



ZytoLight SPEC ALK/EML4 TriCheck Probe

REF Z-2117-50 Σ 5 (0,05 ml)

REF Z-2117-200 Σ 20 (0,2 ml)

Az emberi ALK gén 2p23.1-p23.2 és az emberi EML4 gén 2p21-es génjének minőségi kimutatására fluoreszcens *in situ* hibridizációval (FISH)

4250380P168RC



In vitro diagnosztikai orvostechikai eszköz
az IVDR (EU) 2017/746 szerint

1. Rendeltetészerű cél

A ZytoLight SPEC ALK/EML4 TriCheck Probe (PL74) a humán ALK gén 2p23.1-p23.2 és a humán EML4 gén 2p21 közötti átrendeződések minőségi kimutatására szolgál formalin-fixált, paraffinba ágyazott mintákban, például nem kisesejtű tüdőrákban (NSCLC), fluoreszcens *in situ* hibridizációval (FISH). A szonda a ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Prod. No. Z-2028-5/-20) készlettel együtt használható.

A termék kizárólag professzionális használatra készült. A termékkel végzett valamennyi vizsgálatot minősített, engedéllyel rendelkező anatómiai patológiai laboratóriumban, patológus/humángenetikus felügyelete mellett, szakképzett személyzetnek kell elvégeznie.

A próba az NSCLC differenciáldiagnózisának segédeszközeként szolgál, és terápiás intézkedéseket nem szabad kizárólag a teszteredmény alapján kezdeményezni.

2. A vizsgálat elve

A fluoreszcens *in situ* hibridizációs (FISH) technika lehetővé teszi specifikus nukleinsav-szekvenciák kimutatását és vizualizálását sejtkészítményekben. A fluoreszcensen jelölt DNS-törödékek, az úgynevezett FISH-szondák és a preparátumokban lévő komplementer cél-DNS-szálak együttesen denaturálódnak, majd a hibridizáció során hagyják, hogy a DNS-törödékek egymáshoz kapcsolódjanak. Ezt követően a nem specifikus és nem kötött szondafragmentumokat szigorú mosási lépésekkel távolítják el. A DNS DAPI-val történő ellenfestése után a hibridizált szondafragmentumokat fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizualizáljuk, amely olyan gerjesztő és emissziós szűrőkkel van felszerelve, amelyek specifikusak azokra a fluorokromokra, amelyekkel a FISH-szondafragmentumokat közvetlenül jelölték.

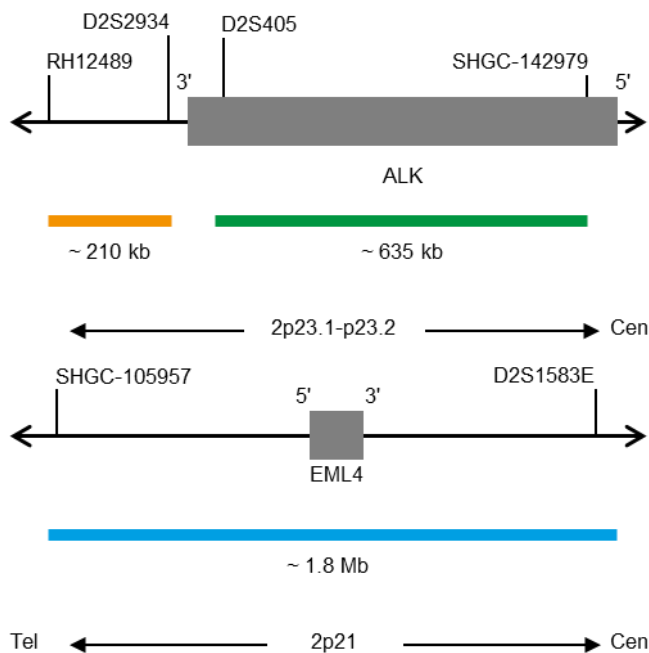
3. Rendelkezésre bocsátott reagensek

A ZytoLight SPEC ALK/EML4 TriCheck Probe a következőkből áll:

