



## ZytoLight

### SPEC NTRK2 Dual Color Break Apart Probe

|     |            |   |             |
|-----|------------|---|-------------|
| REF | Z-2205-50  | Σ | 5 (0.05 ml) |
| REF | Z-2205-200 | Σ | 20 (0.2 ml) |

A humán 9q21.33 kromoszóma régióban kódolt NTRK2 gén transzlokációjának kvalitatív kimutatása fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) módszerrel



*In vitro* diagnosztikai orvosi eszköz  
a 98/79 / EK EU irányelv szerint

#### 1. Javasolt alkalmazás

A ZytoLight SPEC NTRK2 Dual Color Break Apart Probe (PL163) a humán 9q21.33 kromoszóma régióban kódolt NTRK2 gén transzlokációjának kvalitatív kimutatására szolgál fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) módszerrel formalinnal fixált, paraffinba ágyazott minták alkalmazására. A próbát a ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Kat. szám Z-2028-5/-20) készlet reagenssel kombinációban ajánlott használni.

Az eredmények értelmezését a beteg klinikai kórtörténetével összevetve kell elvégezni képzett patológus további klinikopatológiai véleményének figyelembe vételével.

#### 2. Klinikai jelentőség

Az NTRK2 (neurotróf receptor tirozin-kináz 2) receptor tirozin-kináz (TK) az agyi eredetű növekedési faktor (BDGF) és a neurotrophin 4/5 (NT-4/5) megkötésével foszforilálja önmagát és a MAPK útvonal egyéb tagjait. Kulcsszerepet tölt be a központi és a perifériás idegrendszer fejlődésében, valamint a sejtek túlélésében. Az NTRK2 gént érintő transzlokációk számos daganattípusban ismertek, mint pl. glioblastomában, pilocytás astrocytomában, fej-nyaki laphámsejtes carcinomában és tüdő adenocarcinomában. Az NTRK2 átrendeződése a gén 3'-végének fúzióját eredményezi különböző aktiváló gének (AGBL4, PAN3 vagy AFAP1) 5'-végével. A létrejött fúziós gének az NTRK2 gén TK doménjéből és a dimerizációs doméneket kódoló partner fehérjék N-terminális régiójából felépülő hibrid fehérjéket kódolnak és így egy ligandumfüggetlen TK aktivitás kialakítására képesek. Számos klinikai vizsgálat zajlik napjainkban az NTRK2 kinázok működését gátló gyógyszerekkel kapcsolatban. Közülük az entrectinib és a LOXO-101 két ígéretes és a betegek számára jól tolerálható TRK-inhibitor NTRK1,2 vagy 3 génátrendeződéssel igazolt előrehaladott szolid daganatokban vagy NSCLC-ben. Ezért az NTRK2 génátrendeződések fluoreszcens *in situ* hibridizációval (FISH) történő kimutatása diagnosztikus és terápiás jelentőséggel is rendelkezhet.

#### 3. Vizsgálati módszer

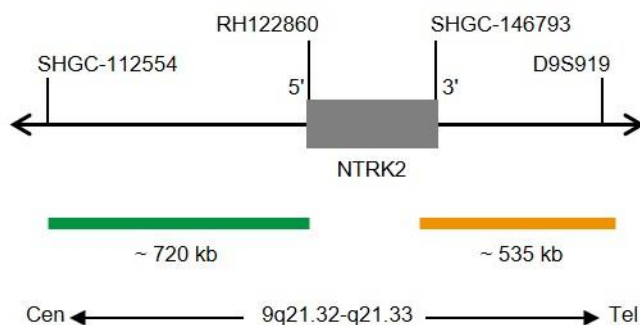
A fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) technika lehetővé teszi sejt preparátumok specifikus nukleinsav szekvenciáinak kimutatását és megjelenítését. A fluoreszcens jelölt DNS fragmensek, úgynevezett FISH próbák vagy szondák és azok komplementer cél-DNS szárai a készítményekben együttesen denaturálódnak, majd a hibridizálás során összekapcsolódnak. Ezután a nem specifikus és a nem kötődött próba darabok magas stringenciájú mosási lépésekkel kerülnek eltávolításra. A DNS DAPI háttérfestését követően a hibridizált szonda fragmentumok a közvetlenül rájuk kapcsolt specifikus fluorokróom molekulák segítségével excitációs és emissziós szűrőkkel felszerelt fluoreszcens mikroszkóppal vizualizálhatók.

