



ZytoDot 2C SPEC IGH Break Apart Probe

REF C-3071-100

Σ 10 (0,1 ml)

A 14q32.33-as humán IGH-lokuszt érintő transzlokációk kromogén *in situ* hibridizációval (CISH) történő minőségi kimutatására

4250380P285RH



In vitro diagnosztikai orvostechikai eszköz
az IVDR (EU) 2017/746 szerint

1. Rendeltetésszerű cél

A ZytoDot 2C SPEC IGH Break Apart Probe (PD51) a 14q32.33-as humán IGH-lokuszt érintő transzlokációk minőségi kimutatására szolgál formalinban rögzített, paraffinba ágyazott mintákban kromogén *in situ* hibridizációval (CISH). A szondát a ZytoDot 2C CISH Implementation Kit (Prod. No. C-3044-10/-40) készlettel együtt kell használni.

A termék kizárólag professzionális használatra készült. A termékkel végzett valamennyi vizsgálatot minősített, engedéllyel rendelkező anatómiai patológiai laboratóriumban, patológus/humángenetikus felügyelete mellett, szakképzett személyzetnek kell elvégeznie.

A szonda a különböző rákos megbetegedések differenciáldiagnózisának segédeszközeként szolgál, és terápiás intézkedéseket nem szabad kizárólag a teszteredmény alapján kezdeményezni.

2. A vizsgálat elve

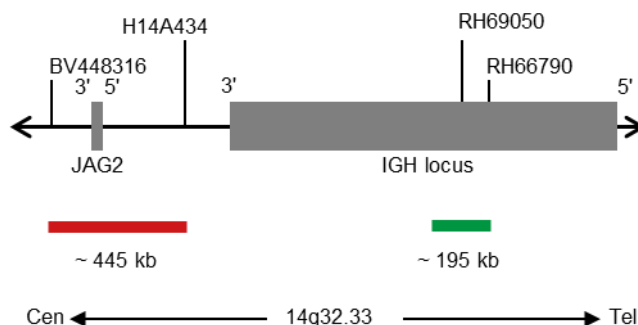
A kromogén *in situ* hibridizációs (CISH) technika lehetővé teszi specifikus nukleinsav-szekvenciák kimutatását és vizualizálását sejt-készítményekben. Hapten-jelölt nukleotidfragmentumok, úgynevezett CISH-szondák és a preparátumokban lévő komplementer célszekvenciák együttesen denaturálódnak, majd a hibridizáció során hagyják, hogy egymáshoz kapcsolódjanak. Ezt követően a nem specifikus és nem kötött szondafragmentumokat szigorú mosási lépésekkel távolítják el. A jelölt szonda duplexképződése elsődleges (nem jelölt) antitestekkel láthatóvá tehető, amelyeket másodlagos polimerizált enzimkonjugált antitestekkel detektálunk. Az enzimatis reakció kromogén szubsztátokkal színes csapadékok képződéséhez vezet. A sejtmag nukleáris festékekkel történő ellenfestése után a hibridizált szondafragmentumok fénymikroszkópiával láthatóvá válnak.

3. Rendelkezésre bocsátott reagensek

A ZytoDot 2C SPEC IGH Break Apart Probe a következőkből áll:

- Digoxigeninnel jelölt polinukleotidok (~0,50 ng/μl), amelyek a 14q32.33* (chr14:106,690,778-106,883,535), az IGH töréspont régiótól távoli szekvenciákat célozzák meg (lásd az 1. ábrát).
- Dinitrofenil-jelölt polinukleotidok (~0,75 ng/μl), amelyek a 14q32.33* (chr14:105,462,169-105,909,611), az IGH töréspont régióhoz közeli szekvenciákat célozzák meg (lásd az 1. ábrát).
- Formamid alapú hibridizációs puffer

*a Human Genome Assembly szerint GRCh37/hg19



1. ábra: SPEC IGH (nem méretarányos)

