



ZytoLight

SPEC TP53/17q22 Dual Color Probe

REF Z-2198-50



5 (0,05 ml)

Pro kvalitativní detekci delecí lidského genu TP53 a zisků specifických lidských sekvencí 17q22 pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)



IVD

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

1. Použití

ZytoLight SPEC TP53/17q22 Dual Color Probe (PL156) je určen k použití pro kvalitativní detekci je určena ke kvalitativní detekci delecí lidského genu TP53 a zisků specifických sekvencí lidského genu 17q22 v cytologických nebo formalínem fixovaných vzorků zalitých do parafinu, metodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Sonda je určena k použití v kombinaci s ZytoLight FISH Implementation Kits (Katalog.č. Z-2028-5/-20 nebo Z-2099-20).

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

Ztráta TP53 v kombinaci se signálním ziskem chromozomální oblasti 17q22 slouží jako marker pro detekci izochromozomů, které se často vyskytují u hematologických malignit i u neuroblastomu. Gen TP53 (nádorový protein 53, též p53, BCC7, LFS1, TRP53) se nachází v chromozomální oblasti 17p13.1 a kóduje transkripční faktor o velikosti 53 kDa. Delece genu TP53 byly zjištěny u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (CLL), mnohočetným myelomem (MM) a akutní myeloidní leukémií (AML). U pacientů s CLL je alelická ztráta krátkého ramene chromozomu 17 spojena se selháním léčby alkylačními látkami a krátkou dobou přežití. Isochromozom 17q je častou cytogenetickou abnormalitou pozorovanou u hematologických malignit včetně blastické fáze chronické myelogenní leukémie (CML), AML, Hodgkinových a neHodgkinových lymfomů. U neuroblastomu je zisk 17q21-qter spojen s výraznější progresí nádoru. Kombinovaná detekce obou cílů pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace tedy umožňuje citlivé stanovení izochromozomů a může být užitečným nástrojem pro diagnostiku a výběr léčby.

3. Princip testu

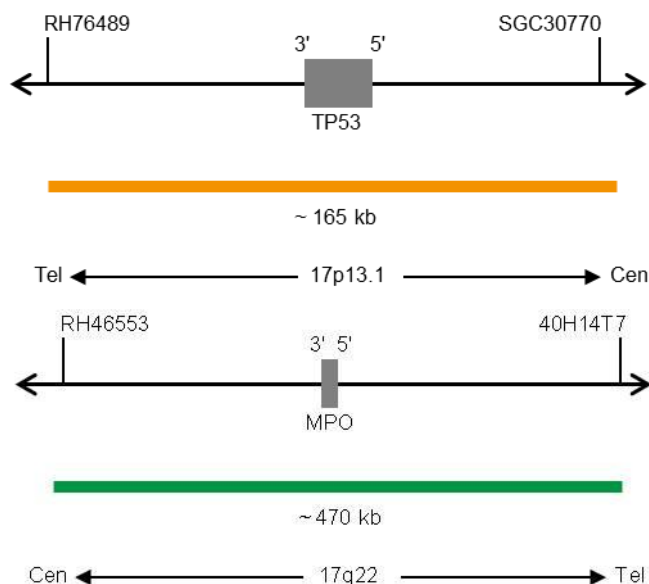
Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je technika, která umožňuje detekci a vizualizaci specifických sekvencí nukleových kyselin v buněčných preparátech. Fluorescenčně označené úseky DNA, tzv. FISH sondy, a jejich komplementární cílové úseky DNA v preparátech jsou společně denaturovány a následně je umožněno jejich spárování v průběhu hybridizace. Poté jsou nespecifické a nenavázané fragmenty práb 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 sondy označeny.

4. Potřebné reagentie

ZytoLight SPEC TP53/17q22 Dual Color Probe se skládá z:

- polynukleotidy značené ZyOrange (excitační vlna 547 nm/emisní vlna 572 nm) (~4,5 ng/μl), které jsou zaměřeny na sekvence mapující oblast 17p13.1* (chr17:7,495,749-7,663,022), v níž se nachází oblast genu TP53 (viz Obr. 1).
- ZyGreen (excitační vlna 503 nm/emisní vlna 528 nm) značené polynukleotidy (~10,0 ng/μl), které cílí na sekvence mapující v 17q22* (chr17:56,124,338-56,594,220) (viz Obr.1).
- Hybridizační pufr založený na formamidu

