



## ZytoLight SPEC MYC Dual Color Break Apart Probe

**REF** Z-2090-50  5 (0,05 ml)

**REF** Z-2090-200  20 (0,2 ml)

Na kvalitatívnu detekciu translokácií zahŕňajúcich ľudský gén MYC na 8q24.21 pomocou fluorescenčnej *in situ* hybridizácie (FISH)

4250380P135QV



Diagnostická zdravotnícka pomôcka in vitro

podľa IVDR (EÚ) 2017/746

### 1. Zamýšľaný účel

ZytoLight SPEC MYC Dual Color Break Apart Probe (PL49) je určená na kvalitatívnu detekciu translokácií zahŕňajúcich ľudský gén MYC na 8q24.21 v cytologických vzorkách alebo vzorkách fixovaných formalínom a vložených do parafínu, ako je difúzny veľkobunkový B-lymfóm (DLBCL) alebo Burkittov lymfóm (BL), pomocou fluorescenčnej *in situ* hybridizácie (FISH). Sonda je určená na použitie v kombinácii so súpravami ZytoLight FISH Implementation Kits (č. Z2028-5/-20 alebo Z-2099-20).

Výrobok je určený len na profesionálne použitie. Všetky testy s použitím výrobku by mal vykonávať kvalifikovaný personál v certifikovanom, licencovanom laboratóriu anatomickej patológie pod dohľadom patológa/humánneho genetika.

Sonda je určená ako pomôcka pri diferenciálnej diagnostike DLBCL alebo BL a terapeutické opatrenia by sa nemali začínať len na základe výsledku testu.

### 2. Princíp testu

Technika fluorescenčnej *in situ* hybridizácie (FISH) umožňuje detekciu a vizualizáciu špecifických sekvencií nukleových kyselín v bunkových preparátoch. Fluorescenčne označené fragmenty DNA, tzv. sondy FISH, a ich komplementárne cieľové reťazce DNA v preparátoch sa počas hybridizácie spoločne kodenaturujú a následne nechajú hybridizovať. Potom sa nešpecifické a nenaviazané fragmenty sond odstránia premytím. Po kontrastnom farbení DNA pomocou DAPI sa hybridizované fragmenty sond vizualizujú pomocou fluorescenčného mikroskopu vybaveného excitačnými a emisnými filtermi špecifickými pre fluorochrómy, ktorými boli fragmenty sond FISH priamo označené.

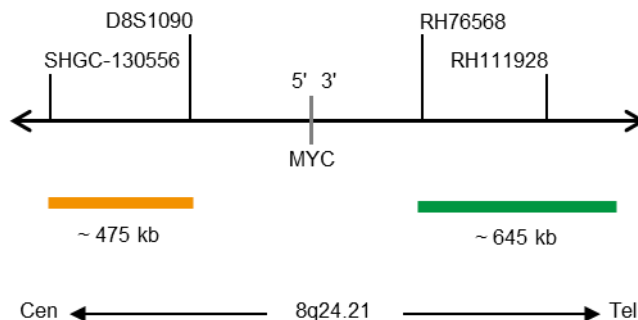
### 3. Poskytnuté činidlá

ZytoLight SPEC MYC Dual Color Break Apart Probe sa skladá z:

- ZyGreen (excitácia 503 nm/emisia 528 nm) značené polynukleotidy (~10 ng/μl), ktoré sú zamerané na sekvencie mapujúce oblasť 8q24.21\* (chr8:130,373,051-130,930,673) vzdialenú od oblasti zlomu MYC (pozri obr. 1).
- ZyOrange (excitácia 547 nm/emisia 572 nm) značené polynukleotidy (~4,5 ng/μl), ktoré sú zamerané na sekvencie mapujúce oblasť 8q24.21\* (chr8:127,888,765-128,363,281) v blízkosti oblasti zlomu MYC (pozri obr. 1).