A ZytoDot 2C SPEC IGH Break Apart Probe egy méretben kapható:

- C-3071-100: 0,1 ml (10 reakció, egyenként 10 μl)

4. Szükséges, de nem biztosított anyagok

- ZytoDot 2C CISH Implementation Kit (Prod. No. C-3044-10/-40)
- Pozitív és negatív kontrollminták
- Mikroszkópos tárgylemezek, pozitív töltésű
- Vízfürdő (80 °C, 98 °C)
- Hibridizátor vagy főzőlap
- Hibridizáló vagy páraaknára a hibridizációs kemencében
- Állítható pipetták (10 μl, 1000 μl)
- Festőedények vagy fürdők
- Időzítő
- Kalibrált hőmérő
- Etanol vagy reagens alkohol
- Xilol
- Metanol 100%
- Hidrogén-peroxid (H₂O₂) 30%
- Deionizált vagy desztillált víz
- fedőlemezek (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Gumicement, pl. Fixogum Rubber Cement (Prod. No E-4005-50/-125) vagy hasonló.
- Megfelelően karbantartott fénymikroszkóp (400-630x)

5. Tárolás és kezelés

2-8 °C-on, függőleges helyzetben tárolja. Használat után azonnal állítsa vissza a tárolási körülmények közé. Ne használja fel a reagenseket a címkén feltüntetett lejárati időn túl. A termék a címkén feltüntetett lejárati dátumig stabil, ha megfelelően kezelik.

6. Figyelmeztetések és óvintézkedések

- Használat előtt olvassa el a használati utasítást!
- Ne használja fel a reagenseket a lejárati idő lejárta után!
- Ez a termék (kis koncentrációban és mennyiségben) egészségre káros és potenciálisan fertőző anyagokat tartalmaz. Kerülje a reagensekkel való közvetlen érintkezést. Tegyen megfelelő védőintézkedéseket (használgon eldobható kesztyűt, védőszemüveget és laboratóriumi ruházatot)!
- A termékkel kapcsolatban bekövetkezett minden súlyos eseményt jelentsen a gyártónak és a helyi előírásoknak megfelelően az illetékes hatóságnak!
- Ha a reagensek bőrrel érintkeznek, azonnal öblítse le a bőrt bőseges mennyiségű vízzel!

- A professzionális felhasználók számára kérésre biztonsági adatlap áll rendelkezésre.
- Ne használja újra a reagenseket, kivéve, ha az újrafelhasználás kifejezetten engedélyezett!
- Kerülje a minták keresztszennyeződését, mivel ez hibás eredményekhez vezethet.
- A minták nem száradhatnak meg a hibridizációs és mosási lépések alatt.

Veszélyre és óvintézkedésekre vonatkozó nyilatkozatok:

A veszélyt meghatározó komponens a formamid.



Veszély

H351	Feltehetően rákot okoz.
H360FD	Károsíthatja a termékenységet. Károsíthatja a magzatot.
H373	Hosszan tartó vagy ismételt expozíció esetén szervi károsodást okozhat.
P201	Használat előtt kérje be a speciális utasításokat.
P202	Ne kezelje, amíg az összes biztonsági óvintézkedést el nem olvasta és meg nem értette.
P260	Ne lélegezze be a port/füstöt/gázt/ködöt/gőzt/permetet.
P280	Viseljen védőkesztyűt/védő ruházatot/szemvédőt/arcvédőt.
P308+P313	HA kitett vagy érintett: Kérjen orvosi tanácsot/megfigyelést.
P405	Elzárva tárolandó.

