

F/*ex*SH**BCL2/BCL6 DistinguISH Probe**REF Z-2283-50 Σ 5 (0,05 ml)REF Z-2283-200 Σ 20 (0,2 ml)

Az emberi BCL2 gént a 18q21.33 és az emberi BCL6 gént a 3q27.3 helyen érintő transzlokációk minőségi kimutatására fluoreszcens *in situ* hibridizációval (FISH)

4250380P367RL



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

1. Rendeltetészerű cél

A F/*ex*SH BCL2/BCL6 DistinguISH Probe (PL238) a 18q21.33-ban található humán BCL2 gént és a 3q27.3-ban található humán BCL6 gént érintő transzlokációk minőségi kimutatására szolgál formalinban rögzített, paraffinba ágyazott mintákban, például B-sejtes limfómákban, fluoreszcens *in situ* hibridizációval (FISH). A szonda a F/*ex*SH-Tissue Implementation Kit (Prod. No. Z-2182-5/-20) készlettel együtt használható.

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 próba a B-sejtes limfómák differenciáldiagnózisának segédeszközeként szolgál, és terápiás intézkedéseket nem szabad kizárólag a teszteredmény alapján kezdeményezni.

2. A vizsgálat elve

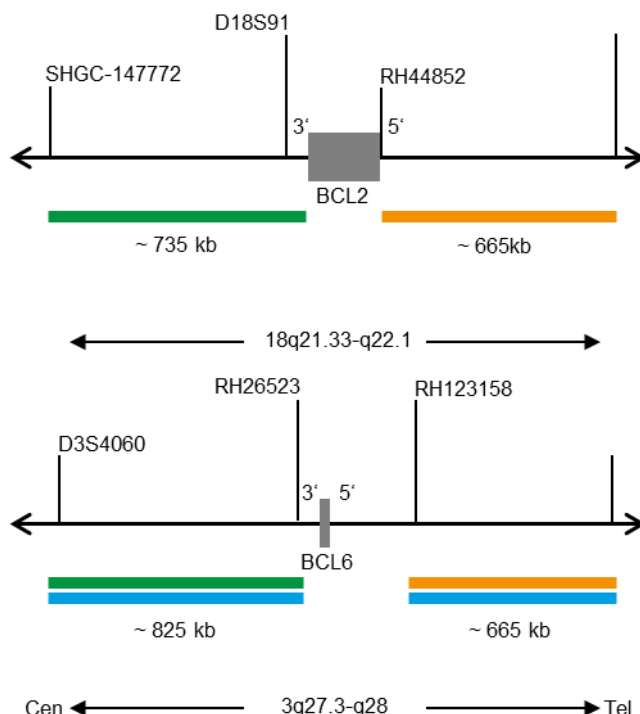
A fluoreszcens *in situ* hibridizációs (FISH) technika lehetővé teszi specifikus nukleinsav-szekvenciák kimutatását és vizualizálását sejtkészítményekben. A fluoreszcensen jelölt DNS-törödékek, az úgynevezett FISH-szondák és a preparátumokban lévő komplementer cél-DNS-szálak együttesen denaturálódnak, majd a hibridizáció során hagyják, hogy a DNS-törödékek egymáshoz kapcsolódjanak. Ezt követően a nem specifikus és nem kötött szondafragmentumokat szigorú mosási lépésekkel távolítják el. A DNS DAPI-val történő ellenfestése után a hibridizált szondafragmentumokat fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizualizáljuk, amely olyan gerjesztő és emissziós szűrőkkel van felszerelve, amelyek specifikusak azokra a fluorokrómokra, amelyekkel a FISH-szondafragmentumokat közvetlenül jelölték.

