# *ZytoLight*
# SPEC FOXO1 Dual Color Break Apart Probe

REF Z-2139-50 Σ 5 (0,05 ml)

Für den qualitativen Nachweis von Translokationen des humanen FOXO1-Gens bei 13q14.11 mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)

4250380P200QF

CE 0483

IVD

In-vitro-Diagnostikum

gemäß IVDR (EU) 2017/746

## 1. Verwendungszweck

Die *ZytoLight* SPEC FOXO1 Dual Color Break Apart Probe (**PL96**) ist für den qualitativen Nachweis von Translokationen des humanen FOXO1-Gens bei 13q14.11 in Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Geweben, wie z. B. alveolärem Rhabdomyosarkom (ARMS), durch Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) bestimmt. Die Sonde ist für die Verwendung in Kombination mit dem *ZytoLight* FISH-Tissue Implementation Kit (Prod. Nr. Z-2028-5/-20) vorgesehen.

Das Produkt ist nur für den professionellen Gebrauch bestimmt. Alle Tests, bei denen das Produkt verwendet wird, sollten in einem zertifizierten, zugelassenen anatomisch-pathologischen Labor unter der Aufsicht eines Pathologen/Humangenetikers von qualifiziertem Personal durchgeführt werden.

Die Sonde ist als Hilfsmittel für die Differentialdiagnose von ARMS vorgesehen, und therapeutische Maßnahmen sollten nicht allein auf der Grundlage des Testergebnisses eingeleitet werden.

## 2. Prinzip der Methode

Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) erlaubt den Nachweis und die Visualisierung von spezifischen Nukleinsäuresequenzen in Zellpräparationen. Fluoreszenzmarkierte DNA-Fragmente, sogenannte FISH-Sonden, und deren komplementäre Zielsequenzen in den Präparationen werden co-denaturiert und können anschließend während der Hybridisierung binden. Danach werden unspezifische und ungebundene Sondenfragmente durch Stringenzwaschschritte entfernt. Nach der Gegenfärbung der DNA mit DAPI werden hybridisierte Sondenfragmente mit einem Fluoreszenzmikroskop visualisiert, welches mit für die Fluorochrome spezifischen Anregungs- und Emissionsfiltern ausgestattet ist, mit denen die FISH-Sondenfragmente direkt markiert wurden.

## 3. Enthaltene Reagenzien

Die *ZytoLight* SPEC FOXO1 Dual Color Break Apart Probe besteht aus:

- ZyGreen (Anregung 503 nm/Emission 528 nm) markierten Polynukleotiden (~10 ng/µl), die gegen Sequenzen in 13q14.11* (chr13:40,285,558-41,132,595) gerichtet sind, welche proximal zur FOXO1-Bruchpunktregion lokalisiert sind (siehe Abb. 1).
- ZyOrange (Anregung 547 nm/Emission 572 nm) markierten Polynukleotiden (~4,5 ng/µl), die gegen Sequenzen in 13q14.11* (chr13:41,246,917-42,054,781) gerichtet sind, welche distal zur FOXO1-Bruchpunktregion lokalisiert sind (siehe Abb. 1).
- Hybridisierungsbuffer auf Basis von Formamid

*nach Human Genome Assembly GRCh37/hg19

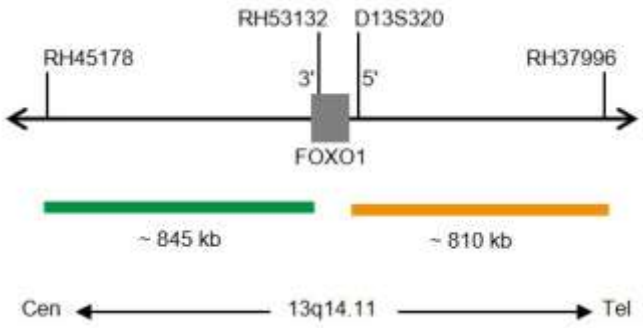


**Abb. 1: SPEC FOXO1 Sondenlokalisation (nicht maßstabsgetreu)**

Die *ZytoLight* SPEC FOXO1 Dual Color Break Apart Probe ist verfügbar in einer Größe:

- Z-2139-50: 0,05 ml (5 Reaktionen von je 10 µl)