7. Korlátozások

- *In vitro* diagnosztikai felhasználásra.
- Kizárólag professzionális használatra.
- Kizárólag nem automatizált használatra.
- Az analitikai normális határértéket az érdeklődésre számot tartó rendellenes jelemintázatra szakképzett patológusnak/humángenetikusknak kell megállapítania.
- A pozitív festődés klinikai értelmezését vagy annak hiányát a klinikai anamnézis, a morfológia, más szövettani kritériumok és más diagnosztikai vizsgálatok összefüggésében kell elvégezni. A szakképzett patológus/humángenetikus felelőssége, hogy ismerje a CISH-szondákat, a reagenseket, a diagnosztikai paneleket és a festett preparátum előállításához használt módszereket. A festést minősített, engedélyezett laboratóriumban kell elvégezni, patológus/humángenetikus felügyelete mellett, aki felelős a festett tárgylemezek felülvizsgálatáért és a pozitív és negatív kontrollok megfelelőségének biztosításáért.
- A minták festése, különösen a jelintenzitás és a háttérfestés, függ a minta festést megelőző kezelésétől és feldolgozásától. A nem megfelelő fixálás, fagyasztás, felolvasztás, mosás, szárítás, melegítés, szeletelés vagy más mintákkal vagy folyadékokkal való szennyeződés artefaktumokat vagy hamis eredményeket eredményezhet. Az inkonzisztens eredmények a fixálási és beágyazási módszerek eltéréseiből, valamint a mintában rejlő szabálytalanságokból adódhatnak.
- A szonda csak a 3. fejezetben leírt lókuszkok kimutatására használható. "Reagensek".
- A teljesítményt a jelen használati utasításban leírt eljárásokkal validálták. Ezen eljárások módosítása megváltoztathatja a teljesítményt, és azt a felhasználónak kell hitelesítenie. Ez az IVD csak akkor rendelkezik CE tanúsítvánnyal, ha az ebben a használati utasításban leírtak szerint, a rendeltetésszerű használat körében használják.

8. Interferenciát okozó anyagok

A következő fixálószer nem kompatibilisek az ISH-val:

- Bouin-fixálószer
- B5 fixálószer
- savas fixálószer (pl. pikrinsav)
- Zenker-fixálószer
- Alkoholok (önmagukban használva)
- Hígany-klorid
- Formaldehid/cink fixálószer
- Hollande fixálója
- Nem puffertelt formalin

9. A minták előkészítése

Készítse elő a mintákat a ZytoDot 2C CISH Implementation Kit használati utasításában leírtak szerint.

10. A készülék előkészítő kezelése

A termék használatra kész. Nincs szükség feloldásra, keverésre vagy hígításra. Használat előtt a szondát szobahőmérsékletre (18-25 °C) kell hozni, fénytől óvni kell. Az injekciós üveg felnyitása előtt vortexeléssel keverje össze, és rövid ideig forgassa le.

11. Vizsgálati eljárás

A minta előkezelése

Végezze el a minta előkezelését (pl. viaszmentesítés, proteolízis) a ZytoDot 2C CISH Implementation Kit használati utasítása szerint.

Denaturáció és hibridizáció

1. Pipettázzon 10 µl szondát minden előkezelt mintára.
2. Fedje le a mintákat egy 22 mm x 22 mm-es fedőlappal (kerülje el a beszorult buborékokat), és zárja le a fedőlappot.

A tömítéshez gumicement (pl. Fixogum) használatát javasoljuk.

3. Helyezze a tárgylemezeket forró lemezre vagy hibridizátorra, és denaturálja a mintákat 5 percig 79 °C-on.
4. Helyezze át a tárgylemezeket egy páraakmárba, és hibridizáljon egy éjszakán át 37 °C-on (pl. hibridizációs kemencében).

Nagyon fontos, hogy a minták ne száradjanak ki a hibridizációs lépés során.

Hibridizáció utáni

Végezze el a hibridizáció utáni feldolgozást (mosás, detektálás, ellenfestés, rögzítés, mikroszkópia) a ZytoDot 2C CISH Implementation Kit használati utasítása szerint.