#### 4. Mellékelt reagensek

A ZytoLight SPEC NTRK2 Dual Color Break Apart Probe készlet tartalmazza:

- ZyGreen (gerjesztő hullámhossz 503 nm/kibocsátási hullámhossz 528 nm) zöld festékkel megjelölt polinukleotidok (~10.0 ng/μl), amelyek cél szekvenciái a NTRK2 gén töréspont régiójától proximálisan helyezkednek el a 9q21.32-q21.33\* (chr9:86,569,621-87,287,312) kromoszóma régióban (lásd 1. ábra).
- ZyOrange (gerjesztő hullámhossz 547 nm/kibocsátási hullámhossz 572 nm) narancssárga festékkel megjelölt polinukleotidok (~4.5 ng/μl), amelyek cél szekvenciái a NTRK2 gén töréspont régiójától disztálisan helyezkednek el a 9q21.33\* (chr9:87,589,037-88,124,082) kromoszóma régióban (lásd 1. ábra).
- Formamid alapú hibridizációs puffer

\*a Human Genome Assembly szerint GRCh37/hg19



1. ábra: SPEC NTRK2 Próba térkép (nem méretarányos)

A ZytoLight SPEC NTRK2 Dual Color Break Apart Probe készlet két kiserelésben elérhető:

- Z-2205-50: 0.05 ml (5 reakció egyenként 10 μl térfogattal)
- Z-2205-200: 0.2 ml (20 reakció egyenként 10 μl térfogattal)

#### 5. Szükséges, de nem biztosított anyagok

- ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Kat. szám Z-2028-5/-20)
- Pozitív és negatív kontrol minták
- Pozitívra töltött tárgylemezek
- Vizfürdő (37°C, 98°C)
- Hibridizációs kamra vagy fűtőblokk
- Hibridizációs pára kamra
- Szabályozható pipetták (10 μl, 25 μl)
- Festőedények vagy fürdők
- Időzítő
- Kalibrált hőmérő
- Etanol
- Xilol
- Deszillált vagy ionmentesített víz
- Fedőlemezek (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Gumicement pl., Fixogum Rubber Cement (Kat. szám. E-4005-50/-125) vagy hasonló ragasztó
- Megfelelően karbantartott fluoreszcens mikroszkóp (400-1000x)
- Fluoreszcens mikroszkópiához elfogadott immerziós olaj
- Megfelelő fluoreszcencia szűrő készletek

## 6. Tárolás és kezelés

Álló helyzetben 2-8°C között fénytől védve tárolandó. Erős fényt elkerülve használatos. Felhasználást követően azonnal a tárolási feltételek alkalmazandók. Ne használja a reagenseket a címkén feltüntetett lejárati időn túl. A termék a címkén feltüntetett lejárati ideig őrzi meg stabilitását megfelelően kezelés mellett.

## 7. Figyelmeztetések és óvintézkedések

- Használat előtt olvassa el a használati utasítást!
- Ne használja a reagenseket a lejárati idő letelte után!
- Ez a termék olyan anyagokat tartalmaz (kis koncentrációban és térfogatban), amelyek az egészségre károsak és potenciálisan fertőzők. Kerülje a közvetlen érintkezést a reagensekkel. Tegyen megfelelő védőintézkedéseket (használjon eldobható kesztyűt, védőszemüveget és laboratóriumi öltözetet)!
- Ha a reagens bőrrel érintkezik, azonnal öblítse le bő vízzel!
- Foglalkozásszerű felhasználók részére igény esetén anyagbiztonsági adatlapot biztosítunk.
- A reagens nem újra felhasználható.
- A minták keresztszennyeződését kerülni kell, mert ez hibás eredményhez vezethet.
- A próbát ne tegye ki fénynek, különösen hosszabb ideig tartó erős fénynek, azaz minden lépést, ha lehetséges, sötétben és/vagy fényálló tartókban hajtson végre!

