



## ZytoLight

### SPEC MYC/IGH Dual Color Dual Fusion Probe

REF	Z-2105-50	∇	5 (0.05 ml)
REF	Z-2105-200	∇	20 (0.2 ml)

A t(8;14)(q24.21;q32.3) transzlokáció kvalitatív kimutatása fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) módszerrel



*In vitro* diagnosztikai orvosi eszköz  
a 98/79 / EK EU irányelv szerint

## 1. Javasolt alkalmazás

A ZytoLight SPEC MYC/IGH Dual Color Dual Fusion Probe (PL62) a t(8;14)(q24.21;q32.3) transzlokáció kvalitatív kimutatására szolgál fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) módszerrel formalinnal fixált, paraffinba ágyazott minták alkalmazására. A próbát a ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Kat. szám Z-2028-5/-20) készlet reagenssel kombinációban ajánlott használni.

Az eredmények értelmezését a beteg klinikai kórtörténetével összevetve kell elvégezni képzett patológus további klinikopatológiai véleményének figyelembe vételével.

## 2. Klinikai jelentőség

A MYC proto-onkogén (MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor) a sejtek növekedéséhez és proliferációjához elengedhetetlen transzkripciósfaktort kódol és széleskörűen érintett a tumorigenezisben. A MYC gént magában foglaló transzlokációk a Burkitt limfóma jellegzetes citogenetikai eltéréseinek tekinthetők, de más típusú limfómákban is megtalálhatók. A MYC gén régió leggyakoribb transzlokációja a t(8;14)(q24.21;q32.3), amely a MYC gént az IgH (immunoglobulin nehéz lánc) lókuszt mellé helyezi. További MYC gént érintő transzlokációk a t(8;22)(q24.21;q11.2) és t(2;8)(11.2;q24.21), amelyek mindegyike a két immunoglobulin könnyű lánc lókuszt egyikét foglalja magában. Mindhárom transzlokáció esetén a MYC gén az egyik immunoglobulin lókuszt egy szabályozó elemének irányítása alá kerül, s mindez a MYC fehérje konstitutív túltermelését eredményezi. A MYC-specifikus átrendeződések kimutatása a diagnosztikus folyamat és kezelés kritikus része, hisz azonosítja azokat a betegeket, akik a BL kezelésében fokozott terápiás előnyre számíthatnak. Az immunhisztokémiával korrelációt mutató fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) kritikus jelentőségű a beteg kezelése szempontjából, és széleskörűen alkalmazott módszert jelent.

## 3. Vizsgálati módszer

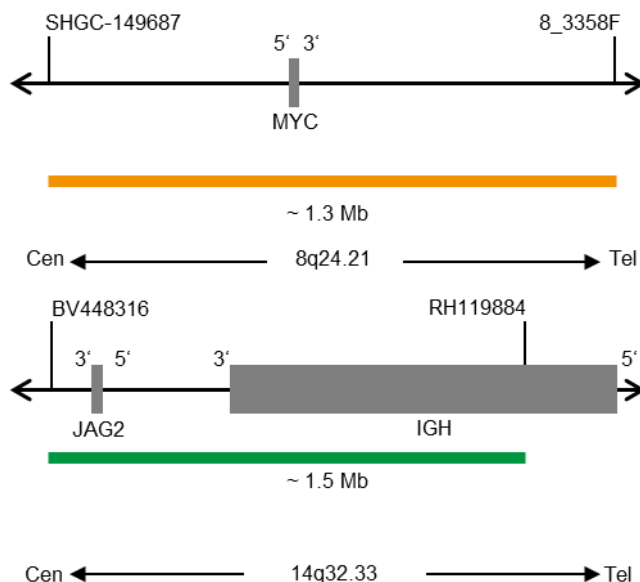
A fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) technika lehetővé teszi sejt preparátumok specifikus nukleinsav szekvenciáinak kimutatását és megjelenítését. A fluoreszcens jelölt DNS fragmensek, úgynevezett FISH próbák vagy szondák és azok komplementer cél-DNS szárai a készítményekben együttesen denaturálódnak, majd a hibridizálás során összekapcsolódnak. Ezután a nem specifikus és a nem kötődött próba darabok magas stringenciájú mosási lépésekkel kerülnek eltávolításra. A DNS DAPI háttérfestését követően a hibridizált szonda fragmentumok a közvetlenül rájuk kapcsolt specifikus fluorokrómmolekulák segítségével excitációs és emissziós szűrőkkel felszerelt fluoreszcens mikroszkóppal vizualizálhatók.

