



ZytoLight Glioma 1p/19q Probe Set

REF Z-2272-20

20

Pro kvalitativní detekci delece zahrnující lidskou chromozomální oblast 1p36.31 a delece zahrnující lidskou chromozomální oblast 19q13.32-q13.33 pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)



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

1. Použití

ZytoLight Glioma 1p/19q Probe Set je určena k použití pro kvalitativní detekci delece zahrnující lidskou chromozomální oblast 1p36.31 a delece zahrnující lidskou chromozomální oblast 19q13.32-q13.33 v formalinem fixovaných, v parafínech zalitých vzorků jmetodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Sondy jsou určeny k použití v kombinaci s ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Prod. No. Z-2028-5/-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

Delece ovlivňující krátké rameno chromozomu 1 (1p) a dlouhé rameno chromozomu 19 (19q) se často vyskytují v lidských gliomech. Podle kritérií WHO z roku 2016 pro klasifikaci nádorů centrálního nervového systému je detekce ztráty 1p / 19q vyžadována pro diagnózu „oligodendrogliomu WHO stupně II nebo III, kódovaného mutanta IDH a 1p / 19q“. Protože jak astrocytomy, tak oligodendrogliomy mohou vykazovat mutace IDH, hraje při odlišení astrocytomy od oligodendrogliomu rozhodující roli hodnocení stavu 1p / 19q. Morfologie oligodendrogliomu, genotyp mutantu IDH a kodelace 1p / 19q jsou spojeny s lepší odpovědí na chemoterapii a zlepšeným přežitím. Stanovení stavu 1p a 19q proto může pomoci při terapeutických rozhodnutích a při odpovědi na výsledek u pacientů s difúzními gliomy.

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 reagentie

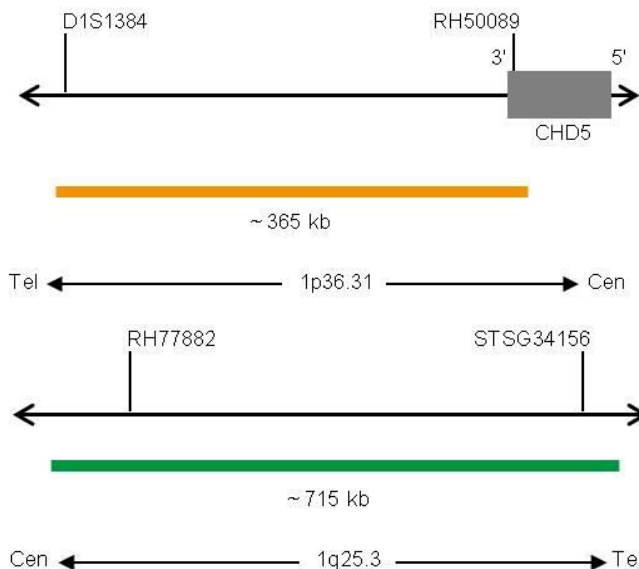
ZytoLight Glioma 1p/19q Probe Set je sada obsahující dvě oddělené sondy a quenching roztok:

- ZytoLight SPEC 1p36/1q25 Dual Color Probe (Prod. No. Z-2075-200)
- ZytoLight SPEC 19q13/19p13 Dual Color Probe (Prod. No. Z-2076-200)
- ZyBlack Quenching Solution (Prod. No. BS-0002-8)

ZytoLight SPEC 1p36/1q25 Dual Color Probe (PL34) se skládá z:

- ZyOrange (excitace 547 nm/ emise 572 nm) označené polynukleotidy (~4.5 ng/μl), s cílovými sekvencemi v 1p36.31* (chr1:5,808,946-6,176,336) (viz Obr.1).
- ZyGreen (excitace 503 nm/ emise 528 nm) označené polynukleotidy (~10.0 ng/μl), s cílovými sekvencemi 1q25.3* (chr1:184,271,714-184,986,522) (viz Obr.1).
- Hybridizační pufr založený na formamidu

* V souladu s knihovnou lidského genomu GRCh37/hg19

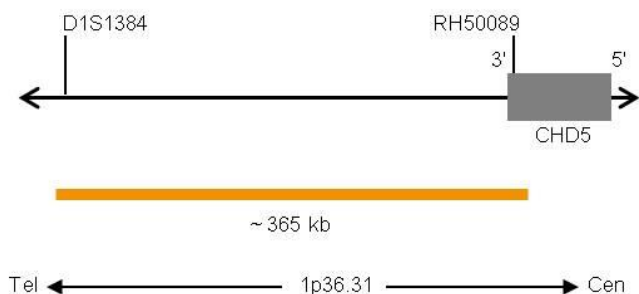


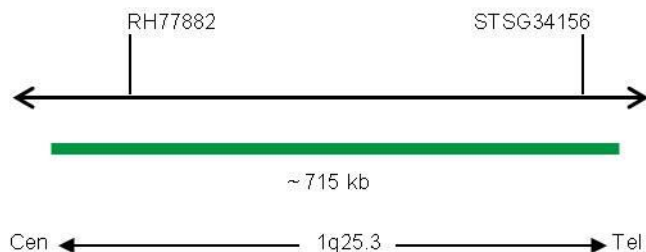
Obr. 1: Horní: SPEC 1p36 Mapa sondy, Spodní: SPEC 1q25 Mapa sondy (mimo měřítko)

