellrote Signale (AEC), Biotin-markierte λ -Polynukleotide erscheinen als blau-violette Signale (NBT/BCIP).

Bei Verwendung des ZytoFast human Ig-kappa/Ig-lambda Permanent CISH Kits (Prod. Nr. T-1105-40) erscheinen die Hybridisierungssignale der Digoxigenin-markierten κ -Polynukleotide als kräftig grüne Signale (HRP-Green), Biotin-markierte λ -Polynukleotide erscheinen als hellrote Signale (Permanent Red).

Eine positive Reaktivität in B-Plasmazellen wird durch eine zytoplasmatische Färbung angezeigt.

Der normale Kappa/Lambda-Quotient in lymphatischen Geweben ist in etwa 2:1, ein Kappa/Lambda-Quotient $>3:1$ oder $<0,3:1$ ist ein Indikator für Monoklonalität.

Bitte beachten:

- Die Signale sollten mindestens mit einer 100fachen Vergrößerung visualisiert werden, sodass die Signale gut zu erkennen sind.
- Keine nekrotischen Bereiche, sich überlagernde Zellkerne, überverdauten Zellkerne oder Zellkerne mit schwacher Signalintensität auswerten.
- Ein negatives oder unspezifisches Ergebnis kann durch verschiedene Faktoren verursacht werden (siehe Kapitel 17 „Fehlerbehebung“).
- Um die Ergebnisse korrekt zu interpretieren, muss der Anwender das Produkt vor der Anwendung in diagnostischen Verfahren unter Berücksichtigung nationaler und/oder internationaler Richtlinien validieren.

14. Empfohlene Qualitätskontrollverfahren

Um die korrekte Leistung der verwendeten Präparate und Testreagenzien zu überwachen, sollte jeder Test von internen und externen Kontrollen begleitet werden. Falls interne und/oder externe Kontrollen keine adäquate Färbung zeigen, müssen die Ergebnisse der Patientenproben als ungültig angesehen werden.

Interne Kontrolle: Eine B-Plasmazelle innerhalb des Präparates sollte entweder ein Ig-Kappa- oder ein Ig-Lambda-Signalmuster aufweisen. Zellen innerhalb des Präparates, welche keine B-Zellen sind, wie beispielsweise Fibroblasten sollten keine Färbung aufweisen.

Externe Kontrolle: Validierte positive und negative Kontrollproben.

15. Leistungsmerkmale

Die Leistung der ZytoFast human Ig-kappa/Ig-lambda Probe wurde mittels der Durchführung von chromogenen *in situ* Hybridisierungen (CISH) mit Leichtketten-Restriktion-positivem und negativem Gewebepreparaten beurteilt. Der Leichtketten-Restriktionsstatus der untersuchten Präparate wurde zuvor durch eine Referenzmethode bestimmt.

Analytische Sensitivität: Es wurde eine analytische Sensitivität von 100% berechnet.

Analytische Spezifität: Es wurde eine analytische Spezifität von 100% berechnet.

16. Entsorgung

Die Entsorgung der Reagenzien muss in Übereinstimmung mit den örtlichen Vorschriften erfolgen.

17. Fehlerbehebung

Jede Abweichung von der Gebrauchsanweisung kann zu schwachen bis gar keinen Färbungen führen.

