




ZytoLight

SPEC MAFB/IGH Dual Color Dual Fusion Probe

REF Z-2271-50  5 (0.05 ml)

Pro kvalitativní detekci translokace zahrnující lidský gen MAFB na 20q12 a lidský lokus IGH na 14q32.33 fluorescenční *in situ* hybridizací (FISH)



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

1. Použití

ZytoLight SPEC MAFB/IGH Dual Color Dual Fusion Probe (PL159) je určen k použití pro kvalitativní detekci translokace zahrnující lidský gen MAFB na 20q12 a lidský lokus IGH na 14q32.33 cytologických vzorků myelomových 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

Translokace t(14;20)(q32.3;q12) se často nachází u mnohočetného myelomu (MM). MM je nízkoproliferativní maligní postgerminální centrální nádor somaticky mutovaných, izotypově změněných plazmatických buněk, které se hromadí v kostní dřeni. Často mu předchází premaligní stav známý jako monoklonální gamapatie neurčitěho významu (MGUS). U 40 % MGUS a MM nádorů bylo identifikováno pět rekurentních primárních translokací zahrnujících lokus imunoglobulinového těžkého řetězce (IGH). Patří mezi ně t(11;14)(q13.3;q32.3), t(6;14)(p21.1;q32.3), t(4;14)(p16.3;q32.3), t(14;16)(q32.3;q23) a t(14;20)(q32.3;q12), které zahrnují geny CCND1, CCND3, FGFR3 a NSD2, MAF, respektive MAFB. Všechny tyto translokace vedou k deregulaci a nadměrné expresi cílových genů v důsledku jejich juxtapozice k regulačním sekvencím lokusu IGH. Výskyt translokací IGH se zvyšuje se stádiem onemocnění na > 90 % v buněčných liniích MM. t(14;20) se vyskytuje přibližně u 1–2 % pacientů s MM a je spojen s nepříznivou prognózou. V současné době je tedy detekce t(14;20) pomocí FISH nejspolehlivějším prognostickým nástrojem a může podpořit terapeutické rozhodování u MM.

3. Princip testu

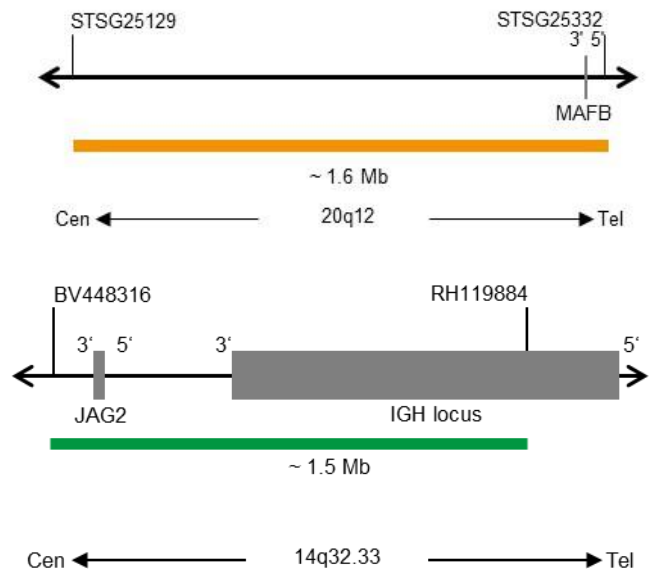
Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je technika, která umožňuje detekci a vizualizaci specifických sekvencí nukleových kyselin v buněčných preparátech. Fluorescenčně označené úseky DNA, tzv. FISH próby, a jejich komplementární cílové úseky DNA v preparátech jsou společně denaturovány a následně 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 reagenty

ZytoLight SPEC MAFB/IGH Dual Color Dual Fusion Probe se skládá z:

- ZyGreen (excitace 503 nm/ emise 528 nm) označené polynukleotidy (~10.0 ng/μl), s cílovými sekvencemi v20q12* (chr20:37,782,012-39,385,613) nesoucí genovou oblast MAFB (viz Obr.1).
- ZyOrange (excitace 547 nm/ emise 572 nm) označené polynukleotidy (~4.5 ng/μl), s cílovými sekvencemi v14q32.33* (chr14:105,462,169-106,995,000) ukrývající lokus IGH (viz Obr.1).
- Hybridizační pufr založený na formamidu

* V souladu s knihovnou lidského genomu GRCh37/hg19



Obr. 1: Horní: SPEC MAFB Mapa sondy, Spodní: SPEC IGH Mapa sondy (mimo měřítko)