* V souladu s knihovnou lidského genomu GRCh37/hg19



Obr. 1: Nahoře: Mapa sond SPEC TP53, dole: Mapa sond SPEC 17q22 (není v měřítku)

ZytoLight SPEC TP53/17q22 Dual Color Probe je k dispozici v jedné velikosti:

- Z-2198-50: 0,05 ml (5 reakcí po 10 μl)

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

- Pozitivní a negativní kontroly vzorků
- Hybridizér nebo vyhřívaná ploténka
- Hybridizér nebo vlhká komůrka v hybridizační peci
- Stopky
- Barvicí nádoby nebo lázně
- Kalibrovaný teploměr
- Nastavitelné pipety (10 μl, 25 μl)
- Etanol nebo alkohol
- Deionizovaná nebo destilovaná voda
- Krycí skříčka (22 mm x 22 mm, 24 mm 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 nastavení filtrů

Cytologické vzorky

- ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit (Katalog.č. Z-2099-20)
- Mikroskopická sklíčka, nepotahovaná
- Vodní lázeň (70 °C)
- 37% formaldehyd, ne-kyselý nebo 10% formalín, pufrovaný na neutrální pH
- 2x Saline-Sodium Citrate (SSC), např. připravené z 20x SSC Solution (Katalog č. WB-0003-50)

FFPE vzorky

- ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Katalog.č. Z-2028-5/-20)
- Mikroskopická sklíčka, pozitivně nabitá
- Vodní lázeň (37 °C, 98 °C)
- Xylén

6. Skladování a zacházení

Skladujte při teplotě 2-8 °C, ve vzpřímené pozici, chráněné před sluncem.

Používejte chráněné před sluncem. Vratte 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 velkým množstvím 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.
- Sonda 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 určující 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 nepochopíte je.
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 sondami, 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.
- Sonda má být používána pouze pro detekci lokusů popsanych v odstavci 4.
- Barvení bylo validováno za použití metod popsanych 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 rtuť
- Formaldehyd/zinkové fixativum
- Hollandovo fixativum
- Nepufrovaný formalín

10. Příprava vzorků

Cytologické vzorky

Připravte vzorek podle instrukcí uvedených u ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit.

FFPE vzorky

- Fixace v 10% neutrálním pufrovaném formalínu po dobu 24h při pokojové teplotě (18-25°C).
- Připravte tkáňové vzorky ≤ 0,5 m³.
- Používejte parafín 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 sondu do pokojové teploty (18-25 °C), chraňte před světlem. Před otevřením nádoby promíchejte krátce ve vortexu a stočte.

12. Pracovní postup

Cytologické vzorky

Příprava vzorku

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

Denaturace a hybridizace

- Napípepujte 10 µl sondy na každý předpřipravený vzorek.
- Přikryjte vzorky krycím sklíčkem 22 mm x 22 mm (vyvarujte se vytvoření bublin) a zalepte krycí sklíčko.

Doporučujeme použít speciální lepidlo např. *Fixogum*.

- Umístěte skla na horkou ploténku nebo do hybridizéru a denaturujte vzorky 5 min při 72°C.
- 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-Cytology Implementation Kit](#).

FFPE Vzorky

Příprava vzorku

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

Denaturace a hybridizace

- Napípepujte 10 µl próby na každý předpřipravený vzorek.
- Přikryjte vzorky krycím sklíčkem 22 mm x 22 mm (vyvarujte se vytvoření bublin) a zalepte krycí sklíčko.

Doporučujeme použít speciální lepidlo např. *Fixogum*.

- Umístěte skla na horkou ploténku nebo do hybridizéru a denaturujte vzorky 10 min při 75°C.
- 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 Kits](#).

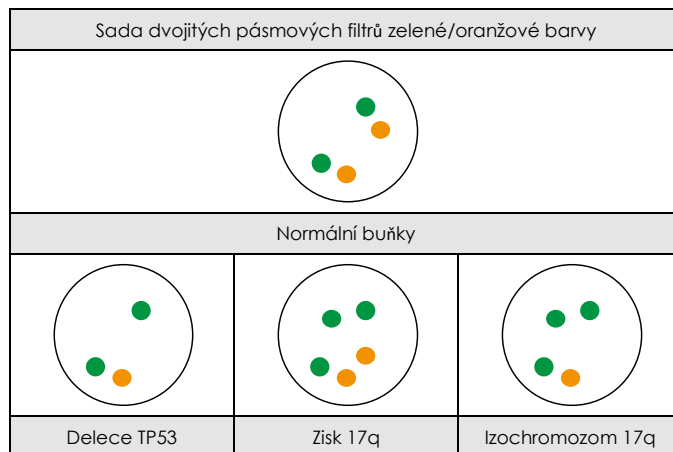
13. Interpretace výsledků

Při použití vhodných sad filtrů se hybridizační signály sondy zobrazí zeleně (oblast genu TP53) a oranžově (lokus 17q22).