## 4. Benötigte, aber nicht bereitgestellte Materialien

- *ZytoLight* FISH-Tissue Implementation Kit (Prod. No. Z-2028-5/-20)
- Positive und negative Kontrollproben
- Objektträger, positiv geladen
- Wasserbad (37 °C, 98 °C)
- Hybridizer oder Wärmeplatte
- Hybridizer oder Feuchtekammer im Hybridisierungsofen
- Verstellbare Pipetten (10 µl, 25 µl)
- Küvetten oder Färbetröge
- Stoppuhr
- Kalibriertes Thermometer
- Ethanol oder denaturierter Alkohol
- Xylol
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser
- Deckgläser (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Naturkautschuk-Klebstoff, z.B. Fixogum Rubber Cement (Prod. Nr. E-4005-50/-125), oder Ähnliches
- Regelmäßig gewartetes Fluoreszenzmikroskop (400-1000x)
- Immersionsöl, geeignet für Fluoreszenzmikroskopie
- Entsprechende Filtersätze

## 5. Lagerung und Handhabung

Bei 2-8°C in aufrechter Position und lichtgeschützt lagern. Vor Licht geschützt verwenden. Unmittelbar nach Gebrauch wieder unter Lagerbedingungen aufbewahren. Keine Reagenzien nach Ablauf des auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatums verwenden. Das Produkt ist bei sachgemäßer Handhabung bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil.

## 6. Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Gebrauchsanweisung vor der Verwendung lesen!
- Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden!
- Dieses Produkt enthält Substanzen (in geringen Konzentrationen und Volumina), welche gesundheitsschädlich und potentiell infektiös sind. Jeder direkte Kontakt mit den Reagenzien muss vermieden werden. Entsprechende Schutzmaßnahmen (Verwendung von Einmalhandschuhen, Schutzbrille und Laborbekleidung) sind zu ergreifen!

- Schwerwiegende Vorfälle, die im Zusammenhang mit dem Produkt aufgetreten sind, in Übereinstimmung mit den örtlichen Vorschriften dem Hersteller sowie den zuständigen Behörden melden!
- Sollten Reagenzien mit der Haut in Kontakt kommen, die betroffenen Stellen sofort mit viel Wasser abspülen!
- Ein Sicherheitsdatenblatt ist auf Anfrage für den beruflichen Anwender verfügbar.
- Reagenzien nicht wiederverwenden, außer die Wiederverwendung ist ausdrücklich erlaubt!
- Kreuzkontaminationen der Präparate vermeiden, da diese zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
- Die Sonde sollte nicht für längere Zeit dem Licht, insbesondere intensivem Licht, ausgesetzt werden. Das bedeutet, falls möglich sollten alle Arbeitsschritte im Dunkeln und/oder unter Verwendung von lichtundurchlässigen Behältnissen durchgeführt werden!

**Gefahren- und Sicherheitshinweise:**

Die gefahrbestimmende Komponente ist Formamid.

**Gefahr**

| | |
|---|---|
| H351 | Kann vermutlich Krebs erzeugen. |
| H360FD | Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann das Kind im Mutterleib schädigen. |
| H373 | Kann die Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition. |
| P201 | Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. |
| P202 | Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen. |
| P260 | Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen. |
| P280 | Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen. |
| P308+P313 | BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. |
| P405 | Unter Verschluss aufbewahren. |

