



ZytoLight SPEC MDM2/CEN 12 Dual Color Probe

REF Z-2013-50 ∇_{Σ} 5 (0,05 ml)

REF Z-2013-200 ∇_{Σ} 20 (0,2 ml)

Az emberi MDM2 génamplifikációk és a 12. kromoszóma alfa-szatelliték minőségi kimutatására fluoreszcens *in situ* hibridizációval (FISH)

4250380P051QN



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

1. Rendeltetészerű cél

A ZytoLight SPEC MDM2/CEN 12 Dual Color Probe (PL18) a humán MDM2 gént érintő amplifikációk minőségi kimutatására, valamint a 12. kromoszóma alfa-szatelliték kimutatására szolgál formálisan rögzített, paraffinba ágyazott mintákban, mint például atípusos lipomatózus tumor/jól differenciált liposzarkóma (ALT/WDLPS) és dedifferenciált liposzarkóma (DDLPS), fluoreszcens *in situ* hibridizációval (FISH). A sonda a ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Prod. No. Z-2028-5/-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 az ALT/WDLPS és a DDLPS differenciáldiagnózisának segédeszközeként szolgál, és terápiás intézkedéseket nem szabad kizárólag a teszteredmény alapján kezdeményezni.

2. A vizsgálat elve

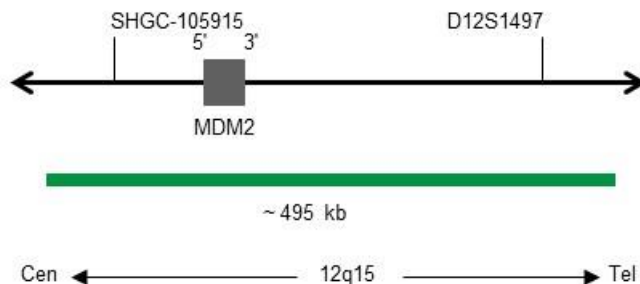
A fluoreszcens *in situ* hibridizációs (FISH) technika lehetővé teszi specifikus nukleinsav-szekvenciák kimutatását és vizualizálását sejt készítményekben. A fluoreszcensen jelölt DNS-törzések, az úgynevezett FISH-szondák és a preparátumokban lévő komplementer cél-DNS-szálak együttesen denaturálódnak, majd a hibridizáció során hagyják, hogy a DNS-törzések 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 fluorokromokra, amelyekkel a FISH-szondafragmentumokat közvetlenül jelölték.

3. Rendelkezésre bocsátott reagensek

A ZytoLight SPEC MDM2/CEN 12 Dual Color Probe a következőkből áll:

- ZyGreen (gerjesztés 503 nm/emisszió 528 nm) jelölt polinukleotidok (~10,0 ng/μl), amelyek a 12q15* (chr12:69,071,802-69,565,421), az MDM2 génterületet tartalmazó szekvenciákat célozzák meg (lásd az 1. ábrát).
- ZyOrange (gerjesztés 547 nm/emisszió 572 nm) jelölésű polinukleotidok (~1,5 ng/μl), amelyek a 12p11.1-q11 kromoszóma D12Z3 alfa-szatellit centromerikus régiójára specifikus, 12p11.1-q11 szekvenciákat célozzák (lásd az 1. ábrát).
- Formamid alapú hibridizációs puffer

*a Human Genome Assembly szerint GRCh37/hg19



1. ábra: SPEC MDM2 (nem méretarányos)

A ZytoLight SPEC MDM2/CEN 12 Dual Color Probe két méretben kapható:

- Z-2013-50: 0,05 ml (5 reakció, egyenként 10 μl)
- Z-2013-200: 0,2 ml (20 reakció, egyenként 10 μl)

4. Szükséges, de nem biztosított anyagok

- ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Prod. No. Z-2028-5/-20)
- Pozitív és negatív kontrollminták
- Mikroszkópos tárgylemezek, pozitív töltésű
- Vizfürdő (37 °C, 98 °C)
- Hibridizátor 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 lejáta után!
- Ez a termék (kis koncentrációban és mennyiségben) egészségre káros és potenciálisan fertőző anyagokat tartalmaz. Kerülje a reagensekkel való közvetlen érintkezést. Tegyén 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 hatóságnak!
- Ha a reagensek bőrrel érintkeznek, azonnal öblítse le a bőrt bőszéges 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

| | |
|-----------|--|
| 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 kitétt vagy érintett: Kérjen orvosi tanácsot/megfigyelést. |
| P405 | Elzárva tárolandó |

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/humángenetikus 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/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 kiváltó anyagok

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

A következő fixálószerrek nem kompatibilisek a FISH-vel:

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

9. A minták előkészítése

Készítse elő a mintákat a ZytoLight FISH-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 ZytoLight FISH-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 fedőlappot.
- 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. 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, ellenfestés, fluoreszcens mikroszkópia) a ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit használati utasítása szerint.