### Veszélyek és óvintézkedések:

A legfőbb veszélyt jelentő összetevő a formamid.



### Veszély

|           |  |
|-----------|--|
| H351      | Feltehetően rákot okoz.  |
| H360FD    | Károsíthatja a termékenységet. Károsíthatja a születendő gyermeket.                            |
| H373      | Ismétlődő vagy hosszabb expozíció esetén károsíthatja a szerveket.                             |
| P201      | Használat előtt ismerje meg az anyagra vonatkozó különleges utasításokat.                      |
| P202      | Ne használja addig, amíg az összes biztonsági óvintézkedést el nem olvasta és meg nem értette. |
| P260      | A por/füst/gáz/köd/gőzök/permet belélegzése tilos.   |
| P280      | Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő használata kötelező.                                     |
| P308+P313 | Expozíció vagy annak gyanúja esetén: orvosi ellátást kell kérni.                               |
| P405      | Elzárva tárolandó.   |

## 8. Korlátozások

- *In vitro* diagnosztikai használatra.
- Csak szakképzett felhasználók részére.
- A pozitív reakció meglétének vagy hiányának klinikai értelmezését a klinikai kórtörténet, morfológia, egyéb hisztopatológiai kritériumok, valamint más diagnosztikai vizsgálatok függvényében végezze. A szakképzett patológus felelőssége a reakciók elkészítéséhez szükséges FISH szondák, reagens, diagnosztikai panelek és módszerek megfelelő ismerete. A FISH festést egy hitelesített, szükséges engedéllyel rendelkező laboratóriumban kell végezni, patológus felügyelete mellett, aki felelős a festett lemezek áttekintéséért és a megfelelő pozitív és negatív kontrol reakciók biztosításáért.
- A minta festése, különösen a jelintenzitás és a háttérfestés erőssége a festést megelőző mintakezeléstől és feldolgozástól függ. A minta nem megfelelő fixálása, fagyasztása, felolvasztása, mosása, szárítása, melegítése, metszése vagy más mintákkal és folyadékokkal való keresztszennyezése műtermékek vagy hamis eredmények kialakulásához vezethet. Ellentmondó eredmények eredhetnek a minta rögzítési és beágyazási eltéréseiből, valamint magában a mintában rejlő egyenlőtlen feltételekből.

- A szondát csak a 4. "Mellékelt reagens" fejezetben leírt lókuszkok kimutatásához szabad használni.

- A reagens teljesítménye a jelen használati utasításban leírt eljárások alkalmazásával került validálásra. Ezen eljárások módosítása a teljesítmény megváltozását okozhatja, amit a felhasználónak validálnia szükséges.

## 9. Interferenciát kiváltó anyagok

A mintában jelen lévő vörösvértetek autofluoreszcenciát mutathatnak akadályozva a megfelelő jelfelismerést.

Az alábbi fixálószer nem alkalmazhatóak FISH reakcióhoz:

- Bouin fixáló
- B5 fixáló
- Savas fixálószer (pl. pikrinsav)
- Zenker fixáló
- Alkohokok (önmagukban használva)
- Higanyklorid
- Formaldehid/cink fixáló
- Hollandi fixáló
- Nem pufferolt formalin

## 10. A minták előkészítése

Ajánlások:

- Fixálja a mintát 10%-os semlegesre pufferelt formalinban 24 órán át szobahőmérsékleten (18-25°C-on).
- A minta mérete  $\leq 0.5 \text{ cm}^3$  legyen.
- Prémium minőségű paraffint használjon.
- A beágyazást 65°C alatti hőmérsékleten hajtja végre.
- 2-4  $\mu\text{m}$  vastagságú metszeteket készítsen.
- Pozitívan töltött tárgylemezeket használjon.
- Fixálja a metszetet a lemezre 2-16 órán át 50-60°C-os hőmérsékleten.

