ZytoDot 2C
Glioma 1p/19q Probe Set

REF	C-3076-10	Σ	10
REF	C-3076-40	Σ	40

Pro kvalitativní detekci delecí zahrnujících lidskou chromozomální oblast 1p36.31 a delecí zahrnujících lidskou chromozomální oblast 19q13.32-q13.33 pomocí chromogenní *in situ* hybridizace (CISH)

4250380N9183

CE 0483

IVD

Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro

podle IVDR (EU) 2017/746

1. Zamýšlený účel

Sada sond ZytoDot 2C Glioma 1p/19q Probe Set je určena ke kvalitativní detekci delecí zahrnujících lidskou chromozomální oblast 1p36.31 a delecí zahrnujících lidskou chromozomální oblast 19q13.32-q13.33 ve formalínem fixovaných, do parafínu zalitých vzorcích, jako je gliom, pomocí chromogenní in situ hybridizace (CISH). Sonda je určena k použití v kombinaci se sadou ZytoDot 2C CISH Implementation Kit (prod. č. C-3044-10/-40).

Výrobek je určen pouze pro profesionální použití. Všechny testy s použitím výrobku by měly být prováděny v certifikované, licencované laboratoři anatomické patologie pod dohledem patologa/humánního genetika kvalifikovaným personálem.

Sonda je určena jako pomůcka pro diferenciální diagnostiku gliomu a léčebná opatření by neměla být zahájena pouze na základě výsledku testu.

2. Princip testu

Technika chromogenní *in situ* hybridizace (CISH) umožňuje detekci a vizualizaci specifických sekvencí nukleových kyselin v buněčných preparátech. Nukleotidové fragmenty značené haptenem, tzv. sondy CISH, a jejich komplementární cílové sekvence v preparátech jsou při hybridizaci společně denaturovány a následně se nechají annealizovat. Poté se nespecifické a nenavázané fragmenty sond odstraní pomocí promývacích kroků. Tvorbu duplexu značené sondy lze vizualizovat pomocí primárních (neznačených) protilátek, které jsou detekovány sekundárními polymerizovanými protilátkami konjugovanými s enzymem. Enzymatická reakce s chromogenními substráty vede k tvorbě barevných precipitátů. Po protibarvení jádra jaderným barvivem se hybridizované fragmenty sondy vizualizují světelnou mikroskopií.

3. Dodaná činidla

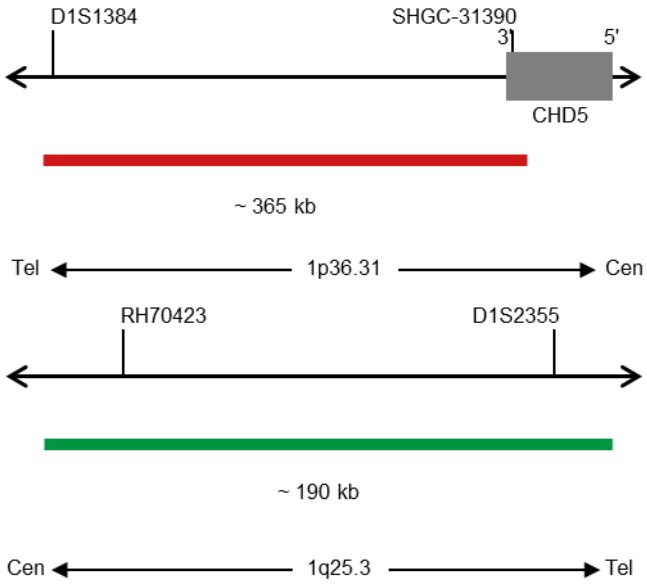
The ZytoDot 2C Glioma 1p/19q Probe Set je sada obsahující dvě samostatné sondy:

- ZytoDot 2C SPEC 1p36/1q25 Probe (prod. č. C-3036-100/-400)
- ZytoDot 2C SPEC 19q13/19p13 Probe (prod. č. C-3037-100/-400)