## 4. Mellékelt reagensok

A ZytoLight SPEC MYC/IGH Dual Color Dual Fusion Probe készlet tartalmazza:

- ZyGreen (gerjesztő hullámhossz 503 nm/kibocsátási hullámhossz 528 nm) zöld festékkel megjelölt polinukleotidok (~10.0 ng/μl), amelyek cél szekvenciái az IGH lókuszt magába foglaló 14q32.33\* (chr14:105,462,169-106,995,000) kromoszóma régióban helyezkednek el (lásd 1. ábra).
- ZyOrange (gerjesztő hullámhossz 547 nm/kibocsátási hullámhossz 572 nm) narancssárga festékkel megjelölt polinukleotidok (~4.5 ng/μl), amelyek cél szekvenciái az MYC gén régióját magába foglaló 8q24.21\* (chr8:128,171,178-129,517,468) kromoszóma régióban helyezkednek el (lásd 1. ábra).
- Formamid alapú hibridizációs puffer

\*a Human Genome Assembly szerint GRCh37/hg19



1. ábra: Fent: SPEC MYC Próba térkép; Lent: SPEC IGH Próba térkép (nem méretarányos)

A ZytoLight SPEC MYC/IGH Dual Color Dual Fusion Probe készlet két kiegészítésben elérhető:

- Z-2105-50: 0.05 ml (5 reakció egyenként 10 μl térfogattal)
- Z-2105-200: 0.2 ml (20 reakció egyenként 10 μl térfogattal)

## 5. Szükséges, de nem biztosított anyagok

- ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Kat. szám Z-2028-5/-20)
- Pozitív és negatív kontrol minták
- Pozitívra töltött tárgylemezek
- Vízfürdő (37°C, 98°C)
- Hibridizációs kamra vagy fűtőblokk
- Hibridizációs pára kamra
- Szabályozható pipetták (10 μl, 25 μl)
- Festőedények vagy fürdők
- Időzítő
- Kalibrált hőmérő
- Etanol
- Xilol

- Desztillált vagy ionmentesített víz
- Fedőlemez (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Gumicement pl., Fixogum Rubber Cement (Kat. szám. E-4005-50/-125) vagy hasonló ragasztó
- Megfelelően karbantartott fluoreszcens mikroszkóp (400-1000x)
- Fluoreszcens mikroszkópiához elfogadott immerziós olaj
- Megfelelő fluoreszcencia szűrő készletek

## 6. Tárolás és kezelés

Álló helyzetben 2-8°C között fénytől védve tárolandó. Erős fényt elkerülve használatos. Felhasználást követően azonnal a tárolási feltételek alkalmazandók. Ne használja a reagenseket a címkén feltüntetett lejárati időn túl. A termék a címkén feltüntetett lejárati ideig őrzi meg stabilitását megfelelően kezelés mellett.

## 7. Figyelmeztetések és óvintézkedések

- Használat előtt olvassa el a használati utasítást!
- Ne használja a reagenseket a lejárati idő letelte után!
- Ez a termék olyan anyagokat tartalmaz (kis koncentrációban és térfogatban), amelyek az egészségre károsak és potenciálisan fertőzők. Kerülje a közvetlen érintkezést a reagensekkel. Tegyen megfelelő védőintézkedéseket (használjon eldobható kesztyűt, védőszemüveget és laboratóriumi öltözetet)!
- Ha a reagens bőrrel érintkezik, azonnal öblítse le bő vízzel!
- Foglalkozásszerű felhasználók részére igény esetén anyagbiztonsági adatlapot biztosítunk.
- A reagens nem újra felhasználható.
- A minták keresztszennyeződését kerülni kell, mert ez hibás eredményhez vezethet.
- A próbát ne tegye ki fénynek, különösen hosszabb ideig tartó erős fénynek, azaz minden lépést, ha lehetséges, sötétben és/vagy fényálló tartókban hajtsa végre!

