



**ZytoLight**

## SPEC PML/RARA Dual Color Dual Fusion Probe

**REF** Z-2113-50  $\Sigma$  5 (0,05 ml)

**REF** Z-2113-200  $\Sigma$  20 (0,2 ml)

Für den qualitativen Nachweis der Translokation t(15;17)(q24;q21.2) mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)



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

### 1. Verwendungszweck

Die ZytoLight SPEC PML/RARA Dual Color Dual Fusion Probe (PL70) ist für den qualitativen Nachweis der Translokation t(15;17)(q24;q21.2) des PML-Gens in der chromosomalen Region 15q24.1 sowie des RARA-Gens in der chromosomalen Region 17q21.2 in zytologischen Präparaten wie beispielsweise Leukämiezellen mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) bestimmt. Die Sonde ist für die Verwendung in Kombination mit dem ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit (Prod. Nr. Z-2099-20) 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

Translokationen des PML (promyelocytic leukemia, aka MYL) Gens sowie des RARA (retinoic acid receptor alpha, aka RAR $\alpha$ ) Gens werden als charakteristisch für die akute promyelozytische Leukämie (APL), einem Subtyp der akuten myeloischen Leukämie, angesehen. Verschiedene Fusionspartner von RARA wurden identifiziert, jedoch sind in 95% aller APL-Fälle Rearrangierungen mit PML nachweisbar. Diese Translokation t(15;17)(q24;q21) führt zu einer Genfusion des PML- und des RARA-Gens. Die Fusion spielt vermutlich eine fundamentale Rolle in der Entstehung, Entwicklung und Progression von APL. Da die PML/RARA-Fusion das Ansprechen dieser Neoplasien auf die Therapie mit All-trans-Retinsäure (ATRA) sowie andere konventionelle Chemotherapien beeinflusst, ist es wichtig, genau zwischen t(15;17)-Translokationen und Translokationen mit anderen Partnern von RARA zu unterscheiden.

### 3. Prinzip der Methode

Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) erlaubt den Nachweis und die Visualisierung von spezifischen Nukleinsäuresequenzen in Zellpräparationen. Fluoreszenzmarkierte DNA-Fragmente, sogenannte FISH-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.

Nach der Gegenfärbung der DNA mit DAPI werden hybridisierte Sondenfragmente mit einem Fluoreszenzmikroskop visualisiert, welches mit für die Fluorochrome spezifischen Anregungs- und Emissionsfiltern ausgestattet ist, mit denen die FISH-Sondenfragmente direkt markiert wurden.

### 4. Enthaltene Komponenten

Die ZytoLight SPEC PML/RARA Dual Color Dual Fusion Probe besteht aus:

- ZyGreen (Anregung 503 nm/Emission 528 nm) markierten Polynukleotiden (~12,0 ng/ $\mu$ l), die gegen Sequenzen in 17q12-q21.2\* (chr17:37,953,503-38,818,030) gerichtet sind (siehe Abb. 1).
- ZyOrange (Anregung 547 nm/Emission 572 nm) markierten Polynukleotiden (~6 ng/ $\mu$ l), die gegen Sequenzen in 15q24.1\* (chr15:73,910,690-74,699,298) gerichtet sind (siehe Abb. 1).
- Hybridisierungsbuffer auf Basis von Formamid

\*nach Human Genome Assembly GRCh37/hg19

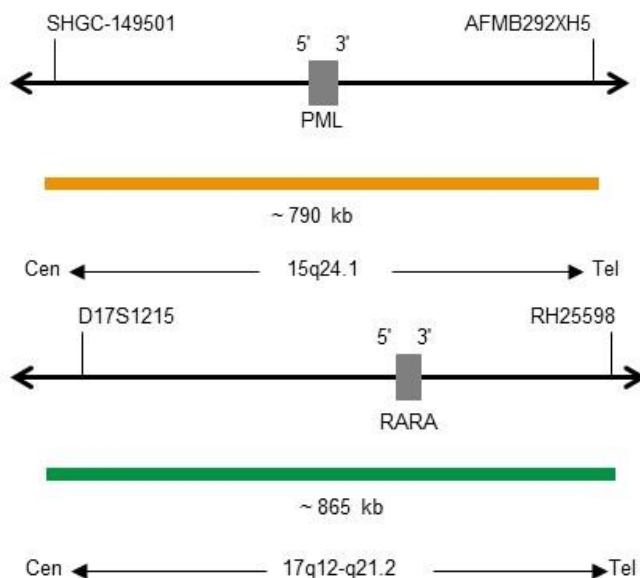


Abb. 1: Oben: SPEC PML Sondenlokalisierung; Unten: SPEC RARA Sondenlokalisierung (nicht maßstabsgetreu)