ZytoDot 2C SPEC 1p36/1q25 Probe (**PD21**) se skládá z:

- Polynukleotidy značené digoxigeninem (~1,7 ng/µl), které cílí na sekvence mapující v 1q25.3* (chr1:184,562,510-184,752,938) (viz obr. 1).
- Polynukleotidy značené dinitrofenylem (~1,7 ng/µl), které se zaměřují na sekvence mapující v 1p36.31* (chr1:5,808,946-6,176,336) (viz obr. 1).
- Formamidový hybridizační pufr

*podle sestavy lidského genomu GRCh37/hg19

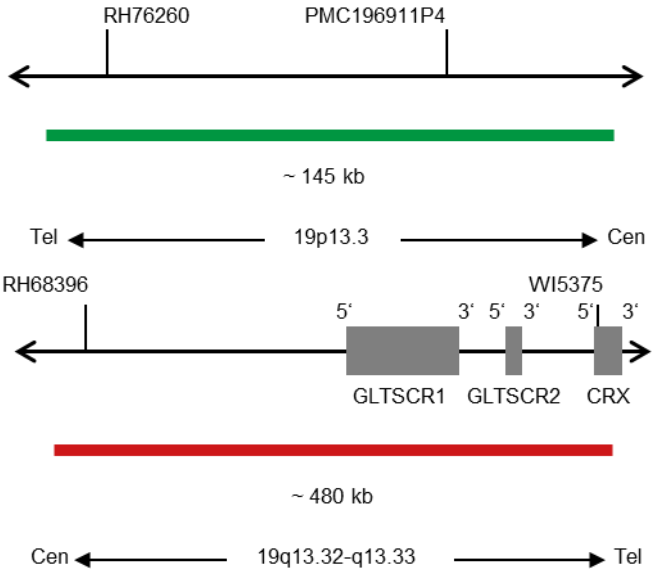


Obr. 1: Nahoře: Mapa sond SPEC 1p36, dole: Mapa sond SPEC 1q25 (není v měřítku)

ZytoDot 2C SPEC 19q13/19p13 Probe (**PD22**) se skládá z:

- Polynukleotidy značené digoxigeninem (~0,8 ng/µl), které cílí na sekvence mapující v 19p13.3* (chr19:815,938-962,244) (viz obr. 2).
- Polynukleotidy značené dinitrofenylem (~0,8 ng/µl), které se zaměřují na sekvence mapující v 19q13.32-q13.33* (chr19:47,857,776-48,339,398) (viz obr. 2).
- Formamidový hybridizační pufr

*podle sestavy lidského genomu GRCh37/hg19



Obr. 2: Nahoře: Mapa sond SPEC 19q13, dole: Mapa sond SPEC 19p13 (není v měřítku)

ZytoDot 2C Glioma 1p/19q Probe Set je k dispozici ve dvou velikostech:

- C-3076-10: Jednotlivé sondy vystačí na 10 reakcí po 10 µl.
- C-3076-40: Jednotlivé sondy vystačí na 40 reakcí po 10 µl.

4. Požadované, ale neposkytované materiály

- ZytoDot 2C CISH Implementation Kit (Prod. č. C-3044-10/-40)
- Pozitivní a negativní kontrolní vzorky
- Mikroskopická sklíčka, kladně nabitá
- Vodní lázeň (80 °C, 98 °C)
- Hybridizér nebo horká deska
- Hybridizátor nebo vlhkostní komora v hybridizační peci
- Nastavitelné pipety (10 µl, 1000 µl)
- Barvící nádoby nebo lázně
- Časovač
- Kalibrovaný teploměr
- Etanol nebo reagenční alkohol
- Xylen
- Metanol 100%
- Peroxid vodíku (H_2O_2) 30 %.
- Deionizovaná nebo destilovaná voda
- Krycí sklíčka (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Pryžový cement, např. Fixogum Rubber Cement (prod. č. E-4005-50/-125) nebo podobné.
- Vhodně udržovaný světelný mikroskop (400-630x)

5. Skladování a manipulace

Skladujte při teplotě 2-8 °C ve svislé poloze. Ihned po použití vraťte do skladovacích podmínek. Nepoužívejte činidla po uplynutí doby použitelnosti uvedené na štítku. Při odpovídajícím zacházení je přípravek stabilní do data použitelnosti uvedeného na štítku.

