



ZytoLight

SPEC IKZF1/CEN 7 Dual Color Probe

REF Z-2304-50



5 (0,05 ml)

Pro kvalitativní detekci delecí lidského genu IKZF1 a alfa satelitů chromozomu 7 pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)



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

1. Použití

Dvoubarevná sonda ZytoLight SPEC IKZF1/CEN 7 Dual Color Probe (PL258) je určena ke kvalitativní detekci delecí lidského genu IKZF1 a alfa satelitů chromozomu 7 v cytologických vzorcích, jako jsou leukemické buňky, pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Sonda je určena k použití v kombinaci s ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit Katalog č. 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

Gen IKZF1 (IKAROS family zinc finger 1, také známý jako ZNFN1A1, IKAROS) se nachází na 7p12.2 a kóduje transkripční faktor zinkového prstu, který je nezbytný pro normální diferenciaci a proliferaci krevetvorby, zejména v lymfoidních liniích. Genomové delecce postihující gen IKZF1 se vyskytují přibližně u 15 % případů dětské a ~40 % případů akutní lymfoblastické leukemie (B-ALL) u dospělých prekurzorů B-buněk. Četnost je pozoruhodně vysoká u BCR-ABL1-pozitivních (~70 %) a BCR-ABL1-like (~40 %) dětských B-ALL. Delecce IKZF1 byly identifikovány také při progresi chronické myeloidní leukemie do lymfoidní blastické krize. Nejčastější delecce u B-ALL postihují celý gen nebo exony 4 až 7. Byly pozorovány i delecce postihující další exony (tj. exony 2 až 7, exony 2 až 8 a exony 4 až 8). Delecce IKZF1 jsou v případech B-ALL spojeny se špatnou prognózou a vysokým rizikem relapsu. Detekce delecí IKZF1 pomocí FISH tedy může pomoci při předpovídání klinického výsledku u pacientů s B-ALL.

3. Princip testu

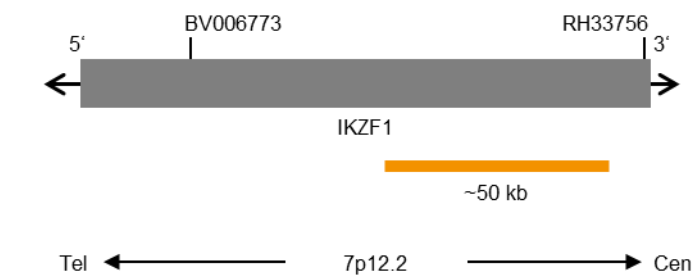
Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je technika, která umožňuje detekci a vizualizaci specifických sekvencí nukleových kyselin v buněčných preparátech. Fluorescenčně označené úseky DNA, tzv. FISH sondy, a jejich komplementární cílové úseky DNA v preparátech jsou společně denaturovány a následně je umožněno jejich spárování v průběhu hybridizace. Poté jsou nespecifické a nenačtené 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 IKZF1/CEN 7 Dual Color Probe se skládá z:

- polynukleotidy značené ZyOrange (excitace 547 nm/emise 572 nm) (~4,5 ng/μl), které jsou zaměřeny na sekvence mapující oblast 7p12.2* (chr7:50,412,912-50,463,612), v níž se nachází oblast genu IKZF1 (viz Obr.1).
- ZyGreen (excitace 503 nm/emise 528 nm) značené polynukleotidy (~4,5 ng/μl), které cílí na sekvence mapující v 7p11.1-q11.1 specifické pro alfa satelitní centromerickou oblast D7Z1 chromozomu 7.
- Hybridizační pufr založený na formamidu

* V souladu s knihovnou lidského genomu GRCh37/hg19



Obr. 1: SPEC IKZF1 Mapa sondy (mimo měřítko)

ZytoLight SPEC IKZF1/CEN 7 Dual Color Probe je k dispozici v jedné velikosti:

- Z-2304-50: 0,05 ml (5 reakcí po 10 μl)

