



ZytoDot 2C SPEC BCL6 Break Apart Probe

REF C-3074-100

Σ 10 (0,1 ml)

Az emberi BCL6 gént a 3q27.3 helyen érintő
transzlokációk minőségi kimutatására kromogén *in situ*
hibridizációval (CISH)

4250380P288RP



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

1. Rendeltetésszerű cél

A ZytoDot 2C SPEC BCL6 Break Apart Probe (PD54) a 22q12.2 helyen lévő humán EWSR1 gént érintő transzlokációk minőségi kimutatására szolgál formalin-fixált, 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

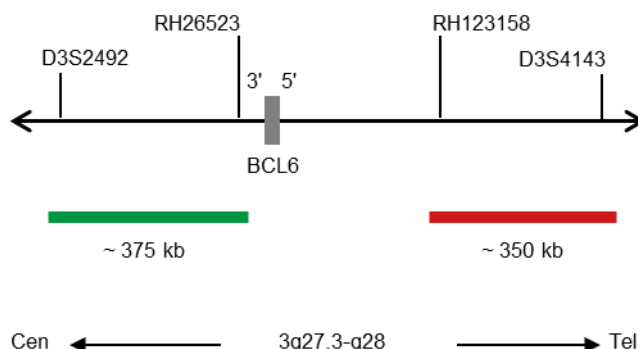
A kromogén *in situ* hibridizációs (CISH) technika lehetővé teszi specifikus nukleinsav-szekvenciák kimutatását és vizualizálását sejtkészítményekben. Hapten-jelölt nukleotidfragmentumok, úgynevezett CISH-szondák és a preparátumokban lévő komplementer célszekvenciák együttesen denaturálódnak, majd a 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 BCL6 Break Apart Probe a következőkből áll:

- Digoxigeninnel jelölt polinukleotidok (~0,50 ng/μl), amelyek az BCL6 töréspont régióhoz közeli 3q27.3* (chr3:187,028,236-187,403,834) szekvenciákat célozzák (lásd az 1. ábrát).
- Dinitrofenil-jelölt polinukleotidok (~0,75 ng/μl), amelyek a 3q27.3-q28* (chr3:187,744,962-188,097,195), az BCL6 töréspont régiótól távoli szekvenciákat célozzák (lásd az 1. ábrát).
- Formamid alapú hibridizációs puffer

*a Human Genome Assembly szerint GRCh37/hg19



1. ábra: SPEC BCL6 (nem méretarányos)

A ZytoDot 2C SPEC BCL6 Break Apart Probe egy méretben kapható:

- C-3074-100: 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 páraakamra 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 lejártá 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 bőséges 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 jelmintázatra szakképzett patológusnak/humángenetikusként 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
- Alkohokok (önmagukban használva)
- Higany-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 pára kamrába, 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.

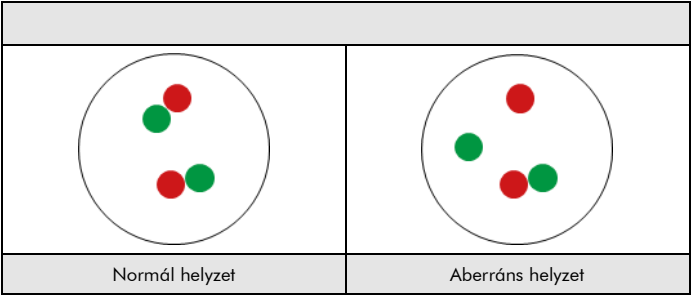
12. Az eredmények értelmezése

A ZytoDot 2C CISH Implementation Kit használatával a Digoxigeninnel jelölt polinukleotidok hibridizációs jelei sötétzöld színű, különálló pontokként jelennek meg (az BCL6 töréspont régiótól proximálisan), a Dinitrofenillel jelölt polinukleotidok pedig élénkpiros színű, különálló pontokként jelennek meg (az BCL6 töréspont régiótól distálisan).

Normál jelrendszer: A normális sejtek vagy az BCL6 génterületet érintő transzlokáció nélküli sejtek interfázisaiban két piros/zöld fúziós jel jelenik meg. (lásd a 2. ábrát).

Rendellenes jelrendszer: Egy transzlokáció által érintett BCL6 génterületet 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.

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 megszámmlálása 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 reagensok 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 reagensok 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 perccig meghosszabbítható.
A kromogén szubsztrát 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 percre meghosszabbítható.
A kromogén szubsztrát 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 "tisztá" minőségű xilolt használjon.

Egyetlen vagy egyes részekben csak nagyon enyhe foltosodás

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Nem teljes viaszmentesítés	Használjon friss oldatokat; ellenőrizze a viaszmentesítési idő tartamát.
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	Lég szárítás meghosszabbítása
Túl sok víz/mosópuffer a szöveten a pepszin, az antitestek és/vagy a színezékszubsztrátumok felvitele 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 szubsztrát inkubációs idő	A szubsztrát inkubációs idejének lerövidítése

Nem teljes viaszmentesítés	Használjon friss oldatokat; ellenőrizze a viaszmentesítés 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.

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.