Schwache oder keine Signale

| Mögliche Ursache | Lösung |
|--|--|
| Zell- oder Gewebeproben sind nicht korrekt fixiert | Die Fixierzeit und das Fixiermittel optimieren |
| Temperatur der Proteolyse, Hybridisierung, Denaturierung, Stringenzwaschung oder der Antikörper-Inkubation nicht korrekt | Die Temperatur aller technischen Geräte mit einem kalibrierten Thermometer überprüfen. Bei Lösungen mit einer kritischen Temperatur immer die gleiche Anzahl an Objektträgern verwenden |
| Proteolytische Vorbehandlung nicht optimal | Abhängig von verschiedenen Faktoren, wie z.B. Art und Dauer der Fixierung, Dicke der Schnitte und Art des Gewebes/der Zellen, können unterschiedliche Inkubationszeiten notwendig sein. Die optimale Dauer der Pepsin-Inkubation in Vortests bestimmen |
| Hybridisierungszeit zu kurz | Für mindestens 2h hybridisieren, falls notwendig, Hybridisierungszeit verlängern |
| Zu gering konzentrierter Wash Buffer | Die Konzentration des Wash Buffers überprüfen |
| Alte Dehydrierungslösungen | Frische Dehydrierungslösungen ansetzen |
| Verdunstung der Sonde | Bei der Nutzung eines Hybridizers ist die Verwendung von feuchten Vliesstreifen/Wassertanks erforderlich. Bei der Nutzung eines Hybridisierungssofens muss eine Feuchtekammer verwendet werden. Zusätzlich sollte das Deckglas, z.B. mit Fixogum, vollständig versiegelt werden, um ein Austrocknen der Präparate während der Hybridisierung zu verhindern |
| Unzureichende Vorbereitung des chromogenen Substrates | Zur Herstellung der Chromogen-Gebrauchslösung kalibrierte Pipetten anstatt des Tropfens verwenden |
| Inkubationstemperatur der Farbsubstrate nicht korrekt | Die Temperatur aller verwendeten technischen Geräte mit einem kalibrierten Thermometer überprüfen |
| Dauer der Gegenfärbung zu lang | Die Dauer der Gegenfärbung ist abhängig von der Art des Präparats und sollte dementsprechend optimiert werden. Dunkle Gegenfärbungen vermeiden, da diese positive Signale verdecken könnten |

| | |
|--|---|
| Keine Zielsequenz vorhanden | Positive Kontrollsonden wie z.B. <u>ZytoFast 28S rRNA (+) Control Probe (PF50)</u> zur Bestimmung der Pepsin-Inkubationszeit verwenden. Verifiziertes positives Gewebe verwenden, um die Leistung des Tests zu bestätigen |
| Bläuen der Gegenfärbung nicht korrekt durchgeführt | Für das Bläuen kaltes Leitungswasser verwenden; kein warmes bzw. heißes Wasser oder Bläuungsreagenzien verwenden |

Signale zu stark

| Mögliche Ursache | Lösung |
|---|--|
| Dauer der proteolytischen Vorbehandlung zu lang | Abhängig von verschiedenen Faktoren, wie z.B. Art und Dauer der Fixierung, Dicke der Schnitte und Art des Gewebes/der Zellen, können unterschiedliche Inkubationszeiten notwendig sein. Die optimale Dauer der Pepsin-Inkubation in Vortests bestimmen |
| Substratreaktion ist zu stark | Inkubationszeit des Substrates verkürzen; die Substratlösung nicht über die in der Gebrauchsanweisung beschriebenen Temperatur hinaus erhitzen |

Signale verblassen oder verschmelzen

| Mögliche Ursache | Lösung |
|--|--|
| Verwendung eines ungeeigneten Eindeckmediums | Nur das mit dem Kit zur Verfügung gestellte oder das in der Gebrauchsanleitung empfohlene Eindeckmedium verwenden. Eindeckmedien frei von Unreinheiten verwenden; keine Eindeckfolie verwenden |

Ungleichmäßige oder teils nur sehr leichte Färbung

| Mögliche Ursache | Lösung |
|--|---|
| Unvollständiges Entparaffinieren | Frische Lösungen verwenden, Dauer des Entparaffinierens überprüfen |
| Volumen der Reagenzien zu gering | Sicherstellen, dass das Volumen der Reagenzien groß genug ist, um den Bereich des Gewebes zu bedecken |
| Luftbläschen vor der Hybridisierung oder während des Eindeckens eingeschlossen | Luftbläschen vermeiden |