ZytoLight SPEC 19q13/19p13 Dual Color Probe (PL35) se skládá z:

- ZyOrange (excitace 547 nm/ emise 572 nm) označené polynukleotidy (~4.5 ng/μl), s cílovými sekvencemi v 19q13.32-q13.33* (chr19:47,857,776-48,374,564) (viz Obr.2).
- ZyGreen (excitace 503 nm/ emise 528 nm) označené polynukleotidy (~10.0 ng/μl), s cílovými sekvencemi 19p13.3* (chr19:658,555-1,144,465) (viz Obr.2).
- Hybridizační pufr založený na formamidu

* V souladu s knihovnou lidského genomu GRCh37/hg19





Obr. 2: Horní: SPEC 19q13 Mapa sondy, Spodní: SPEC 19p13 Mapa sondy (mimo měřítko)

ZytoLight SPEC 1p36/1q25 Dual Color Probe dostupný v jedné velikosti:

- Z-2272-20: Jednotlivé sondy jsou dostatečné pro 20 reakcí po 10 ul každé.

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

- ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Prod. No. Z-2028-5/-20)
- 25x Wash Buffer A (Prod. No.: WB-0002-50)
- Pozitivní a negativní kontrolní vzorky
- Mikroskopická sklíčka, pozitivně nabitá
- Vodní lázeň (37°C, 98°C)
- Hybridizér nebo vyhřívaná ploténka
- Hybridizér nebo vlhká komůrka v hybridizační troubě
- Pipety (10 μ l, 25 μ l)
- Stopky
- Barvicí nádoby nebo lázně
- Kalibrovaný teploměr
- Xylen
- Ethanol (alkohol)
- 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 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 reagentii. 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 obzarejte speciální instrukce.
P202	Nepoužívejte, dokud jste si nepřčetli 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, morfologie, ostatních histopatologických kritérií a stejně tak i ostatních diagnostických testů. Je odpovědností kvalifikovaného patologa být obeznámený s FISH próbami, reagentii, 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 sklů 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 prosovcovacích 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

Následující fixační tekutiny jsou nekompatibilní (nevhodné) pro FISH:

- Bouinův roztok
- B5 fixace
- Kyselá fixativa (např. kys. pikrová)
- Zenkerova fixační tekutina
- Alkoholy (pokud jsou používány samostatně)
- Chlorid rtuti
- Formaldehyd/zinkové fixativum
- Hollandovo fixativum
- Nepufrovaný formalin

10. Příprava vzorků

- Fixace v 10% neutrálním pufrovaném formalínu po dobu 24h při pokojové teplotě (18-25°C).
- Připravte tkáňové vzorky $\leq 0,5 \text{ m}^3$.
- Používejte parafin nejvyšší (prémiové) kvality.
- Prosycení by mělo být prováděno při teplotě nižší než 65°C.
- Připravte řezy o tloušťce 2-4 μm .
- Používejte pozitivně nabitá skla.
- Fixujte po dobu 2-16h při teplotě 50-60°C.

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

1. Přeneste ZyBlack™ Quenching Solution před použitím do pokojové teploty.
2. Dokončete předúpravu vzorku (odvoskování, proteolýza) podle pokynů k použití ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit.
3. Aplikujte předem zmražené množství ZyBlack™ Quenching Solution na suché vzorky.
4. Inkubujte po dobu 30 min při pokojové teplotě na rovném povrchu.
5. Promyjte 2x 5 minut při pokojové teplotě v 1x promývacím pufru A (připravený podle pokynů v návodu k použití 25x Wash Buffer A).
6. Promyjte 1x 1 min v deionizované vodě.
7. Sušte na vzduchu nejméně 30 min.

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 plotěnku nebo do hybridizéru a denaturujte vzorky 10 min při 75°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 nevyschly.

Post-hybridizace

Post-hybridizační kroky (oplach, dobarvení, fluorescenční mikroskopie) provádějte podle instrukcí uvedených v ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit.

