



ZytoLight

## SPEC KMT2A Dual Color Break Apart Probe

REF Z-2193-50  $\nabla$  5 (0.05 ml)

REF Z-2193-200  $\nabla$  20 (0.2 ml)

Do jakościowej detekcji translokacji obejmującej ludzki gen KMT2A w 11q23.3 metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH)



Wyrób medyczny do diagnostyki *in vitro*  
zgodnie z dyrektywą 98/79/WE

### 1. Przeznaczenie

ZytoLight SPEC KMT2A Dual Color Break Apart Probe (PL151) jest przeznaczony do jakościowej detekcji translokacji obejmującej ludzki gen KMT2A w 11q23.3 w próbkach cytologicznych takich jak komórki białaczkowe metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH). Sonda jest przeznaczona do stosowania w połączeniu z zestawem ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit (Nr. kat. Z-2099-20).

Interpretacja wyników musi być wykonana przez wykwalifikowanego patologa w kontekście klinicznej historii pacjenta w odniesieniu do pozostałych klinicznych i patologicznych danych pacjenta.

### 2. Znaczenie kliniczne

Translokacje z udziałem genu KMT2A są identyfikowane w 5-6% wszystkich ostrych białaczek szpikowych (AML) i 5-10% wszystkich ostrych białaczek limfoblastycznych (ALL). Częstotliwość translokacji z udziałem genu KMT2A jest znacznie wyższa u niemowląt z AML (50%), a także z ALL (80%). Udokumentowano ponad 30 partnerów fuzji dla KMT2A, najczęstszymi translokacjami są t(4; 11) i t(11; 19) w ALL oraz t(6; 11), t(9; 11) i t(11; 19) u pacjentów z AML. U 1-15% pacjentów z rakiem leczonych inhibitorem topoizomerazy DNA II rozwija się białaczka związana z terapią (t-AML) związana z translokacjami KMT2A. Generalnie obecność przegrupowań KMT2A u pacjentów z ostrą białaczką wskazuje mniej korzystne rokowanie. Jednak ostatnie badania sugerują, że konkretny partner translokacji KMT2A może wpływać na odpowiedź na leczenie i ogólne rokowanie w zależności od kontekstu klinicznego. Dlatego wykrycie translokacji KMT2A za pomocą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* może mieć znaczenie diagnostyczne i prognostyczne.

### 3. Zasada testu

Technika fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) umożliwia wykrywanie i wizualizację określonych sekwencji kwasów nukleinowych w preparatach komórkowych. Fluorescencyjnie oznakowane fragmenty DNA, nazwane sondami, i ich komplementarne docelowe nici DNA w preparatach są wspólnie denaturowane, a następnie łączą się podczas hybrydyzacji. Niespecyficzne i niezwiązane fragmenty sondy są usuwane przez stopniowe przemywanie. Po barwieniu kontrastowym DNA za pomocą DAPI, zhybrydowane fragmenty sondy są wizualizowane za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego wyposażonego w filtry wzbudzenia i emisji specyficzne dla fluorochromów, którymi fragmenty sondy FISH zostały oznakowane.

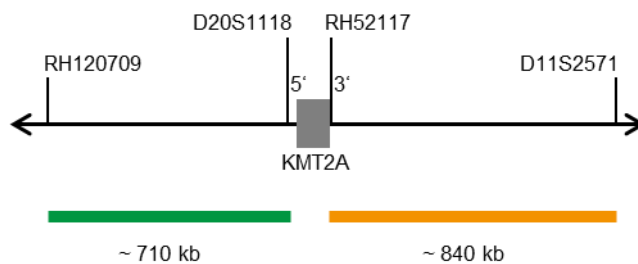
### 4. Dostarczone odczynniki

ZytoLight SPEC KMT2A Dual Color Break Apart Probe składa się z:

- ZyGreen (wzbudzenie 503 nm/emisja 528 nm) wyznakowane polinukleotydy (~10.0 ng/ $\mu$ l), których docelowe sekwencje są zmapowane w 11q23.3\* (chr11:117,574,074-118,284,029) proksymalnie do regionu punktu przerwania KMT2A (patrz Rys. 1).
- ZyOrange (wzbudzenie 547 nm/emisja 572 nm) wyznakowane polinukleotydy (~4.5 ng/ $\mu$ l), których docelowe sekwencje są zmapowane w 11q23.3\* (chr11:118,399,293-119,237,675) dystalnie do regionu punktu przerwania KMT2A (patrz Rys. 1).