6. Upozornění a bezpečnostní opatření

- Před použitím si přečtěte návod k použití!
- Nepoužívejte činidla po uplynutí doby použitelnosti!
- Tento výrobek obsahuje látky (v nízkých koncentracích a objemech), které jsou zdraví škodlivé a potenciálně infekční. Vyvarujte se jakéhokoli přímého kontaktu s činidly. Přijměte vhodná ochranná opatření (používejte jednorázové rukavice, ochranné brýle a laboratorní oděv)!
- Jakoukoli závažnou událost, ke které došlo v souvislosti s výrobkem, nahlaste výrobci a příslušnému úřadu v souladu s místními předpisy!
- Pokud se činidla dostanou do kontaktu s kůží, okamžitě ji opláchněte velkým množstvím vody!
- Pro profesionální uživatele je na vyžádání k dispozici bezpečnostní list materiálu.
- Reagencie nepoužívejte opakovaně, pokud není opakované použití výslovně povoleno!
- Vyvarujte se křížové kontaminace vzorků, protože to může vést k chybným výsledkům.
- Během hybridizace a promývání se vzorky nesmí nechat zaschnout.

Standardní věty o nebezpečnosti a pokyny pro bezpečné zacházení:

Složkou určující nebezpečnost je formamid.

Nebezpečí

H351	Podezření, že způsobuje rakovinu.
H360FD	Může poškodit plodnost. Může poškodit nenarozené dítě.
H373	Může způsobit poškození orgánů při dlouhodobé nebo opakované expozici.
P201	Před použitím si vyžádejte zvláštní pokyny.
P202	Nemanipulujte s ním, dokud si nepřečtete a neporozumíte všem bezpečnostním pokynům.
P260	Nevdechujte prach/dým/plyn/hmlu/výpary/stříkance.
P280	Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranu očí/ochranu obličeje.
P308+P313	Jste-li vystaveni nebo znepokojeni: Vyhledejte lékařskou pomoc/opatření.
P405	Sklad je uzamčený.

7. Omezení

- Pro diagnostické použití *in vitro.*
- Pouze pro profesionální použití.
- Pouze pro neautomatizované použití.
- Klinická interpretace jakéhokoli pozitivního barvení nebo jeho nepřítomnosti musí být provedena v kontextu klinické anamnézy, morfologie, dalších histopatologických kritérií a také dalších diagnostických testů. Za znalost sond CISH, reagencií, diagnostických panelů a metod používaných k výrobě barveného preparátu odpovídá kvalifikovaný patolog/humánní genetik. Barvení musí být prováděno v certifikované licencované laboratoři pod dohledem patologa/humánního genetika, který je odpovědný za revizi obarvených preparátů a zajištění adekvátnosti pozitivních a negativních kontrol.
- Barvení vzorků, zejména intenzita signálu a barvení pozadí, závisí na manipulaci se vzorkem a jeho zpracování před barvením. Nesprávná fixace, zmrazení, rozmrazení, mytí, sušení, zahřívání, řezání nebo kontaminace jinými vzorky či tekutinami může vést k artefaktům nebo falešným výsledkům. Nekonzistentní výsledky mohou být důsledkem rozdílů v metodách fixace a vkládání, jakož i vrozených nepravidelností ve vzorku.
- Sonda by se měla používat pouze pro detekci lokusů popsaných v kapitole 3. "Dodávané reagencie".
- Výkon byl ověřen pomocí postupů popsaných v tomto návodu k použití. Úpravy těchto postupů mohou změnit výkon a musí být ověřeny uživatelem. Tento IVD je certifikován jako CE, pouze pokud je používán způsobem popsaným v tomto návodu k použití v rozsahu určeného použití.