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

- ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit (Prod. No. Z-2099-20)
- Pozitivní a negativní kontrolní vzorky
- Mikroskopická sklička
- Vodní lázeň (70°C)
- Hybridizér nebo vyhřívaná ploténka
- Hybridizér nebo vlhká komůrka v hybridizační troubě
- Nastavitelné pipety (10 μl, 25 μl)
- Barvicí nádoby nebo lázně
- Stopky
- Kalibrovaný teploměr
- Ethanol (alkohol)
- 37% formaldehyd (bez kyseliny) nebo 10% neutrálně pufrovaný formalin
- 2x citrát sodný (SSC), např. 20x SSC Solution (WB-0003-50)
- Deionizovaná nebo destilovaná voda
- Krycí sklička (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 reagentie po uplynutí doby expirace uvedeně na štítku. Při odpovídajícím zacházení je přípravek stabilní až do data použitelnosti uvedeného na etiketě.

7. Varování a preventivní opatření

- Před použitím si přečtěte instrukce!
- Nepoužívejte reagentie 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 reagentiemi. 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 reagentie 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 obstarajte speciální instrukce.
P202	Nepoužívejte, dokud jste si nepřečetli 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, morfologie, ostatních histopatologických kritérií a stejně tak i ostatních diagnostických testů. Je odpovědností kvalifikovaného patologa být obeznámený s FISH sondami, reagentiemi, 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 popsaných v odstavci 4.

- Barvení bylo validováno za použití metod popsaných 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.

10. Příprava vzorků

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

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-Cytology Implementation Kit](#).

Denaturace a hybridizace

1. Napípepujte 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 plotěnkou nebo do hybridizéru a denaturujte vzorky 5 min při 72°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-Cytology Implementation Kit](#).

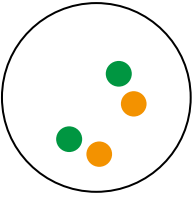
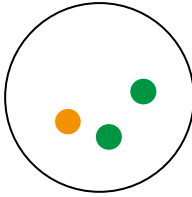
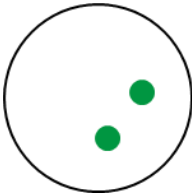
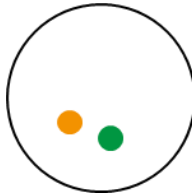
13. Interpretace výsledků

Při použití vhodných sad filtrů se hybridizační signály sondy zobrazí zeleně (oblast genu IKZF1) a oranžově (CEN 7).

Normální situace: V interfázích normálních buněk nebo buněk bez delece v oblasti genu IKZF1 se objevují dva zelené a dva oranžové signály (viz obrázek č.2).

Abnormální situace: V buňce s delecí postihující oblast genu IKZF1 bude pozorován snížený počet oranžových signálů. Delece postihující pouze části oblastí genu T IKZF1 mohou vést k normálnímu signálnímu vzorci s oranžovými signály o snížené velikosti. V buňce s monozomií 13 je pozorován snížený počet oranžových (oblast genu IKZF1) i modrých (CEN 7) signálů (viz obrázek č.2).

Překrývající se signály se mohou zobrazovat jako žluté signály.

Sada dvojíých pásmových filtrů zelené/oranžové barvy	
	
Normální situace	Homozygotní delece IKZF1
	
Homozygotní delece IKZF1	Monozomie 7

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

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

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.
- Nehodnoťte 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

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.
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 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
Příliš silné natrávení	Zkorte inkubaci s pepsinem.
Příliš velký objem sondy na plochu vzorku	Snižte objem sondy na řez, rozmístujte sondy 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
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.

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

- Boer JM, et al. (2016) *Leukemia* 30: 32-8.
- Hashiguchi J, et al. (2018) *J Mol Diagn* 20: 446-54.
- Iacobucci I, et al. (2009) *Blood* 114: 2159-67.
- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Meyer C, et al. (2013) *Am J Blood Res* 3: 165-73.
- Mullighan CG, et al. (2008) *Nature* 453: 110-4.
- 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.