



## ZytoLight SPEC IGH Dual Color Break Apart Probe

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

A 14q32.33-as humán IGH-lokuszt érintő transzlokációk minőségi kimutatására fluoreszcens *in situ* hibridizációval (FISH)

4250380P157R7



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

### 1. Rendeltetészerű cél

A ZytoLight SPEC IGH Dual Color Break Apart Probe (PL67) a 14q32.33-as humán IGH lokuszt érintő transzlokációk minőségi kimutatására szolgál citológiai vagy formalinban rögzített, paraffinba ágyazott mintákban fluoreszcens *in situ* hibridizációval (FISH). A szondát a ZytoLight FISH Implementation Kits (Prod. No. Z-2028-5/-20, vagy Z-2099-20) kombinálva kell használni.

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 szonda a különböző rákos megbetegedések differenciáldiagnózisának segédeszközeként szolgál, és terápiás intézkedéseket nem szabad kizárólag a teszteredmény alapján kezdeményezni.

### 2. A vizsgálat elve

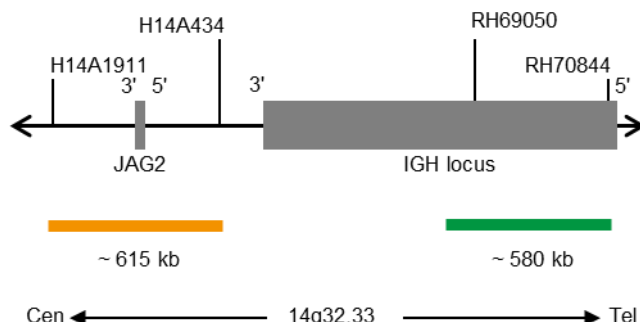
A fluoreszcens *in situ* hibridizációs (FISH) technika lehetővé teszi specifikus nukleinsav-szekvenciák kimutatását és vizualizálását sejtkezítményekben. A fluoreszcensen jelölt DNS-fragmentumok, az úgynevezett FISH-szondák és a preparátumokban lévő komplementer cél-DNS-szálak együttesen denaturálódnak, majd a hibridizáció során hagyják, hogy a DNS-ek 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 IGH Dual Color Break Apart Probe a következőkből áll:

- ZyGreen (gerjesztés 503 nm/emisszió 528 nm) jelölt polinukleotidok (~10 ng/μl), amelyek a 14q32.33\* (chr14:106,690,778-107,268,412), a IGH töréspont régiótól távoli szekvenciákat célozzák meg (lásd az 1. ábrát).
- ZyOrange (gerjesztés 547 nm/emisszió 572 nm) jelölt polinukleotidok (~4,5 ng/μl), amelyek a IGH töréspont régióhoz közeli 14q32.33\* (chr14:105,296,741-105,909,611) szekvenciákat célozzák meg (lásd az 1. ábrát).
- Formamid alapú hibridizációs puffer

\*a Human Genome Assembly szerint GRCh37/hg19



1. ábra: SPEC IGH (nem méretarányos)

A ZytoLight SPEC IGH Dual Color Break Apart Probe két méretben kapható:

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

### 4. Szükséges, de nem biztosított anyagok

- Pozitív és negatív kontrollminták
- Hibridizátor vagy főzőlap
- Hibridizáló vagy pára kamra a hibridizációs kemencében
- Időzítő
- Festőedények vagy fűrdők
- Kalibrált hőmérő
- Állítható pipetták (10 μl, 25 μl)
- Etanol vagy reagens alkohol
- 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

### Citológiai minták

- ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit (Prod. No. Z-2099-20)
- Mikroszkópos tárgylemezek, bevonat nélküli
- Vízfürdő (70 °C)
- 37%-os formaldehid, savmentes, vagy 10%-os formalin, semlegesen pufferelve
- 2x sóoldat-nátrium-citrát (SSC), pl. 20x SSC Solution (Prod. No. WB-0003-50)