### Veszélyek és óvintézkedések:

A legfőbb veszélyt jelentő összetevő a formamid.



### Veszély

H351	Feltehetően rákot okoz.
H360FD	Károsíthatja a termékenységet. Károsíthatja a születendő gyermeket.
H373	Ismétlődő vagy hosszabb expozíció esetén károsíthatja a szerveket.
P201	Használat előtt ismerje meg az anyagra vonatkozó különleges utasításokat.
P202	Ne használja addig, amíg az összes biztonsági óvintézkedést el nem olvasta és meg nem értette.
P260	A por/füst/gáz/köd/gőzök/permet belélegzése tilos.
P280	Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő használata kötelező.
P308+P313	Expozíció vagy annak gyanúja esetén: orvosi ellátást kell kérni.
P405	Elzárva tárolandó.

## 8. Korlátozások

- *In vitro* diagnosztikai használatra.
- Csak szakképzett felhasználók részére.
- A pozitív reakció meglétének vagy hiányának klinikai értelmezését a klinikai kórtörténet, morfológia, egyéb hisztopatológiai kritériumok, valamint más diagnosztikai vizsgálatok függvényében végezze. A szakképzett patológus felelőssége a reakciók elkészítéséhez szükséges FISH szondák, reagens, diagnosztikai panelek és módszerek megfelelő ismerete. A FISH festést egy hitelesített, szükséges engedélyekkel rendelkező laboratóriumban kell végezni, patológus felügyelete mellett, aki felelős a festett lemezek áttekintéséért és a megfelelő pozitív és negatív kontrol reakciók biztosításáért.

- A minta festése, különösen a jelintenzitás és a háttérfestés erőssége a festést megelőző mintakezeléstől és feldolgozástól függ. A minta nem megfelelő fixálása, fagyasztása, felolvasztása, mosása, szárítása, melegítése, metszése vagy más mintákkal és folyadékokkal való keresztszennyezése műtermékek vagy hamis eredmények kialakulásához vezethet. Ellentmondó eredmények eredhetnek a minta rögzítési és beágyazási eltéréseiből, valamint magában a mintában rejlő egyenlőtlen feltételekből.

- A szondát csak a 4. "Mellékelt reagensek" fejezetben leírt lókuszkok kimutatásához szabad használni.

- A reagens teljesítménye a jelen használati utasításban leírt eljárások alkalmazásával került validálásra. Ezen eljárások módosítása a teljesítmény megváltozását okozhatja, amit a felhasználónak validálnia szükséges.

## 9. Interferenciát kiváltó anyagok

A mintában jelen lévő vörösvértestek autofluoreszcenciát mutathatnak akadályozva a megfelelő jelfelismerést.

Az alábbi fixálószerke nem alkalmazhatóak FISH reakcióhoz:

- Bouin fixáló
- B5 fixáló
- Savas fixálószerke (pl. pikrinsav)
- Zenker fixáló
- Alkohokok (önmagukban használva)
- Híganyklorid
- Formaldehid/cink fixáló
- Hollandé fixáló
- Nem pufferolt formalin

## 10. A minták előkészítése

Ajánlások:

- Fixálja a mintát 10%-os semlegesre pufferelt formalinban 24 órán át szobahőmérsékleten (18-25°C-on).
- A minta mérete  $\leq 0.5 \text{ cm}^3$  legyen.
- Prémium minőségű paraffint használjon.
- A beágyazást 65°C alatti hőmérsékleten hajtsa végre.
- 2-4  $\mu\text{m}$  vastagságú metszeteket készítsen.
- Pozitívan töltött tárgylemezeket használjon.
- Fixálja a metszetet a lemezre 2-16 órán át 50-60°C-os hőmérsékleten.

