



ZytoLight

SPEC ALK/EML4 TriCheck Probe

REF	Z-2117-50	∇	5 (0.05 ml)
REF	Z-2117-200	∇	20 (0.2 ml)

Do jakościowej detekcji rearanżacji ALK-EML4 metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH)



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

1. Przeznaczenie

ZytoLight SPEC ALK/EML4 TriCheck Probe (PL74) jest przeznaczony do jakościowej detekcji rearanżacji z udziałem ludzkiego genu ALK w 2p23.1-p23.2 i ludzkiego genu EML4 w 2p21 w próbkach utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH). Sonda jest przeznaczona do stosowania w połączeniu z zestawem ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Nr. kat. Z-2028-5/-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

Stosując tę sondę możliwe jest rozróżnienie pomiędzy inwersją EML4-ALK, a translokacją wpływającą na ALK, ale nie EML4, takich jak translokacje ALK-TFG lub ALK-KIF5B. Inwersja w krótkim ramieniu chromosomu 2 [inv(2)(p21p23)] była często wykrywana w niedrobnokomórkowym raku płuc (NSCLC) i prowadziła do tworzenia transkryptów fuzyjnych EML4-ALK. W kilku raportach zidentyfikowano również transkrypty fuzyjne EML4-ALK w rakach piersi, żołądka i jelita grubego. W tych odpowiednich inwersjach zidentyfikowano wiele różnych miejsc przerwania wpływających na ALK i EML4. Tak więc, zidentyfikowano wiele wariantów transkryptu EML4-ALK, z których wszystkie obejmują wewnątrzkomórkową domenę kinazy ALK. Terapie ukierunkowane na kinazy ALK mogą stanowić bardzo skuteczną strategię terapeutyczną u pacjentów z NSCLC z rearanżacją EML4-ALK. W celu wykrycia tego podzbioru pacjentów z NSCLC, specyficzne wykrywanie przegrupowań EML4-ALK przy użyciu fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) jest pomocnym narzędziem do diagnozy i wyboru leczenia.

3. Zasada testu

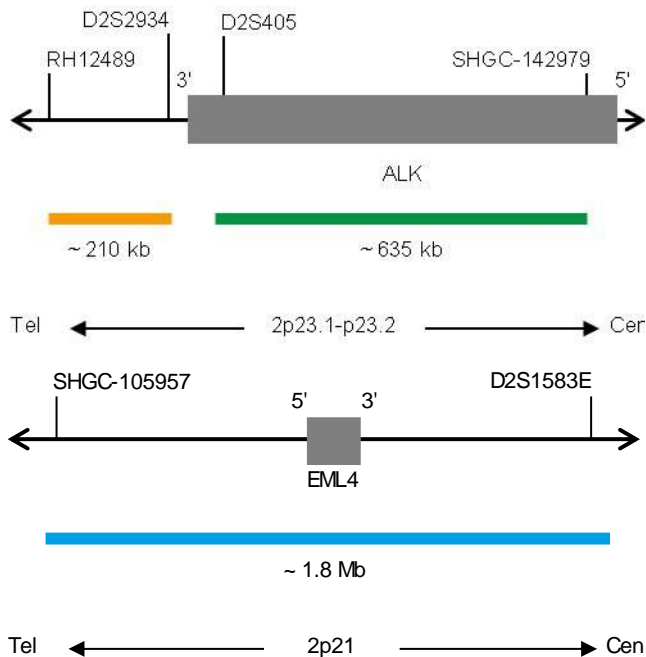
Technika fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) umożliwia wykrywanie i wizualizację określonych sekwencji kwasów nukleinowych w preparatach komórkowych. Fluorescencyjnie oznakowane fragmenty DNA, nazwane sondami, i ich komplementarne docelowe nici DNA w preparatach są wspólnie denaturowane, a 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 zwizualizowane za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego wyposażonego w filtry wzbudzenia i emisji specyficzne dla fluorochromów, którymi fragmenty sondy FISH zostały oznakowane.

