



ZytoLight

SPEC 11q gain/loss Triple Color Probe

REF Z-2216-50



5 (0,05 ml)

Pro kvalitativní detekci změn 11q pomocí fluorescenční *in situ* hybridizací (FISH)



IVD

Prostředek pro lékařskou *in vitro* diagnostiku

V souladu s EU nařízením 98/79/EC

1. Použití

ZytoLight SPEC 11q gain/loss Triple Color Probe (PL174) je určena ke kvalitativní detekci změn 11q ve formalínem fixovaných, v parafínu zalitých vzorcích, jako jsou Burkitt-like lymfomy, pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Sonda je určena k použití v kombinaci s ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit je určena k použití v kombinaci s ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Katalog č. Z-2028-5/-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

Nedávno byla popsána podskupina lymfomů s genovou expresí a patologickými charakteristikami Burkittových lymfomů (BL), ale bez translokace MYC, která nese proximální zisky 11q a telomerické ztráty, což naznačuje ko-deregulaci onkogenů a tumor supresorových genů, které se nacházejí v postižených chromozomálních oblastech. Revize WHO klasifikace lymfoidních neoplazií z roku 2016 zavedla tuto novou prozatímní jednotku jako Burkitt-like lymfom s aberací 11q. Minimální oblast zisku (MGR) a ztráty (MLR) byla definována na 11q23.3, resp. 11q24.1-q25. Potenciálními onkogeny nacházejícími se v MGR jsou USP2 a PAFAH1B2. Kandidátní tumor-supresorové geny v MLR zahrnují např. geny FLI1 a ETS1. Vzorec 11q-gain/loss u je high-grade lymfomu z B-buněk významně častější u lymfomů vzniklých v souvislosti s transplantací a imunosupresí než u imunokompetentních pacientů, což naznačuje, že imunosuprese může podporovat jeho vznik. Vzhledem k tomu, že identifikace pacientů s aberací 11q-gain/loss je klinicky důležitá, ale cytogeneticky náročná, je test fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) užitečným diagnostickým nástrojem pro hodnocení pacientů po transplantaci i imunokompetentních pacientů s Burkittovým lymfomem a lymfomem podobným Burkittovu lymfomu.

3. Princip testu

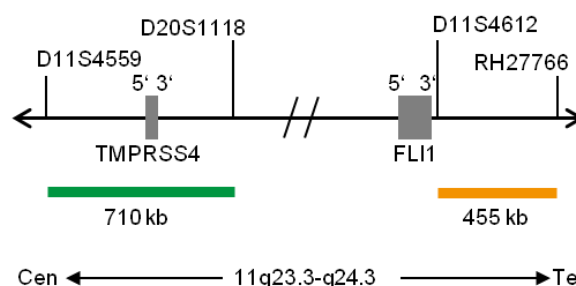
Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je technika, která umožňuje detekci a vizualizaci specifických sekvencí nukleových kyselin v buněčných preparátech. Fluorescenčně označené úseky DNA, tzv. FISH sondy, a jejich komplementární cílové úseky DNA v preparátech jsou společně denaturovány a následně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

ZytoLight SPEC 11q gain/loss Triple Color Probe se skládá z:

- Polynukleotidy značené ZyGreen (excitace 503 nm/emise 528 nm) (~10 ng/μl), které jsou zaměřeny na sekvenční mapující minimální získanou oblast (MGR) v 11q23.3* (chr11:117,574,074-118,284,029) (viz Obr.1).
- Polynukleotidy značené ZyOrange (excitace 547 nm/emise 572 nm) (~4,5 ng/μl), které jsou zaměřeny na sekvenční mapující oblast minimální ztráty (MLR) v 11q24.3* (chr11:128,707,454-129,161,227) (viz Obr.1).
- ZyBlue (excitace 418 nm/emise 467 nm) značené polynukleotidy (~12 ng/μl), které cílí na sekvenční mapující v 11p11.11-q11 specifické pro alfa satelitní centromerickou oblast D11Z1 chromozomu 11.
- Hybridizační pufr založený na formamidu

* V souladu s knihovnou lidského genomu GRCh37/hg19



Obr. 1: SPEC 11q Mapa sondy (mimo měřítka)

ZytoLight SPEC 11q gain/loss Triple Color Probe je k dispozici v jedné velikosti:

- Z-2216-50: 0,05 ml (5 reakcí po 10 μl)

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

- ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Prod. No. Z-2028-5/-20)
- Pozitivní a negativní kontrolní vzorky
- Mikroskopická sklíčka, pozitivně nabitá
- Vodní lázeň (37°C, 98°C)
- Hybridizér nebo vyhřívaná ploténka
- Hybridizér nebo vlhká komůrka v hybridizační troubě
- Pipety (10 μl, 25 μl)
- Stopky
- Barvicí nádoby nebo lázně
- Kalibrováný teploměr
- Xylen
- Ethanol (alkohol)
- Deionizovaná nebo destilovaná voda
- Krycí sklíčka (22 x 22 mm, 24 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 sada filtrů