ZytoLight SPEC MAFB/IGH Dual Color Dual Fusion Probe dostupný v jedné velikosti:

- Z-2271-50: 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. Z209920)
- 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

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

7. Varování a preventivní opatření

- Před použitím si přečtěte instrukce!
- Nepoužívejte reagentie 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 reagentiemi. 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 reagentie 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 určující 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 obstarajte 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: Vyhleďte lékařskou pomoc/ošetření.
P405	Składujte 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, morfologie, ostatních histopatologických kritérií a stejně tak i ostatních diagnostických testů. Je odpovědností kvalifikovaného patologa být obeznámený s FISH próbami, reagentiemi, diagnostickými panely a metodami používanými k barvení preparátů. Barvení musí být prováděno v certifikované, licencované laboratoři pod dozorem patologa, který je odpovědný za prohlášení 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 prosvycovacích 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. Napípepujte 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. Přeneste skla do vlhké komůrky nebo hybridizujte přes noc při 37 °C (např. v hybridizační troubě).

Je zcela zásadní, aby vzorky v průběhu hybridizačního kroku nevyšly.

Post-hybridizace

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

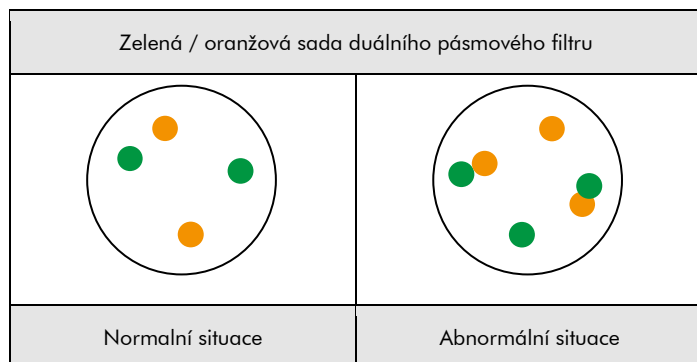
13. Interpretace výsledků

Při použití vhodných sad filtrů se hybridizační signály sondy objeví zeleně (IGH lokus) a oranžově (MAFB genová oblast).

Normální situace: V interfázích normálních buněk nebo buněk bez translokace zahrnující příslušné genové oblasti se objevují dva oddělené zelené a oranžové signály (viz obrázek č.2).

Abnormální situace: Genová fúze je indikována jedním samostatným oranžovým signálem, jedním samostatným zeleným signálem a dvěma oranžovo/zelenými fúzními signály (viz obrázek č.2).

Překrývající se signály se mohou objevit jako žluté signály.



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

Kvůli homologním sekvencím IGH v 16p11.2 a 15q11.2 lze pozorovat slabé křížové hybridizace.

Další aberantní signální vzorce mohou být způsobeny úplnou nebo částečnou ztrátou genů IGHC nebo IGHV, jakož i kryptickými inzercemi do jiných lokusů. Kromě toho chybějící nebo snížené zelené signály na jedné nebo obou alelách mohou představovat delece genů IGHV vyplývající z normální somatické rekombinace V-D-J.

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 dovyšetřeny.

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 spredech 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 spredech 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 spredech 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 reagensů 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. Při použití hybridizační pece, vhlké 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
IPoužití nesprávného setu filtrů	Použijte set filtrů, které jsou odpovídající fluochromům próby. <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	Zkorte inkubaci s pepsinem.
Příliš velký objem próby na plochu vzorku	Snízte objem próby na řez, rozmístujte próbu po kapkách, abyste se vyhnuli příliš vysoké místní koncentraci.
Preparáty jsou vychladlé na pokojovou teplotu před hybridizací	Přenešte 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, zkrorte 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

- Boersma-Vreugdenhil GR, et al. (2004) *British Journal of Haematology* 126: 355-63.
- Chesi M, et al. (1998) *Blood* 92: 4457-63.
- Fabris S, et al. (2005) *GenesChromosomesCancer* 42: 117-27.
- Fonseca R, et al. (2009) *Leukemia* 23: 2210-21.
- Gabrea A, et al. (2006) *DNA Repair (Amst)* 5: 1225-33.
- Hanamura I, et al. (2001) *Jpn N Cancer Res* 92: 638-44.
- Kievičs 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.

Naši experti jsou Vám k dispozici zodpovědět Vaše otázky. Prosím kontaktujte helptech@zytovision.com



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

Ochranná známka:

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