Bufor do hybrydyzacji oparty na formamidzie

\*zgodnie z Human Genome Assembly GRCh37/hg19



Rys. 1: SPEC KMT2A Mapa sondy (bez skali)

ZytoLight SPEC KMT2A Dual Color Break Apart Probe jest dostępny w dwóch rozmiarach:

- Z-2193-50: 0.05 ml (5 reakcji po 10  $\mu$ l każda)
- Z-2193-200: 0.2 ml (20 reakcji po 10  $\mu$ l każda)

### 5. Materiały wymagane, ale nie dostarczane

- ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit (Nr. kat. Z-2099-20)
- Pozytywny i negatywny preparat kontrolny
- Szkiełka mikroskopowa, niepokryte
- Łażnia wodna (70°C)
- Hybrydyzator lub płyta grzewcza
- Hybrydyzator lub komora wilgotnościowa w ciepłarni do hybrydyzacji
- Regulowane pipety (10  $\mu$ l, 25  $\mu$ l)
- Barwiacze
- Timer
- Skalibrowany termometr
- Etanol lub odczynnik alkoholowy
- 37% formaldehyd, wolny od kwasów, lub 10% neutralna zbuforowana formalina
- 2x Saline-Sodium Citrate (SSC), np., z 20x SSC Solution (Nr. kat. WB-0003-50)
- Dejonizowana lub destylowana woda
- Szkiełka nakrywkowa (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Rubber cement, np. Fixogum Rubber Cement (Nr. kat. E-4005-50/-125) lub podobny
- Odpowiednio utrzymany mikroskop fluorescencyjny (400-1000x)
- Olejek immersyjny zatwierdzony do mikroskopii fluorescencyjnej
- Odpowiedni zestaw filtrów

## 6. Przechowywanie i obsługa

Przechowywać w temperaturze 2-8°C w pozycji pionowej chroniąc przed światłem.

Używać chroniąc przed światłem. Powrót do warunków przechowywania natychmiast po użyciu. Nie należy używać odczynników po upływie terminu ważności podanego na etykiecie. Produkt jest stabilny do daty ważności podanej na etykiecie, gdy jest odpowiednio przechowywany.

## 7. Ostrzeżenie i środki ostrożności

- Przeczytaj instrukcję użytkowania przed użyciem!
- Nie stosować odczynników po przekroczeniu daty ważności!
- Produkt ten zawiera substancje (w małym stężeniu i objętości), które są szkodliwe dla zdrowia i potencjalnie zakaźne. Unikać jakiegokolwiek bezpośredniego kontaktu z odczynnikami. Podejmij odpowiednie środki ochronne (stosuj rękawiczki ochronne, okulary ochronne i odzież laboratoryjną)!
- Jeśli odczynniki wejdą w kontakt ze skórą, natychmiast opłucz skórę dużą ilością wody!
- Karta charakterystyki substancji niebezpiecznej jest dostępna na żądanie profesjonalnego użytkownika.
- Nie używaj ponownie odczynników.
- Unikaj krzyżowego zanieczyszczenia próbek, które może prowadzić do błędnych wyników.
- Sonda nie powinna być ekspozycja na światło, zwłaszcza silne światło, przez dłuższy okres czasu, np. wszystkie kroki powinny zostać wykonane, jeśli to możliwe, w ciemności i/lub używając pojemników odpornych na światło!

## Zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia i określające środki ostrożności:

Składnik determinujący zagrożenie to formamid.



### Niebezpieczeństwo

H351	Podejrzewa się, że powoduje raka.
H360FD	Może działać szkodliwie na płodność. Może działać szkodliwie na dziecko w tonie matki.
H373	Może powodować uszkodzenie narządów poprzez długotrwałe lub powtarzane narażenie.
P201	Przed użyciem zapoznać się ze specjalnymi środkami ostrożności.
P202	Nie używać przed zapoznaniem się i zrozumieniem wszystkich środków bezpieczeństwa.
P260	Nie wdychać pyłu/dymu/gazu/mgły/par/rozpylonej cieczy.
P280	Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy.
P308+P313	W przypadku narażenia lub styczenia: Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.
P405	Przechowywać pod zamknięciem.