Hybridizačný pufer na báze formamidu

\*podľa Human Genome Assembly GRCh37/hg19



Obr. 1: SPEC MYC Mapa sondy (bez mierky)

ZytoLight SPEC MYC Dual Color Break Apart Probe je k dispozícii v dvoch veľkostiach:

- Z-2090-50: 0,05 ml (5 reakcií po 10 μl)
- Z-2090-200: 0,2 ml (20 reakcií po 10 μl)

### 4. Požadované, ale neposkytované materiály

- Pozitívne a negatívne kontrolné vzorky
- Hybridizér alebo horúca platňa
- Hybridizér alebo komora na udržiavanie vlhkosti v hybridizačnej peci
- Časovač
- Farbiace nádoby alebo kúpele
- Kalibrovaný teplomer
- Nastaviteľné pipety (10 μl, 25 μl)
- Etanol alebo reagenčný alkohol
- Deionizovaná alebo destilovaná voda
- Krycie sklička (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Gumové lepidlo, napr. Fixogum Rubber Cement (č. E-4005-50/-125) alebo podobný
- Primerane udržiavaný fluorescenčný mikroskop (400-1000x)
- Imerzný olej schválený pre fluorescenčnú mikroskopiu
- Vhodné súpravy filtrov

### Vzorky na cytológiu

- ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit (č. Z-2099-20)
- Mikroskopické sklička, nepotiahnuté
- Vodný kúpeľ (70 °C)
- 37% formaldehyd, bez obsahu kyselín, alebo 10% formalín, neutrálne pufrovaný
- 2x fyziologický roztok citrátu sodného (SSC), napr. z 20x SSC Solution (č. WB-0003-50)

### Vzorky FFPE

- ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (č. Z-2028-5/-20)
- Mikroskopické sklička, kladne nabité
- Vodný kúpeľ (37 °C, 98 °C)
- Xylén

### 5. Skladovanie a manipulácia

Skladujte pri teplote 2 - 8 °C vo zvislej polohe chránenej pred svetlom. Používajte chránené pred svetlom. Okamžite po použití vráťte do skladovacích podmienok. Nepoužívajte činidlá po dátume expirácie uvedenom na etikete. Produkt je stabilný do dátumu expirácie uvedeného na etikete, ak sa s ním zaobchádza primeraným spôsobom.

## 6. Upozornenia a bezpečnostné opatrenia

- Pred použitím si prečítajte návod na použitie!
- Nepoužívajte činidlá po uplynutí dátumu expirácie!
- Tento výrobok obsahuje látky (v nízkych koncentráciách a objemoch), ktoré sú zdraviu škodlivé a potenciálne infekčné. Vyhnite sa akémukoľvek priamemu kontaktu s činidlami. Prijmite vhodné ochranné opatrenia (používajte jednorazové rukavice, ochranné okuliare a laboratórny odev)!
- Každý závažný incident, ku ktorému došlo v súvislosti s výrobkom, nahláste výrobcovi a príslušnému orgánu podľa miestnych predpisov!
- Ak sa činidlá dostanú do kontaktu s pokožkou, okamžite ju opláchnite veľkým množstvom vody!
- Pre profesionálnych používateľov je na požiadanie k dispozícii karta bezpečnostných údajov.
- Reagencie nepoužívajte opakovane, pokiaľ nie je opakované použitie výslovne povolené!
- Zabráňte krížovej kontaminácii vzoriek, pretože to môže viesť k chybným výsledkom.
- Sonda by nemala byť dlhší čas vystavená svetlu, najmä silnému svetlu, t. j. všetky kroky by sa mali vykonávať, ak je to možné, v tme a/alebo s použitím nádob odolných voči svetlu.

## Výstražné a bezpečnostné upozornenia:

Zložkou určujúcou nebezpečenstvo je formamid.



### Nebezpečenstvo

H351	Podozrenie, že spôsobuje rakovinu.
H360FD	Môže poškodiť plodnosť. Môže poškodiť nenarodené dieťa.
H373	Môže spôsobiť poškodenie orgánov pri dlhodobej alebo opakovanej expozícii.
P201	Pred použitím si vyžiadať špeciálne pokyny.
P202	Nemanipulujte s ním, kým si neprečítate a nepochopíte všetky bezpečnostné opatrenia.
P260	Nevdychujte prach/dym/plyn/hmlu/výpary/sprej.
P280	Používajte ochranné rukavice/ochranný odev/ochranu očí/ochranu tváre.
P308+P313	Po expozícii alebo podozrení z nej: Vyhľadajte lekársku pomoc/starostlivosť.
P405	Skladujte uzamknuté.