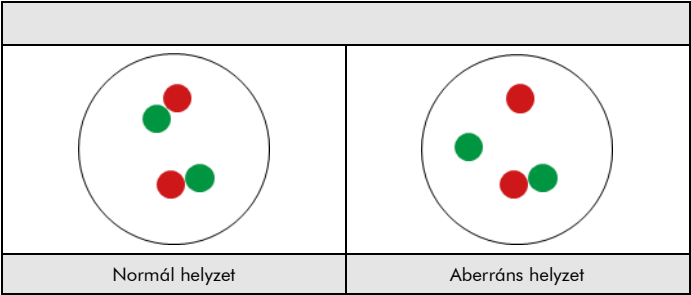
12. Az eredmények értelmezése

A ZytoDot 2C CISH Implementation Kit használatával a Digoxigeninnel jelölt polinukleotidok hibridizációs jelei sötétzöld színű, különálló pontokként jelennek meg (az IGH töréspont régiótól distalisán), a Dinitrofenillel jelölt polinukleotidok pedig élénkpiros színű, különálló pontokként jelennek meg (az IGH töréspont régiótól proximálisan).

Normál jelrendszer: A normális sejtek vagy az IGH lokusz érintő transzlokáció nélküli sejtek interfázisaiban két piros/zöld fúziós jel jelenik meg (lásd a 2. ábrát).

Rendellenes jelrendszer: Egy transzlokáció által érintett IGH lokusz egy különálló, különálló, pont alakú zöld jel és egy különálló, különálló, pont alakú piros jel jelöl (lásd a 2. ábrát).

Az egymást átfedő jelek barna jelekként jelenhetnek meg.



2. ábra: Várható eredmények normális és rendellenes sejtmagok esetén

A kis deléciók, duplikációk vagy inverziók okozta genomiális aberrációk feltűnésmentes jelmintákat eredményezhetnek.
A 16p11.2 és 15q11.2 IGH homolog szekvenciái miatt gyenge kereszthibridizáció figyelhető meg.
Más aberráns jelmintázatokat okozhat az IGHC vagy IGHV gének teljes vagy részleges elvesztése, valamint más lókuszekba történő rejtőzködő inszerciók. Továbbá, az egyik vagy mindkét allél hiányzó vagy csökkent zöld jelei az IGHV gének normál szomatikus V-D-J rekombinációból eredő delécióit jelenthetik.
Egyes rendellenes mintákban a fent leírtaktól eltérő jelminták is megfigyelhetők. Ezeket a váratlan jelmintákat tovább kell vizsgálni.

Kérjük, vegye figyelembe:

- A dekonzenzált kromatin miatt az egyes CISH-jelek kis jelhalmazokként jelenhetnek meg. Ezért két vagy három azonos méretű, ≤ 1 jelátmérővel elválasztott jelet egy jelnek kell tekinteni.
- A jelek megszámlálása előtt a mintát 100-200-szoros nagyítással meg kell vizsgálni az esetleges tumoron belüli heterogenitás szempontjából.
- A jelek vizualizálását legalább 400-szoros nagyítással kell elvégezni, ami könnyen látható jeleket eredményez. A kromoszómatöréseket detektáló szondák esetében 630-szoros nagyítás ajánlott. Ne használjon kontrasztfokozó szűrőlelencsét, mivel ez torzíthatja a jelek színét. A világos színű jelek eléréséhez nyissa ki a rekesznyílást. Ügyeljen arra, hogy a sejtmag kiértékelésekor felfelé és lefelé fókuszáljon, mivel a piros és zöld jelek egymáson helyezkedhetnek el.
- Ne értékelje a nekrotikus területeket, az átfedő magokat, a túlságosan megemésztett magokat és a gyenge jelintenzitású magokat.
- A mitózis miatt további jelek lehetnek láthatóak még a nem neoplasztikus sejtek kis százalékában is. Esetenként a paraffinba ágyazott mintákban a vágási artefaktumok miatt hiányzó jelekkel rendelkező sejtmagok figyelhetők meg.
- A negatív vagy nem specifikus eredményt több tényező is okozhatja (lásd a 16. fejezet "Hibaelhárítás" című részét).
- Az eredmények helyes értelmezése érdekében a felhasználónak a nemzeti és/vagy nemzetközi irányelveknek megfelelően validálnia kell a terméket a diagnosztikai eljárásokban való felhasználás előtt.