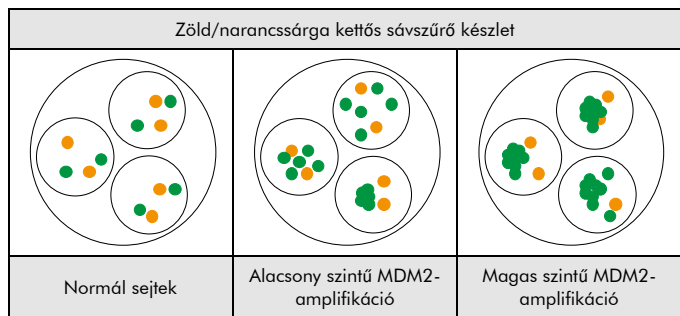
12. Az eredmények értelmezése

Megfelelő szűrőkészletek használatával a próba hibridizációs jelei zöld (MDM2 génterület) és narancssárga (CEN 12) színűek.

Normál jelrendszer: A normál sejtek vagy az MDM2 gén régióját érintő amplifikáció nélküli sejtek interfázisaiban két zöld és két narancssárga jel jelenik meg (lásd a 2. ábrát).

Rendellenes jelrendszer: Az MDM2 gén régiójának amplifikációjával rendelkező sejtekben a zöld jelek vagy zöld jelklaszterek megnövekedett száma figyelhető meg (lásd a 2. ábrát).

Az egymást átfedő jelek sárga jelzésként jelenhetnek meg.



2. ábra: Várható eredmények normális és rendellenes 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 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

14.1 Analitikai teljesítmény

A teljesítményt a ZytoLight FISH-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: | ALT/WDLPS: 93.48% (95% CI 91.3 – 98.0) vs. szövettani értékelés 100% (95% CI 91.3 – 100.0) vs. szövettani adatok 100% (95% CI 76.8 – 100.0) vs. szövettani vizsgálat DDLPS: 100% (95% CI 91.3 – 100.0) vs. szövettani adatok 100% vs. IHC 66.67% (95% CI 66.1 – 99.8) a sejtmentes DNS szekvenálása a teljes genom szekvenálásával szemben 94.74% (95% CI 94.3 – 97.6) vs. szövettani vizsgálat |
| Diagnosztikai specifikitás | ALT/WDLPS: 97.67% (95% CI 91.3 – 98.0) vs. szövettani értékelés 97.73% (95% CI 91.3 – 100.0) vs. szövettani adatok 100% (95% CI 76.8 – 100.0) vs. szövettani vizsgálat DDLPS: 97.73% (95% CI 91.3 – 100.0) vs. szövettani adatok 100% (95% CI 66.1 – 99.8) a sejtmentes DNS szekvenálása a teljes genom szekvenálásával szemben 100% (95% CI 94.3 – 97.6) vs. szövettani vizsgálat |

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 rögzített sejt- vagy szövetszövetminta | Optimalizálja a rögzítési időt és a fixálószer, vagy alkalmazzon posztfixálási lépést a <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</u> kézikönyvének "Assay procedure" részében leírtak szerint. |
| Nem megfelelően végzett proteolitikus előkezelés | Optimalizálja a pepszin inkubációs idejét, szükség esetén növelje vagy csökkentse azt. |
| Szonda párolgás | A hibridizáló használata esetén a nedves csikok/vízzel töltött tartályok használata kötelező. Hibridizáló kemence használata esetén a pára kamra 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 e háromsávos szűrőkészletek 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 sejt- vagy szövetmintát nem megfelelően rögzítették | Optimalizálja a rögzítési időt és a fixálószeret, vagy alkalmazzon poszt-fixálási lépést a ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit kézikönyvének "Assay procedure" részében leírtak szerint. |
| Nem megfelelően végzett proteolitikus előkezelés | Optimalizálja a pepszin inkubációs idejét, szükség esetén csökkentse azt. |
| Elégtelen szárítás a szonda felhelyezése előtt | A levegőn való szárítás idejének növelése |

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 DAPI/DuraTect-Solution (ultra) (Prod. No. MT-0008-0.8). |
| Túl rövid DAPI inkubációs idő | A DAPI inkubációs idő beállítása |

17. Irodalom

- Kammerer-Jacquet S-F, et al. (2017) *Hum Pathol.*
- Kashima T, et al. (2012) *Mod Pathol.*
- 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.

18. Felülvizsgálatwww.zytovision.com

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

Szakértőink készséggel válaszolnak kérdéseire.

Kérjük vegye fel velünk a kapcsolatot a helptech@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 ZytoLight® a ZytoVision GmbH védjegyei.