



ZytoLight

## SPEC CBFB Dual Color Break Apart Probe

REF Z-2207-50

5 (0.05 ml)

Pro kvalitativní detekci translokací zahrnujících lidský gen CBFB v 16q22.1 fluorescenční *in situ* hybridizací (FISH)



Prostředek pro lékařskou *in vitro* diagnostiku  
V souladu s EU nařízením 98/79/EC

### 1. Použití

ZytoLight SPEC CBFB Dual Color Break Apart Probe (PL165) je určen k použití pro kvalitativní detekci translokací zahrnujících lidský gen CBFB v 16q22.1 cytologických vzorků leukemických buněk metodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Průběh je určen k použití v kombinaci s ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit (Katalog č. Z-2099-20).

Interpretace výsledků musí být prováděna kvalifikovaným patologem, v kontextu s klinickou historií pacienta a s ohledem na ostatní klinické a patologické nálezy.

### 2. Klinický význam

CBFB kóduje beta podjednotku komplexu transkripčních faktorů CBFA / CBFB zapojených do myeloidní diferenciace. Chromozomální aberace inv (16) (p13.1q22.1) a související translokace t (16; 16) (p13.1; q22.1), které byly detekovány u přibližně 10% pacientů s AML (akutní myeloblastická leukémie), vedou k fúzi CBFB s genem MYH11 (těžký řetězec hladkého svalstva myosinu) na 16p13.1. Výsledný fúzní gen CBFB-MYH11 je zapojen do leukemické transformace. Pacienti s AML s těmito genetickými přeusmyky mají příznivou prognózu. Inv (16) může být někdy obtížné identifikovat konvenční cytogenetickou analýzou.

### 3. Princip testu

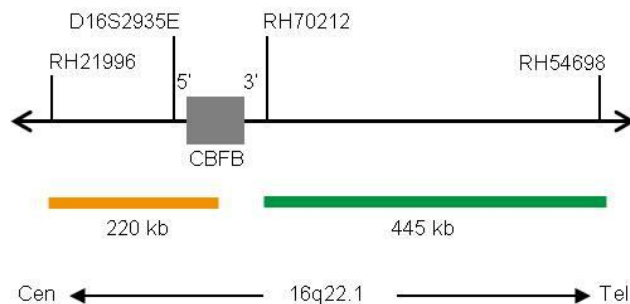
Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je technika, která umožňuje detekci a vizualizaci specifických sekvencí nukleových kyselin v buněčných preparátech. Fluorescenčně označené úseky DNA, tzv. FISH próby, a jejich komplementární cílové úseky DNA v preparátech jsou společně denaturovány a následně je umožněno jejich spárování v průběhu hybridizace. Poté jsou nespecifické a nenavázané fragmenty prób odstraněny pomocí důkladných oplachovacích kroků. Po dobarvení DNA pomocí DAPI jsou hybridizované úseky DNA vizualizovány pomocí fluorescenčního mikroskopu vybaveného excitačními a emisními filtry specifickými pro fluorochromy, se kterými byly FISH próby označeny.

### 4. Potřebné reagensie

ZytoLight SPEC CBFB Dual Color Break Apart Probe se skládá z:

- ZyGreen (excitace 503 nm/ emise 528 nm) označené polynukleotidy (~10.0 ng/μl), s cílovými sekvencemi v 16q22.1\* (chr16:67,161,347-67,605,304) distálně k bodu přerušení CBFB (viz Obr.1).
- ZyOrange (excitace 547 nm/ emise 572 nm) označené polynukleotidy (~4.5 ng/μl), s cílovými sekvencemi v 16q22.1\* (chr16:66,882,262-67,102,895) proximálně k bodu přerušení CBFB (viz Obr.1).
- Hybridizační pufr založený na formamidu

\* V souladu s knihovnou lidského genomu GRCh37/hg19



Obr. 1: SPEC CBFB Mapa sondy (mimo měřítko)

ZytoLight SPEC CBFB Dual Color Break Apart Probe dostupný v jedné velikosti:

- Z-2207-50: 0.05 ml (5 reakcí po 10 μl každá)

### 5. Vybavení, které je vyžadováno, ale není součástí dodávky

- ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit (Katalog č. Z-2099-20)
- Pozitivní a negativní kontrolní vzorky
- Mikroskopická sklíčka
- Vodní lázeň (70°C)
- Hybridizér nebo vyhřívaná ploténka
- Hybridizér nebo vlhká komůrka v hybridizační troubě
- Stopky
- Barvicí nádoby nebo lázně
- Kalibrovaný teploměr
- Nastavitelné pipety (10 μl, 25 μl)
- Ethanol (alkohol)
- 37% formaldehyde (bez kyseliny) nebo 10% neutrálně pufovaný formalin
- 2x citrát sodný (SSC), např. 20x SSC Solution (WB-0003-50)
- Deionizovaná nebo destilovaná voda
- Krycí sklíčka (22 x 22 mm, 24 x 60 mm)
- Lepidlo, např. Fixogum Rubber Cement (Katalog č. E-4005-50/-125) nebo podobné
- Fluorescenční mikroskop s odpovídajícím vybavením (400 - 1000x)
- Imerzní olej určený pro fluorescenční mikroskop
- Odpovídající sada filtrů