8. Rušivé látky

Následující fixativa jsou s ISH neslučitelná:

- Bouinovo fixační činidlo
- fixační prostředek B5
- Kyselé fixační prostředky (např. kyselina pikrová)
- Zenkerovo fixační činidlo
- Alkoholy (při samostatném použití)
- Chlorid rtuťnatý
- Formaldehydové/zinkové fixační činidlo
- Hollandův fixativ
- Formalin bez pufru

9. Příprava vzorků

Připravte vzorky podle návodu k použití sady ZytoDot 2C CISH Implementation Kit.

10. Přípravné ošetření zařízení

Výrobek je připraven k použití. Není třeba rekonstituce, míchání ani ředění. Před použitím uveďte sondu na pokojovou teplotu (18-25 °C), chraňte před světlem. Před otevřením lahvičky promíchejte vortexováním a krátce roztočte.

11. Postup analýzy

Předúprava vzorků
Proveďte předběžnou úpravu vzorku (např. odvoskování, proteolýzu) podle návodu k použití sady ZytoDot 2C CISH Implementation Kit.

Denaturace a hybridizace

1. Na každý předem ošetřený vzorek napipetujte 10 µl sondy.
2. Vzorky zakryjte krycím sklíčkem o rozměrech 22 x 22 mm (zamezte zachycení bublin) a krycí sklíčko utěsněte.

K utěsnění doporučujeme použít gumový cement (např. Fixogum).

3. Umístěte sklíčka na horkou desku nebo hybridizátor a denaturujte vzorky po dobu 5 minut při 79 °C.
4. Přeneste sklíčka do vlhké komory a hybridizujte přes noc při 37 °C (např. v hybridizační peci).

Je důležité, aby vzorky během hybridizace nevyschly.

Po hybridizaci
Zpracování po hybridizaci (promytí, detekce, protibarvení, montáž, mikroskopie) proveďte podle návodu k použití sady ZytoDot 2C CISH Implementation Kit.

12. Interpretace výsledků

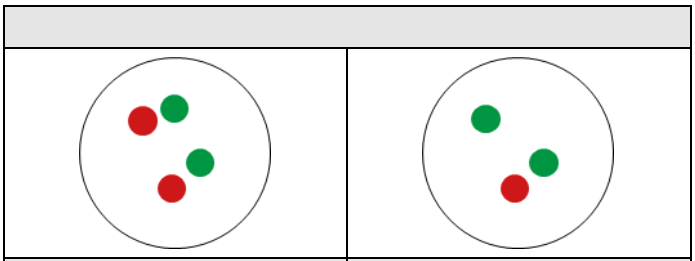
ZytoDot 2C SPEC 1p36/1q25 Probe:

Při použití sady ZytoDot 2C CISH Implementation Kit se hybridizační signály polynukleotidů značených digoxigeninem zobrazí jako tmavě zelené odlišné tečky (lokus 1q25) a polynukleotidy značené dinitrofenylem se zobrazí jako jasně červené odlišné tečky (lokus 1p36).

Normální situace: V interfázích normálních buněk nebo buněk bez delece zahrnující lokus 1p36 se objevují dva zřetelné červené a dva zřetelné zelené tečkovité signály. (viz obr. 3).

Neobvyklá situace: V buňce s delecí postihující lokus 1p36 bude pozorován snížený počet červených signálů. Delece postihující pouze části lokusu 1p36 mohou vést k normálnímu signálnímu vzorci s červenými signály o snížené velikosti. (viz obr. 3).

Překrývající se signály se mohou zobrazovat jako hnědé signály.