- ZyGreen (gerjesztés 503 nm/emisszió 528 nm) jelölt polinukleotidok (~10,0 ng/μl), amelyek az ALK töréspont régióhoz közeli 2p23.1-p23.2* (chr2:29,460,144-30,095,822) szekvenciákat célozzák meg (lásd az 1. ábrát).
- ZyOrange (gerjesztés 547 nm/emisszió 572 nm) jelölt polinukleotidok (~4,5 ng/μl), amelyek a 2p23.2* (chr2:29,174,204-29,383,335), az ALK töréspont régiótól távoli szekvenciákat célozzák meg (lásd az 1. ábrát).
- ZyBlue (gerjesztés 418 nm/emisszió 467 nm) jelölt polinukleotidok (~37,0 ng/μl), amelyek a 2p21* (chr2:41,573,525-43,349,624), az EML4 génterületet tartalmazó szekvenciákat célozzák meg

• Formamid alapú hibridizációs puffer

*a Human Genome Assembly szerint GRCh37/hg19



1. ábra: : Fent: SPEC ALK próbatérkép, lent: (nem méretarányos): SPEC EML4 próbatérkép.

A ZytoLight SPEC ALK/EML4 TriCheck Probe két méretben kapható:

- Z-2117-50: 0,05 ml (5 reakció, egyenként 10 μl)
- Z-2117-200: 0,2 ml (20 reakció, egyenként 10 μl)

4. Szükséges, de nem biztosított anyagok

- ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Prod. No. Z-2028-5/-20)
- Pozitív és negatív kontrollminták
- Mikroszkópos tárgylemezek, pozitív töltésű
- Vízfürdő (37 °C, 98 °C)
- Hibridizátor vagy főzőlap
- Hibridizáló vagy pára kamra a hibridizációs kemencében
- Állítható pipetták (10 μl, 25 μl)
- Festőedények vagy fürdők
- Időzítő
- Kalibrált hőmérő
- Etanol vagy reagens alkohol
- Xilol
- Deionizált vagy desztillált víz
- fedőlemezek (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Gumicement, pl. Fixogum Rubber Cement (Prod. No.E-4005-50/-125) vagy hasonló.
- Megfelelően karbantartott fluoreszcens mikroszkóp (400-1000x)
- Fluoreszcens mikroszkópiához jóváhagyott merülőolaj
- Megfelelő szűrőkészletek

5. Tárolás és kezelés

2-8 °C-on, fénytől védett, függőleges helyzetben tárolja. Használja fénytől védve. Használat után azonnal állítsa vissza a tárolási körülmények közé. Ne használja fel a reagenseket a címkén feltüntetett lejárati időn túl. A termék a címkén feltüntetett lejárati dátumig stabil, ha megfelelően kezelik.

6. Figyelmeztetések és óvintézkedések

- Használat előtt olvassa el a használati utasítást!
- Ne használja fel a reagenseket a lejárati idő lejártá után!
- Ez a termék (kis koncentrációban és mennyiségben) egészségre káros és potenciálisan fertőző anyagokat tartalmaz. Kerülje a reagensekkel való közvetlen érintkezést. Tegyén megfelelő védőintézkedéseket (használgjon eldobható kesztyűt, védőszemüveget és laboratóriumi ruházatot)!
- A termékkel kapcsolatban bekövetkezett minden súlyos eseményt jelentsen a gyártónak és a helyi előírásoknak megfelelően az illetékes hatóságoknak!
- Ha a reagensek bőrrel érintkeznek, azonnal öblítse le a bőrt bőseges mennyiségű vízzel!
- A professzionális felhasználók számára kérésre biztonsági adatlap áll rendelkezésre.
- Ne használja újra a reagenseket, kivéve, ha az újrafelhasználás kifejezetten engedélyezett!
- Kerülje a minták keresztszennyeződését, mivel ez hibás eredményekhez vezethet.
- A szondát nem szabad hosszabb ideig fénynek, különösen erős fénynek kitenni, azaz minden lépést lehetőség szerint sötétben és/vagy fényálló edényben kell elvégezni.

Veszélyre és óvintézkedésekre vonatkozó nyilatkozatok:

A veszélyt meghatározó komponens a formamid.