13. Interpretace výsledků

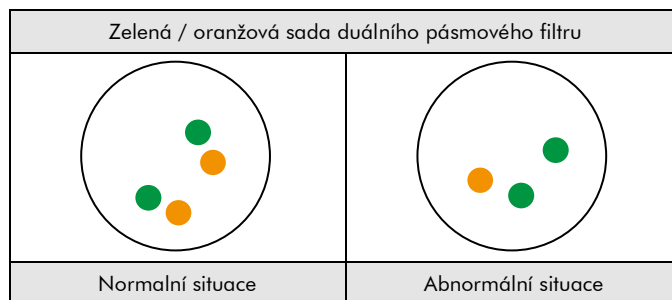
ZytoLight SPEC 1p36/1q25 Dual Color Probe:

Při použití vhodných sad filtrů se hybridizační signály sondy jeví oranžově (1p36 lokus) a zeleně (1q25 lokus).

Normální situace: V interfázích normálních buněk nebo buněk bez delece zahrnující lokus 1p36 se objeví dva oranžové signály a dva zelené signály (viz obrázek č.3).

Abnormální situace: V buňce s delecí ovlivňující lokus 1p36 bude pozorován snížený počet oranžových signálů. Delece ovlivňující pouze část lokusu 1p36 může vést k normálnímu vzoru signálu s oranžovými signály menší velikosti (viz obrázek č.3).

Překrývající se signály se mohou jevit jako žluté signály.



Obr. Č. 3 : Předpokládaný normální výsledek a abnormální jádra

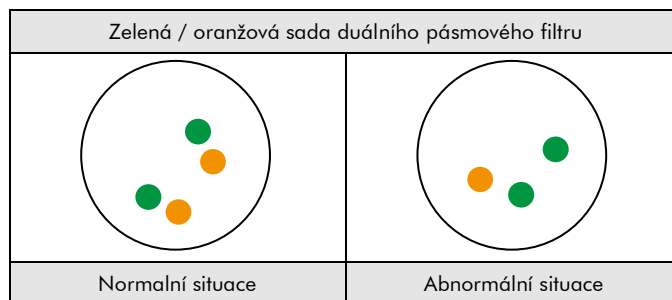
ZytoLight SPEC 19q13/19p13 Dual Color Probe:

Při použití vhodných sad filtrů se hybridizační signály sondy jeví oranžově (19q13 lokus) a zeleně (19p13 lokus).

Normální situace: V interfázích normálních buněk nebo buněk bez delece zahrnující lokus 19q13 se objeví dva oranžové signály a dva zelené signály (viz obrázek č.4).

Abnormální situace: V buňce s delecí ovlivňující lokus 19q13 bude pozorován snížený počet oranžových signálů. Delece ovlivňující pouze část lokusu 19q13 může vést k normálnímu vzoru signálu s oranžovými signály menší velikosti (viz obrázek č.4).

Překrývající se signály se mohou jevit jako žluté signály.



Obr. Č. 4 : Předpokládaný normální výsledek a abnormální jádra

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 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.
Buňky nebo tkáň nebyly fixovány správně	Optimalizujte fixační čas nebo aplikujte postfixační kroky popsaných v kapitole 12 „Pracovní postup“ v návodu ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit
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, 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
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
Nekompletní odparafinování	Používejte čerstvé roztoky; zkontrolovat délku odparafinování
Příliš silné natrávení	Zkraťte inkubaci s pepsinem.
Příliš velký objem próby na plochu vzorku	Snižte objem próby na řez, rozmístujte prouby 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
Buňky nebo tkáň nebyly fixovány správně	Optimalizujte fixační čas nebo aplikujte postfixační kroky popsaných v kapitole 12 „Pracovní postup“ v návodu ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit
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.

Překrývání jader

Možná příčina	Řešení
Nevhodná tloušťka tkáňových řezů	Připravte 2-4 μm microtomové řezy.

Vzorek uplavává ze sklíčka

Možná příčina	Řešení
Nevhodný povrch sklíčka	Použijte vhodná sklíčka.
Natrávení je příliš silné	Snižte inkubační dobu pepsinu

Slabé barvení

Možná příčina	Řešení
Nízká koncentrace roztoku DAPI	Používejte DAPI/DuraTect-Solution (ultra) (Prod. No. MT-0008-0.8)
Příliš krátká doba inkubace	Prodlužte dobu inkubace s DAPI.

18. Literatura

- Barbashina V, et al. (2005) *Clin Cancer Res* 11: 1119-28.
- Cairncross JG, et al. (1998) *J Natl Cancer Inst* 90: 1473-9.
- Cairncross G, et al. (2013) *J Clin Oncol* 31: 337-43.
- Griffin CA, et al. (2006) *J Neuropathol Exp Neurol* 65: 988-94.
- Louis DN, et al. (ed.) (2016) *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System* (Revised 4th Edition).
- Reifenberger G, et al. (2017) *Nat Rev Clin Oncol* 14: 434-52.
- Rosenberg JE, et al. (1996) *Oncogene* 13: 2483-5.
- Smith JS, et al. (1999) *Oncogene* 18: 4144-52.
- Smith JS, et al. (2000) *Genes Chromosomes Cancer* 29: 16-25.
- 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.