Obr. 3: Očekávané výsledky u normálních a aberantních jader

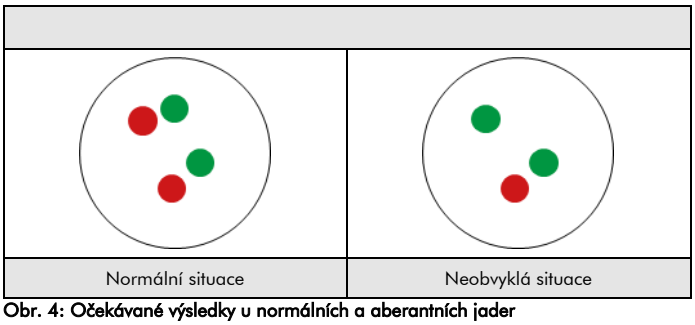
ZytoDot 2C SPEC 19q13/19p13 Probe:

Při použití sady ZytoDot 2C CISH Implementation Kit se hybridizační signály polynukleotidů značených digoxigeninem zobrazí jako tmavě zelené odlišné tečky (lokus 19p13) a polynukleotidy značené dinitrofenylem se zobrazí jako jasně červené odlišné tečky (lokus 19p13).

Normální situace: V interfázích normálních buněk nebo buněk bez delece zahrnující lokus 19p13 se objevují dva zřetelné červené a dva zřetelné zelené tečkovité signály. (viz obr. 4).

Neobvyklá situace: V buňce s delecí postihující lokus 1p36 bude pozorován snížený počet červených signálů. Delece postihující pouze části lokusu 19p13 mohou vést k normálnímu signálnímu vzorci s červenými signály o snížené velikosti. (viz obr. 4).

Překrývající se signály se mohou zobrazovat jako hnědé signály.



Obr. 4: Očekávané výsledky u normálních a aberantních jader

U některých abnormálních vzorků mohou být pozorovány jiné vzorce signálu, než jsou popsány výše. Tyto neočekávané vzorce signálu by měly být dále zkoumány.

Upozornění:

- Vzhledem k dekondenzovanému chromatinu se jednotlivé signály CISH mohou jevit jako malé shluky signálů. Dva nebo tři signály stejné velikosti, oddělené vzdáleností ≤ 1 průměr signálu, by se tedy měly počítat jako jeden signál.
- Před vyčíslením signálu by měl být vzorek naskenován kvůli případné intratumorální heterogenitě při 100- až 200násobném zvětšení.
- Vizualizace signálů by měla být prováděna při nejméně 400násobném zvětšení, což vede k dobře viditelným signálům. U sond detekujících chromozomální zlomy se doporučuje 630násobné zvětšení. Nepoužívejte čočky s filtrem zvyšujícím kontrast, protože by to mohlo zkreslit barvu signálu. Chcete-li získat signály v jasných barvách, otevřete clonu. Při vyhodnocování jádra nezapomeňte zaostřit nahoru a dolů, protože červené a zelené signály se mohou nacházet nad sebou.
- Nehodnoťte oblasti nekrózy, překrývající se jádra, nadměrně strávená jádra a jádra se slabou intenzitou signálu.

- V důsledku mitózy mohou být další signály viditelné i u malého procenta nenádorových buněk. Občas mohou být v parafinových vzorcích pozorována jádra s chybějícími signály v důsledku artefaktů při řezání.
- Negativní nebo nespecifický výsledek může být způsoben více faktory (viz kapitola 16 "Řešení problémů").
- Pro správnou interpretaci výsledků musí uživatel tento výrobek před použitím v diagnostických postupech validovat v souladu s národními a/nebo mezinárodními pokyny.

13. Doporučené postupy kontroly kvality

Aby bylo možné sledovat správnou funkčnost zpracovávaných vzorků a testovacích činidel, měla by být každá analýza doplněna interními a externími kontrolami. Pokud interní a/nebo externí kontroly neprokáží odpovídající zbarvení, je třeba výsledky se vzorky pacientů považovat za neplatné.