13. Ajánlott minőségellenőrzési eljárások

A feldolgozott minták és a vizsgálati reagensek megfelelő teljesítményének ellenőrzése érdekében minden egyes vizsgálathoz belső és külső kontrollokat kell rendelni. Ha a belső és/vagy külső kontrollok nem mutatnak megfelelő festődést, a betegmintákkal kapott eredményeket érvénytelennek kell tekinteni.

Belső ellenőrzés: Nem neoplasztikus sejtek a mintán belül, amelyek normális jelmintázatot mutatnak, pl. fibroblasztok.

Külső vezérlés: Validált pozitív és negatív kontrollminták.

14. Teljesítményjellemzők

A próba teljesítményét a megfelelő IVD által jóváhagyott FISH-szondával való összehasonlítással határozták meg.

Analitikai érzékenység:	100% (95% CI 98.5 – 100.0)
Analitikai specifikusság:	100% (95% CI 97.0 – 100.0)

15. Eltávolítás

A reagensek ártalmatlanítását a helyi előírásoknak megfelelően kell elvégezni.

16. Hibaelhárítás

A kezelési utasításoktól való bármilyen eltérés rosszabb festési eredményhez vagy egyáltalán nem festéshez vezethet. További információkért kérjük, olvassa el a www.zytovision.com/honlapot.

Gyenge jelek vagy egyáltalán nincs jel

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Nem megfelelően végzett proteolitikus előkezelés	Optimalizálja a pepszin inkubációs idejét, szükség esetén növelje vagy csökkentse azt.
Szonda párolgás	A hibridizáló használata esetén a nedves csíkok/vízzel töltött tartályok használata kötelező. Hibridizáló kemence használata esetén a párákamra használata kötelező. Ezenkívül a fedőlemezt teljesen le kell zárni, pl. Fixogummal, hogy megakadályozzuk a minta kiszáradását a hibridizáció során.
Túl hosszú az ellenfestési idő	Kerülje a sötét ellenfestést, mert az elfedheti a pozitív festési jeleket.
Az ellenfesték kékítése nem megfelelően történik	A kékítéshez hideg folyó csapvizet használjon; ne használjon meleg vagy forró vizet vagy kékítő reagenseket.

Túl erős jelek

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Túl hosszú ideig végzett proteolitikus előkezelés	Optimalizálja a pepszin inkubációs idejét, szükség esetén növelje vagy csökkentse azt.
Az AP-Red Solution inkubációs ideje nem megfelelő	Szükség esetén az inkubációs idő 5 percre lerövidíthető. A szubsztrátoldatot ne melegítse 25 °C fölé; csak szobahőmérsékleten inkubálja.
HRP-zöld oldat inkubációs ideje nem megfelelő	Szükség esetén az inkubációs idő 7 percre rövidíthető. A szubsztrátoldatot ne melegítse 25 °C fölé; csak szobahőmérsékleten inkubáljon.

A piros jelek túl gyengék

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Az AP-Red oldatot erős közvetlen fénynek tették ki.	Készítse el és használja az AP-Red oldatot erős közvetlen fénytől védve.
Az AP-Red oldatot túl korán készítették el	Azonnali használat előtt készítse elő

Az AP-Red Solution inkubációs ideje nem megfelelő	Szükség esetén az inkubációs idő 15 perccel meghosszabbítható.
A kromogén szubsztát nem megfelelő előkészítése	Ne növelje az A oldat térfogatát