## 7. Obmedzenia

- Na diagnostické použitie *in vitro*.
- Len na profesionálne použitie.
- Len na neautomatizované použitie.
- Klinická interpretácia akéhokoľvek pozitívneho farbenia alebo jeho neprítomnosti sa musí vykonať v kontexte klinickej anamnézy, morfológie, iných histopatologických kritérií, ako aj iných diagnostických testov. Je zodpovednosťou kvalifikovaného patológa/humánneho genetika, aby poznal sondy FISH, reagencie, diagnostické panely a metódy použité na výrobu farbeného preparátu. Farbenie sa musí vykonávať v certifikovanom, licencovanom laboratóriu pod dohľadom patológa/humánneho genetika, ktorý je zodpovedný za preskúmanie farbených preparátov a zabezpečenie primeranosti pozitívnych a negatívnych kontrol.
- Zafarbenie vzorky, najmä intenzita signálu a zafarbenie pozadia, závisí od manipulácie so vzorkou a jej spracovania pred zafarbením. Nesprávna fixácia, zmrazenie, rozmrazenie, umývanie, sušenie, zahrievanie, rezanie alebo kontaminácia inými vzorkami alebo tekutinami môže spôsobiť artefakty alebo falošné výsledky. Nekonzistentné výsledky môžu byť dôsledkom rozdielov v metódach fixácie a vkladania, ako aj vnútorných nepravidielností vo vzorke.
- Sonda by sa mala používať len na detekciu lokusov opísaných v kapitole 3. "Dodávané činidlá".

- Výkon bol overený pomocou postupov opísaných v tomto návode na použitie. Úpravy týchto postupov môžu zmeniť výkon a musí ich overiť používateľ. Tento IVD je certifikovaný ako CE len vtedy, keď sa používa tak, ako je opísané v tomto návode na použitie v rozsahu určeného použitia.

## 8. Rušivé látky

Červené krvinky prítomné vo vzorke môžu vykazovať autofluorescenciu, ktorá bráni rozpoznaníu signálu.

Nasledujúce fixatíva sú nekompatibilné s FISH:

- Bouinovo fixačné činidlo
- Fixačné činidlo B5
- Kyslé fixačné prostriedky (napr. kyselina pikrová)
- Zenkerov fixatív
- Alkoholy (ak sa používajú samostatne)
- Chlorid ortuťnatý
- Formaldehydové/zinkové fixačné činidlo
- Hollandova fixácia
- Formálín bez pufru

## 9. Príprava vzoriek

Prípravte vzorky podľa návodu na použitie príslušnej súpravy ZytoVision.

## 10. Prípravné ošetrenie zariadenia

Výrobok je pripravený na použitie. Nie je potrebná rekonštitúcia, miešanie ani riedenie. Pred použitím uveďte sondu na izbovú teplotu (18 - 25 °C) a chráňte ju pred svetlom. Pred otvorením injekčnej liekovky premiešajte vortexovaním a krátko roztočte.

## 11. Postup analýzy

### Vzorky na cytológiu

#### Predbežná úprava vzorky

Vykonajte predbežnú úpravu vzorky podľa návodu na použitie súpravy ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit.

#### Denaturácia a hybridizácia

1. Na každú predpripravenú vzorku napipetujte 10 µl sondy.
  2. Vzorky zakryte krycím sklíčkom s rozmermi 22 x 22 mm (vyhnite sa zachyteným bublinkám) a krycie sklíčko utesnite.
- Na utesnenie odporúčame použiť gumové lepidlo (napr. Fixogum).*
3. Umiestnite sklíčka na horúcu platňu alebo hybridizér a vzorky denaturujte 5 minút pri teplote 72 °C.
  4. Premiestnite sklíčko do vlhkej komory a hybridizujte cez noc pri 37 °C (napr. v hybridizačnej peci).

*Je dôležité, aby vzorky počas hybridizácie nevyschli.*

#### Po hybridizácii

Spracovanie po hybridizácii (premytie, kontrastné farbenie, fluorescenčná mikroskopia) vykonajte podľa návodu na použitie ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit.

### Vzorky FFPE

#### Predbežná úprava vzorky

Vykonajte predbežnú úpravu vzorky (odparafinovanie, proteolýzu) podľa návodu na použitie súpravy ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit.

#### Denaturácia a hybridizácia

1. Na každú predpripravenú vzorku napipetujte 10 µl sondy.
  2. Vzorky zakryte krycím sklíčkom s rozmermi 22 x 22 mm (vyhnite sa zachyteným bublinkám) a krycie sklíčko utesnite.
- Na utesnenie odporúčame použiť gumové lepidlo (napr. Fixogum).*
3. Umiestnite sklíčka na horúcu platňu alebo hybridizér a vzorky denaturujte 10 minút pri teplote 75 °C.
  4. Sklíčka preneste do vlhkej komory a hybridizujte cez noc pri 37 °C (napr. v hybridizačnej peci).

*Je dôležité, aby vzorky počas hybridizácie nevyschli.*

Po hybridizácii

Spracovanie po hybridizácii (premytie, kontrastné farbenie, fluorescenčná mikroskopia) vykonajte podľa návodu na použitie súpravy ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit.