## 8. Ograniczenia

- Do zastosowań w diagnostyce *in vitro*.
- Tylko do użytku profesjonalnego.
- Interpretacja kliniczna jakiegokolwiek pozytywnego zabarwienia lub jego braku musi być wykonana w kontekście historii klinicznej, morfologii, innych kryteriów histopatologicznych, a także innych badań diagnostycznych. Obowiązkiem wykwalifikowanego patologa jest zaznajomienie się z sondami FISH, odczynnikami, panelami diagnostycznymi i metodami stosowanymi do wytwarzania barwionego preparatu. Barwienie musi być wykonane w certyfikowanym, licencjonowanym laboratorium pod nadzorem patologa, który jest odpowiedzialny za przeglądanie wybarwionych preparatów i zapewnienie odpowiedniej kontroli pozytywnej i negatywnej.

- Wybarwienie preparatów, szczególnie intensywność sygnału i barwienie tła, zależy od obróbki i przetwarzania próbki przed barwieniem. Nieodpowiednie utrwalenie, zamrażanie, rozmrażanie, płukanie, suszenie, podgrzewanie, krojenie lub zanieczyszczenie innym preparatem lub płynami może być źródłem artefaktów lub fałszywych wyników. Niepójne wyniki mogą być wynikiem różnych odmian metod utrwalania i zatapiania, a także obecności nieprawidłowości w próbce.

- Sonda powinna być użyta do detekcji loci opisanej w części 4 „Dostarczone odczynniki”.
- Wydajność została zatwierdzona przy użyciu procedur opisanych w niniejszej instrukcji użytkowania. Modyfikacje tych procedur mogą zmienić wydajność i muszą zostać zatwierdzone przez użytkownika.

## 9. Substancje zakłócające

Czerwone krwinki krwi obecne w próbce mogą wykazywać autofluorescencję, która utrudnia rozpoznawanie sygnału.

## 10. Przygotowanie próbek

Przygotuj próbki tak jak zostało to opisane w instrukcji użycia zestawu [ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit](#).

## 11. Obróbka wstępna produktu

Produkt jest gotowy do użycia. Nie jest wymagana rekonstrukcja, mieszanie lub rozcieńczenie. Przed użyciem przenieś sondę do temperatury pokojowej (18-25°C), chroniąc przed światłem. Przed otwarciem fiolki zamieszaj w worysku i krótko odwiruj.

## 12. Procedura testu

### Obróbka wstępna próbki

Przygotuj obróbkę wstępną próbki zgodnie z instrukcją użycia zestawu [ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit](#).

### Denaturacja i hybrydyzacja

1. Nanieś pipetą 10 µl sondy na każdy przygotowany wstępnie preparat.
2. Nakryj preparat szkiełkiem nakrywkowym 22 mm x 22 mm (unikaj zamknięcia bąbli powietrza) i uszczelnij preparat.  
*Rekomendujemy stosowanie rubber cement (np., Fixogum) do uszczelniania preparatów.*
3. Umieść szkiełka na płycie grzewczej lub hybrydyzatorze i denaturuj preparaty przez 5 min w 72°C.
4. Przeprowadź hybrydyzację od 2 h do 16 h (np. przez noc) w 37°C poprzez przeniesienie szkiełek do hybrydyzatora lub do komory wilgotnościowej w cieplarni.

*Istotne jest, aby próbki nie wysychały podczas etapu hybrydyzacji.*

### Obróbka po hybrydyzacji

Przygotuj obróbkę po hybrydyzacji (płukanie, barwienie kontrastowe, mikroskop fluorescencyjny) zgodnie z instrukcją użycia zestawu [ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kits](#).

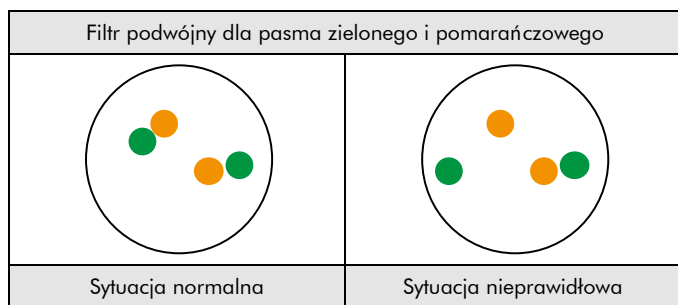
## 13. Interpretacja wyników

Przy użyciu odpowiednich zestawów filtrów, sygnały hybrydyzacji sondy są zielone (proksymalnie do regionu punktu przerwania KMT2A) i pomarańczowe (dystalnie do regionu punktu przerwania KMT2A).