3. Rendelkezésre bocsátott reagensek

A F/*ex*SH BCL2/BCL6 DistinguISH Probe a következőkből áll:

- ZyGreen (gerjesztés 503 nm/emisszió 528 nm) jelölésű polinukleotidok (~10,0 ng/μl), amelyek a 18q21.33* (chr18:60,046,152-60,779,138) BCL2 töréspont régióhoz közeli és a 3q27.3* (chr3:186,578,337-187,403,834) BCL6 töréspont régióhoz közeli szekvenciákat célozzák meg (lásd az 1. ábrát).
- ZyOrange (gerjesztés 547 nm/emisszió 572 nm) jelölt polinukleotidok (~2,5 ng/μl), amelyek a BCL2 töréspont régiótól távoli 18q21.33-q22.1* (chr18:60,994,528-61,658,503) és a BCL6 töréspont régiótól távoli 3q27.3-q28* (chr3:187,744,962-188,411,425) szekvenciákat célozzák meg (lásd az 1. ábrát).
- ZyBlue (gerjesztés 418 nm/emisszió 467 nm) jelölt polinukleotidok (~70,0 ng/μl), amelyek a 3q27.3* (chr3:186,578,337-187,403,834), a BCL6 töréspont régióhoz közeli, a zölddel jelölt BCL6 polinukleotidokkal és a 3q27.3-ben ko-lokalizálódó szekvenciákat célozzák. 3q27.3-q28* (chr3:187,744,962-188,411,425) a BCL6 töréspont régiótól távolabb, a narancssárgán jelölt BCL6 polinukleotidokkal együtt lokalizálva (lásd az 1. ábrát).
- Formamid alapú hibridizációs puffer

*a Human Genome Assembly szerint GRCh37/hg19



1. ábra: Fent: SPEC BCL2 próbatérkép, lent: (nem méretarányos): SPEC BCL6 próbatérkép

A F/*ex*SH BCL2/BCL6 DistinguISH Probe két méretben kapható:

- Z-2283-50: 0,05 ml (5 reakció, egyenként 10 μl)
- Z-2283-200: 0,2 ml (20 reakció, egyenként 10 μl)

4. Szükséges, de nem biztosított anyagok

- F/*ex*SH-Tissue Implementation Kit (Prod. No. Z-2182-5/-20)
- Pozitív és negatív kontrollminták
- Mikroszkópos tárgylemez, pozitív töltésű
- Vízfürdő (37 °C, 98 °C)
- Hibridizáló vagy főzőlap
- Hibridizáló vagy pára kamra a hibridizációs kemencében
- Állítható pipetták (10 μl, 25 μl)
- Festőedények vagy fürdők
- Időzítő
- Kalibrált hőmérő
- Etanol vagy reagens alkohol
- Xilol
- Deionizált vagy desztillált víz

- fedőlemezek (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Gumicement, pl. Fixogum Rubber Cement (Prod. No. E-4005-50/-125) vagy hasonló.
- Megfelelően karbantartott fluoreszcens mikroszkóp (400-1000x)
- Fluoreszcens mikroszkópiához jóváhagyott merülőolaj
 - Megfelelő szűrőkészletek

5. Tárolás és kezelés

2-8 °C-on, fénytől védett, függőleges helyzetben tárolja. Használja fénytől védve. 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 (használjon eldobható kesztyűt, védőszemüveget és laboratóriumi ruházatot)!
- A termékkel kapcsolatban bekövetkezett minden súlyos eseményt jelentsen a gyártónak és a helyi előírásoknak megfelelően az illetékes hatóságoknak!
- 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 szondát nem szabad hosszabb ideig fénynek, különösen erős fénynek kitenni, azaz minden lépést lehetőség szerint sötétben és/vagy fényálló edényben kell elvégezni.

Veszélyre és óvintézkedésekre vonatkozó nyilatkozatok:

A veszélyt meghatározó komponens a formamid.



Veszély

H319	Súlyos szemirritációt okoz.
H351	A gyanú szerint rákot okozhat.
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.
P260	Ne lélegezze be a port/füstöt/gázt/ködöt/gőzt/permetet.
P280	Viseljen védőkesztyűt/védő ruházatot/szemvédőt/arcvédőt.
P305+P351+P338	HA SZEMBEN: Óvatosan öblítse ki vízzel néhány percig. Távolítsa el a kontaktlencsét, ha van és könnyen elvégezhető. Folytassa az öblítést.
P308+P313	HA ki van téve vagy érintett: Kérjen orvosi tanácsot/megfigyelést.
P337+P313	HA a szemirritáció továbbra is fennáll: Orvosi tanácsot/ellátást kell kérni.