## 7. Einschränkungen

- Für die Verwendung als In-vitro-Diagnostikum.
- Nur für die professionelle Anwendung.
- Nur für den nicht-automatischen Gebrauch.
- Die klinische Interpretation jeglicher positiven Färbung bzw. deren Abwesenheit muss im Kontext mit der klinischen Anamnese, Morphologie, anderer histopathologischer Kriterien sowie weiterer diagnostischer Tests erfolgen. Es obliegt der Verantwortung eines qualifizierten Pathologen, mit FISH Sonden, Reagenzien, Diagnose-Panels und den zur Erstellung von gefärbten Präparaten verwendeten Methoden vertraut zu sein. Die Färbung ist in einem zertifizierten, lizenzierten Labor unter Aufsicht eines Pathologen durchzuführen, der für die Auswertung der Färbepräparate und für die Sicherstellung der Eignung von positiven und negativen Kontrollen verantwortlich ist.
- Die Färbung der Präparate, insbesondere die Signalintensität und die Hintergrundfärbung, ist abhängig von der Behandlung und Prozessierung der Präparate vor der Färbung. Unsachgemäßes Fixieren, Einfrieren, Auftauen, Waschen, Trocknen, Erhitzen, Schneiden oder Kontamination mit anderen Präparaten oder Flüssigkeiten können Artefakte oder falsche Ergebnisse verursachen. Inkonsistente Ergebnisse können von Variationen bei Fixierungs- und Einbettungsverfahren sowie von inhärenten Unregelmäßigkeiten innerhalb des Präparates resultieren.
- Die Sonde ist nur für den Nachweis der Loci, die in Kapitel 3 „Enthaltene Reagenzien" beschrieben werden, zu verwenden.
- Die Leistung wurde unter Verwendung der in dieser Gebrauchsanweisung beschriebenen Verfahren validiert. Abweichungen von diesen Verfahren können die Leistung beeinflussen und müssen vom Anwender validiert werden. Dieses IVD ist nur dann CE-zertifiziert, wenn es wie in dieser Gebrauchsanweisung beschrieben im Rahmen der bestimmungsgemäßen Verwendung eingesetzt wird.

## 8. Störsubstanzen

Rote Blutzellen innerhalb des Präparates können Autofluoreszenz verursachen, welche die Signalerkennung behindert.

Folgende Fixierungen sind nicht kompatibel mit FISH:

- Bouin Fixierung
- B5 Fixierung
- Saure Fixiermittel (z.B. Pikrinsäure)
- Zenker Fixierung
- Alkohole (bei alleiniger Verwendung)
- Quecksilberchlorid
- Formaldehyd/Zink Fixiermittel
- Hollande Fixierung
- Ungepuffertes Formalin

## 9. Vorbereitung der Präparate

Die Präparatevorbehandlung ist wie in der Gebrauchsanweisung des ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit beschrieben durchzuführen.

## 10. Vorbereitung der Reagenzien

Das Produkt ist gebrauchsfertig. Kein Rekonstituieren, Mischen oder Verdünnen ist notwendig. Die Sonde vor der Anwendung lichtgeschützt auf Raumtemperatur (18-25°C) bringen. Vor dem Öffnen durch Vortexen mischen und kurz herunterzentrifugieren.

## 11. Testverfahren

**Vorbehandlung der Präparate**
Die Präparatevorbehandlung (Entwaxen, Proteolyse) ist wie in der Gebrauchsanweisung des ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit beschrieben durchzuführen.

**Denaturierung und Hybridisierung**

1. 10 µl der Sonde auf jedes der vorbehandelten Präparate pipettieren.
2. Die Präparate mit 22 mm x 22 mm Deckgläser abdecken (Einschluss von Luftbläschen vermeiden) und das Deckglas versiegeln.

*Wir empfehlen die Verwendung von Naturkautschuk-Klebstoff (z.B. Fixogum zum Versiegeln.*

3. Die Objektträger auf einer Wärmeplatte oder in einem Hybridizer platzieren und die Proben für 10 min bei 75 °C denaturieren.
4. Die Objektträger in eine Feuchtekammer überführen und über Nacht bei 37°C hybridisieren (z.B. in einem Hybridisierungsofen).

*Es ist essentiell, dass die Präparate während des Hybridisierungsschritts nicht austrocknen.*

**Post-Hybridisierung**
Die Post-Hybridisierung (Waschen, Gegenfärbung, Fluoreszenz-mikroskopie) gemäß der Gebrauchsanweisung des ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kits durchführen.

## 12. Interpretation der Ergebnisse

Bei Verwendung von geeigneten Filtersätzen erscheinen die Hybridisierungssignale der Sonde grün (proximal zur FOXO1-Bruchpunktregion) und orange (distal zur FOXO1-Bruchpunktregion).

**Normale Situation**: In Interphasen von normalen Zellen oder Zellen ohne eine Translokation der FOXO1-Genregion erscheinen zwei grün/orange Fusionssignale (siehe Abb. 2).

**Aberrante Situation**: Eine von einer Translokation betroffene FOXO1-Genregion wird durch ein separates grünes Signal und ein separates oranges Signal gekennzeichnet (siehe Abb. 2).