Inkonsistente Ergebnisse

| Mögliche Ursache | Lösung |
|---|---|
| Unzureichende Trocknung vor Applikation der Sonde | Lufttrocknung verlängern |
| Zu viel Wasser/Waschpuffer auf dem Gewebe vor Applikation von Pepsin, Antikörpern und/oder Farbsubstraten | Überschüssige Flüssigkeit durch Abklopfen oder Abschütteln des Objektträgers von dem Gewebeschnitt entfernen. Kleinere Mengen an restlichem Wasser/Waschpuffer beeinträchtigen den Test nicht |
| Variierende Methoden der Gewebefixierung oder Einbettung | Methoden der Fixierung und Einbettung optimieren |
| Variierende Gewebedicke | Schneiden optimieren |

Degradierete Morphologie

| Mögliche Ursache | Lösung |
|---|--|
| Zell- oder Gewebeproben sind nicht optimal fixiert | Die Fixierzeit und das Fixiermittel optimieren |
| Proteolytische Vorbehandlung nicht optimal ausgeführt | Die Inkubationszeit mit Pepsin optimieren |

Hintergrundsignale

| Mögliche Ursache | Lösung |
|---|---|
| Temperatur der Stringenzwaschung nicht korrekt | Die Temperatur aller technischen Geräte mit einem kalibrierten Thermometer überprüfen. Immer die gleiche Anzahl an Objektträgern verwenden. Bei Hitze-Inkubationsschritten nicht mehr als acht Objektträger pro Küvette verwenden |
| Objektträger nicht ausreichend gespült | Wenn angegeben, ausreichend und frischen Waschpuffer bzw. deionisiertes oder destilliertes Wasser verwenden |
| Schnitte sind während oder nach der Hybridisierung ausgetrocknet | Das Austrocknen der Schnitte vermeiden; Feuchtekammern verwenden; Deckglas sorgfältig abdichten |
| Verlängerte Inkubationszeit des Substrates | Inkubationszeit des Substrates verkürzen |
| Unvollständiges Entparaffinieren | Frische Lösungen verwenden, Dauer des Entparaffinierens überprüfen |
| Proteolytische Vorbehandlung zu stark | Inkubationszeit von Pepsin optimieren |
| Objektträger sind vor der Hybridisierung auf Raumtemperatur abgekühlt | Die Objektträger zügig auf Hybridisierungstemperatur überführen |
| Gewebe-Antikörper Interaktion | Negative Kontrollsonden wie z.B. <i>ZytoFast</i> RNA (-) Control Probe (PF33) zur Bestimmung der gewebespezifischen Hintergrundfärbung verwenden |

Überlagernde Zellkerne

| Mögliche Ursache | Lösung |
|--------------------------------------|--|
| Ungeeignete Dicke der Gewebeschnitte | 3-5 µm dicke Mikrotomschnitte anfertigen |

Präparat löst sich vom Objektträger

| Mögliche Ursache | Lösung |
|---|--|
| Ungeeignete Beschichtung der Objektträger | Geeignete Objektträger (positiv geladen) verwenden |
| Proteolytische Vorbehandlung ist zu stark | Inkubationszeit mit Pepsin reduzieren |

18. Literatur

- Erber WN, et al. (1993) *Pathology* 25: 63-7.
- Hieter PA, et al. (1980) *Cell* 22: 197-207.
- Hieter PA, et al. (1981) *Nature* 294: 536-40.
- Marti GE, et al. (2005) *Br J Haematol* 130: 325-32.
- McNicol AM, Farquharson MA (1997) *J Pathol* 182: 250-61.
- Pringle JH, et al. (1990) *J Pathol* 162: 197-207.
- Wilkinson DG: *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.

Unsere Experten stehen Ihnen für Ihre Fragen zur Verfügung.
Bitte kontaktieren Sie help@zytovision.com



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

Warenzeichen:

ZytoVision® und ZytoFast® sind Warenzeichen der ZytoVision GmbH.