### FFPE minták

- ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Prod. No. Z-2028-5/-20)
- Mikroszkópos tárgylemezek, pozitív töltésű
- Vízfürdő (37 °C, 98 °C)
- Xilol

### 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 lejáratási idő lejáratá után!
- Ez a termék (kis koncentrációban és mennyiségben) egészségre káros és potenciálisan fertőző anyagokat tartalmaz. Kerülje a reagensekkel való közvetlen érintkezést. Tegyen megfelelő védőintézkedéseket (használon 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 bőseges 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 érte.
P260	Ne lélegezzen be a port/füstöt/gázt/ködöt/gőzt/permetet.
P280	Viseljen védőkesztyűt/védő ruházatot/szemvédőt/arcvédőt.
P308+P313	HA ki van téve vagy érintett: Kérjen orvosi tanácsot/megfigyelést.
P405	Elzárva tárolandó.

## 7. Korlátozások

- *In vitro* diagnosztikai felhasználásra.
- Kizárólag professzionális használatra.
- Kizárólag nem automatizált használatra.
- Az analitikai normális határértéket az érdeklődésre számot tartó rendellenes jelmintázatra szakképzett patológusnak/humán-genetikusnak kell megállapítania.
- A pozitív festődés klinikai értelmezését vagy annak hiányát a klinikai anamnézis, a morfológia, más szövettani kritériumok és más diagnosztikai vizsgálatok összefüggésében kell elvégezni. A képzett patológus/humán-genetikus 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-genetikus 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 fixálószer nem kompatibilis a FISH-vel:

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

## 9. A minták előkészítése

Készítse elő a mintákat a megfelelő ZytoVision végrehajtási készlet 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

### Citológiai minták

#### Minta előkezelés

Végezze el a minta előkezelését a [ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit](#) használati utasítása szerint.

#### Denaturáció és hibridizáció

1. Pipetázzon 10 µl szondát minden előkezelt mintára.
  2. Fedjük le a mintákat egy 22 mm x 22 mm-es fedőlemezzel (kerüljük el a beszorult buborékokat), és zárjuk le a fedőlemezt.
- A tömítéshez gumicement (pl. Fixogum) használatát javasoljuk.*
3. Helyezze a tárgylemezeket forró lemezre vagy hibridizálóra, és denaturálja a mintákat 5 percig 72 °C-on.
  4. Helyezze át a tárgylemezt egy páramamrába, 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-Cytology Implementation Kit](#) használati utasítása szerint.

#### FFPE minták

##### A minta előkezelése

Végezze el a minta előkezelését (viaszmentesítés, proteolízis) a [ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit](#) használati utasítása szerint.

#### Denaturáció és hibridizáció

1. Pipetázzon 10 µl szondát minden előkezelt mintára.
2. Fedjük le a mintákat egy 22 mm x 22 mm-es fedőlappal (kerüljük el a beszorult buborékokat), és zárjuk le a fedőlappot.

A tömítéshez gumicement (pl. Fixogum) használatát javasoljuk.

- Helyezzük a tárgylemezeket forró lemezre vagy hibridizátorra, és denaturáljuk a mintákat 10 percig 75 °C-on.
- Helyezze át a tárgylemezeket egy páraaknába, 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.

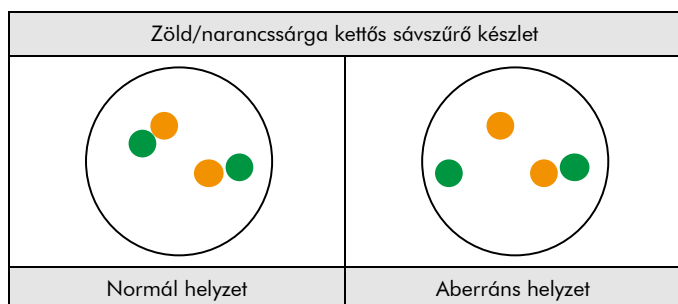
## 12. Az eredmények értelmezése

Megfelelő szűrőkészletek használatával a próba hibridizációs jelei zöld színűek (a IGH töréspont régiótól distalisán) és narancssárgák (a IGH töréspont régiótól proximálisan).