*Sich überlagernde Signale können als gelbe Signale erscheinen.*

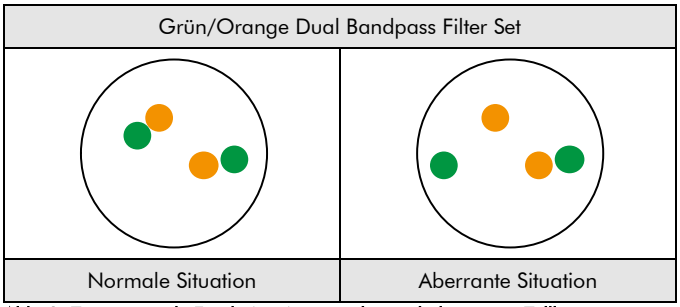


**Abb. 2: Zu erwartende Ergebnisse in normalen und aberranten Zellkernen**

Genomische Aberrationen aufgrund kleinerer Deletionen, Duplikationen oder Inversionen können zu unauffälligen Signalmustern führen. Bei einigen aberranten Präparaten können andere Signalmuster als die oben beschriebenen beobachtet werden. Diese unerwarteten Signalmuster sollten weiter untersucht werden.

**Bitte beachten:**

- Aufgrund von dekondensiertem Chromatin können einzelne FISH-Signale als kleine Signal-Cluster erscheinen. Daher sollten zwei oder drei Signale der gleichen Größe mit einer Distanz von ≤ 1 Signaldurchmesser als ein Signal gewertet werden.
- Sich überlagernde Zellkerne nicht auswerten.
- Über-verdaute Zellkerne nicht auswerten (erkennbar als dunkle Areale im Zellkern).
- Keine Auswertung von Zellen mit starker Eigenfluoreszenz, welche die Signalerkennung behindert.
- Ein negatives oder unspezifisches Ergebnis kann durch verschiedene Faktoren verursacht warden (siehe Kapitel 16 "Fehlerbehebung")
- Um die Ergebnisse korrekt zu interpretieren, muss der Anwender das Produkt vor der Anwendung in diagnostischen Verfahren unter Berücksichtigung nationaler und/oder internationaler Richtlinien validieren.

## 13. Empfohlene Qualitätskontrollverfahren

Um die korrekte Leistung der verwendeten Präparate und Testreagenzien zu überwachen, sollte jeder Test von internen und externen Kontrollen begleitet werden. Falls interne und/oder externe Kontrollen keine adäquate Färbung zeigen, müssen die Ergebnisse der Patientenproben als ungültig angesehen werden.

**Interne Kontrolle:** Nicht-neoplastische Zellen innerhalb des Präparates, die ein normales Signalmuster aufweisen, z.B. Fibroblasten.

**Externe Kontrolle:** Validierte positive und negative Kontrollproben.

## 14. Leistungsmerkmale

### 14.1 Analytische Leistung

Die Leistung wurde gemäß der Gebrauchsanweisung des ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kits evaluiert.

| | |
|---|---|
| **Analytische Sensitivität:** | 100% (95% CI 98.5 – 100.0) |
| **Analytische Spezifität:** | 100% (95% CI 97.0 – 100.0) |

Die Tag-zu-Tag-Reproduzierbarkeit wurde getestet, indem die von einem Prüfer an 10 verschiedenen Tagen erzielten Ergebnisse verglichen und die Übereinstimmung bewertet wurde.

| | **Prozentuale Übereinstimmung** |
|---|---|
| Negative Präparate | 100% |
| Positive Präparate | 100% |

Die Wiederholbarkeit wurde getestet, indem die von einem Prüfer an 10 verschiedenen Tagen erzielten Ergebnisse verglichen und die Übereinstimmung bewertet wurde.

| | **Prozentuale Übereinstimmung** |
|---|---|
| Negative Präparate | 100% |
| Positive Präparate | 100% |

### 14.2 Klinische Leistung

| | |
|---|---|
| **Diagnostische Sensitivität:** | 88.89% (95% CI 78.9 – 99.9) vs. TFAP2B IHC<br>100% (95% CI 74.9 – 99.1) vs. OLIG2 IHC |
| **Diagnostische Spezifität:** | 100% (95% CI 78.9 – 99.9) vs. TFAP2B IHC<br>90% (95% CI 74.9 – 99.1) vs. OLIG2 IHC |

## 15. Entsorgung

Die Entsorgung der Reagenzien muss in Übereinstimmung mit den örtlichen Vorschriften erfolgen.