Die ZytoLight SPEC PML/RARA Dual Color Dual Fusion Probe ist verfügbar in zwei Größen:

- Z-2113-50: 0,05 ml (5 Reaktionen von je 10  $\mu$ l)
- Z-2113-200: 0,2 ml (20 Reaktionen von je 10  $\mu$ l)

### 5. Benötigte, aber nicht bereitgestellte Materialien

- ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit (Prod. Nr. Z-2099-20)
- Positive und negative Kontrollproben
- Objektträger, unbeschichtet
- Wasserbad (70°C)
- Hybridizer oder Wärmeplatte
- Hybridizer oder Feuchtekkammer im Hybridisierungssofen
- Verstellbare Pipetten (10  $\mu$ l, 25  $\mu$ l)
- Küvetten oder Färbetröge
- Stoppuhr
- Kalibriertes Thermometer
- Ethanol oder denaturierter Alkohol
- 37% Formaldehyd, säurefrei, oder 10% Formalin, neutral gepuffert
- 2x Natriumcitrat Salzlösung (SSC), z.B. aus 20x SSC Solution (Prod. Nr. WB-0003-50)
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser
- Deckgläser (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Naturkautschuk-Klebstoff, z.B. Fixogum Rubber Cement (Prod. Nr. E-4005-50/-125), oder Ähnliches
- Regelmäßig gewartetes Fluoreszenzmikroskop (400-1000x)
- Immersionsöl, geeignet für Fluoreszenzmikroskopie
- Entsprechende Filtersätze

## 6. Lagerung und Handhabung

Bei 2-8°C in aufrechter Position und lichtgeschützt lagern. Vor Licht geschützt verwenden. 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 Anfrage für den beruflichen Anwender verfügbar.
- Die Reagenzien nicht wiederverwenden.
- Kreuzkontaminationen der Präparate vermeiden, da diese zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
- Die Sonde sollte nicht für längere Zeit dem Licht, insbesondere intensivem Licht, ausgesetzt werden. Das bedeutet, falls möglich sollten alle Arbeitsschritte im Dunkeln und/oder unter Verwendung von lichtundurchlässigen Behältnissen durchgeführt werden!

### Gefahren- und Sicherheitshinweise:

Die gefahrbestimmende Komponente ist Formamid.



#### Gefahr

H351	Kann vermutlich Krebs erzeugen.
H360FD	Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
H373	Kann die Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition.
P201	Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
P202	Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.
P260	Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen.
P280	Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
P308+P313	BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P405	Unter Verschluss aufbewahren.

## 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 liegt in der Verantwortung eines qualifizierten Pathologen, mit FISH 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 Loci, 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

Rote Blutzellen innerhalb des Präparates können Autofluoreszenz verursachen, welche die Signalerkennung behindert.

## 10. Vorbereitung der Präparate

Die Präparatevorbehandlung ist wie in der Gebrauchsanweisung des [ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kits](#) beschrieben durchzuführen.

## 11. Vorbereitung der Reagenzien

Das Produkt ist gebrauchsfertig. Kein Rekonstituieren, Mischen oder Verdünnen ist notwendig. Die Sonde vor der Anwendung lichtgeschützt auf Raumtemperatur (18-25°C) bringen. Vor dem Öffnen durch Vortexen mischen und kurz herunterzentrifugieren.

## 12. Durchführung

### Vorbehandlung der Präparate

Die Präparatevorbehandlung ist wie in der Gebrauchsanweisung des [ZytoLight FISH-Cytology Implementation 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 Präparate für 5 min bei 72°C denaturieren.
4. Die Hybridisierung für 2h bis 16h (d.h. über Nacht) bei 37°C durchführen, indem die Objektträger entweder in einen Hybridizer oder in eine Feuchtekammer im Hybridisierungssofen überführt werden.

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

### Post-Hybridisierung

Die Post-Hybridisierung (Waschen, Gegenfärbung, Fluoreszenzmikroskopie) gemäß der Gebrauchsanweisung des [ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kits](#) durchführen.

## 13. Interpretation der Ergebnisse

Bei Verwendung von geeigneten Filtersätzen erscheinen die Hybridisierungssignale der Sonde grün (RARA-Genregion) und orange (PML-Genregion).

