



## ZytoLight SPEC BCL2/IGH Dual Color Dual Fusion Probe

**REF** Z-2114-50

Σ 5 (0,05 ml)

**REF** Z-2114-200

Σ 20 (0,2 ml)

Pro kvalitativní detekci translokace t(14;18)(q32.3;q21.3) pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH).

4250380P161QW



Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro

podle IVD (EU) 2017/746

### 1. Zamýšlený účel

ZytoLight SPEC BCL2/IGH Dual Color Dual Fusion Probe (PL71) je určena ke kvalitativní detekci translokace t(14;18)(q32.3;q21.3) zahrnující lidské geny IGH a BCL2 ve formalínem fixovaných, do parafínu vložených vzorcích pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Sonda je určena k použití v kombinaci se sadou ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (prod. č. Z-2028-5/-20).

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 různých druhů rakoviny a léčebná opatření by neměla být zahájena pouze na základě výsledku testu.

### 2. Princip testu

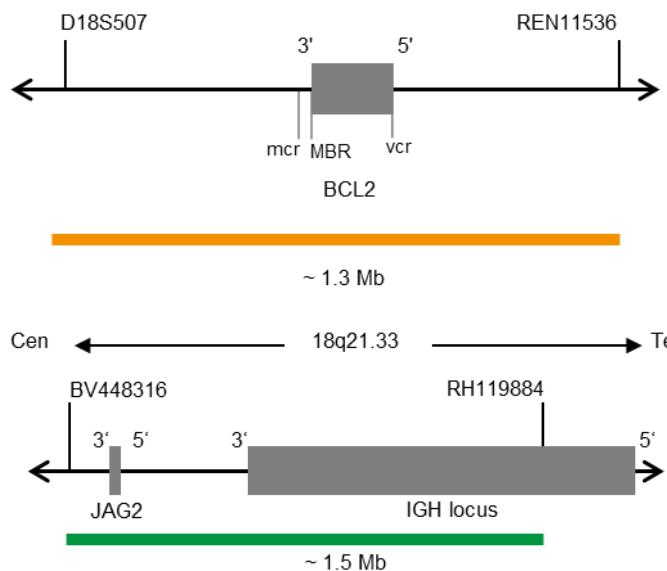
Technika fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) umožňuje detekci a vizualizaci specifických sekvencí nukleových kyselin v buněčných preparátech. Fluorescenčně značené fragmenty DNA, tzv. sondy FISH, a jejich komplementární cílové řetězce DNA v preparátech jsou při hybridizaci společně denaturovány a následně se nechají annealizovat. Poté se nespecifické a nenavázané fragmenty sond odstraní pomocí promývacích kroků. Po protibarvení DNA pomocí DAPI se hybridizované fragmenty sond vizualizují pomocí fluorescenčního mikroskopu vybaveného excitačními a emisními filtry specifickými pro fluorochromy, kterými byly fragmenty sond FISH přímo označeny.

### 3. Dodaná činidla

ZytoLight SPEC BCL2/IGH Dual Color Dual Fusion Probe se skládá z:

- polynukleotidy značené ZyOrange (excitace 547 nm/emise 572 nm) (~6 ng/μl), které jsou zaměřeny na sekvence mapující oblast 18q21.33\* (chr18:60,180,078-61,507,691), v nichž se nachází oblast genu BCL2 (viz obr. 1).
- Polynukleotidy značené ZyGreen (excitace 503 nm/emise 528 nm) (~12 ng/μl), které jsou zaměřeny na sekvence mapující 14q32.33\* (chr14:105,462,169-106,995,000), v nichž se nachází lokus IGH (viz obr. 1).
- Formamidový hybridizační pufr

\*podle sestavy lidského genomu GRCh37/hg19



Obr. 1: Nahoře: Mapa sond SPEC BCL2, dole: Mapa sond SPEC IGH (bez měřítka)

ZytoLight SPEC BCL2/IGH Dual Color Dual Fusion Probe je k dispozici ve dvou velikostech:

- Z-2114-50: 0,05 ml (5 reakcí po 10 μl)
- Z-2114-200: 0,2 ml (20 reakcí po 10 μl)

