*Zyto**Light***
SPEC ALK/EML4 TriCheck Probe

REF Z-2117-50 — 5 (0,05 ml)

REF Z-2117-200 — 20 (0,2 ml)

Für den qualitativen Nachweis von Rearrangierungen des humanen ALK-Gens bei 2p23.1-p23.2 und des humanen EML4-Gens bei 2p21 mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)

4250380P168RC

CE 0483

IVD

In-vitro-Diagnostikum

gemäß IVDR (EU) 2017/746

1. Verwendungszweck

Die Zyto*Light* SPEC ALK/EML4 TriCheck Probe (**PL74**) ist für den qualitativen Nachweis von Rearrangements des humanen ALK-Gens bei 2p23.1-p23.2 und des humanen EML4-Gens bei 2p21 in Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Geweben, wie z. B. nicht-kleinzelligem Lungenkrebs (NSCLC), durch Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) bestimmt. Die Sonde ist für die Verwendung in Kombination mit dem Zyto*Light* FISH-Tissue Implementation Kit (Prod. Nr. Z-2028-5/-20) vorgesehen.

Das Produkt ist nur für den professionellen Gebrauch bestimmt. Alle Tests, bei denen das Produkt verwendet wird, sollten in einem zertifizierten, zugelassenen anatomisch-pathologischen Labor unter der Aufsicht eines Pathologen/Humangenetikers von qualifiziertem Personal durchgeführt werden.

Die Sonde ist als Hilfsmittel für die Differentialdiagnose von NSCLC vorgesehen, und therapeutische Maßnahmen sollten nicht allein auf der Grundlage des Testergebnisses eingeleitet werden.

2. Prinzip der Methode

Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) erlaubt den Nachweis und die Visualisierung von spezifischen Nukleinsäuresequenzen in Zellpräparationen. Fluoreszenzmarkierte DNA-Fragmente, sogenannte FISH-Sonden, und deren komplementäre Zielsequenzen in den Präparationen werden co-denaturiert und können anschließend während der Hybridisierung binden. Danach werden unspezifische und ungebundene Sondenfragmente durch Stringenzwaschschritte entfernt. Nach der Gegenfärbung der DNA mit DAPI werden hybridisierte Sondenfragmente mit einem Fluoreszenzmikroskop visualisiert, welches mit für die Fluorochrome spezifischen Anregungs- und Emissionsfiltern ausgestattet ist, mit denen die FISH-Sondenfragmente direkt markiert wurden.

3. Enthaltene Reagenzien

Die Zyto*Light* SPEC ALK/EML4 TriCheck Probe besteht aus:

- ZyGreen (Anregung 503 nm/Emission 528 nm) markierten Polynukleotiden (~10 ng/µl), die gegen Sequenzen in 2p23.1-p23.2* (chr2:29,460,144-30,095,822) gerichtet sind, welche proximal zur ALK-Bruchpunktregion lokalisiert sind (siehe Abb. 1).
- ZyOrange (Anregung 547 nm/Emission 572 nm) markierten Polynukleotiden (~4,5 ng/µl), die gegen Sequenzen in 2p23.2* (chr2:29,174,204-29,383,335) gerichtet sind, welche distal zur ALK-Bruchpunktregion lokalisiert sind (siehe Abb. 1).
- ZyBlue (Anregung 418 nm/Emission 467 nm) markierten Polynukleotiden (~37,0 ng/µl), die gerichtet sind gegen Sequenzen in 2p21* (chr2:41,573,525-43,349,624) gerichtet sind, welche die EML4-Genregion enthalten (siehe Abb. 1).
- Hybridisierungsbuffer auf Basis von Formamid