7. Korlátozások

- *In vitro* diagnosztikai felhasználásra.
- Kizárólag professzionális használatra.
- Kizárólag nem automatizált használatra.

- A pozitív festődés klinikai értelmezését vagy annak hiányát a klinikai anamnézis, a morfológia, az egyéb szövettani kritériumok, valamint az egyéb diagnosztikai vizsgálatok összefüggésében kell elvégezni. A képzett patológus/humán genetikai felelőssége, hogy ismerje a FISH-szondákat, a reagenseket, a diagnosztikai paneleket és a festett preparátum előállításához használt módszereket. A festést tanúsított, engedélyezett laboratóriumban kell elvégezni, patológus/humán genetikai 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 lókuszok 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 kiváltó anyagok

A mintában lévő vörösvértestek autofluoreszcenciát mutathatnak, ami akadályozza a jelfelismerést.

A következő fixálószer nem kompatibilisek a FISH-vel:

- Bouin-fixáló
- B5 fixáló
- savas fixálók (pl. pikrinsav)
- Zenker-fixáló
- Alkoholak (önmagukban használva)
- Higany-klorid
- Formaldehid/cink fixáló
- Hollandi fixáló
- Nem puffertelt formalin

9. A minták előkészítése

Készítse elő a mintákat a F/exSH-Tissue 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 (viaszmentesítés, proteolízis) a F/exSH-Tissue 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 fedőlapot.
- A tömítéshez gumicement (pl. Fixogum) használatát javasoljuk.*
3. Helyezze a tárgylemezeket forró lemezre vagy hibridizátorra, és denaturálja a mintákat 10 percig 75 °C-on.
 4. Végezze el a hibridizációt 2 órától 16 óráig (azaz egy éjszakán át) 37 °C-on úgy, hogy a tárgylemezeket vagy egy hibridizáló

készülékbe, vagy egy párakamrába és egy hibridizációs kemencébe helyezi.

Lényeges, hogy a minták ne száradjanak ki a hibridizációs lépés során.

Hibridizáció utáni

A F/exlSH-Tissue Implementation Kit használati utasítása szerint végezze el a hibridizáció utáni feldolgozást (mosás, ellenfestés, fluoreszcens mikroszkópia).

12. Az eredmények értelmezése

Megfelelő szűrőkészletek használatával a próba hibridizációs jelei zöld (az BCL2 és a BCL6 töréspont régióhoz proximálisan), narancssárga (az BCL2 és a BCL6 töréspont régióhoz distálisan) és kék (a BCL6 töréspont régióhoz proximálisan és distálisan) jelennek meg.

Normál jelrendszer Normális sejtek vagy az BCL2 vagy BCL6 génterületet érintő átrendeződést nem mutató sejtek interfázisaiban négy zöld/narancssárga fúziós jel jelenik meg megfelelő kettős sávszűrő készlet alkalmazásakor, és két kék jel jelenik meg megfelelő egyszeres sávszűrő készlet alkalmazásakor (lásd a 2. ábrát).

Rendellenes jelrendszer: Egy BCL2-transzlokáció által érintett 18q21.33-q22.1 lókuszt egy különálló zöld és egy különálló narancssárga jel jelöl, amely nem ko-lokalizál a kék jelekkel. Egy BCL6-transzlokáció által érintett 3q27.3-q28 lókuszt egy különálló zöld és egy különálló narancssárga jel jelöl, amelyek mindegyike kék jellel együtt lokalizál. (lásd a 2. ábrát).

Az egymást átfedő zöld és narancssárga jelek sárga jelekként jelenhetnek meg.