Veszély

H351	Feltehetően rákot okoz.
H360FD	Károsíthatja a termékenységet. Károsíthatja a magzatot.
H373	Hosszan tartó vagy ismételt expozíció esetén szervi károsodást okozhat.
P201	Használat előtt kérje be a speciális utasításokat.
P202	Ne kezelje, amíg az összes biztonsági óvintézkedést el nem olvasta és meg nem értette.
P260	Ne lélegezzen be a port/füstöt/gázt/ködöt/gőzt/permetet.
P280	Viseljen védőkesztyűt/védő ruházatot/szemvédőt/arcvédőt.
P308+P313	HA kitétt vagy érintett: Kérjen orvosi tanácsot/megfigyelést.
P405	Elzárva tárolandó

7. Korlátozások

- *In vitro* diagnosztikai felhasználásra.
- Kizárólag professzionális használatra.
- Kizárólag nem automatizált használatra.
- A pozitív festődés klinikai értelmezését vagy annak hiányát a klinikai anamnézis, a morfológia, az egyéb szövettani kritériumok, valamint az egyéb diagnosztikai vizsgálatok összefüggésében kell elvégezni. A képzett patológus/humán genetikus felelőssége, hogy ismerje a FISH-szondákat, a reagenseket, a diagnosztikai paneleket és a festett preparátum előállításához használt módszereket. A festést tanúsított, engedélyezett laboratóriumban kell elvégezni, patológus/humán genetikus felügyelete mellett, aki felelős a festett tárgylemezek felülvizsgálatáért és a pozitív és negatív kontrollok megfelelőségének biztosításáért.
- A minták festése, különösen a jelintenzitás és a háttérfestés, függ a minta festést megelőző kezelésétől és feldolgozásától. A nem megfelelő fixálás, fagyasztás, felolvasztás, mosás, szárítás,

melegítés, szeletelés vagy más mintákkal vagy folyadékokkal való szennyeződés artefaktumokat vagy hamis eredményeket eredményezhet. Az inkonzisztens eredmények a fixálási és beágyazási módszerek eltéréseiből, valamint a mintában rejlő szabálytalanságokból adódhatnak.

- A szonda csak a 3. fejezetben leírt lókuszkok kimutatására használható. "Reagensek".
- A teljesítményt a jelen használati utasításban leírt eljárásokkal validálták. Ezen eljárások módosítása megváltoztathatja a teljesítményt, és azt a felhasználónak kell hitelesítenie. Ez az IVD csak akkor rendelkezik CE tanúsítvánnyal, ha az ebben a használati utasításban leírtak szerint, a rendeltetészerű használat körében használják.

8. Interferenciát kiváltó anyagok

A mintában lévő vörösvértestek autofluoreszcenciát mutathatnak, ami akadályozza a jelfelismerést.

A következő fixálószer nem kompatibilisek a FISH-vel:

- Bouin-fixáló
- B5 fixáló
- savas fixálók (pl. pikrinsav)
- Zenker-fixáló
- Alkohokok (önmagukban használva)
- Higany-klorid
- Formaldehid/cink fixáló
- Hollande fixáló
- Nem pufferelt formalin

9. A minták előkészítése

Készítse elő a mintákat a [ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit](#) használati utasításában leírtak szerint.

10. A készülék előkészítő kezelése

A termék használatra kész. Nincs szükség feloldásra, keverésre vagy hígításra. Használat előtt a szondát szobahőmérsékletre (18-25 °C) kell hozni, fénytől óvni kell. Az injekciós üveg felnyitása előtt vortexeléssel keverje össze, és rövid ideig forgassa le.

11. Vizsgálati eljárás

A minta előkezelése

Végezze el a minta előkezelését (viaszmentesítés, proteolízis) a [ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit](#) használati utasítása szerint.

Denaturáció és hibridizáció

1. Pipettázzon 10 µl szondát minden előkezelt mintára.
 2. Fedje le a mintákat egy 22 mm x 22 mm-es fedőlappal (kerülje el a beszorult buborékokat), és zárja le a fedőlappot.
- A tömítéshez *gumicement* (pl. *Fixogum*) használatát javasoljuk.
3. Helyezze a tárgylemezeket forró lemezre vagy hibridizátorra, és denaturálja a mintákat 10 percig 75 °C-on.
 4. Helyezze át a tárgylemezeket egy pára kamrába, és hibridizáljon egy éjszakán át 37 °C-on (pl. hibridizációs kemencében).