Vnitřní kontrola: Neoplastické buňky ve vzorku, které vykazují normální vzor signálu, např. fibroblasty.

Externí ovládání: Ověřené pozitivní a negativní kontrolní vzorky.

14. Výkonnostní charakteristiky

14.1 Analytický výkon

Analytická citlivost:	100% (95% CI 98.5 – 100.0)
Analytická specifičnost:	100% (95% CI 97.0 – 100.0)

Byla testována denní reprodukovatelnost, př ičemž se porovnávaly výsledky získané od jednoho zkoušejícího v 10 různých dnech a hodnotila se shoda.

	Procentuální shoda
negativní vzorek	100%
pozitivní vzorek	100%

Opakovatelnost byla testována porovnáním opakovaných výsledků získaných od jednoho zkoušejícího v 10 různých dnech a vyhodnocením shody.

	Procentuální shoda
negativní vzorek	100%
pozitivní vzorek	100%

14.2 Klinický výkon

Diagnostická citlivost:	**ZytoDot 2C SPEC 1p36/1q25 Probe**: 100% (95% CI 91.6 – 100.0) vs FISH **ZytoDot 2C SPEC 19q13/19p13 Probe:** 100% (95% CI 91.4 – 100.0) vs. FISH
Diagnostická specifičnost:	**ZytoDot 2C SPEC 1p36/1q25 Probe:** 100% (95% CI 91.6 – 100.0) vs FISH **ZytoDot 2C SPEC 19q13/19p13 Probe:** 100% (95% CI 91.4 – 100.0) vs. FISH

15. Likvidace

Likvidace činidel musí být prováděna v souladu s místními předpisy.

16. Řešení problémů

Jakákoli odchylka od návodu k obsluze může vést k horším výsledkům barvení nebo k tomu, že barvení nebude vůbec provedeno. Další informace naleznete na www.zytovision.com.

Slabý nebo žádný signál

Možná příčina	Akce
Nesprávně provedená proteolytická předúprava	Optimalizujte dobu inkubace pepsinu, v případě potřeby ji prodlužte nebo zkraťte.
Odpařování sondy	Při použití hybridizátoru je použití mokrých pruhů/nádrží naplněných vodou povinné. Při použití hybridizační pece je nutné použít vlhkou komoru. Kromě toho by měl být krycí list zcela uzavřen, např. pomocí Fixogumu, aby se zabránilo vysychání vzorku během hybridizace.
Příliš dlouhá doba proti barvení	Vyhněte se tmavému protibarvení, protože může zakrýt pozitivní signály barvení.
Nesprávně provedené modření protibarviva	K modření používejte studenou tekoucí vodu z vodovodu; nepoužívejte teplou nebo horkou vodu ani modřící činidla.

Příliš silné signály

Možná příčina	Akce
Příliš dlouhá proteolytická předúprava	Optimalizujte dobu inkubace pepsinu, v případě potřeby ji prodlužte nebo zkraťte.
Inkubační doba roztoku AP-Red není správná	V případě potřeby lze dobu inkubace zkrátit na 5 minut. Roztok substrátu nezahřívejte nad 25 °C; inkubujte pouze při pokojové teplotě.
Doba inkubace roztoku HRP-Green není správná	V případě potřeby lze dobu inkubace zkrátit na 7 minut. Roztok substrátu nezahřívejte nad 25 °C; inkubujte pouze při pokojové teplotě.

Příliš slabé červené signály

Možná příčina	Akce
Roztok AP-Red byl vystaven silnému přímému světlu.	Roztok AP-Red připravujte a používejte chráněný před silným přímým světlem.
Roztok AP-Red byl připraven příliš brzy	Příprava před okamžitým použitím
Inkubační doba roztoku AP-Red není správná	V případě potřeby lze inkubační dobu prodloužit až na 15 min.
Nedostatečná příprava chromogenního substrátu	Nezvyšujte objem roztoku A