**Normál jelrendszer:** A normális sejtek vagy az IGH-lokuszt érintő transzlokáció nélküli sejtek interfázisaiban két zöld/narancssárga fúziós jel jelenik meg (lásd a 2. ábrát).

**Rendellenes jelrendszer:** Egy transzlokáció által érintett IGH-lokuszt egy különálló zöld és egy különálló narancssárga jelzés jelez (lásd a 2. ábrát).

Az egymást átfedő jelek sárga jelzésként jelenhetnek meg.



2. ábra: Várható eredmények normális és rendellenes sejtmagok esetén

A kis deléciók, duplikációk vagy inverziók okozta genomális aberrációk feltűnésmentes jelmintákat eredményezhetnek.

A 16p11.2 és 15q11.2 IGH homológ szekvenciái miatt gyenge kereszthibridizáció figyelhető meg.

Más aberráns jelmintázatokat okozhat az IGHC vagy IGHV gének teljes vagy részleges elvesztése, valamint más lókusztokba történő rejtőzködő inszerciók. Továbbá, az egyik vagy mindkét allél hiányzó vagy csökkent zöld jelei az IGHV gének normál szomatikus V-D-J rekombinációból eredő delécióit jelenthetik.

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,  $\leq 1$  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 Citológiai minták

A teljesítményt a ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit használati utasítása szerint értékelték.

<b>Analitikai érzékenység:</b>	100% (95% CI 98.5 – 100.0)
<b>Analitikai specifikusság:</b>	100% (95% CI 97.0 – 100.0)

### 14.2 FFPE minták

A teljesítményt a ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit használati utasítása szerint értékelték.

<b>Analitikai érzékenység:</b>	100% (95% CI 98.5 – 100.0)
<b>Analitikai specifikusság:</b>	100% (95% CI 97.0 – 100.0)

## 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. Az ebben a szakaszban található néhány tipp csak a ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit használatakor érvényes. További információkért kérjük, olvassa el a [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com) webhelyet.

### Gyenge jelek vagy egyáltalán nincs jel

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Nem megfelelően rögzített sejt- vagy szövetszövetminta	Optimalizálja a rögzítési időt és a fixálószeret, 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 csok/vízzel töltött tartályok használata kötelező. Hibridizáló kemence használata esetén a páraaknára használata kötelező. Ezenkívül a fedőlemezt teljesen le kell zárni, pl. Fixogummal, hogy megakadályozzák a minta kiszáradását a hibridizáció során.
Nem megfelelő szűrőkészletek használata	Használjon a szonda fluorokrómjainak megfelelő szűrőkészleteket. A háromszoros sávszűrő-készletek kevesebb fényt biztosítanak az egy- vagy kétsávú szűrő-készletekhez képest. Következésképpen a jelek halványabbnak tűnhetnek e háromsávú szűrő-készletek használatával.

**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 fixálószer, vagy alkalmazzon poszt-fixálási 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 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 <u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (Prod. No. MT-0008-0.8).
Túl rövid DAPI inkubációs idő	A DAPI inkubációs idő beállítása

**17. Irodalom**

- 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. Felülvizsgálat**

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

A legfrissebb használati utasításokat, valamint a különböző nyelvű használati utasításokat a [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com) oldalon találja.

Szakértőink készséggel válaszolnak kérdéseire.

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

A biztonságról és a teljesítményről szóló összefoglalóért kérjük, olvassa el a következőt [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com).



ZytoVision GmbH  
Fischkai 1  
27572 Bremerhaven/ Németország  
Telefon: +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)

**Védjegyek:**

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