## 11. A reagens előkészítése

A termék azonnal felhasználható (RTU). Nem szükséges feloldani, átkeverni vagy tovább hígítani. Használat előtt hozza szobahőmérsékletre (18-25°C) fénytől védve. Mielőtt kinyitná a próbát tartalmazó fiólat vortexeléssel keverje össze és rövid ideig centrifugálja.

## 12. A vizsgálati eljárás

### A minta előkezelése

A minta előkezelését (paraffin-mentesítés, proteolitikus emésztés) a [ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit](#) készlet használati utasításának megfelelően végezze.

### Denaturáció és hibridizáció

1. Pipettázzon 10  $\mu\text{l}$  próbát az előkezelt minták megfelelő területeire.
2. Helyezzen fel egy 22 mm x 22 mm-es üveg fedőlemezt a próbakeverékre (akadályozza meg a légbuborékok képződését) és tömítéssel zárja le a fedőlemezt.

*Javasoljuk, hogy gumicementet (pl. Fixogum-ot) használjon a tömítéshez.*

3. Helyezze be a tárgylemezeket fűtőblokkba vagy hibridizációs kamrába és denaturálja a mintákat 75°C-on 10 percen át.
4. Helyezze a tárgylemezeket hibridizációs páramrába és a hibridizációhoz inkubálja őket 37°C-on egy éjszakán át.

*Lényeges, hogy a minták ne száradjanak ki a hibridizációs lépés folyamán.*

### Poszt-hibridizáció

Végezzen poszt-hibridizációs eljárást (mosást, háttérfestést és fluoreszcens mikroszkópos értékelést) a [ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit](#) készlet használati utasításának megfelelően.

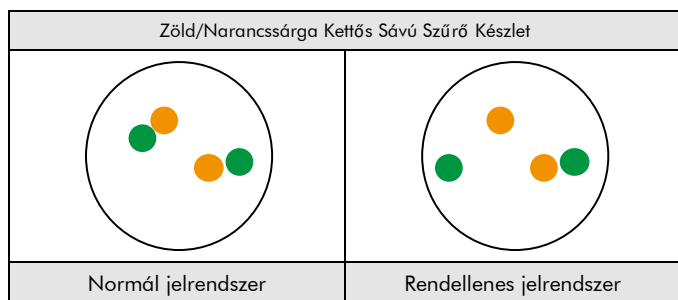
## 13. Az eredmények kiértékelése

Megfelelő fluoreszcencia szűrő készletek használatával a próbák hibridizációs jelei zöld (a NTRK2 gén töréspontjától proximálisan eső régió) és narancssárga (a NTRK2 gén töréspontjától disztálisan eső régió) színűnek látszódnak.

**Normál jelrendszer:** Normál sejtek NTRK2 transzlokáció nélküli, interfázisos sejtmagjaiban két zöld/narancssárga színű fúziós jel látható (lásd 2. ábra).

**Rendellenes jelrendszer:** A NTRK2 gén régióját érintő transzlokációt egy egymástól elkülönült zöld és narancssárga jel mutatja (lásd 2. ábra).

*Az egymással átfedő jelek citromsárgának tűnhetnek.*



2. ábra: Várt eredmények normál és rendellenes sejtmagok esetén

A kisebb deléciók, duplikációk vagy inverziók okozta genomális eltérések nehezen észlelhető jelmintázatokat eredményezhetnek.

Néhány abnormális mintában a fent leírt két típustól eltérő jelmintázat-eloszlás figyelhető meg, mely egyéb variáns génátrendezésre utal. Ezen nem várt szignál mintázatokat további vizsgálatokat igényelhetnek.

#### Kérjük, vegye figyelembe:

- A dekoncentrált kromatinszerkezet következtében egyes FISH jelek kis szignál klaszterekként jelentkezhetnek. Így kettő vagy három egyforma méretű szignál egymástól  $\leq 1$  szignál átmérő távolsággal elválasztva egy szignálnak számolandó.
- Ne értékeljen egymással átfedésben levő sejtmagokat.
- Ne számolja a túlemésztett sejtmagokat (amelyek a sejtmagon belüli sötét területek alapján ismerhetők fel).
- Ne számolja az erős autofluoreszcenciával rendelkező sejtmagokat, ami a jelek felismerését gátolhatja.
- Negatív vagy nem specifikus eredményt számos tényező kiválthat (lásd a 17. fejezetet).
- Az eredmények helyes interpretálása érdekében a terméket a diagnosztikai eljárásokban történő felhasználás előtt a felhasználónak validálnia kell a nemzeti és/vagy nemzetközi iránymutatások szerint.