Příliš slabé zelené signály

Možná příčina	Akce
Příliš dlouhá doba inkubace všech promývacích kroků po barvení pomocí HRP-Green	Nepřekračujte uvedené inkubační doby
Doba inkubace roztoku HRP-Green není správná	V případě potřeby lze inkubační dobu prodloužit až na15 min.
Nedostatečná příprava chromogenního substrátu	Nezvyšujte objem roztoku A

Signály slábnou nebo se slučují

Možná příčina	Akce
Bylo použito nevhodné montážní řešení	Používejte pouze montážní roztok dodaný se sadou nebo montážní roztoky na bázi xylenu bez jakýchkoli nečistot; nepoužívejte krycí pásku.
Řezy nebyly řádně dehydratovány	Používejte čerstvé roztoky ethanolu a xylenu; používejte pouze xylen "čisté" kvality.

Nerovnoměrné nebo v některých částech jen velmi lehké skvrny

Možná příčina	Akce
Nedokonalé odparafinování	Používejte čerstvé roztoky; zkontrolujte dobu trvání odparafinování.
Příliš malý objem činidla	Ujistěte se, že objem činidla je dostatečně velký, aby pokryl oblast tkáně.

Nekonzistentní výsledky

Možná příčina	Akce
Nedostatečné vysušení před aplikací sondy	Prodloužení sušení na vzduchu
Příliš velké množství vody/proplachovacího pufru na tkáni před aplikací pepsinu, protilátek a/nebo barevných substrátů.	Ujistěte se, že je přebytečná tekutina z tkáňového řezu odstraněna rozetřením nebo setřesením ze sklíčka. Malá množství zbytkové vody/mycího pufru neinterferují s testem.
Rozdíly v metodách fixace a vkládání tkání	Optimalizace metod fixace a vkládání
Změny v tloušťce tkáňového řezu	Optimalizace řezu

Zhoršená morfologie

Možná příčina	Akce
Vzorek buněk nebo tkáně nebyl řádně fixován	Optimalizace doby fixace a fixačního prostředku
Předběžná proteolytická úprava se neprovádí příliš dlouho	Zkrácení doby inkubace pepsinu

Křížové hybridizační signály; rušivé pozadí

Možná příčina	Akce
Sekce vyschly kdykoli během hybridizace nebo po ní.	Zabraňte vysychání řezů; použijte komoru s vlhkostí; řádně utěsněte krycí sklíčko.
Prodloužená doba inkubace substrátu	Zkrácení doby inkubace substrátu
Nedokonalé odparafinování	Používejte čerstvé roztoky; zkontrolujte délku odparafinování
Příliš silná proteolytická předúprava	Optimalizace doby inkubace pepsinu
Sklíčka se před hybridizací ochladí na pokojovou teplotu.	Rychle přeneste preparáty na hybridizační teplotu

Překrývající se signály

Možná příčina	Akce
Nevhodná tloušťka tkáňových řezů	Připravte si řezy mikrotomem o velikosti 3-5 μm

Vzorek vyplave ze sklíčka

Možná příčina	Akce
Příliš silná proteolytická předúprava	Zkrácení inkubační doby pepsinu

17. Literatura

- Lass U, et al. (2013) *Brain Pathol 23*: 311-8.
- Wilkinson DG: In Situ Hybridization, A Practical Approach, *Oxford University Press* (1992) ISBN 0 19 963327 4.

18. Revize

Revize	Popis změny
5.1.1	Změna notifikovaného subjektu 14. Výkonnostní charakteristiky př idat př esnost

www.zytovision.com

Nejnovější návod k použití a návod k použití v různých jazycích naleznete na adrese www.zytovision.com.

Naši odborníci jsou připraveni zodpovědět vaše dotazy.
Kontaktujte prosím helptech@zytovision.com
Shrnutí bezpečnosti a výkonnosti naleznete na stránce www.zytovision.com.

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

Ochranné známky:
ZytoVision® a Zyto*Dot*® jsou ochranné známky společnosti ZytoVision GmbH.