### 6. Skladování a zacházení

Skladujte při teplotě 2-8 °C, ve vzpřímené pozici, chráněné před sluncem. Používejte chráněné před sluncem. Vraťte do skladovacích podmínek okamžitě po použití. Nepoužívejte reagensie po uplynutí doby expirace uvedené na štítku.

### 7. Varování a preventivní opatření

- Před použitím si přečtěte instrukce!
- Nepoužívejte reagensie po uplynutí doby expirace!
- Tento produkt obsahuje látky (v nízkých koncentracích a objemech), které jsou škodlivé pro zdraví a potenciálně infekční. Vyvarujte se přímého kontaktu s reagensiemi. Používejte přiměřené ochranné prostředky (jednorázové rukavice, ochranné brýle a laboratorní plášť).
- V případě kontaktu s kůží omyjte okamžitě velkým množstvím vody!

- Pro profesionální uživatele je na vyžádání dostupný bezpečnostní list.
- Nepoužívejte reagenty opakovaně.
- Vyvarujte se vzájemné kontaminace vzorů, neboť to může vést k chybným výsledkům.
- Průba by neměla být po delší dobu vystavena světlu, speciálně ne silnému světlu, tzn., že všechny kroky by se měly provádět ve tmě a/nebo za použití tmavých, světlo nepropouštějících nádobek.

#### Rizika:

Složka určují riziko je formamid



#### Nebezpečí

|           |  |
|-----------|--|
| H351      | Podezření na vyvolání rakoviny.  |
| H360FD    | Může poškodit reprodukční schopnost. Může poškodit plod v těle matky.                  |
| H373      | Může způsobit poškození orgánů při prodloužené nebo opakované expozici.                |
| P201      | Před použitím si obstarejte speciální instrukce.                                       |
| P202      | Nepoužívejte, dokud jste si nepřečetli všechny bezpečnostní pokyny a neporozuměli jim. |
| P260      | Nevdechujte prach/dým/plyn/mlhu/páry/aerosoly.   |
| P280      | Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.             |
| P308+P313 | Při expozici nebo podezření na ni: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.                |
| P405      | Skladujte uzamčené.  |

#### 8. Omezení

- Pouze pro *in vitro* diagnostiku.
- Pouze pro profesionální uživatele.
- Klinická interpretace jakéhokoliv pozitivního barvení nebo jeho chybění musí být hodnocena v kontextu klinické historie, morfolgie, ostatních histopatologických kritérií a stejně tak i ostatních diagnostických testů. Je odpovědností kvalifikovaného patologa být obeznámený s FISH próbami, reagenty, diagnostickými panely a metodami používanými k barvení preparátů. Barvení musí být prováděno v certifikované, licencované laboratoři pod dozorem patologa, který je odpovědný za prohlížení obarvených skel a vyhodnocení odpovídajících pozitivních a negativních kontrol.
- Barvení preparátu, obzvláště intenzita a barvení pozadí závisí na zacházení se vzorkem před barvením. Neodpovídající fixace, mražení, tání, oplachování a sušení, var, krájení nebo kontaminace jinými vzorky nebo tekutinami může vést k artefaktům nebo falešným výsledkům. Nekonzistentní výsledky mohou být výsledkem variací ve fixaci a prosycovacích metodách, stejně tak jako nepravidelnostmi uvnitř vzorku.
- Průba má být používána pouze pro detekci lokusů popsaných v odstavci 4.
- Barvení bylo validováno za použití metod popsaných v těchto instrukcích pro použití. Obměny těchto procedur mohou vést ke změnám barvení a mají být validovány uživatelem.

#### 9. Interferující látky

Pokud jsou ve vzorku přítomny červené krvinky, mohou jevit autofluorescenci, která ztěžuje detekci hledaných signálů

#### 10. Příprava vzorků

Připravte vzorek podle instrukcí uvedených u [ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit](#).

#### 11. Příprava před použitím

Produkt je ready-to-use, tedy připraven k přímému použití. Není vyžadována žádná obnova, mísení nebo ředění. Před použitím přineste průbu do pokojové teploty (18-25 °C), chraňte před světlem. Před otevřením nádoby promíchejte krátce ve vortexu a stočte.

#### 12. Pracovní postup

##### Příprava vzorku

Připravte vzorek podle instrukcí uvedených u [ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit](#).