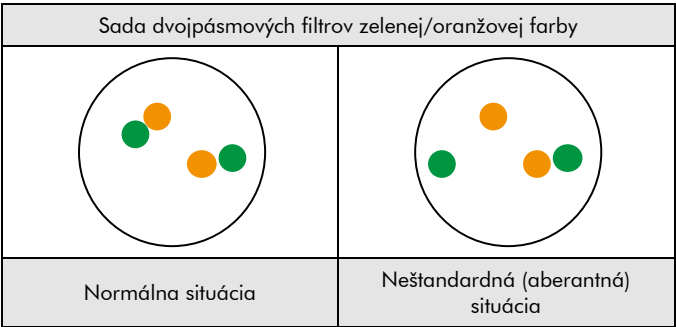
12. Interpretácia výsledkov

Pri použití vhodných súprav filtrov sa hybridizačné signály sondy zobrazujú zelené (distálne od oblasti bodu zlomu MYC) a oranžové (proximálne od oblasti bodu zlomu MYC).

**Normálna situácia:** V interfázach normálnych buniek alebo buniek bez translokácie zahŕňajúcej oblasť génu MYC sa objavujú dva zeleno/oranžové fúzne signály (pozri obr. 2).

**Neštandardná situácia:** Jedna oblasť génu MYC ovplyvnená translokáciou je označená jedným samostatným zeleným signálom a jedným samostatným oranžovým signálom (pozri obr. 2).

*Prekrývajúce sa signály sa môžu zobrazovať ako žlté signály.*



Obr. 2: Očakávané výsledky v normálnych a aberantných jadrách

Genomické aberácie spôsobené malými deléciami, duplikáciami alebo inverziami môžu mať za následok nenápadné signálne vzory. Alternatívne body zlomu, pozorované najmä pri variantných translokáciách MYC t(8;22) a t(2;8), môžu mať za následok odlišné vzory signálov, ako sú opísané vyššie, alebo falošne negatívne vzory signálov. Pozorne skontrolujte lokalizáciu sondy (pozri obr. 1). Neočakávané vzory signálu alebo výsledky by sa mali ďalej skúmať. V niektorých abnormálnych vzorkách možno pozorovať iné vzory signálov, ako sú opísané vyššie. Tieto neočakávané vzory signálov by mali byť ďalej preskúmané.

Upozornenie:

- Vzhľadom na dekonzenzovaný chromaín sa jednotlivé signály FISH môžu javiť ako malé zhľuky signálov. Preto by sa dva alebo tri signály rovnakej veľkosti, oddelené vzdialenosťou  $\leq 1$  priemer signálu, mali považovať za jeden signál.
- Nehodnotte prekrývajúce sa jadrá.
- Nepočítajte nadmerne strávené jadrá (rozpoznať podľa tmavých oblastí viditeľných vo vnútri jadier).
- Nepočítajte jadrá so silnou autofluorescenciou, ktorá bráni rozpoznaní signálu.
- Negatívny alebo nešpecifický výsledok môže byť spôsobený viacerými faktormi (pozri kapitolu 16 "Riešenie problémov").
- V záujme správnej interpretácie výsledkov musí používateľ tento výrobok pred použitím v diagnostických postupoch validovať podľa národných a/alebo medzinárodných smerníc.

13. Odporúčané postupy kontroly kvality

Na monitorovanie správneho fungovania spracovaných vzoriek a testovacích činidiel by mali byť ku každému testu pripojené interné a externé kontroly. Ak interné a/alebo externé kontroly nepreukážu vhodné zafarbenie, výsledky so vzorkami pacientov sa musia považovať za neplatné.

**Vnútorňá kontrola:** Nenádorové bunky vo vzorke, ktoré vykazujú normálny vzor signálu, napr. fibroblasty.

**Externé ovládanie:** Validované pozitívne a negatívne kontrolné vzorky.

14. Výkonnostné charakteristiky

14.1 Analytický výkon

Výkon sa hodnotil podľa návodu na použitie súpravy ZytoLight FISH Implementation Kit.

Analytická citlivosť:	100% (95% CI 98.5 – 100.0)
Analytická špecifickosť:	100% (95% CI 97.0 – 100.0)

14.2 Klinický výkon

Diagnostická senzitivita:	DLBCL: 53.33% (95% CI 78.2 – 91.2) vs. IHC BL: 90.22% (95% CI 82.2 – 95.4) vs. IHC
Diagnostická špecifita:	DLBCL: 95.79% (95% CI 78.2 – 91.2) vs. IHC

15. Likvidácia

Likvidácia činidiel sa musí vykonávať v súlade s miestnymi predpismi.