### 4. Požadované, ale neposkytované materiály

- ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Prod. č. Z-2028-5/-20)
- Pozitivní a negativní kontrolní vzorky
- Mikroskopická sklíčka, kladně nabité
- Vodní lázeň (37 °C, 98 °C)
- Hybridizér nebo horká deska
- Hybridizátor nebo vlhkostní komora v hybridizační peci
- Nastavitelné pipety (10 μl, 25 μl)
- Barvící nádoby nebo lázně
- Časovač
- Kalibrovaný teploměr
- Etanol nebo reagenční alkohol
- Xylen
- Deionizovaná nebo destilovaná voda
- Krycí sklíčka (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Pryžový cement, např. Fixogum Rubber Cement (prod. č. E-4005-50/-125) -nebo podobný.
- Vhodně udržovaný fluorescenční mikroskop (400-1000x)
- Ponorný olej schválený pro fluorescenční mikroskopii
- Vhodné sady filtrů

## 5. Skladování a manipulace

Skladujte při teplotě 2-8 °C ve svislé poloze chráněné před světlem. Používejte chráněné před světlem. Ihned po použití vratte do skladovacích podmínek. Nepoužívejte činidla po uplynutí doby použitelnosti uvedené na štítku. Při odpovídajícím zacházení je přípravek stabilní až 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 výrobcu 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 chybám výsledků.
- Sonda by neměla být delší dobu vystavena světlu, zejména silnému světlu, tj. všechny kroky by měly být prováděny pokud možno ve tmě a/nebo s použitím nádob odolných proti světlu.

### 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 nenariozené dítě.
H373	Může způsobit poškození orgánů při dlouhodobé nebo opakované expozici.
P201	Před použitím si vyžádejte zvláštní pokyny.
P202	Nemanipuluje s ním, dokud si nepřečtete a neprozumíte všem bezpečnostním pokynům.
P260	Nevdechujte prach/dým/plyn/hmlu/výparu/stříkanec.
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.
- Analytickou normální hranici pro abnormální vzorek signálu, který vás zajímá, by měl stanovit kvalifikovaný patolog/lidský genetik.

- 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 FISH, reagencí, 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, rozmrzení, 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

Červené krvinky přítomné ve vzorku mohou vykazovat autofluorescenci, která brání rozpoznání signálu.

Následující fixativa jsou s FISH 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 ZytoLight FISH-Tissue 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 rozložte.

## 11. Postup analýzy

### Předúprava vzorků

Provedte předběžnou úpravu vzorku (odvoskování, proteolýzu) podle návodu k použití sady ZytoLight FISH-Tissue 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 hybridizační denaturujte vzorky po dobu 10 minut při teplotě 75 °C.
  4. Přeneste sklíčka do vlhké komory a hybridizujte přes noc při 37 °C (např. v hybridizační peci).

*Je důležité, aby vzorky během hybridizace nevyschlily.*

**Po hybridizaci**

Zpracování po hybridizaci (promytí, protibarvení, fluorescenční mikroskopie) provedte podle návodu k použití sady ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit.

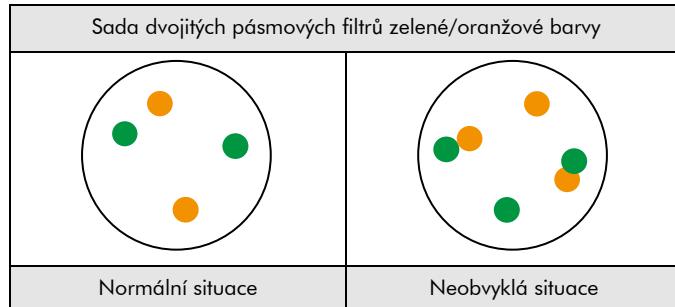
**12. Interpretace výsledků**

Při použití vhodných sad filtrů se hybridizační signály sondy zobrazí oranžově (oblast genu BCL2) a zeleně (lokus IGH).

**Normální situace:** V interfázích normálních buněk nebo buněk bez translokace zahrnující příslušné oblasti genu se objevují dva oddělené zelené a oranžové signály (viz obr. 2).

**Neobvyklá situace:** Fúze genů je indikována jedním samostatným oranžovým signálem, jedním samostatným zeleným signálem a jedním oranžovým/zeleným fúzním signálem (viz obr. 2).

Překrývající se signály se mohou zobrazovat jako žluté signály.



Obr. 2: Očekávané výsledky u normálních a aberantních jader

Vzhledem k homologním sekvencím IGH v 16p11.2 a 15q11.2 lze pozorovat slabé křížové hybridizace.

Jiné aberantní signální vzorce mohou být způsobeny úplnou nebo částečnou ztrátou genůIGHC nebo IGHV, stejně jako kryptickými inzercemi do jiných lokusů. Kromě toho mohou chybějící nebo snížené zelené signály na jedné nebo obou alelách představovat delece IGHV genů v důsledku normální somatické V-D-J rekombinace.