Normální situace: V interfázích normálních buněk nebo buněk bez delece v oblasti genu TP53 se objevují dva zelené a dva oranžové signály (viz obrázek č.2).

Abnormální situace: V buňce s delecí postihující oblast genu TP53 bude pozorován snížený počet oranžových signálů. Delece postihující pouze části oblasti genu TP53 mohou vést k normálnímu signálnímu vzorci s oranžovými signály o snížené velikosti. Zisk 17q zahrnující oblast 17q22 bude mít za následek zvýšený počet zelených signálů. Izochromozom 17q je označen třemi zelenými a jedním oranžovým signálem (viz obrázek č.2).

Překrývající se signály se mohou zobrazovat jako žluté signály.



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

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

Vezměte 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.
- Nehodnotte 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

Cytologické vzorky

Barvení bylo hodnoceno s ohledem na instrukce uvedeny v [ZytoLight FISH Cytology Implementation Kit](#).

Přesnost: Místo hybridizace sondy bylo hodnoceno na metafázových spreadech karyotypově normálního samce. Ve všech testovaných vzorcích hybridizovala sonda pouze 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. Hna 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%.

FFPE vzorky

Barvení bylo hodnoceno s ohledem na instrukce uvedené v [ZytoLight FISH Tissue Implementation Kit](#).

Přesnost: Místo hybridizace sondy bylo hodnoceno na metafázových spreadech karyotypově normálního samce. Ve všech testovaných vzorcích hybridizovala sonda pouze 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 reagensů musí být provedena v souladu s místními 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
Nesprávný pretreatment teplem, natrávení, denaturace, hybridizace nebo teplota oplachu	Zkontrolujte teplotu u všech zařízení, u kterých je kalibrovaný teploměr
Buňky nebo tkáň nebyly dobře fixovány	Optimalizujte fixační dobu a fixativa nebo aplikujte post-fixační krok, jak je uvedeno v kapitole 12 „Postup zkoušky“ v návodu ZytoLight FISH-tissue implementation kit
Proteolytický pretreatment není řádně proveden	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 komory, 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 lázně	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
Neúplné odparafinování	Používejte čerstvé roztoky; zkontrolovat délku odparafinování
Příliš silné natrávení	Zkraťte inkubaci s pepsinem.
Příliš velký objem sondy na plochu vzorku	Snižte objem sondy na řez, rozmísťte sondu po kapkách, abyste se vyhnuli příliš vysoké místní koncentraci.
Preparáty jsou vychladlé na pokojovou teplotu před hybridizací	Přenešte 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, zkraťte nebo prodlužte, je-li potřeba
Nedostatečné oschnutí preparátu na vzduchu před aplikací sondy	Prodlužte sušení.

Překrývající se jádra

Možná příčina	Řešení
Nesprávná tloušťka tkáňových řezů	Připravujte řezy tloušťky 2-4 µm.

Vzorek uplavává ze sklíčka

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

Slabé barvení

Možná příčina	Řešení
Nízká koncentrace roztoku DAPI	Používejte DAPI/DuraTect-Solution (ultra) (Katalog.č. MT-0008-0.8)
Příliš krátká doba inkubace	Prodlužte dobu inkubace s DAPI.

18. Literatura

- Becher R, et al. (1990) *Blood* 8: 1679-83.
- Bown N, et al. (1999) *N Engl J Med* 340: 1954-61.
- Fioretos T, et al. (1999) *Blood* 94: 225-32.
- Pettitt AR, et al. (2001) *Blood* 98: 814-22.
- Ripollés L, et al. (2006) *Cancer Genet Cytogenet* 171: 57-64.
- Shanafelt TD, et al. (2006) *Ann Intern Med* 145: 435-47.
- Wilkinson DG: *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4

Naši experti jsou Vám k dispozici zodpovědět Vaše otázky.
Prosím kontaktuje 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.