##### Denaturace a hybridizace

1. Napípejte 10 µl průby na každý předpřipravený vzorek.
2. Přikryjte vzorky krycím sklíčkem 22 mm x 22 mm (vyvarujte se vytvoření bublin) a zalepte krycí sklíčko.

*Doporučujeme použít speciální lepidlo např. Fixogum.*

3. Umístěte skla na horkou ploténku nebo do hybridizéru a denaturujte vzorky 5 min při 72°C.
4. Proveďte hybridizaci po dobu 2 hodin až 16 hodin (tj. přes noc) při 37 °C buď přenesením sklíček do hybridizátoru nebo do vlhké komory a hybridizační pece.

*Je zcela zásadní, aby vzorky v průběhu hybridizačního kroku nevyschly.*

##### Post-hybridizace

Posthybridizační kroky (oplach, dobarvení, fluorescenční mikroskopie) provádějte podle instrukcí uvedených v [ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit](#).

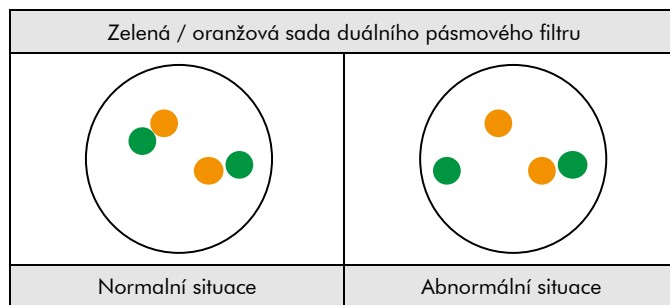
#### 13. Interpretace výsledků

Při použití vhodných sad filtrů se hybridizační signály sondy objeví zeleně (distančně od bodu zlomu CBFb) a oranžově (proximálně od bodu zlomu CBFb).

**Normální situace:** V interfázích normálních buněk nebo buněk bez translokace zahrnující genovou oblast CBFb se objevují dva zelené / oranžové fúzní signály (viz obrázek č.2).

**Abnormální situace:** Jedna oblast genu CBFb ovlivněná translokací je indikována jedním samostatným zeleným signálem a jedním samostatným oranžovým signálem (viz obrázek č.2).

*Při ekrvávající se signály se mohou objevit jako žluté signály.*



Obr. Č. 2 : Předpokládaný normální výsledek a abnormální jádra

V případě delece vzdálené od oblasti zlomu CBFb můžeme očekávat jediný oranžový signál.

Genomické aberace v důsledku malých delecí, duplikací nebo inverzí mohou vést k nenápadným signálům.

Jiná distribuce (rozmístění) signálů může být pozorována v některých abnormálních vzorcích, která může vést ve výsledku k jinému vzoru signálů, než jsou popsány výše, indikující variantní přestavby. Nečekané vzory signálů by měly být dále dovysvětleny.

**Vemte v potaz:**

- Kvůli rozvolněnému chromatinu se mohou jednotlivé signály jevit jako malé shluky signálů. A proto dva nebo tři signály stejné velikosti, které jsou ve vzdálenosti, která je menší než průměr jednoho signálu, mají být počítány jako jeden signál.
- Nehodnoťte překrývající se jádra.
- Nepočítejte příliš natrávená jádra (rozpoznatelná podle přítomnosti tmavých oblastí uvnitř jader).
- Nepočítejte jádra se silnou autofluorescencí, která znesnadňuje rozpoznání signálů.
- Negativní nebo neočekávaný výsledek může být způsoben vícečetnými faktory, viz odst. 17.
- Za účelem správného hodnocení výsledků musí uživatel před použitím produktu provést validaci v souladu s národními a/nebo mezinárodními doporučeními.

**14. Doporučené postupy kontroly kvality**

Za účelem zajištění správných postupů má být ke každému testu přiřazena vnitřní a vnější kontrola. Pokud tyto kontroly selžou při demonstraci správného barvení, výsledky vzorku pacienta musí být hodnoceny jako invalidní.

**Vnitřní kontrola:** Nenádorové buňky uvnitř vzorku, ve kterých je patrný normální vzor signálů.

**Externí kontrola:** Ověřené (validované) pozitivní a negativní kontrolní vzorky.

**15. Výkonnostní charakteristiky**

**Přesnost:** Místo hybridizace sondy bylo hodnoceno na metafázových spreadech karyotypově normálního samce. Ve všech testovaných vzorcích hybridizovala sonda pouze na očekávané lokusy. Nebyly pozorovány žádné další signály nebo křížové hybridizace. Proto byla vypočítána přesnost na 100%.

**Analytická citlivost:** Pro analytické stanovení citlivosti byla sonda vyhodnocena na metafázových spreadech karyotypicky normálních samců. Všechna jádra ukázala očekávaný normální signál ve všech testovaných vzorcích. Analytická citlivost byla proto vypočtena na 100%.