6. Skladování a zacházení

Skladujte při teplotě 2-8 °C, ve vzpřímené pozici, chráněné před sluncem. Používejte chráněné před sluncem. Vraťte 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 velkými množství 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 nepřčetli všechny bezpečnostní pokyny a neporozuměli jim.
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, morfolgie, 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, mrazení, 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 rtuti
- Formaldehyd/zinkové fixativum
- Hollandovo fixativum
- Nepufrovaný formalin

10. Příprava vzorků

Doporučení:

- Fixace v 10% neutrálním pufrovaném formalínu po dobu 24h při pokojové teplotě (18-25°C).
- Připravte tkáňové vzorky ≤ 0,5 m³.
- Používejte parafin 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

Příprava vzorku

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

Denaturace a hybridizace

1. Napípejte 10 µl sondy na každý předpřipravený vzorek.
 2. Přikryjte vzorky krycím sklíčkem 22 mm x 22 mm (vyvarujte se vytvoření bublin) a zalepte krycí sklíčko.
- Doporučujeme použít speciální lepidlo např. Fixogum.*
3. Umístěte skla na horkou ploténku nebo do hybridizéru a denaturujte vzorky 10 min při 75°C.
 4. 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 Kit](#).

13. Interpretace výsledků

Při použití vhodných sad filtrů se hybridizační signály zobrazují zeleně (zisk 11q), oranžově (ztráta 11q) a modře (CEN 11).

Normální situace: interfázích normálních buněk nebo buněk bez změny 11q se objevují dva zelené, dva oranžové a dva modré signály. (viz obrázek č.2).

Abnormální situace: V interfázích buněk postižených změnou 11q-gain/loss se očekává jeden zelený a jeden oranžový signál pro nepostižený chromozom a získání zelených signálů a ztráta jednoho oranžového signálu pro chromozom postižený změnou 11q-gain/loss. Delece postihující pouze části ztrátové oblasti 11q mohou vést k normálnímu signálnímu vzorci s oranžovými signály menší velikosti. (viz obrázek č.2).

Překrývající se signály se mohou zobrazovat jako žluté signály.

	Sada dvojitých pásmových filtrů zelené/oranžové barvy	Modrá sada jednopásmových filtrů	Sloučený obraz nebo sada tří pásmových filtrů
Normální buňky			
Aberantní buňky se vzorcem 11q-gain/loss			

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, indikující variantní přestavby, než ty které jsou popsány výše. Nečekané vzory signálů by měly být dále dovyšetřeny.

Vezměte 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.
- Nehodnoťte překrývající se jádra.
- Nepočítejte příliš natrávená jádra (ropoznatelná 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

Přesnost: Místo hybridizace sondy bylo hodnoceno na metafázových spreadech karyotypově normálního samce. Ve všech testovaných vzorcích hybridizovala sonda pouze na 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 reagentů 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, natrávení, denaturace, hybridizace nebo teplota oplachu	Zkontrolujte teplotu u všech zařízení, u kterých je kalibrovaný teploměr
Proteolytický pretreatment není řádně proveden	Optimalizujte inkubační dobu pepsinu, zvýšte 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 lázně.
Špatné nastavení fluorescenčního mikroskopu	Nastavte správně
Použití nesprávného setu filtrů	Použijte set filtrů, které jsou odpovídající fluochromům sondy. <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
Nekompletní odparařování	Používejte čerstvé roztoky; zkontrolujte délku odparařování
Příliš silné natrávení	Zkorte inkubaci s pepsinem.
Příliš velký objem sondy na plochu vzorku	Snižte objem sondy na řez, rozmístěte sondu po kapkách, abyste se vyhnuli příliš vysoké místní koncentraci.
Preparáty jsou vychladlé na pokojovou teplotu před hybridizací	Přeneste preparáty krátce do 37 °C
Příliš vysoká koncentrace promývacího pufru	Zkontrolujte koncentraci promývacího pufru.
Oplachovací teplota po hybridizaci je příliš nízká	Zkontrolujte teplotu a zvýšte 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 <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</u>
Příprava natrávením není provedena správně	Optimalizujte dobu inkubace s pepsinem, zkratíte nebo prodlužte, je-li potřeba
Nedostatečné oschnutí preparátu na vzduchu před aplikací sondy	Prodlužte sušení.

Překrývání jader

Možná příčina	Řešení
Nevhodná tloušťka tkáňových řezů	Připravte 2-4 μm mikrotomové řezy.

Vzorek uplavit ze sklíčka

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

Slabé barvení

Možná příčina	Řešení
Nízká koncentrace roztoku DAPI	Používejte DAPI/DuraTect-Solution (ultra) (Prod. No. MT-0008-0.8)
Příliš krátká doba inkubace	Prodlužte dobu inkubace s DAPI.

18. Literatura

- Ferreiro JF, et al. (2015) *Haematologica* 100: e275-9.
- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Salaverria I, et al. (2014) *Blood* 123: 1187-98.
- Swerdlow SH, et al. (2016) *Blood* 127: 2375-90.
- 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 kontaktujte 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.