Nagyon fontos, hogy a minták ne száradjanak ki a hibridizációs lépés során.

Hibridizáció utáni

Végezze el a hibridizáció utáni feldolgozást (mosás, ellenfestés, fluoreszcens mikroszkópia) a [ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit](#) használati utasítása szerint.

12. Az eredmények értelmezése

Megfelelő szűrőkészletek használatával a próba hibridizációs jelei zöld (ERBB2 génterület), narancssárga (TOP2A génterület) és kék (CEN 17) színűek.

Normál jelrendszer: Az EML4-ALK gén régió átrendeződése nélküli normál sejtek interfázisaiban két narancssárga/zöld fúziós jel és két kék jel jelenik meg (lásd a 2. ábrát).

Rendellenes jelrendszer: Az EML4-ALK inverziót egy különálló zöld jel, egy különálló narancssárga jel és egy további kék jel jelzi. A különálló zöld és narancssárga jel egy-egy kék jellel együtt lokalizálódik. Az EML4-et nem érintő ALK-transzlokációt különálló narancssárga és zöld jelek jelzik további kék jel nélkül. Az 5'-ALK szekvenciák deléciójával járó EML4-ALK inverziót az egyik zöld jel elvesztése és az elkülönített narancssárga jel egy további kék jellel való együttlokalizációja jelzi (lásd a 2. ábrát).

Az egymást átfedő jelek sárga jelzésként jelenhetnek meg.

	Zöld/narancssárga a kettős sávszűrő készlet	Kék egysávos szűrőkészlet	Összevont kép vagy hármassáv szűrő készlet
Normál sejtek			
EML4 - ALK inverzió			
ALK transzlokáció - nem érinti az EML4-et			
EML4 - ALK inverzió az 5' ALK szekvenciák deléciójával			

2. ábra: Várható eredmények normális és rendellenes sejtmagok esetén

Egyes rendellenes mintákban a fent leírtaktól eltérő jelminták is megfigyelhetők. Ezeket a váratlan jelmintákat tovább kell vizsgálni.

Kérjük, vegye figyelembe:

- A dekonzenzált kromatin miatt az egyes FISH-jelek kis jelhalmazokként jelenhetnek meg. Ezért két vagy három azonos méretű, ≤ 1 jelátmérővel elválasztott jelet egy jelnek kell tekinteni.
- Ne értékelje az egymást átfedő magokat.
- Ne számolja meg a túlságosan megemésztett sejtmagokat (a sejtmagok belsejében látható sötét területekről ismerhető fel).
- Ne számolja az erős autofluoreszcenciájú sejtmagokat, amelyek akadályozzák a jelfelismerést.
- A negatív vagy nem specifikus eredményt több tényező is okozhatja (lásd a 16. fejezet "Hibaelhárítás" című részét).
- Az eredmények helyes értelmezése érdekében a felhasználónak a nemzeti és/vagy nemzetközi irányelveknek megfelelően validálnia kell a terméket a diagnosztikai eljárásokban való felhasználás előtt.

13. Ajánlott minőségellenőrzési eljárások

A feldolgozott minták és a vizsgálati reagensek megfelelő teljesítményének ellenőrzése érdekében minden egyes vizsgálathoz belső és külső kontrollokat kell rendelni. Ha a belső és/vagy külső kontrollok nem mutatnak megfelelő festődést, a betegmintákkal kapott eredményeket érvénytelennek kell tekinteni.

Belső ellenőrzés: Nem neoplasztikus sejtek a mintán belül, amelyek normális jelmintázatot mutatnak, pl. fibroblasztok.

Külső vezérlés: Validált pozitív és negatív kontrollminták.

14. Teljesítményjellemzők

14.1 Analitikai teljesítmény

A teljesítményt a ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit használati utasítása szerint értékelték.