	Zöld/narancssárga a kettős sávszűrő készlet	Kék egyszeres sávszűrő készlet	Összevont kép vagy hármas sávszűrő készlet
Normál sejtek			
BCL2- átrendeződés			
BCL6-átrendeződés			

2. ábra: Várható eredmények normális és aberrált sejtmagok esetén

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 FISH-jelek kis jelhalmazokként jelenhetnek meg. Ezért két vagy három azonos méretű, ≤ 1 jelátmérővel elválasztott jelet egy jelnek kell tekinteni.
- Ne értékelje az egymást átfedő magokat.
- Ne számolja meg a túlságosan megemésztett sejtmagokat (a sejtmagok belsejében látható sötét területekről ismerhető fel).
- Ne számolja az erős autofluoreszcenciájú sejtmagokat, amelyek akadályozzák a jelfelismerést.
- 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 vizsgálatához 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

14.1 Analitikai teljesítmény

A teljesítményt a F/exlSH-Tissue Implementation Kit használati utasítása szerint értékelték.

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

14.2 Klinikai teljesítmény

Diagnosztikai érzékenység:	100% (95% CI 98.0 – 100.0) vs BCL2 FISH 100% (95% CI 97.3 – 100.0) vs. BCL6 FISH
Diagnosztikai specifikitás:	100% (95% CI 98.0 – 100.0) vs BCL2 FISH 100% (95% CI 97.3 – 100.0) vs. BCL6 FISH

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 információért kérjük, olvassa el a www.zytovision.com/honlapot.

Gyenge jelek vagy egyáltalán nincs jel

Lehetséges ok	Javasolt teendő
A mintát nem rögzítették megfelelően	A rögzítési idő és a fixálószer optimalizálása
Nem megfelelően végzett proteolitikus előkezelés	Optimalizálja a pepszin inkubációs idejét, szükség esetén növelje vagy csökkentse azt.
Szonda párologás	A hibridizáló használata esetén a nedves csíkok/vízzel töltött tartályok használata kötelező. Hibridizáló kemence használata esetén a párakamra használata kötelező. Ezenkívül a fedőlemezt teljesen le kell zárni, pl. Fixogummal, hogy megakadályozzuk a minta kiszáradását a hibridizáció során.
Nem megfelelő szűrőkészletek használata	Használjon a szonda fluorokrómjainak megfelelő szűrőkészleteket. <i>A háromszoros sávszűrő-készletek kevesebb fényt biztosítanak az egy- vagy kétsávszűrő-készletekhez képest. Következésképpen a jelek halványabbnak tűnhetnek a háromsávszűrő-készletek használatával.</i>

Kereszt hibridizációs jelek; zajos háttér

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Nem teljes viaszmentesítés	Használjon friss oldatokat; ellenőrizze a viaszmentesítés időtartamát.
Túl erős proteolitikus előkezelés	Csökkentse a pepszin inkubációs idejét

A tárgylemezeket hibridizáció előtt szobahőmérsékletre kell hűteni.	A tárgylemezeket gyorsan helyezzük át 37 °C-ra
---	--

Morfológia romlott

Lehetséges ok	javasolt teendő
A mintát nem rögzítették megfelelően	A rögzítési idő és a fixálószer optimalizálása
Nem megfelelően végzett proteolitikus előkezelés	Optimalizálja a pepszin inkubációs idejét, szükség esetén csökkentse azt.
Elégtelen szárítás a szonda felhelyezése előtt	Légszárítás meghosszabbítása

Átfedő magok

Lehetséges ok	javasolt teendő
A szöveti metszetek nem megfelelő vastagsága	Készítsünk 2-4 µm-es mikrotomos metszeteket

A minta lebeg a tárgylemezről

Lehetséges ok	javasolt teendő
Túl erős proteolitikus előkezelés	Csökkentse a pepszin inkubációs idejét

Gyenge ellenfesték

Lehetséges ok	javasolt teendő
Alacsony koncentrációjú DAPI-oldat	Használjon helyette <u>DAPI/DuraTect-oldatot (ultra)</u> (Prod. No. MT-0008-0.8).
Túl rövid DAPI inkubációs idő	A DAPI inkubációs idő beállítása

17. Irodalom

- Marino F, et al. (2021) *Virchows Archiv* 479: 565-573.
- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Willenbacher E, et al. (2020) *Annals of Hematology* 99: 2123-2132.
- 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 összefoglalót lásd a következő oldalon 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 F/exSH® a ZytoVision GmbH védjegyei.