4. Dostarczone odczynniki

ZytoLight SPEC ALK/EML4 TriCheck Probe składa się z:

- ZyGreen (wzbudzenie 503 nm/emisja 528 nm) wyznakowane polinukleotydy (~10.0 ng/μl), których docelowe sekwencje są zmapowane w 2p23.1-p23.2* (chr2:29,460,144-30,095,822) proksymalnie do regionu punktu przerwania ALK (patrz Rys. 1).
- ZyOrange (wzbudzenie 547 nm/emisja 572 nm) wyznakowane polinukleotydy (~4.5 ng/μl), których docelowe sekwencje są zmapowane w 2p23.2* (chr2:29,174,204-29,383,335) dystalnie do regionu punktu przerwania ALK (patrz Rys. 1).
- ZyBlue (wzbudzenie 418 nm/emisja 467 nm) wyznakowane polinukleotydy (~37.0 ng/μl), których docelowe sekwencje są zmapowane w 2p21* (chr2:41,573,525-43,349,624) zajmujący region genu EML4 (patrz Rys. 1).
- Bufor do hybrydyzacji oparty na formamidzie

* zgodnie z Human Genome Assembly GRCh37/hg19



Rys. 1: Góra: SPEC ALK Mapa sondy; Dół: SPEC EML4 Mapa sondy (bez skali)

ZytoLight SPEC ALK/EML4 TriCheck Probe jest dostępny w dwóch rozmiarach:

- Z-2117-50: 0.05 ml (5 reakcji po 10 μl każda)
- Z-2117-200: 0.2 ml (20 reakcji po 10 μl każda)

5. Materiały wymagane, ale nie dostarczane

- ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Nr. kat. Z-2028-5/-20)
- Pozytywny i negatywny preparat kontrolny
- Szkiełka mikroskopowe, pozytywnie naładowane
- Łażnia wodna (37°C, 98°C)
- Hybrydyzator lub płyta grzewcza
- Hybrydyzator lub komora wilgotnościowa w ciepłarni do hybrydyzacji

- Regulowane pipety (10 μ l, 25 μ l)
- Barwiacze
- Timer
- Skalibrowany termometr
- Etanol lub odczynnik alkoholowy
- Ksylen
- Dejonizowana lub destylowana woda
- Szkiełka nakrywkowe (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 ołucz 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 łonie 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 styczności: 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 utwalenie, zamrażanie, rozmrażanie, płukanie, suszenie, podgrzewanie, krojenie lub zanieczyszczenie innym preparatem lub płynami może być źródłem artefaktów lub fałszywych wyników. Niespójne wyniki mogą być wynikiem różnych odmian metod utwalania 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.

Następujące utwalacze są niekompatybilne z FISH:

- Utrwalacz Bouin'a
- Utrwalacz B5
- Utrwalacze kwaśne (np., kwas pikrynowy)
- Utrwalacz Zenker'a
- Alkohole (stosowane samodzielnie)
- Chlorek rtęci
- Utrwalacz formaldehyd/cynk
- Utrwalacz Holandesa
- Niebuforowana formalina

10. Przygotowanie próbek

Zalecenia:

- Utrwalanie w 10% neutralnej buforowanej formalinie przez 24 h w temperaturze pokojowej (18-25°C).
- Rozmiar próbki $\leq 0.5 \text{ cm}^3$.
- Stosuj parafinę jakości premium.
- Zatapianie powinno się odbywać w temperaturze poniżej 65°C.
- Przygotuj skrawki o grubości 2-4 μm .
- Stosuj szkiełka mikroskopowe pozytywnie naładowane.
- Utrwalaj przez 2-16 h w 50-60°C.

11. Obróbka wstępna produktu

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

12. Procedura testu

Obróbka wstępna próbki

Przygotuj obróbkę wstępną próbki (odparafinowanie, proteolizę) zgodnie z instrukcją użycia zestawu ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit.

Denaturacja i hybrydyzacja

1. Nanieś pipetą 10 μ l sondy na każdy przygotowany wstępnie preparat.
2. Nakryj preparat szkiełkiem nakrywkowym 22 mm x 22 mm (unikaj zamknięcia błędną powietrzem) i uszczelnij preparat.

Rekomendujemy stosowanie rubber cement (np., Fixogum) do uszczelniania preparatów.

- Umieść szkiełka na płycie grzewczej lub hybrydyzatorze i denaturuj preparaty przez 10 min w 75°C.
- Przenieś szkiełka do komory wilgotnościowej i hybryduj przez noc w temperaturze 37°C (np. w ciepłarni hybrydyzatora).

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-Tissue Implementation Kit.

13. Interpretacja wyników

Przy użyciu odpowiednich zestawów filtrów, sygnały hybrydyzacji sondy są zielone (proksymalnie do regionu punktu przerwania ALK), pomarańczowe (dystalnie do regionu punktu przerwania ALK) i niebieskie (region genu EML4).

