



ZytoLight

SPEC IGH Dual Color Break Apart Probe

REF	Z-2110-50	5 (0,05 ml)
REF	Z-2110-200	20 (0,2 ml)

Na kvalitatívnu detekciu translokácií zahŕňajúcich ľudský IGH lokus na 14q32.33 pomocou fluorescenčnej *in situ* hybridizácie (FISH)

4250380P157R7



Diagnostická zdravotnícka pomôcka in vitro

podľa IVDR (EÚ) 2017/746

1. Zamýšľaný účel

Sonda ZytoLight SPEC IGH Dual Color Break Apart Probe (PL67) je určená na kvalitatívnu detekciu translokácií zahŕňajúcich ľudský lokus IGH na 14q32.33 v cytologických vzorkách alebo vzorkách fixovaných formalínom a vložených do parafrínu 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/ľudského genetika.

Sonda sa má používať ako pomôcka pri diferenciálnej diagnostike rôznych druhov rakoviny a terapeutické opatrenia by sa nemali začínať len na základe výsledku testu.

2. Princíp testu

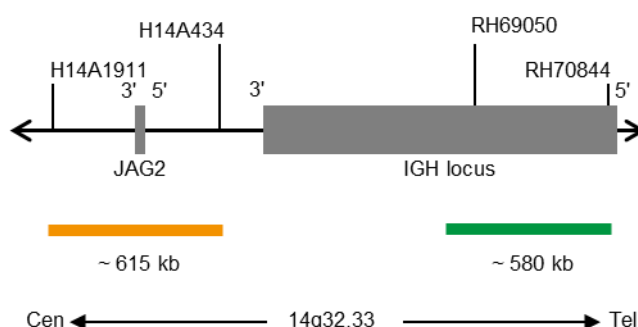
Technika fluorescenčnej *in situ* hybridizácie (FISH) umožňuje detekciu a vizualizáciu špecifických sekvencií nukleových kyselín v bunkových preparátoch. Fluorescenčne označené fragmenty DNA, tzv. sondy FISH, a ich komplementárne cieľové reťazce DNA v preparátoch sa počas hybridizácie spoločne kodenaturujú 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 filtrami špecifickými pre fluorochrómy, ktorými boli fragmenty sond FISH priamo označené.

3. Poskytnuté činidlá

ZytoLight SPEC IGH 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 14q32.33* (chr14:106,690,778-107,268,412) vzdialenú od oblasti zlomu IGH (pozri obr. 1).
- ZyOrange (excitácia 547 nm/emisia 572 nm) značené polynukleotidy (~4,5 ng/μl), ktoré sú zamerané na sekvencie mapujúce oblasť 11q21* (chr11:95,296,828-95,668,215) 14q32.33* (chr14:105,296,741-105,909,611) v blízkosti oblasti zlomu IGH (pozri obr. 1).
- Hybridizačný pufer na báze formamidu

*podľa Human Genome Assembly GRCh37/hg19



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

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

- Z-2110-50: 0,05 ml (5 reakcií po 10 μl)
- Z-2110-200: 0,2 ml (20 reakcií po 10 μl)

4. Požadované, ale neposkytované materiály

- Pozitívne a negatívne kontrolné vzorky
- Hybridizér alebo horúca platnička
- Hybridizér alebo vlhká 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 sklíčka (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Gumové lepidlo, napr. Fixogum Rubber Cement (č. E-4005-50/-125) alebo podobné
- 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 sklíčka, 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 sklíčka, 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/striekanie.
P280	Používajte ochranné rukavice/ochranný odev/ochranu očí/ochranu tváre.
P308+P313	Ak je vystavená alebo znepokojená: Vyhľadajte lekársku pomoc/opatrenie.
P405	Obchod je uzamknutý.

7. Obmedzenia

- Na diagnostické použitie *in vitro*.
- Len na profesionálne použitie.
- Len na neautomatizované použitie.
- Analytickú normálnu cut-off hranicu pre abnormálny vzor signálu, ktorý vás zaujíma, by mal stanoviť kvalifikovaný patológ/humánny genetik.
- 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 nepravidlostí 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 rozpoznaniu 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

Pripravte vzorky podľa návodu na použitie príslušnej súpravy ZytoVision.

10. Prípravné ošetrovanie 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 liekovky premiešajte vortexovaním a krátko scentrifugujte.

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 (odparaťovanie, 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 gumový cement (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.

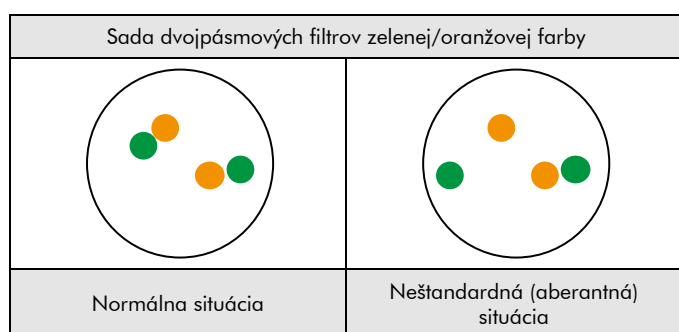
12. Interpretácia výsledkov

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

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

Neštandardná situácia: Jeden lokus IGH ovplyvnený translokáciou je označený 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 aberrantných jadrách

Genomické aberácie spôsobené malými deléciami, duplikáciami alebo inverziami môžu mať za následok nenápadné signálne vzory.

Vzhľadom na homologické sekvencie IGH v 16p11.2 a 15q11.2 možno pozorovať slabé krížové hybridizácie.

Iné aberrantné vzory signálov môžu byť spôsobené úplnou alebo čiastočnou stratou génov IGHC alebo IGHV, ako aj kryptickými inzerciami do iných lokusov. Okrem toho chýbajúce alebo oslabené zelené signály na jednej alebo oboch alelách môžu predstavovať delécie génov IGHV, ktoré sú výsledkom normálnej somatickej V-D-J rekombinácie.

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 dekonenzovaný chromaín sa jednotlivé signály FISH môžu javiť ako malé zhľuky signálov. Preto by sa dva alebo tri signály rovnakej veľkosti, oddelené vzdialenosťou ≤ 1 priemer signálu, mali považovať za jeden signál.
- Nehodnoťte prekrývajúce sa jadrá.
- Nepočítajte nadmerne natrávené jadrá (rozpoznatelné 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.

Vnútna 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 Vzorky na cytológiu

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

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

14.2 Vzorky FFPE

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

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

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.

Slabé signály alebo žiadne signály

Možná příčina	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 hybridizéru 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>

Krížové hybridizačné signály ; silné pozadie

Možná příčina	Akcia
Neúplné odparafinovanie	Používajte čerstvé roztoky; skontrolujte trvanie odparafinovania

Príliš silná proteolytická predúprava	Skrátenie inkubačného času pepsínu
Sklíčka pred hybridizáciou ochladené na izbovú teplotu	Sklíčka rýchlo presuňte na teplotu 37 °C

Zhoršená morfológia

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

Vzorka vypláva zo sklíčka

Možná príčina	Akcia
Príliš silná proteolytická predúprava	Skrátiť čas inkubácie pepsínu

Slabé kontrastné farbenie

Možná príčina	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

- 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.
- 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. Revízia
www.zytovision.com

Najnovší návod na použitie, ako aj návod na použitie v rôznych jazykoch nájdete na stránke www.zytovision.com.

Naši odborníci sú pripravení odpovedať na vaše otázky.

Obráťte sa na help@zytovision.com

Prehľad o bezpečnosti a výkonnosti nájdete na www.zytovision.com.



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

Ochranné známky:

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