**Analytická specifita:** Pro stanovení analytické specifity byla sonda vyhodnocena na metafázových spreadech karyotypicky normálních samců. Ve všech testovaných vzorcích hybridizovaly všechny signály pouze s očekávanými cílovými lokusy a žádnými jinými lokusy. Analytická specifita byla proto vypočtena na 100%.

**16. Likvidace odpadů**

Likvidace reagentů musí být provedena v souladu s lokálními zákony.

**17. Řešení problémů**

Jakákoliv odchylka od návodu k obsluze může vést k horším výsledkům barvení nebo k žádnému znečištění.

**Slabé nebo vůbec žádné signály**

| Možná příčina  | Řešení   |
|--|--|
| Žádné dostupné cílové sekvence   | Použijte vhodnou kontrolu.   |
| Nesprávná příprava teplem, natrávení, denaturace, hybridizace nebo teplota oplachu | Zkontrolujte teplotu u vše zařízení, u kterých je kalibrovaný teploměr |
| Proteolytická předběžná úprava není řádně provedena                                | Optimalizujte inkubační dobu pepsinu, Zvyšte nebo snižte.              |

|   |  |
|---|--|
| Odpařování sondy                            | Při použití hybridizéru, je nutné použít mokré proužky / nádrže naplněné vodou.<br>Při použití hybridizační pece, vlhké komoty, by mělo být krycí sklíčko zcela uzavřené, např. Fixogum, aby se zabránilo vysychání vzorků během hybridizace |
| Příliš nízká koncentrace promývacího pufru  | Zkontrolujte koncentraci promývacího pufru   |
| Staré odvodňovací roztoky                   | Připravte čerstvé odvodňovací roztoky.   |
| Špatné nastavení fluorescenčního mikroskopu | Nastavte správně   |
| Použití nesprávného setu filtrů             | Použijte set filtrů, které jsou odpovídající fluochromům próby.<br><i>Trojité filtry poskytují méně světla v porovnání s jednoduchými nebo duálními filtry. Navíc signály se mohou při použití trojitého filtru jevit bledší.</i>            |
| Poškození próby světlem                     | Hybridizační a promývací kroky provádějte ve tmě.  |

**Zkřížené hybridizační signály, šum na pozadí**

| Možná příčina  | Řešení   |
|--|--|
| Příliš silné natrávení   | Zkraťte inkubaci s pepsinem.   |
| Příliš velký objem próby na plochu vzorku                      | Snižte objem próby na řez, rozmístujte proužky po kapkách, abyste se vyhnuli příliš vysoké místní koncentraci. |
| Preparáty jsou vychladlé na pokojovou teplotu před hybridizací | Přeneste preparáty krátce do 37 °C   |
| Příliš vysoká koncentrace promývacího pufru                    | Zkontrolujte koncentraci promývacího pufru.  |
| Oplachovací teplota po hybridizaci je příliš nízká             | Zkontrolujte teplotu a zvyšte ji, pokud je to nutné  |
| Vysušení vzorků mezi jednotlivými kroky inkubace               | Zabraňte vysušení pomocí přilepení krycího sklíčka a provádění inkubace ve vlhkém prostředí.                   |

**Poškozená morfologie**

| Možná příčina  | Řešení  |
|--|---|
| Příprava natrávením není provedena správně                     | Optimalizujte dobu inkubace s pepsinem, zkraťte nebo prodlužte, je-li potřeba |
| Nedostatečné oschnutí preparátu na vzduchu před aplikací próby | Prodlužte osušení.  |

**Slabé barvení**

| Možná příčina                  | Řešení   |
|--------------------------------|--|
| Nízká koncentrace roztoku DAPI | Používejte DAPI/DuraTect-Solution (ultra) (Katalog č. MT-0008-0.8) |
| Příliš krátká doba inkubace    | Prodlužte dobu inkubace s DAPI.                                    |

## 18. Literatura

- Aventín A, et al. (2002) *Cancer Genet Cytogenet* 134: 142-4.
- Dierlamm J, et al. (1998) *Genes Chromosomes and Cancer* 22: 87-94.
- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Krauter J, et al. (2001) *Genes Chromosomes and Cancer* 30: 342-8.
- Le Beau MM, et al. (1983) *N Engl J Med* 309: 630-6.
- Li MM, et al. (2013) *Curr Genet Med Rep* 1: 99-112.
- Wilkinson DG: *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.

Naši experti jsou Vám k dispozici zodpovědět Vaše otázky. Prosím kontaktujte [help@zytovision.com](mailto:help@zytovision.com)



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

**Ochranná známka:**

ZytoVision® a ZytoLight® jsou pod ochrannou známkou ZytoVision GmbH.