## 11. A reagens előkészítése

A termék azonnal felhasználható (RTU). Nem szükséges feloldani, átkeverni vagy tovább hígítani. Használat előtt hozza szobahőmérsékletre (18-25°C) fénytől védve. Mielőtt kinyitná a próbát tartalmazó fiolát vortexeléssel keverje össze és rövid ideig centrifugálja.

## 12. A vizsgálati eljárás

### A minta előkezelése

A minta előkezelését (paraffin-mentesítés, proteolitikus emésztés) a ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit készlet használati utasításának megfelelően végezze.

### Denaturáció és hibridizáció

1. Pipettázzon 10  $\mu\text{l}$  próbát az előkezelt minták megfelelő területeire.
2. Helyezzen fel egy 22 mm x 22 mm-es üveg fedőlemez a próbakeverékre (akadályozza meg a légbuborékok képződését) és tömítéssel zárja le a fedőlemez.

*Javasoljuk, hogy gumicementet (pl. Fixogum-ot) használjon a tömítéshez.*

3. Helyezze be a tárgylemezeket fűtőblokkba vagy hibridizációs kamrába és denaturálja a mintákat 75°C-on 10 percen át.
4. Helyezze a tárgylemezeket hibridizációs páramrába és a hibridizációhoz inkubálja őket 37°C-on egy éjszakán át.

*Lényeges, hogy a minták ne száradjanak ki a hibridizációs lépés folyamán.*

### Poszt-hibridizáció

Végezzen poszt-hibridizációs eljárást (mosást, háttérfestést és fluoreszcens mikroszkópos értékelést) a ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit készlet használati utasításának megfelelően.

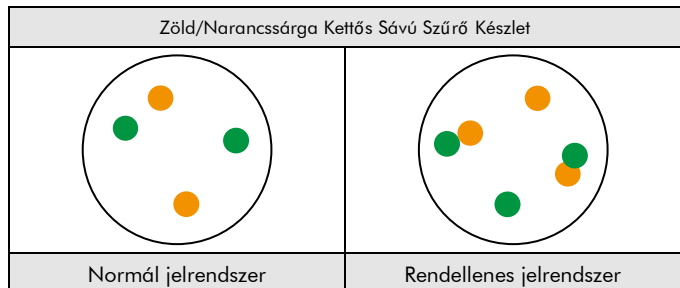
### 13. Az eredmények kiértékelése

Megfelelő fluoreszcencia szűrő készletek használatával a próbák hibridizációs jelei zöld (IGH gén régió) és narancssárga (MYC gén régió) színűnek látszódnak.

**Normál jelrendszer:** Normál sejtek transzlokáció nélküli, interfázisos sejtmagjaiban két zöld/narancssárga színű fúziós jel látható (lásd 2. ábra).

**Rendellenes jelrendszer:** A génfúziót egy külön narancssárga jel, egy külön zöld jel és két narancssárga/zöld fúziós jel mutatja (lásd 2. ábra).

*Az egymással átfedő jelek citromsárgának tűnhetnek.*



2. ábra: Várt eredmények normál és rendellenes sejtmagok esetén

A 16p11.2 és a 15q11.2 régiókkal az IGH-homológ szekvenciáik miatt enyhe kereszt-hibridizációk figyelhetők meg.

Néhány abnormális mintában a fent leírt két típustól eltérő jelmintázat-eloszlás figyelhető meg, mely egyéb variáns génátrendeződésre utal. Ezen nem várt szignál mintázatok további vizsgálatokat igényelhetnek.

#### Kérjük, vegye figyelembe:

- A dekoncentrált kromatinszerkezet következtében egyes FISH jelek kis szignál klaszterekként jelentkezhetnek. Így kettő vagy három egyforma méretű szignál egymástól  $\leq 1$  szignál átmérő távolsággal elválasztva egy szignálnak számolandó.
- Ne értékeljen egymással átfedésben levő sejtmagokat.
- Ne számolja a túlemésztett sejtmagokat (amelyek a sejtmagon belüli sötét területek alapján ismerhetők fel).
- Ne számolja az erős autofluoreszcenciával rendelkező sejtmagokat, ami a jelek felismerését gátolhatja.
- Negatív vagy nem specifikus eredményt számos tényező kiválthat (lásd a 17. fejezetet).
- Az eredmények helyes interpretálása érdekében a terméket a diagnosztikai eljárásokban történő felhasználás előtt a felhasználónak validálnia kell a nemzeti és/vagy nemzetközi iránymutatások szerint.