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 FISH mohou jevit jako malé shluky signálů. Dva nebo tři signály stejné velikosti, které jsou od sebe vzdáleny  $\leq 1$  průměr signálu, by se tedy měly počítat jako jeden signál.
- Nehodnoťte překrývající se jádra.
- Nepočítejte nadměrně strávená jádra (pozná se podle tmavých oblastí viditelných uvnitř jáder).
- Nepočítejte jádra se silnou autofluorescencí, která brání rozpoznání signálu.
- 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 neprokází 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**

Výkon byl hodnocen podle návodu k použití sady ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit.

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

**15. Likvidace**

Likvidace činidel musí být prováděna v souladu s místními předpisy.

**16. Řešení problémů**

Jakékoli 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](http://www.zytovision.com).

**Slabý nebo žádný signál**

Možná příčina	Akce
Vzorek buněk nebo tkáně není správně fixován	Optimalizujte dobu fixace a fixační činidlo nebo použijte postfixační krok, jak je popsáno v "postupu analýzy" v příručce k sadě <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</u> .
Nesprávně provedená proteolytická předúprava	Optimalizujte dobu inkubace pepsinu, v případě potřeby ji prodlužte nebo zkrátte.
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.
Použití nevhodných sad filtrů	Použijte sady filtrů vhodné pro fluochromy sondy. <i>Sady řípásmových filtrů poskytují méně světla ve srovnání se sadami jednopásmových nebo dvoupásmových filtrů. V důsledku toho se mohou signály při použití těchto sad řípásmových filtrů jevit slabší.</i>

**Křížové hybridizační signály; rušivé pozadí**

Možná příčina	Akce
Nedokonalé odparafinování	Používejte čerstvé roztoky; zkontrolujte délku odparafinování
Příliš silná proteolytická předúprava	Zkrácení inkubační doby pepsinu
Sklíčka se před hybridizací ochladí na pokojovou teplotu.	Sklíčka rychle přeneste na teplotu 37 °C

**Zhoršená morfologie**

Možná příčina	Akce
Vzorek buněk nebo tkáně nebyl správně fixován	Optimalizujte dobu fixace a fixační činidlo nebo použijte postfixační krok, jak je popsáno v "postupu analýzy" v příručce k sadě <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</u> .
Nesprávně provedená proteolytická předúprava	Optimalizujte dobu inkubace pepsinu, v případě potřeby ji zkrátte.
Nedostatečné vysušení před aplikací sondy	Prodloužení sušení na vzduchu

**Překrývající se jádra**

Možná příčina	Akce
Nevhodná tloušťka tkáňových řezů	Příprava řezů o velikosti 2-4 µm z mikrotomu

**Vzorek vyplave ze sklíčka**

Možná příčina	Akce
Příliš silná proteolytická předúprava	Zkrácení inkubační doby pepsinu

**Slabá protibarva**

Možná příčina	Akce
Nízkokoncentrovaný roztok DAPI	Místo toho použijte roztok DAPI/DuraTect-Solution (ultra) (prod. č. MT-0008-0.8).
Příliš krátká doba inkubace DAPI	Úprava doby inkubace DAPI

**17. Literatura**

- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Wilkinson DG: In Situ Hybridization, A Practical Approach, *Oxford University Press* (1992) ISBN 0 19 963327 4.
- Włodarska I, et al. (2007) *J Mol Diagn* 9: 47-54.
- Quintero-Rivera F, et al. (2009) *Cancer Genet and Cytogenet* 190: 33-9.

**18. Revize**[www.zytovision.com](http://www.zytovision.com)

Nejnovější návod k použití a návod k použití v různých jazycích  
naleznete na adrese [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com).

Naši odborníci jsou připraveni zodpovědět vaše dotazy.

Kontaktujte prosím [helptech@zytovision.com](mailto:helptech@zytovision.com)

Shrnutí bezpečnosti a výkonnosti naleznete na stránce  
[www.zytovision.com](http://www.zytovision.com).



ZytoVision GmbH

Fischkai 1

27572 Bremerhaven/ Německo

Telefon: +49 471 4832-300

Fax: +49 471 4832-509

[www.zytovision.com](http://www.zytovision.com)

E-mail: [info@zytovision.com](mailto:info@zytovision.com)

**Ochranné známky:**

ZytoVision® a ZytoLight® jsou ochranné známky společnosti ZytoVision GmbH.