## 16. Fehlerbehebung

Jede Abweichung von der Gebrauchsanweisung kann zu schwachen bis gar keinen Färbungen führen. Weitere Informationen erhalten Sie unter www.zytovision.com.

**Schwache oder keine Signale**

| Mögliche Ursache | Lösung |
|---|---|
| Zell- oder Gewebeproben sind nicht korrekt fixiert | Die Fixierzeit und das Fixiermittel optimieren oder Post-Fixierungsschritte wie in „Testverfahren" der Gebrauchsanweisung des ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kits beschrieben anwenden |
| Proteolytische Vorbehandlung nicht optimal | Die Inkubationszeit mit Pepsin optimieren, falls notwendig erhöhen oder reduzieren |
| Verdunstung der Sonde | Bei der Nutzung eines Hybridizers ist die Verwendung von feuchten Vliesstreifen/Wassertanks erforderlich. Bei der Nutzung eines Hybridisierungsofens muss eine Feuchtekammer verwendet werden. Zusätzlich sollte das Deckglas, z.B. mit Fixogum, vollständig versiegelt werden, um ein Austrocknen der Präparat während der Hybridisierung zu verhindern. |
| Ungeeignete Filtersätze verwendet | Für die Fluorochrome der Sonde geeignete Filtersätze verwenden. *Triple-Bandpass-Filtersätze liefern im Vergleich zu Single- oder Dual-Bandpass-Filtersätzen weniger Licht. Daher können die Signale unter Verwendung von Triple-Bandpass-Filtersätzen schwächer erscheinen.* |

**Kreuzhybridisierungssignale, Hintergrundsignale**

| Mögliche Ursache | Lösung |
|---|---|
| Unvollständiges Entparaffinieren | Frische Lösungen verwenden, Dauer des Entparaffinierens überprüfen |
| Proteolytische Vorbehandlung zu stark | Die Inkubationszeit mit Pepsin reduzieren |
| Objektträger sind vor der Hybridisierung auf Raumtemperatur abgekühlt | Objektträger schnell auf 37°C transferieren |

**Degradierte Morphologie**

| Mögliche Ursache | Lösung |
|---|---|
| Zell- oder Gewebeproben sind nicht optimal fixiert | Die Fixierzeit und das Fixiermittel optimieren oder Post-Fixierungsschritte wie in „Testverfahren" der Gebrauchsanweisung des ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kits beschrieben anwenden |
| Proteolytische Vorbehandlung nicht optimal ausgeführt | Die Inkubationszeit mit Pepsin optimieren, falls notwendig erhöhen oder reduzieren |

| | |
|---|---|
| Unzureichende Trocknung vor Applikation der Sonde | Lufttrocknung verlängern |

**Überlagernde Zellkerne**

| Mögliche Ursache | Lösung |
|---|---|
| Ungeeignete Dicke der Gewebeschnitte | 2-4 µm dicke Mikrotomschnitte anfertigen |

**Präparat löst sich vom Objektträger**

| Mögliche Ursache | Lösung |
|---|---|
| Proteolytische Vorbehandlung ist zu stark | Inkubationszeit mit Pepsin reduzieren |

**Schwache Gegenfärbung**

| Mögliche Ursache | Lösung |
|---|---|
| Gering konzentrierte DAPI-Lösung | DAPI/DuraTect-Solution (ultra) (Prod. Nr. MT-0008-0.8) stattdessen verwenden |
| Inkubationszeit mit DAPI zu kurz | Inkubationszeit mit DAPI anpassen |

## 17. Literatur


- Kaleta M, et al. (2019) *Diagn Pathol.*
- 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.


## 18. Revision

| Revision | Beschreibung der Änderung |
|---|---|
| 4.X.Y | 4. Benötigte, aber nicht bereitgestellte Materialien<br>• *Objektträger, positiv geladen.* |

www.zytovision.com

Die aktuellste Gebrauchsanweisung sowie Gebrauchsanweisungen in verschiedenen Sprachen finden Sie unter www.zytovision.com.

Unsere Experten stehen Ihnen für Ihre Fragen zur Verfügung.
Bitte kontaktieren Sie helptech@zytovision.com
Einen Kurzbericht über Sicherheit und Leistung finden Sie unter www.zytovision.com.

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

**Warenzeichen:**
ZytoVision® und Zyto*Light*® sind Warenzeichen der ZytoVision GmbH.