### 14. Ajánlott minőségellenőrzési eljárások

A feldolgozott minták és a vizsgálati reagensek pontos hatékonyságának felmérése érdekében minden vizsgálathoz belső és külső kontrol festéseket kell végezni. Amennyiben a belső és/vagy külső pozitív kontrol reakciók nem mutatnak megfelelő festődést, akkor a beteg vizsgált mintájának eredményét érvénytelennek kell tekinteni.

**Belső kontrol:** Az elemzett mintában lévő nem neoplasztikus sejtek (pl. fibroblasztok) normál szignál mintázatot mutatnak.

**Külső kontrol:** Validált pozitív és negatív kontrol minták.

### 15. Teljesítményjellemzők

**Pontosság:** A próba hibridizációjának helyét normál férfi kariotípusú minták metafázis készítményein határozták meg. Minden vizsgált mintában a próba kizárólag a várt lókuszhomológokhoz hibridizálódott. Nem figyeltek meg további jeleket vagy kereszt-hibridizációt. Így a pontosság 100%-nak számítható.

**Analitikai érzékenység:** Az analitikai érzékenység meghatározásához a próba működését normál férfi kariotípusú minták metafázis készítményein határozták meg. Valamennyi sejtmag a várt normális jelmintázatot mutatta az összes vizsgált mintában. Ezért az analitikai érzékenységet 100%-osnak becsülték.

**Analitikai specificitás:** Az analitikai specificitás meghatározásához a próba működését normál férfi kariotípusú minták metafázis készítményein határozták meg. Minden vizsgált mintában a próbák csak a várt cél lókuszhomológokhoz hibridizálódtak, más lókuszhomológokhoz nem kötődtek. Ezért az analitikai specificitás 100%-nak számítható.

### 16. Hulladékkezelés

A reagensek hulladékként történő elhelyezését az országos szabályozásokkal összhangban kell elvégezni.

### 17. Hibaelhárítás

A használati utasítástól való bármilyen eltérés gyengébb vagy akár teljesen negatív festési eredményekhez vezethet.

#### Gyenge jel vagy nincs jel

Valószínűsíthető ok	Javasolt teendő
A célszekvencia nem kimutatható	Használjon megfelelő kontrolokat
A sejt- vagy szövetminta nem megfelelően fixálódott	Optimalizálja a fixálás idejét és a fixálószeret vagy alkalmazzon utófixálási lépést a <a href="#">ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</a> kézikönyvének "vizsgálati eljárásában" leírtak szerint
A melegítés előkezelési, az emésztési, a denaturációs, a hibridizációs vagy a magas stringenciájú mosás hőmérséklete nem megfelelő	Kalibrált hőmérővel ellenőrizze a használt műszaki berendezések hőmérsékletét
Nem megfelelő proteolitikus előkezelés	Optimalizálja a pepszines emésztés inkubációs idejét, szükség esetén növelje vagy csökkentse azt
A próbakeverék párolgása	Hibridizációs pára kamra használata esetén a nedvesített csíkok/vízrel töltött tartályok használata kötelező. Hibridizációs fűtőblokk használata esetén gondoskodjon megfelelő páratartalomról. Ezenkívül a fedőlemez teljesen le kell zárni, például Fixogum ragasztóval, a minta kiszáradását a hibridizáció során elkerülendő
A magas stringenciájú mosópuffer koncentrációja túl alacsony	Ellenőrizze a magas stringenciájú mosópuffer koncentrációját
Régi dehidratáló oldatok	Készítsen friss dehidratáló oldatokat
A fluoreszcens mikroszkóp nem működik megfelelően	Ellenőrizze a mikroszkópot
Nem megfelelő szűrőkészletet használ	Használjon a fluorokrómoknak megfelelő szűrőkészleteket. <i>A hármas szűrő szett készletek kevesebb fényt biztosítanak, mint a mono- vagy kettős szűrő k. Ennek következtében a jelek a hármas szűrő szett készlet használatával gyengébbek lehetnek</i>
A próbák/fluorokrómok fény által károsodhattak	A hibridizációt és a mosási lépéseket sötétben végezze