*nach Human Genome Assembly GRCh37/hg19

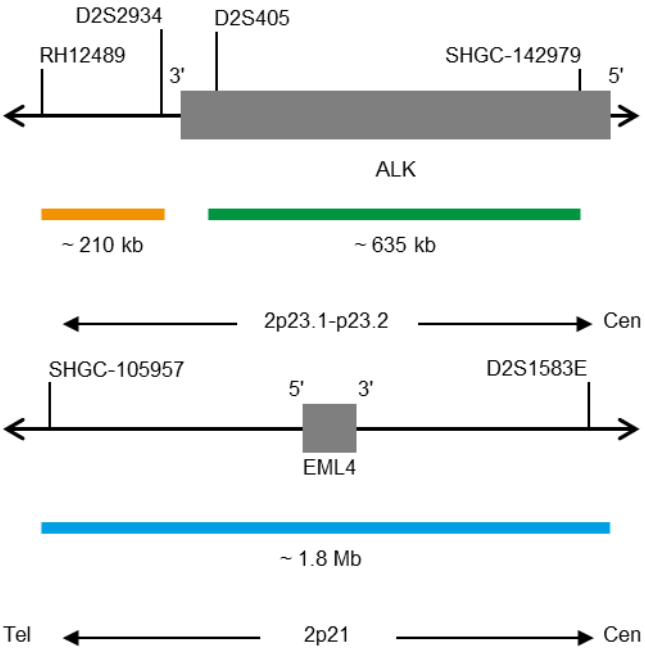

Abb. 1: Oben: SPEC ALK Sondenlokalisation; Unten: SPEC EML4 Sondenlokalisation (nicht maßstabsgetreu)

Die Zyto*Light* SPEC ALK/EML4 TriCheck Probe ist verfügbar in zwei Größen:

- Z-2117-50: 0,05 ml (5 Reaktionen von je 10 µl)
- Z-2117-200: 0,2 ml (20 Reaktionen von je 10 µl)

4. Benötigte, aber nicht bereitgestellte Materialien

- Zyto*Light* FISH-Tissue Implementation Kit (Prod. No. Z-2028-5/-20)
- Positive und negative Kontrollproben
- Objektträger, positiv geladen
- Wasserbad (37 °C, 98 °C)
- Hybridizer oder Wärmeplatte
- Hybridizer oder Feuchtekammer im Hybridisierungsofen
- Verstellbare Pipetten (10 µl, 25 µl)
- Küvetten oder Färbetröge
- Stoppuhr
- Kalibriertes Thermometer
- Ethanol oder denaturierter Alkohol
- Xylol
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser
- Deckgläser (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Naturkautschuk-Klebstoff, z.B. Fixogum Rubber Cement (Prod. Nr. E-4005-50/-125), oder Ähnliches
- Regelmäßig gewartetes Fluoreszenzmikroskop (400-1000x)
- Immersionsöl, geeignet für Fluoreszenzmikroskopie
- Entsprechende Filtersätze

5. Lagerung und Handhabung

Bei 2-8°C in aufrechter Position und lichtgeschützt lagern. Vor Licht geschützt verwenden. Unmittelbar nach Gebrauch wieder unter Lagerbedingungen aufbewahren. Keine Reagenzien nach Ablauf des auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatums verwenden. Das Produkt ist bei sachgemäßer Handhabung bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil.

6. Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Gebrauchsanweisung vor der Verwendung lesen!
- Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden!
- Dieses Produkt enthält Substanzen (in geringen Konzentrationen und Volumina), welche gesundheitsschädlich und potentiell infektiös sind. Jeder direkte Kontakt mit den Reagenzien muss vermieden werden. Entsprechende Schutzmaßnahmen (Verwendung von Einmalhandschuhen, Schutzbrille und Laborbekleidung) sind zu ergreifen!
- Schwerwiegende Vorfälle, die im Zusammenhang mit dem Produkt aufgetreten sind, in Übereinstimmung mit den örtlichen Vorschriften dem Hersteller sowie den zuständigen Behörden melden!
- Sollten Reagenzien mit der Haut in Kontakt kommen, die betroffenen Stellen sofort mit viel Wasser abspülen!
- Ein Sicherheitsdatenblatt ist auf Anfrage für den beruflichen Anwender verfügbar.
- Reagenzien nicht wiederverwenden, außer die Wiederverwendung ist ausdrücklich erlaubt!
- Kreuzkontaminationen der Präparate vermeiden, da diese zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
- Die Sonde sollte nicht für längere Zeit dem Licht, insbesondere intensivem Licht, ausgesetzt werden. Das bedeutet, falls möglich sollten alle Arbeitsschritte im Dunkeln und/oder unter Verwendung von lichtundurchlässigen Behältnissen durchgeführt werden!