**Sytuacja normalna:** W interfazach normalnych komórek lub komórek bez translokacji obejmującej region genu KMT2A, pojawiają się dwa zielono-pomarańczowe sygnały fuzji (patrz Rys. 2).

**Sytuacja nieprawidłowa:** Jeden region genu KMT2A dotknięty translokacją jest wskazany przez jeden oddzielny zielony sygnał i jeden oddzielny pomarańczowy sygnał (patrz Rys. 2).

Nakładają ce się sygnały mogą być wyświetlane jako z ótte sygnały.



Rys. 2: Oczekiwane wyniki w normalnych i nieprawidłowych jądrach komórkowych.

Genomowe aberracje spowodowane małymi delecjami, duplikacjami lub inwersjami, mogą skutkować niepozornymi wzorcami sygnałów. Inny rozkład sygnału może być obserwowany w niektórych nieprawidłowych próbkach, co może skutkować innym wzorcem sygnału niż opisany powyżej, wskazując na wariantowe rearanżacje. Nieoczekiwane wzorce sygnału powinny zostać dalej zbadane.

#### Należy pamiętać:

- Z powodu zdekondensowanej chromatyny pojedyncze sygnały FISH mogą pojawić się jako małe skupienia sygnałów. Zatem, dwa lub trzy sygnały o tym samym rozmiarze, oddzielone odległością  $\leq 1$  średnicy sygnału, powinny być liczone, jako jeden sygnał.
- Nie należy oceniać jąder komórkowych zachodzących na siebie.
- Nie zliczać jąder komórkowych nadmiernie strawionych (rozpoznane jako ciemne obszary widoczne w jądrze komórkowym).
- Nie zliczać jąder komórkowych z silną autofluorescencją, co utrudnia rozpoznawanie sygnału.
- Negatywne lub nieoczekiwane wyniki mogą być wynikiem wielu czynników (patrz część 17).
- Aby poprawnie zinterpretować wyniki, użytkownik musi zatwierdzić ten produkt przed użyciem w procedurach diagnostycznych zgodnie z wytycznymi krajowymi i/lub międzynarodowymi.

#### 14. Rekomendowane procedury kontroli jakości

W celu monitorowania prawidłowego przygotowania próbek i odczynników testowych do każdego testu należy dołączyć kontrole wewnętrzne i zewnętrzne. Jeśli li wewnętrzne i/lub zewnętrzne kontrole nie wykazują odpowiedniego zabarwienia, wyniki z próbkami od pacjentów muszą być uznane za nieważne.

**Kontrola wewnętrzna:** Nienowotworowe komórki w obrębie próbki, które wykazują normalny wzorzec sygnału.

**Kontrola zewnętrzna:** Walidowane preparaty z kontrolą dodatnią i ujemną.

#### 15. Charakterystyka wydajności

**Dokładność:** Lokalizacja hybrydyzacji sondy oceniona na metafazowych wymazach kariotypów normalnych samców. We wszystkich badanych próbkach sonda hybrydyzowała wyłącznie z oczekiwanymi loci. Nie zaobserwowano dodatkowych sygnałów ani krzyżowych hybrydyzacji. Dlatego dokładność została obliczona na 100%.

**Czułość analityczna:** W celu oceny wrażliwości analitycznej sonda była oceniana na podstawie metafazowych wymazach kariotypów normalnych samców. Wszystkie jądra komórkowe wykazały oczekiwany prawidłowy wzorzec sygnału we wszystkich badanych próbkach. Dlatego czułość analityczna została obliczona na 100%.

**Specyficzność analityczna:** W celu oceny specyficzności analitycznej sonda była oceniana na podstawie metafazowych wymazach kariotypów normalnych samców. We wszystkich badanych próbkach sonda hybrydyzowała wyłącznie z oczekiwanymi loci i żadnymi innymi loci. Dlatego specyficzność analityczna została obliczona na 100%.

#### 16. Utylizacja

Utylizacja odczynników musi odbywać się zgodnie z lokalnymi przepisami.

#### 17. Rozwiązywanie problemów

Każde odchylenie od instrukcji obsługi może prowadzić do gorszych wyników barwienia lub braku zabarwienia.