**Normale Situation:** In Interphasen von normalen Zellen oder Zellen ohne eine Translokation der entsprechenden Genregion erscheinen zwei einzelne grüne und orange Signale (siehe Abb. 2).

**Aberrante Situation:** Eine Genfusion wird durch ein separates oranges Signal, ein separates grünes Signal sowie durch zwei orange/grüne Fusionssignale gekennzeichnet (siehe Abb. 2).

Sich überlagernde Signale können als gelbe Signale erscheinen.

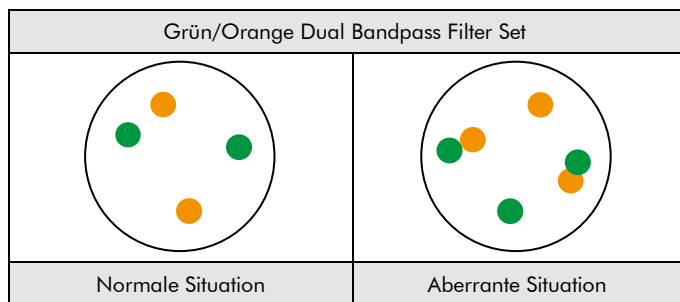


Abb. 2: Zu erwartende Ergebnisse in normalen und aberranten Zellkernen

Bei einigen aberranten Präparaten kann eine abweichende Signalverteilung beobachtet werden, welche zu einem anderen Signalmuster als zuvor beschrieben führen kann. Dies kann auf abweichende Rearrangierungen hinweisen. Unerwartete Signalmuster sollten näher untersucht werden.

**Bitte beachten:**

- Aufgrund von dekondensiertem Chromatin können einzelne FISH-Signale als kleine Signal-Cluster erscheinen. Daher sollten zwei oder drei Signale der gleichen Größe mit einer Distanz von  $\leq 1$  Signaldurchmesser als ein Signal gewertet werden.
- Sich überlagernde Zellkerne nicht auswerten.
- Über-verdaute Zellkerne nicht auswerten (erkennbar als dunkle Areale im Zellkern).
- Keine Auswertung von Zellen mit starker Eigenfluoreszenz, welche die Signalerkennung behindert.
- Ein negatives oder unspezifisches Ergebnis kann durch verschiedene Faktoren verursacht werden (siehe Kapitel 17).
- 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:** Nicht-neoplastische Zellen innerhalb des Präparates, die ein normales Signalmuster aufweisen.

**Externe Kontrolle:** Validierte positive und negative Kontrollproben.

**15. Leistungsmerkmale**

**2h Hybridisierung**

**Genauigkeit:** Die Lokalisation der Hybridisierung der Sonde wurde auf Metaphasen eines karyotypisch unauffälligen Mannes überprüft. Die Sonde hybridisierte in allen getesteten Präparaten nur an die erwarteten Loci. Es wurden keine zusätzlichen Signale oder Kreuzhybridisierungen beobachtet. Daher wurde eine Genauigkeit von 100% berechnet.

**Analytische Sensitivität:** Für die Bestimmung der analytischen Sensitivität wurde die Sonde auf Metaphasen von karyotypisch unauffälligen Männern getestet. Sämtliche Zellkerne zeigten das erwartete unauffällige Signalmuster in allen getesteten Präparaten. Daher wurde eine analytische Sensitivität von 100% berechnet.

**Analytische Spezifität:** Für die Bestimmung der analytischen Spezifität wurde die Sonde auf Metaphasen von karyotypisch unauffälligen Männern getestet. In sämtlichen getesteten Präparaten hybridisierten alle Signale nur an die erwarteten Zielbereiche und an keine weiteren Loci. Daher wurde eine analytische Spezifität von 100% berechnet.

**Übernacht-Hybridisierung**

**Genauigkeit:** Die Lokalisation der Hybridisierung der Sonde wurde auf Metaphasen eines karyotypisch unauffälligen Mannes überprüft. Die Sonde hybridisierte in allen getesteten Präparaten nur an die erwarteten Loci. Es wurden keine zusätzlichen Signale oder Kreuzhybridisierungen beobachtet. Daher wurde eine Genauigkeit von 100% berechnet.