Gefahren- und Sicherheitshinweise:
Die gefahrbestimmende Komponente ist Formamid.

Gefahr

H351	Kann vermutlich Krebs erzeugen.
H360FD	Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
H373	Kann die Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition.
P201	Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
P202	Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.
P260	Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen.
P280	Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.
P308+P313	BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P405	Unter Verschluss aufbewahren.

7. Einschränkungen

- Für die Verwendung als In-vitro-Diagnostikum.
- Nur für die professionelle Anwendung.
- Nur für den nicht-automatischen Gebrauch.
- Die klinische Interpretation jeglicher positiven Färbung bzw. deren Abwesenheit muss im Kontext mit der klinischen Anamnese, Morphologie, anderer histopathologischer Kriterien sowie weiterer diagnostischer Tests erfolgen. Es obliegt der Verantwortung eines qualifizierten Pathologen, mit FISH Sonden, Reagenzien, Diagnose-Panels und den zur Erstellung von gefärbten Präparaten verwendeten Methoden vertraut zu sein. Die Färbung ist in einem zertifizierten, lizenzierten Labor unter Aufsicht eines Pathologen durchzuführen, der für die Auswertung der Färbepräparate und für die Sicherstellung der Eignung von positiven und negativen Kontrollen verantwortlich ist.
- Die Färbung der Präparate, insbesondere die Signalintensität und die Hintergrundfärbung, ist abhängig von der Behandlung und Prozessierung der Präparate vor der Färbung. Unsachgemäßes Fixieren, Einfrieren, Auftauen, Waschen, Trocknen, Erhitzen, Schneiden oder Kontamination mit anderen Präparaten oder Flüssigkeiten können Artefakte oder falsche Ergebnisse verursachen. Inkonsistente Ergebnisse können von Variationen bei Fixierungs- und Einbettungsverfahren sowie von inhärenten Unregelmäßigkeiten innerhalb des Präparates resultieren.
- Die Sonde ist nur für den Nachweis der Loci, die in Kapitel 3 „Enthaltene Reagenzien" beschrieben werden, zu verwenden.
- Die Leistung wurde unter Verwendung der in dieser Gebrauchsanweisung beschriebenen Verfahren validiert. Abweichungen von diesen Verfahren können die Leistung beeinflussen und müssen vom Anwender validiert werden. Dieses IVD ist nur dann CE-zertifiziert, wenn es wie in dieser Gebrauchsanweisung beschrieben im Rahmen der bestimmungsgemäßen Verwendung eingesetzt wird.

8. Störsubstanzen

Rote Blutzellen innerhalb des Präparates können Autofluoreszenz verursachen, welche die Signalerkennung behindert.

Folgende Fixierungen sind nicht kompatibel mit FISH:

- Bouin Fixierung
- B5 Fixierung
- Saure Fixiermittel (z.B. Pikrinsäure)
- Zenker Fixierung
- Alkohole (bei alleiniger Verwendung)
- Quecksilberchlorid
- Formaldehyd/Zink Fixiermittel
- Hollande Fixierung
- Ungepuffertes Formalin

9. Vorbereitung der Präparate

Die Präparatevorbehandlung ist wie in der Gebrauchsanweisung des ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit beschrieben durchzuführen.

10. Vorbereitung der Reagenzien

Das Produkt ist gebrauchsfertig. Kein Rekonstituieren, Mischen oder Verdünnen ist notwendig. Die Sonde vor der Anwendung lichtgeschützt auf Raumtemperatur (18-25°C) bringen. Vor dem Öffnen durch Vortexen mischen und kurz herunterzentrifugieren.

11. Testverfahren

Vorbehandlung der Präparate
Die Präparatevorbehandlung (Entwaxen, Proteolyse) ist wie in der Gebrauchsanweisung des ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit beschrieben durchzuführen.