##### Słabe sygnały lub brak sygnałów

Możliwa przyczyna	Działanie
Niedostępna sekwencja docelowa	Zastosuj odpowiednią kontrolę docelową
Nieprawidłowa temperatura proteolizy, denaturacji, hybrydyzacji lub płukania	Sprawdź temperaturę wszystkich wykorzystywanych urządzeń technicznych za pomocą skalibrowanego termometru
Proteolityczna obróbka wstępna nie została przeprowadzona prawidłowo	Zoptymalizuj czas inkubacji pepsyny, wydłuż lub skróć jeśli to konieczne
Odparowanie sondy	Gdy używasz hybrydyzatora obowiązkowe jest stosowanie mokrych pasów / napełnionych wodą zbiorników. Gdy używasz ciepłarki wymagane jest użycie komory wilgotnościowej. W dodatku szkiełko nakrywkowe powinno być dokładnie uszczelnione, np. Fixogumem w celu zabezpieczenia przed wyschnięciem podczas hybrydyzacji
Zbyt niskie stężenie buforu płuczącego	Sprawdź stężenie buforu płuczącego
Stare roztwory do odwadniania	Przygotuj świeże roztwory do odwadniania
Nieprawidłowo ustawiony mikroskop fluorescencyjny	Dostosuj poprawnie
Stosowanie nieodpowiednich zestawów filtrów	Stosuj zestawy filtrów odpowiednich do fluorochromów sondy. <i>Filtry z potrójnym pasmem zapewniają mniej światła w porównaniu z zestawami filtrów jedno lub dwupasmowymi.</i> <i>W konsekwencji sygnały mogą wydawać się słabsze przy użyciu tych zestawów filtrów z potrójnym pasmem.</i>
Obraz sondy/fluorochromu nieprawidłowy	Wykonaj etapy hybrydyzacji i płukania w ciemności

##### Sygnały krzyżowe hybrydyzacji; wysokie tło

Możliwa przyczyna	Działanie
Zbyt silna proteolityczna obróbka wstępna	Zredukuj czas inkubacji z pepsyną
Zbyt duża objętość sondy w obszarze	Zredukuj objętość sondy na materiale/obszarze, rozprowadź sondę kroplami w celu uniknięcia lokalnej koncentracji
Szkiełko schłodzone do temperatury pokojowej przed hybrydyzacją	Przenieś szybko szkiełko do temperatury 37°C
Zbyt wysokie stężenie buforu płuczącego	Sprawdź stężenie buforu płuczącego
Zbyt niska temperatura płukania po hybrydyzacji	Sprawdź temperaturę; podnieś ją jeśli to konieczne
Odwodnienie próbek pomiędzy poszczególnymi etapami inkubacji	Zapobiegaj odwodnieniu próbek przez uszczelnienie szkiełek i przeprowadzanie inkubacji w wilgotnym środowisku

**Morfologia uległa degradacji**

Możliwa przyczyna	Działanie
Proteolityczna obróbka wstępna nie przeprowadzona prawidłowo	Zoptymalizuj czas inkubacji pepsyny, wydłuż lub skróć jeśli to konieczne
Niewystarczające wysuszenie przed aplikacją sondy	Wydłuż suszenie

**Słabe barwienie kontrastowe**

Możliwa przyczyna	Działanie
Niskie stężenie roztworu DAPI	Zamiast tego użyj <u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (Nr. kat. MT-0008-0.8)
Zbyt krótki czas inkubacji z DAPI	Dostosuj czas inkubacji z DAPI

**18. Literatura**

- Broeker PL, et al. (1996) *Blood* 87: 1912-22.
- De Braekeleer M, et al. (2005) *Anticancer Res* 25: 1931-44.
- Ford DJ & Dingwall AK (2015) *Cancer Genet* 208(5): 178-91.
- Gindin T, et al. (2015) *Hematol Oncol* 33(4) 239-46.
- Keefe JG, et al. (2010) *J Mol Diagn* 12: 441-52.
- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Langer T, et al. (2003) *Genes Chromosomes Cancer* 36: 393-401.
- Wechsler DS, et al. (2003) *Genes Chromosomes Cancer* 36: 26-36.
- Wilkinson DG: *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.

Nasi eksperci są gotowi odpowiedzieć na Państwa pytania.  
 Prosimy o kontakt [help@zytovision.com](mailto:help@zytovision.com)



ZytoVision GmbH  
 Fischkai 1  
 27572 Bremerhaven/ Germany  
 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)

**Znaki towarowe:**

ZytoVision® i ZytoLight® to znaki towarowe ZytoVision GmbH.