#### Keresztreakáló fluoreszcens jelek; magas háttérzaj

Valószínűsíthető ok	Javasolt teendő
A paraffin-mentesítés nem megfelelő	Használjon friss oldatokat; ellenőrizze a paraffin-mentesítés időtartamát
Túl erős proteolitikus előkezelés	Csökkentse a pepszines inkubáció idejét

Túlságosan nagy a próba mennyisége az adott területre	Csökkentse a próba mennyiségét a hibridizációs terület arányához mérten, cseppenként ossza szét a próbát elkerülve a túlkonzentrálódást
A tárgylemezek szobahőmérsékletűre hűltek a hibridizációt megelőzőleg	Tegye a tárgylemezeket mielőbb 37°C-ra
A magas stringenciájú mosópuffer koncentrációja túl magas	Ellenőrizze a magas stringenciájú mosópuffer koncentrációját
A hibridizációt követő mosási lépés hőmérséklete túl alacsony	Ellenőrizze a hőmérsékletet; szükség esetén emelje azt
A minták kiszáradnak az egyes inkubációs lépések között	A fedőlemezek leragasztásával akadályozza meg a kiszáradást és az inkubációt nedvesített körülmények között végezze

**Károsodott szöveti morfológia**

Valószínűsíthető ok	Javasolt teendő
A sejt- vagy szövetminta nem megfelelően fixálódott	Optimalizálja a fixálás idejét és a fixálószerrel vagy alkalmazzon utófixálási lépést a <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</u> kézikönyvének "vizsgálati eljárásában" leírtak szerint
Nem megfelelő proteolitikus előkezelés	Optimalizálja a pepszines emésztés inkubációs idejét, szükség esetén növelje vagy csökkentse azt
A minta elégtelen száradása a próba alkalmazása előtt	Növelje a levegőn történő száradás idejét

**Átfedő sejtmagok**

Valószínűsíthető ok	Javasolt teendő
A metszetek vastagsága nem megfelelő	Készítsen 2-4 µm vastagságú metszeteket

**A metszet leúszik a tárgylemezről**

Valószínűsíthető ok	Javasolt teendő
A tárgylemez bevonata nem megfelelő	Használjon megfelelő tárgylemezeket
Túl erős proteolitikus előkezelés	Csökkentse a pepszines emésztés inkubációs idejét

**Gyenge háttérfestés**

Valószínűsíthető ok	Javasolt teendő
Alacsony koncentraciójú DAPI oldat	Használja a <u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (Kat.szám MT-0008-0.8) terméket
A DAPI festés inkubációs ideje túl rövid	Állítsa be megfelelően a DAPI festés inkubációs idejét

**18. Hivatkozások**

- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- May P, et al. (2010) *Cancer Genet Cytogenet* 198: 71-5.
- Perkins A & Friedberg J (2008) *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2008: 341-8.
- Veronese ML, et al. (1995) *Blood* 85: 2132-8.
- Wilkinson DG: *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.

Szakembereink készséggel válaszolnak kérdéseikre.

Vegye fel velünk a kapcsolatot a [help@zytovision.com](mailto:help@zytovision.com) címen.



ZytoVision GmbH  
Fischkai 1  
27572 Bremerhaven/ Németország  
Phone: +49 471 4832-300  
Fax: +49 471 4832-509  
[www.zytovision.com](http://www.zytovision.com)  
Email: [info@zytovision.com](mailto:info@zytovision.com)

**Védjegy:**

A ZytoVision® és a ZytoLight® a ZytoVision GmbH védjegyei.