**Analytische Sensitivität:** Für die Bestimmung der analytischen Sensitivität wurde die Sonde auf Metaphasen von karyotypisch unauffälligen Männern getestet. Sämtliche Zellkerne zeigten das erwartete unauffällige Signalmuster in allen getesteten Präparaten. Daher wurde eine analytische Sensitivität von 100% berechnet.

**Analytische Spezifität:** Für die Bestimmung der analytischen Spezifität wurde die Sonde auf Metaphasen von karyotypisch unauffälligen Männern getestet. In sämtlichen getesteten Präparaten hybridisierten alle Signale nur an die erwarteten Zielbereiche und an keine weiteren Loci. Daher 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
Es sind keine Zielsequenzen vorhanden	Geeignete Kontrollen verwenden
Temperatur der Proteolyse, Denaturierung, Hybridisierung oder der Stringenzwaschung nicht korrekt	Die Temperatur aller technischen Geräte mit einem kalibrierten Thermometer überprüfen
Proteolytische Vorbehandlung nicht optimal	Die Inkubationszeit mit Pepsin optimieren, falls notwendig erhöhen oder reduzieren
Verdunstung der Sonde	Bei der Nutzung eines Hybridizers ist die Verwendung von feuchten Vliesstreifen/Wassertanks erforderlich. Bei der Nutzung eines Hybridisierungsofens muss eine Feuchteammer verwendet werden. Zusätzlich sollte das Deckglas, z.B. mit Fixogum, vollständig versiegelt werden, um ein Austrocknen der Präparat während der Hybridisierung zu verhindern.
Zu gering konzentrierter Stringenzwaschpuffer	Die Konzentration des Stringenzwaschpuffers überprüfen
Alte Dehydrierungslösungen	Frische Dehydrierungslösungen ansetzen
Fluoreszenzmikroskop falsch eingestellt	Einstellungen überprüfen
Ungeeignete Filtersätze verwendet	Für die Fluorochrome der Sonde geeignete Filtersätze verwenden. <i>Triple-Bandpass-Filtersätze liefern im Vergleich zu Single- oder Dual-Bandpass-Filtersätzen weniger Licht. Daher können die Signale unter Verwendung von Triple-Bandpass-Filtersätzen schwächer erscheinen.</i>
Schädigungen der Sonden/Fluorophore durch Licht	Hybridisierung und Waschschritte im Dunkeln durchführen

**Kreuzhybridisierungssignale, Hintergrundsignale**

Mögliche Ursache	Lösung
Proteolytische Vorbehandlung zu stark	Die Inkubationszeit mit Pepsin reduzieren
Sondenvolumen pro Fläche zu hoch	Das Volumen der Sonde pro Präparat/Fläche reduzieren, Sonde tropfenweise verteilen, um lokale Konzentration zu vermeiden

Objekträger sind vor der Hybridisierung auf Raumtemperatur abgekühlt	Objekträger zügig auf 37°C überführen
Zu hoch konzentrierter Stringenzwaschpuffer	Die Konzentration des Stringenzwaschpuffers überprüfen
Temperatur der Waschschrte nach Hybridisierung ist zu gering	Temperatur überprüfen und, wenn nötig, erhöhen
Austrocknung der Präparate zwischen den einzelnen Inkubationsschritten	Austrocknung durch Versiegeln der Objekträger und durch das Durchführen der Inkubation in feuchter Umgebung verhindern

**Degradierete Morphologie**

Mögliche Ursache	Lösung
Proteolytische Vorbehandlung nicht optimal ausgeführt	Die Inkubationszeit mit Pepsin optimieren, falls notwendig erhöhen oder reduzieren
Unzureichende Trocknung vor Applikation der Sonde	Lufttrocknung verlängern

**Schwache Gegenfärbung**

Mögliche Ursache	Lösung
Gering konzentrierte DAPI-Lösung	<u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (Prod. Nr. MT-0008-0.8) stattdessen verwenden
Inkubationszeit mit DAPI zu kurz	Inkubationszeit mit DAPI anpassen

**18. Literatur**

- Abe S, et al. (2008) *Cancer Genet and Cytogenet* 184: 44-7.
- Brockmann SR, et al. (2003) *Cancer Genet and Cytogenet* 145: 144-51.
- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Reiter A, et al. (2004) *Acta Hematol* 112: 55-67.
- Sanz MA, et al. (2009) *Blood* 113: 1875-91.
- 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](mailto:help@zytovision.com)



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

**Warenzeichen:**

ZytoVision® und ZytoLight® sind Warenzeichen der ZytoVision GmbH.