Sytuacja normalna: W interfazach normalnych komórek bez rearanżacji regionu genu EML4-ALK, pojawiają się dwa fuzyjne sygnały pomarańczowo-zielone i dwa sygnały niebieskie (patrz Rys. 2).

Sytuacja nieprawidłowa: Inwersja EML4-ALK jest wskazywana przez jeden oddzielny zielony sygnał, jeden oddzielny pomarańczowy sygnał i dodatkowy niebieski sygnał. Każde z oddzielnych sygnałów, zielony i pomarańczowy kolokalizują z niebieskim sygnałem. Translokacja ALK nie wpływająca na EML4 jest wskazywana przez jeden oddzielny pomarańczowy sygnał bez dodatkowego niebieskiego sygnału. Inwersja EML4-ALK z delecją sekwencji 5'-ALK jest wskazywana przez brak jednego sygnału zielonego i kolokalizację oddzielnego sygnału pomarańczowego z dodatkowym sygnałem niebieskim. (patrz Rys. 2).

Nakładają ce się sygnały zielone i pomarańczowe mogą pojawiać się jako 2 ólte sygnały.

	Filtr podwójny dla pasma zielonego i pomarańczowego	Filtr pojedynczy dla pasma niebieskiego	Obraz złożony lub filtr potrójny
Komórki normalne			
Inwersja EML4 – ALK			
Translokacja ALK nieobejmująca EML4			
Inwersja EML4 – ALK z delecją sekwencji 5' ALK			

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

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 ≤ 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 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, np. fibroblasty.

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 hybrydowała 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 hybrydowała 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
Komórka lub tkanka nie została prawidłowo utrwalona	Zoptymalizuj czas utrwalania i utrwalacz lub zastosuj dodatkowy etap utrwalania jak to zostało opisane w "procedurze testu" w instrukcji użycia zestawu <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</u>
Nieprawidłowa temperatura wstępnej obróbki ciepłej, 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 / napędzonych wodą zbiorników. Gdy używasz ciepłarki wymagane jest utrzymanie 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
Niekompletne odparowanie	Użyj słabszych odczynników; sprawdź czas usuwania parafiny
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

Zdegradowana morfologia tkanki

Możliwa przyczyna	Działanie
Komórka lub tkanka nie zostały utrwalone prawidłowo	Zoptymalizuj czas utrwalania i utrwalacz lub zastosuj dodatkowy etap utrwalania jak to zostało opisane w "procedurze testu" w instrukcji użycia zestawu <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</u>
Proteolityczna obróbka wstępna nie została przeprowadzona prawidłowo	Zoptymalizuj czas inkubacji pepsyny, wydłuż lub skróć jeśli to konieczne
Niewystarczające wysuszenie przed aplikacją sondy	Wydłuż suszenie

Zachodzące na siebie jądra komórkowe

Możliwa przyczyna	Działanie
Niewłaściwa grubość skrawków tkanek	Przygotuj skrawki o grubości 2-4 µm

Preparat spłynął ze szkiełka

Możliwa przyczyna	Działanie
Szkiełko z nieodpowiednią powłoką	Zastosuj odpowiednie szkiełko
Zbyt silna proteolityczna obróbka wstępna	Zredukuj czas inkubacji z pepsyną

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

- Inamura K, et al. (2009) *Mod Pathol* 22: 508-15.
- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Koivunen JP, et al. (2008) *Clin Cancer Res* 14: 4275-83.
- Lawce HJ & Olson S (2013) *J Assoc Genet Technol* 39: 66-71.
- Martelli MP, et al. (2009) *Am J Pathol* 174: 661-70.
- Perner S, et al. (2008) *Neoplasia* 10: 298-302.
- Preusser M, et al. (2013) *Lung Cancer* 80: 278-83.
- Rodig SJ, et al. (2009) *Clin Cancer Res* 15: 5216-23.
- Sasaki T, et al. (2010) *Eur J Cancer* 46: 1773-80.
- Schildgen V, et al. (2012) *Per Med* 9: 801-3.
- Schildhaus HU, et al. (2013) *Mod Pathol* 26: 1468-77.
- Schoppmann SF, et al. (2013) *Eur J Cancer* 49: 1876-81.
- Thunnissen E, et al. (2012) *Virchows Arch* 461: 245-57.
- Von Laffert M, et al. (2013) *Lung Cancer* 81: 200-6.
- 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



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

Znaki towarowe:

ZytoVision® i ZytoLight® to znaki towarowe ZytoVision GmbH.