Denaturierung und Hybridisierung

1. 10 µl der Sonde auf jedes der vorbehandelten Präparate pipettieren.
2. Die Präparate mit 22 mm x 22 mm Deckgläser abdecken (Einschluss von Luftbläschen vermeiden) und das Deckglas versiegeln.

Wir empfehlen die Verwendung von Naturkautschuk-Klebstoff (z.B. Fixogum zum Versiegeln.

3. Die Objektträger auf einer Wärmeplatte oder in einem Hybridizer platzieren und die Proben für 10 min bei 75 °C denaturieren.
4. Die Objektträger in eine Feuchtekammer überführen und über Nacht bei 37°C hybridisieren (z.B. in einem Hybridisierungsofen).

Es ist essentiell, dass die Präparate während des Hybridisierungsschritts nicht austrocknen.

Post-Hybridisierung
Die Post-Hybridisierung (Waschen, Gegenfärbung, Fluoreszenz-mikroskopie) gemäß der Gebrauchsanweisung des ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kits durchführen.

12. Interpretation der Ergebnisse

Bei Verwendung von geeigneten Filtersätzen erscheinen die Hybridisierungssignale der Sonde grün (proximal zur ALK-Bruchpunktregion), orange (distal zur ALK-Bruchpunktregion) und blau (EML4-Genregion).

Normale Situation: In Interphasen von normalen Zellen oder Zellen ohne eine Rearrangierung der EML4-ALK-Genregion erscheinen zwei grün/ orange Fusionssignale und zwei blaue Signale (siehe Abb. 2).

Aberrante Situation: Eine EML4-ALK Inversion ist durch ein separates grünes Signal, ein separates oranges Signal und ein zusätzliches blaues Signal gekennzeichnet. Die einzelnen grünen und orangen Signale kolokalisieren jeweils mit einem blauen Signal. Eine ALK-Translokation ohne Beteiligung von EML4 ist durch getrennte orange und grüne Signale ohne zusätzliches blaues Signal gekennzeichnet. Eine EML4-ALK-Inversion mit Deletion von 5'-ALK-Sequenzen ist gekennzeichnet durch den Verlust eines grünen Signals und die Kolokalisation des einzelnen orangen Signals mit einem zusätzlichen blauen Signal (siehe Abb. 2).

Sich überlagernde Signale können als gelbe Signale erscheinen.

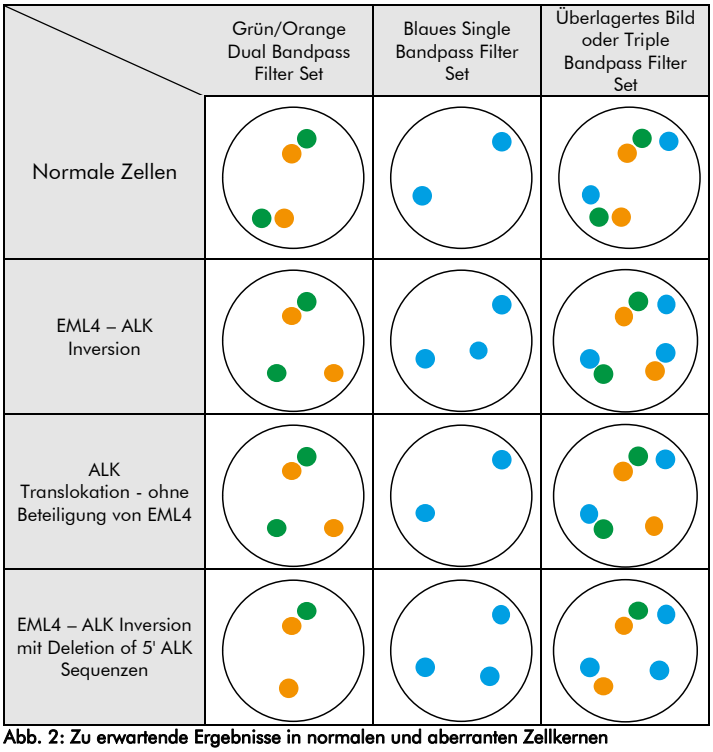

Abb. 2: Zu erwartende Ergebnisse in normalen und aberranten Zellkernen

Bei einigen aberranten Präparaten können andere Signalmuster als die oben beschriebenen beobachtet werden. Diese unerwarteten Signalmuster sollten weiter untersucht werden.