A zöld jelek túl gyengék

Lehetséges ok	Javasolt teendő
A HRP-zölddel történő festést követő mosási lépések inkubációs ideje túl hosszú	Ne lépje túl a megadott inkubációs időt
HRP-zöld oldat inkubációs ideje nem megfelelő	Szükség esetén az inkubációs idő 15 perccel meghosszabbítható.
A kromogén szubsztát nem megfelelő előkészítése	Ne növelje az A oldat térfogatát

A jelek elhalványulnak vagy összeolvadnak

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Nem megfelelő szerelési megoldást használtak	Kizárólag a készlethez mellékelt rögzítő oldatot vagy minden szennyeződéstől mentes xilén alapú rögzítő oldatot használjon; ne használjon fedőszalagot.
A metszeteket nem dehidratálták megfelelően.	Friss etanol- és xilololdatokat használjon; csak "tiszt" minőségű xilolt használjon.

Egyenetlen vagy egyes részekben csak nagyon enyhe foltosodás

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Nem teljes viaszmentesítés	Használjon friss oldatokat; ellenőrizze a viaszmentesítési időtartamát.
Túl kicsi a reagens térfogata	Győződjön meg arról, hogy a reagens térfogata elég nagy ahhoz, hogy a szöveti területet lefedje.

Ellentmondásos eredmények

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Elégtelen szárítás a szonda felhelyezése előtt	Légszárítás meghosszabbítása
Túl sok víz/mosópuffer a szöveten a pepszin, az antitestek és/vagy a színezékszubsztátumok felvitelére előtt.	Győződjön meg arról, hogy a felesleges folyadékot a szövetszelvényről a tárgylemezről való leitatással vagy lerázással eltávolítja. A kis mennyiségű maradék víz/mosópuffer nem zavarja a vizsgálatot.
A szövetek rögzítési és beágyazási módszereinek változatai	A rögzítési és beágyazási módszerek optimalizálása
A szövetszelvény vastagságának változása	Optimalizálja a szekcionálást

Morfológia romlott

Lehetséges ok	Javasolt teendő
A sejt- vagy szövetmintát nem rögzítették megfelelően	A rögzítési idő és a fixálószer optimalizálása
Nem túl hosszú ideig végzett proteolitikus előkezelés	Csökkentse a pepszin inkubációs idejét

Kereszt hibridizációs jelek; zajos háttér

Lehetséges ok	Javasolt teendő
A metszetek a hibridizáció során vagy után bármikor kiszáradhattak.	Kerülje a szelvények kiszáradását; használjon pára kamrát; zárja le megfelelően a fedőlapot.
Meghosszabbított szubsztát inkubációs idő	A szubsztát inkubációs idejének lerövidítése
Nem teljes viaszmentesítés	Használjon friss oldatokat; ellenőrizze a viaszmentesítési időtartamát.
Túl erős proteolitikus előkezelés	A pepszin inkubációs idejének optimalizálása
A tárgylemezeket hibridizáció előtt szobahőmérsékletre kell hűteni.	A tárgylemezeket gyorsan helyezze át hibridizációs hőmérsékletre

Átfedő jelek

Lehetséges ok	Javasolt teendő
A szöveti metszetek nem megfelelő vastagsága	Készítsünk 3-5 µm-es mikrotomos metszeteket

A minta lebeg a tárgylemezről

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Túl erős proteolitikus előkezelés	A pepszin inkubációs idő lerövidítése

17. Irodalom

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

18. Felülvizsgálat
www.zytovision.com

A legfrissebb használati utasításokat, valamint a különböző nyelvű használati utasításokat a www.zytovision.com oldalon találja.

Szakértőink készséggel válaszolnak kérdéseire.

Vegye fel velünk a kapcsolatot a help@zytovision.com címen. A biztonságról és a teljesítményről szóló összefoglalóért kérjük, olvassa el a következőt www.zytovision.com.



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

Védjegyek:

A ZytoVision® és a ZytoDot® a ZytoVision GmbH védjegyei.