#### 14. Ajánlott minőségellenőrzési eljárások

A feldolgozott minták és a vizsgálati reagensek pontos hatékonyságának felmérése érdekében minden vizsgálathoz belső és külső kontrol festéseket kell végezni. Amennyiben a belső és/vagy külső pozitív kontrol reakciók nem mutatnak megfelelő festődést, akkor a beteg vizsgált mintájának eredményét érvénytelennek kell tekinteni.

**Belső kontrol:** Az elemzett mintában lévő nem neoplastikus sejtek (pl. fibroblasztok) normál szignál mintázatot mutatnak.

**Külső kontrol:** Validált pozitív és negatív kontrol minták.

#### 15. Teljesítményjellemzők

**Pontosság:** A próba hibridizációjának helyét normál férfi kariotípusú minták metafázis készítményein határozták meg. Minden vizsgált mintában a próba kizárólag a várt lókuszhoz hibridizálódott. Nem figyeltek meg további jeleket vagy kereszthibridizációt. Így a pontosság 100%-nak számítható.

**Analitikai érzékenység:** Az analitikai érzékenység meghatározásához a próba működését normál férfi kariotípusú minták metafázis készítményein határozták meg. Valamennyi sejtmag a várt normális jelmintázatot mutatta az összes vizsgált mintában. Ezért az analitikai érzékenységet 100%-osnak becsülték.

**Analitikai specifitás:** Az analitikai specifitás meghatározásához a próba működését normál férfi kariotípusú minták metafázis készítményein határozták meg. Minden vizsgált mintában a próbák csak a várt cél lókuszhoz hibridizálódtak, más lókuszhoz nem kötődtek. Ezért az analitikai specifitást 100%-nak számítható.

#### 16. Hulladékkezelés

A reagensek hulladékként történő elhelyezését az országos szabályozásokkal összhangban kell elvégezni.

#### 17. Hibaelhárítás

A használati utasítástól való bármilyen eltérés gyengébb vagy akár teljesen negatív festési eredményekhez vezethet.

#### Gyenge jel vagy nincs jel

| Valószínűsíthető ok  | Javasolt teendő  |
|--|--|
| A célszekvencia nem kimutatható  | Használjon megfelelő kontrolokat   |
| A sejt- vagy szövetminta nem megfelelően fixálódott  | Optimalizálja a fixálás idejét és a fixálószeret vagy alkalmazzon utófixálási lépést a <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</u> kézikönyvének "vizsgálati eljárásában" leírtak szerint  |
| A melegítés előkezelési, az emésztési, a denaturációs, a hibridizációs vagy a magas stringenciájú mosás hőmérséklete nem megfelelő | Kalibrált hőmérővel ellenőrizze a használt műszaki berendezések hőmérsékletét  |
| Nem megfelelő proteolitikus előkezelés   | Optimalizálja a pepszines emésztés inkubációs idejét, szükség esetén növelje vagy csökkentse azt   |
| A próbakeverék párolgása   | Hibridizációs pára kamra használata esetén a nedvesített csíkok/vízrel töltött tartályok használata kötelező. Hibridizációs fűtőblokk használata esetén gondoskodjon megfelelő páratartalomról. Ezenkívül a fedőlemez teljesen le kell zárni, például Fixogum ragasztóval, a minta kiszáradását a hibridizáció során elkerülendő |
| A magas stringenciájú mosópuffer koncentrációja túl alacsony   | Ellenőrizze a magas stringenciájú mosópuffer koncentrációját   |
| Régi dehidratáló oldatok   | Készítsen friss dehidratáló oldatokat  |
| A fluoreszcens mikroszkóp nem működik megfelelően  | Ellenőrizze a mikroszkópot   |
| Nem megfelelő szűrőkészletet használ   | Használjon a fluorokrómoknak megfelelő szűrőkészleteket.<br><i>A hármas szűrő szett készletek kevesebb fényt biztosítanak, mint a mono- vagy kettős szűrők. Ennek következtében a jelek a hármas szűrő szett készlet használatával gyengébbek lehetnek</i>   |
| A próbák/fluorokrómok fény által károsodhattak   | A hibridizációt és a mosási lépéseket sötétben végezze   |