Analitikai érzékenység:	100% (95% CI 98.5 – 100.0)
Analitikai specifikusság:	100% (95% CI 97.0 – 100.0)

14.2 Klinikai teljesítmény

Diagnosztikai érzékenység:	95% (95% CI 91.0 – 98.0) kétváltozós modell alapján
Diagnosztikai specifitás:	95% (95% CI 89.0 – 98.0) kétváltozós modell alapján

15. Eltávolítás

A reagensek ártalmatlanítását a helyi előírásoknak megfelelően kell elvégezni.

16. Hibaelhárítás

A kezelési utasításoktól való bármilyen eltérés rosszabb festési eredményhez vagy egyáltalán nem festéshez vezethet. További információkért kérjük, olvassa el a www.zytovision.com/honlapot.

Gyenge jelek vagy egyáltalán nincs jel

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Nem megfelelően rögzített sejt- vagy szövetszövetminta	Optimalizálja a rögzítési időt és a fixálószeret, vagy alkalmazzon poszt-fixálási lépést a <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</u> kézikönyvének "Assay procedure" részében leírtak szerint.
Nem megfelelően végzett proteolitikus előkezelés	Optimalizálja a pepszin inkubációs idejét, szükség esetén növelje vagy csökkentse azt.
Szonda párolgás	A hibridizáló használata esetén a nedves csíkok/vízzel töltött tartályok használata kötelező. Hibridizáló kemence használata esetén a pára kamra használata kötelező. Ezenkívül a fedőlemezt teljesen le kell zárni, pl. Fixogummal, hogy megakadályozzák a minta kiszáradását a hibridizáció során.
Nem megfelelő szűrőkészletek használata	Használjon a szonda fluorokrómjainak megfelelő szűrőkészleteket. <i>A háromszoros sávszűrő-készletek kevesebb fényt biztosítanak az egy- vagy kétsávszűrő-készletekhez képest. Következésképpen a jelek halványabbnak tűnhetnek e háromsávos szűrőkészletek használatával.</i>

Kereszt hibridizációs jelek; zajos háttér

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Nem teljes viaszmentesítés	Használjon friss oldatokat; ellenőrizze a viaszmentesítés időtartamát.
Túl erős proteolitikus előkezelés	Csökkentse a pepszin inkubációs idejét
A tárgylemezeket hibridizáció előtt szobahőmérsékletre kell hűteni.	A tárgylemezeket gyorsan helyezze át 37 °C-ra

Morfológia romlott

Lehetséges ok	Javasolt teendő
A sejt- vagy szövetmintát nem megfelelően rögzítették	Optimalizálja a rögzítési időt és a fixálószer, vagy alkalmazzon poszt-fixálási lépést a ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit kézikönyvének "Assay procedure" részében leírtak szerint.
Nem megfelelően végzett proteolitikus előkezelés	Optimalizálja a pepszin inkubációs idejét, szükség esetén csökkentse azt.
Elégtelen szárítás a szonda felhelyezése előtt	A levegőn való szárítás idejének növelése

Átfedő magok

Lehetséges ok	Javasolt teendő
A szöveti metszetek nem megfelelő vastagsága	Készítsünk 2-4 µm-es mikrotomos metszeteket

A minta lebeg a tárgylemezről

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Túl erős proteolitikus előkezelés	Csökkentse a pepszin inkubációs idejét

Gyenge ellenfesték

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Alacsony koncentrációjú DAPI-oldat	Használjon helyette DAPI/DuraTect-Solution (ultra) (Prod. No. MT-0008-0.8).
Túl rövid DAPI inkubációs idő	A DAPI inkubációs idő beállítása

17. Irodalom

- 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. Felülvizsgálat

Felülvizsgálat	A változás leírása
2.2.1	14.2 Klinikai teljesítmény Teljesítményadatok frissítése


www.zytovision.com

A legfrissebb használati utasításokat, valamint a különböző nyelvű használati utasításokat a www.zytovision.com oldalon találja.

Szakértőink készséggel válaszolnak kérdéseire.

Kérjük vegye fel velünk a kapcsolatot a helptech@zytovision.com címen.

A biztonságról és a teljesítményről szóló összefoglalót lásd a következő oldalon www.zytovision.com.



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

Védjegyek:

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