Bitte beachten:

- Aufgrund von dekondensiertem Chromatin können einzelne FISH-Signale als kleine Signal-Cluster erscheinen. Daher sollten zwei oder drei Signale der gleichen Größe mit einer Distanz von ≤ 1 Signaldurchmesser als ein Signal gewertet werden.
- Sich überlagernde Zellkerne nicht auswerten.
- Über-verdaute Zellkerne nicht auswerten (erkennbar als dunkle Areale im Zellkern).
- Keine Auswertung von Zellen mit starker Eigenfluoreszenz, welche die Signalerkennung behindert.
- Ein negatives oder unspezifisches Ergebnis kann durch verschiedene Faktoren verursacht warden (siehe Kapitel 16 "Fehlerbehebung")
- Um die Ergebnisse korrekt zu interpretieren, muss der Anwender das Produkt vor der Anwendung in diagnostischen Verfahren unter Berücksichtigung nationaler und/oder internationaler Richtlinien validieren.

13. Empfohlene Qualitätskontrollverfahren

Um die korrekte Leistung der verwendeten Präparate und Testreagenzien zu überwachen, sollte jeder Test von internen und externen Kontrollen begleitet werden. Falls interne und/oder externe Kontrollen keine adäquate Färbung zeigen, müssen die Ergebnisse der Patientenproben als ungültig angesehen werden.

Interne Kontrolle: Nicht-neoplastische Zellen innerhalb des Präparates, die ein normales Signalmuster aufweisen, z.B. Fibroblasten.

Externe Kontrolle: Validierte positive und negative Kontrollproben.

14. Leistungsmerkmale

14.1 Analytische Leistung

Die Leistung wurde gemäß der Gebrauchsanweisung des ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kits evaluiert.

Analytische Sensitivität:	100% (95% CI 98.5 – 100.0)
Analytische Spezifität:	100% (95% CI 97.0 – 100.0)

Die Tag-zu-Tag-Reproduzierbarkeit wurde getestet, indem die von einem Prüfer an 10 verschiedenen Tagen erzielten Ergebnisse verglichen und die Übereinstimmung bewertet wurde.

	Prozentuale Übereinstimmung
Negative Präparate	100%
Positive Präparate	100%

Die Wiederholbarkeit wurde getestet, indem die von einem Prüfer an 10 verschiedenen Tagen erzielten Ergebnisse verglichen und die Übereinstimmung bewertet wurde.

	Prozentuale Übereinstimmung
Negative Präparate	100%
Positive Präparate	100%

14.2 Klinische Leistung

Diagnostische Sensitivität:	95% (95% CI 91.0 – 98.0auf der Grundlage eines bivariaten Modells
Diagnostische Spezifität:	95% (95% CI 89.0 – 98.0) auf der Grundlage eines bivariaten Modells

15. Entsorgung

Die Entsorgung der Reagenzien muss in Übereinstimmung mit den örtlichen Vorschriften erfolgen.

16. Fehlerbehebung

Jede Abweichung von der Gebrauchsanweisung kann zu schwachen bis gar keinen Färbungen führen. Weitere Informationen erhalten Sie unter www.zytovision.com.

Schwache oder keine Signale

Mögliche Ursache	Lösung
Zell- oder Gewebeproben sind nicht korrekt fixiert	Die Fixierzeit und das Fixiermittel optimieren oder Post-Fixierungsschritte wie in „Testverfahren" der Gebrauchsanweisung des ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kits beschrieben anwenden
Proteolytische Vorbehandlung nicht optimal	Die Inkubationszeit mit Pepsin optimieren, falls notwendig erhöhen oder reduzieren