#### Keresztreagáló fluoreszcens jelek; magas háttérzaj

| Valószínűsíthető ok                                   | Javasolt teendő   |
|---|---|
| A paraffin-mentesítés nem megfelelő                   | Használjon friss oldatokat; ellenőrizze a paraffin-mentesítés időtartamát   |
| Túl erős proteolitikus előkezelés                     | Csökkentse a pepszines inkubáció idejét   |
| Túlságosan nagy a próba mennyisége az adott területre | Csökkentse a próba mennyiségét a hibridizációs terület arányához mérten, cseppenként ossza szét a próbát elkerülve a túlkonzentrálódást |

|   |   |
|---|---|
| A tárgylemezek szobahőmérsékletűre hűltek a hibridizációt megelőzőleg | Tegye a tárgylemezeket mielőbb 37°C-ra  |
| A magas stringenciájú mosópuffer koncentrációja túl magas             | Ellenőrizze a magas stringenciájú mosópuffer koncentrációját  |
| A hibridizációt követő mosási lépés hőmérséklete túl alacsony         | Ellenőrizze a hőmérsékletet; szükség esetén emelje azt  |
| A minták kiszáradnak az egyes inkubációs lépések között               | A fedőlemezek leragasztásával akadályozza meg a kiszáradást és az inkubációt nedvesített körülmények között végezze |

**Károsodott szöveti morfológia**

| Valószínűsíthető ok                                   | Javasolt teendő   |
|---|---|
| A sejt- vagy szövetminta nem megfelelően fixálódott   | Optimalizálja a fixálás idejét és a fixálószer vagy alkalmazzon utófixálási lépést a <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</u> kézikönyvének "vizsgálati eljárásában" leírtak szerint |
| Nem megfelelő proteolitikus előkezelés                | Optimalizálja a pepszines emésztés inkubációs idejét, szükség esetén növelje vagy csökkentse azt  |
| A minta elégtelen száradása a próba alkalmazása előtt | Növelje a levegőn történő száradás idejét   |

**Átfedő sejtmagok**

| Valószínűsíthető ok                  | Javasolt teendő                         |
|--------------------------------------|---|
| A metszetek vastagsága nem megfelelő | Készítsen 2-4 µm vastagságú metszeteket |

**A metszet leúszik a tárgylemezről**

| Valószínűsíthető ok                 | Javasolt teendő                                   |
|-------------------------------------|---|
| A tárgylemez bevonata nem megfelelő | Használjon megfelelő tárgylemezeket               |
| Túl erős proteolitikus előkezelés   | Csökkentse a pepszines emésztés inkubációs idejét |

**Gyenge háttérfestés**

| Valószínűsíthető ok                      | Javasolt teendő   |
|--|---|
| Alacsony koncentraciójú DAPI oldat       | Használja a <u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (Kat.szám MT-0008-0.8) terméket |
| A DAPI festés inkubációs ideje túl rövid | Állítsa be megfelelően a DAPI festés inkubációs idejét                            |

**18. Hivatkozások**

- Amatu A, et al. (2016) *ESMO Open* 1: e000023.
- Jones DTW, et al. (2013) *Nat Genet* 45: 927-32.
- Kievičs T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Raez LE & Rolfo C (2016) *Lung Cancer Manag* 5: 1-4.
- Stransky N, et al. (2014) *Nat Commun* 5: 4846.
- Wilkinson DG: *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.
- Wu G, et al. (2014) *Nat Genet* 46: 444-50.

Szakembereink készséggel válaszolnak kérdéseikre.  
Vegye fel velünk a kapcsolatot a [helptech@zytovision.com](mailto:helptech@zytovision.com) címen.



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

**Védjegy:**

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