16. Riešenie problémov

Akákoľvek odchýlka od návodu na obsluhu môže viesť k horším výsledkom farbenia alebo k tomu, že sa farbenie vôbec nevyskytne. Niektoré typy v tejto časti sa vzťahujú len na použitie súpravy ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit. Ďalšie informácie nájdete na stránke [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com).

Slabé signály alebo žiadne signály

Možná príčina	Akcia
Vzorka buniek alebo tkaniva nie je správne fixovaná	Optimalizujte čas fixácie a fixačné činidlo alebo použite postfixačný krok, ako je opísané v "postupe analýzy" v príručke <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</u>
Predbežná proteolytická úprava nebola vykonaná správne	Optimalizujte čas inkubácie pepsínu, v prípade potreby ho predĺžte alebo skráťte
Odparovanie sondy	Pri používaní hybridizéra je používanie vlhkých pásov/nádob naplnených vodou povinné. Pri používaní hybridizačnej pece je potrebné používať vlhkú komoru. Okrem toho by malo byť krycie sklo úplne utesnené, napr. pomocou Fixogumu, aby sa zabránilo vysychaniu vzorky počas hybridizácie
Použitie nevhodných súprav filtrov	Použite sady filtrov vhodné pre fluochrómy sondy. <i>Sady filtrov s trojpásmovou priepustnosťou poskytujú menej svetla v porovnaní so sadami filtrov s jedнопásmovou alebo dvojпásmovou priepustnosťou. V dôsledku toho sa signály pri použití týchto trojpásmových filtračných súprav môžu javiť slabšie</i>

Krízové hybridizačné signály; silné pozadie

Možná príčina	Akcia
Neúplné odparafinovanie	Používajte čerstvé roztoky; skontrolujte trvanie odparafinovania
Príliš silná proteolytická predúprava	Skrátenie inkubačného času pepsínu
Sklíčka pred hybridizáciou ochladiť na izbovú teplotu	Sklíčka rýchlo presuňte na teplotu 37 °C

**Zhoršená morfológia**

Možná příčina	Akcia
Vzorka buniek alebo tkaniva nebola správne fixovaná	Optimalizujte čas fixácie a fixačné činidlo alebo použite postfixačný krok, ako je opísané v "postupe analýzy" v príručke <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</u>
Predbežná proteolytická úprava nebola vykonaná správne	Optimalizujte čas inkubácie pepsínu, v prípade potreby ho skráťte
Nedostatočné vysušenie pred aplikáciou sondy	Predĺženie sušenia na vzduchu

**Prekrývajúce sa jadrá**

Možná příčina	Akcia
Nevhodná hrúbka tkanivových rezov	Pripravte 2-4 µm rezy mikrotomom

**Vzorka vypláva zo sklíčka**

Možná příčina	Akcia
Príliš silná proteolytická predúprava	Skrátiť čas inkubácie pepsínu

**Slabá protifarbivá**

Možná příčina	Akcia
Nízko koncentrovaný roztok DAPI	Namiesto toho použite <u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (č. produktu MT-0008-0.8)
Príliš krátky čas inkubácie DAPI	Úprava času inkubácie DAPI

**17. Literatúra**

- Chisholm KM, et al. (2015). *Am J Surg Pathol.* 39(3):294-303.
- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Mundo L, et al. (2019). *Blood Cancer J.* 20;9(12):91
- Wilkinson DG: In Situ Hybridization, A Practical Approach, *Oxford University Press* (1992) ISBN 0 19 963327 4.

**18. Revízia**
[www.zytovision.com](http://www.zytovision.com)

Najnovší návod na použitie, ako aj návod na použitie v rôznych jazykoch nájdete na stránke [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com).

Naši odborníci sú pripravení odpovedať na vaše otázky.

Obráťte sa na [help@zytovision.com](mailto:help@zytovision.com)

Prehľad o bezpečnosti a výkonnosti nájdete na [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com).



ZytoVision GmbH

Fischkai 1

27572 Bremerhaven/ Nemecko

Telefón: +49 471 4832-300

Fax: +49 471 4832-509

[www.zytovision.com](http://www.zytovision.com)

E-mail: [info@zytovision.com](mailto:info@zytovision.com)

**Ochranné známky:**

ZytoVision® a ZytoLight® sú ochranné známky spoločnosti ZytoVision GmbH.