Verdunstung der Sonde	Bei der Nutzung eines Hybridizers ist die Verwendung von feuchten Vliesstreifen/Wassertanks erforderlich. Bei der Nutzung eines Hybridisierungsofens muss eine Feuchtekammer verwendet werden. Zusätzlich sollte das Deckglas, z.B. mit Fixogum, vollständig versiegelt werden, um ein Austrocknen der Präparat während der Hybridisierung zu verhindern.
Ungeeignete Filtersätze verwendet	Für die Fluorochrome der Sonde geeignete Filtersätze verwenden. *Triple-Bandpass-Filtersätze liefern im Vergleich zu Single- oder Dual-Bandpass-Filtersätzen weniger Licht. Daher können die Signale unter Verwendung von Triple-Bandpass-Filtersätzen schwächer erscheinen.*

Kreuzhybridisierungssignale, Hintergrundsignale

Mögliche Ursache	Lösung
Unvollständiges Entparaffinieren	Frische Lösungen verwenden, Dauer des Entparaffinierens überprüfen
Proteolytische Vorbehandlung zu stark	Die Inkubationszeit mit Pepsin reduzieren
Objektträger sind vor der Hybridisierung auf Raumtemperatur abgekühlt	Objektträger schnell auf 37°C transferieren

Degradierte Morphologie

Mögliche Ursache	Lösung
Zell- oder Gewebeproben sind nicht optimal fixiert	Die Fixierzeit und das Fixiermittel optimieren oder Post-Fixierungsschritte wie in „Testverfahren" der Gebrauchsanweisung des ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kits beschrieben anwenden
Proteolytische Vorbehandlung nicht optimal ausgeführt	Die Inkubationszeit mit Pepsin optimieren, falls notwendig erhöhen oder reduzieren
Unzureichende Trocknung vor Applikation der Sonde	Lufttrocknung verlängern

Überlagernde Zellkerne

Mögliche Ursache	Lösung
Ungeeignete Dicke der Gewebeschnitte	2-4 µm dicke Mikrotomschnitte anfertigen

Präparat löst sich vom Objektträger

Mögliche Ursache	Lösung
Proteolytische Vorbehandlung ist zu stark	Inkubationszeit mit Pepsin reduzieren

Schwache Gegenfärbung

Mögliche Ursache	Lösung
Gering konzentrierte DAPI-Lösung	DAPI/DuraTect-Solution (ultra) (Prod. Nr. MT-0008-0.8) stattdessen verwenden
Inkubationszeit mit DAPI zu kurz	Inkubationszeit mit DAPI anpassen

17. Literatur

- Gruber K, et al. (2014) *J Thorac Oncol 9*: 307-315.
- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet 53*: 134-6.
- Marchetti A, et al. (2014) *J Thorac Oncol 9*: 1470-1476.
- Moskalev EA, et al. (2014) *Lung Cancer 84*: 215-221.
- Pecciarini L, et al. (2023) *Cells 12 (8):* 1135.
- Preusser M, et al. (2013*) Lung Cancer 80*: 278-283.
- Schildhaus HU, et al. (2013) *Mod Pathol 26*: 1468-1477.
- Selinger C, et al. (2015) *Histopathology 67*: 654-663.
- Wilkinson DG: In Situ Hybridization, A Practical Approach, *Oxford University Press* (1992) ISBN 0 19 963327 4.

18. Revision

Revision	Beschreibung der Änderung
2.2.1	14.2 Klinische Leistung Aktualisierte Leistungsdaten
4.X.Y	4. Benötigte, aber nicht bereitgestellte Materialien • *Objektträger, positiv geladen.*
5.1.1	Änderung der Benanntenstelle 14. Leistungsmerkmale Genauigkeit hinzugefügt

www.zytovision.com

Die aktuellste Gebrauchsanweisung sowie Gebrauchsanweisungen in verschiedenen Sprachen finden Sie unter www.zytovision.com.

Unsere Experten stehen Ihnen für Ihre Fragen zur Verfügung.
Bitte kontaktieren Sie helptech@zytovision.com
Einen Kurzbericht über Sicherheit und Leistung finden Sie unter www.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

Warenzeichen:
ZytoVision® und ZytoLight® sind Warenzeichen der ZytoVision GmbH.