



## ZytoLight SPEC ALK/EML4 TriCheck Probe

**REF** Z-2117-50  $\Sigma$  5 (0,05 ml)

**REF** Z-2117-200  $\Sigma$  20 (0,2 ml)

Kvalitatīvai pārkārtojumu noteikšanai, kas saistīti ar cilvēka ALK gēnu 2p23.1-p23.2 un cilvēka EML4 gēnu 2p21, izmantojot fluorescences *in situ* hibridizāciju (FISH)

4250380P168RC



In vitro diagnostikas medicīnas ierīce

saskaņā ar IVDR (ES) 2017/746

### 1. Paredzētais mērķis

ZytoLight SPEC ALK/EML4 TriCheck Probe (PL74) ir paredzēta kvalitatīvai pārkārtojumu, kas saistīti ar cilvēka ALK gēnu 2p23.1-p23.2 un cilvēka EML4 gēnu 2p21, noteikšanai formalinā fiksētos, parafinā iestrādātos paraugos, piemēram, ar fluorescences *in situ* hibridizāciju (FISH). Zonde ir paredzēta lietošanai kopā ar ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Produkta Nr. Z-2028-5/-20).

Produkts ir paredzēts tikai profesionālai lietošanai. Visi testi, kuros izmanto šo produktu, jāveic sertificētā, licencētā anatomiskās patoloģijas laboratorijā, patologa/cilvēka ģenētiķa uzraudzībā, ko veic kvalificēts personāls.

Zondi paredzēts izmantot kā palīg līdzekli NSCLC diferenciāldiagnozei, un, pamatojoties tikai uz testa rezultātu, nevajadzētu uzsākt terapeitiskus pasākumus.

### 2. Testa princips

Fluorescences *in situ* hibridizācijas (FISH) metode ļauj noteikt un vizualizēt specifiskas nukleīnskābju sekvenču šūnu preparātos. Fluorescējoši marķēti DNS fragmenti, tā sauktās FISH zondes, un to komplementārās mērķa DNS virknes preparātos tiek kopendaturētas un pēc tam hibridizācijas laikā tiek atdalītas. Pēc tam nespecifiskos un nesaistītos zondes fragmentus noņem ar stingrām mazgāšanas darbībām. Pēc DNS pretkrāsošanas ar DAPI hibridizētos zondes fragmentus vizualizē, izmantojot fluorescences mikroskopu, kas aprīkots ar izstarošanas un emisijas filtriem, kuri ir specifiski fluorohromiem, ar kuriem ir tieši marķēti FISH zondes fragmenti.

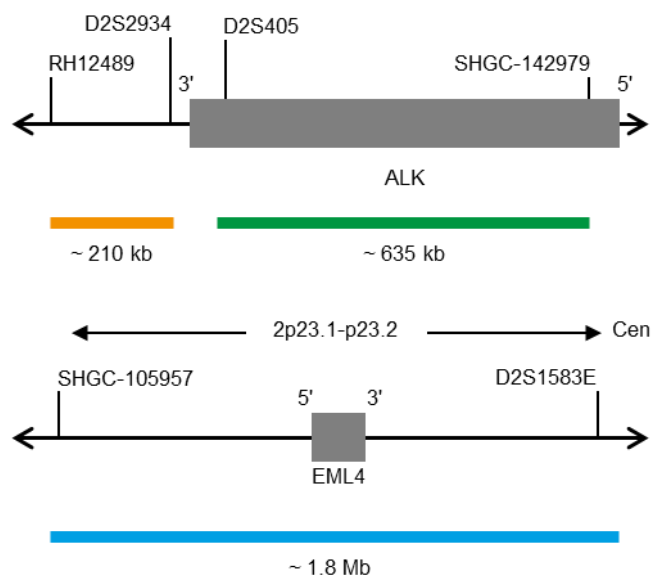
### 3. Sniegtie reaģenti

ZytoLight SPEC ALK/EML4 TriCheck Probe sastāv no:

- ZyGreen (uzbudinājums 503 nm/emisija 528 nm) marķēti polinukleotīdi (~10 ng/μl), kas ir vērsti uz sekvencēm, kas kartētas 2p23.1-p23.2\* (chr2:29,460,144-30,095,822) tuvāk ALK lūzuma punktam (skatīt 1. attēlu).
- ZyOrange (uzbudinājums 547 nm/emisija 572 nm) marķēti polinukleotīdi (~4,5 ng/μl), kas ir vērsti uz sekvencēm, kas kartētas 2p23.2\* (chr2:29,174,204-29,383,335) attālak no ALK lūzuma punkta reģiona (skatīt 1. attēlu).
- ZyBlue (uzbudinājums 418 nm/emisija 467 nm) marķēti polinukleotīdi (~37,0 ng/μl), kas ir vērsti uz sekvencēm, kas kartētas 2p21\* (chr2:41,573,525-43,349,624), kurā atrodas EML4 gēna reģions (skatīt 1. attēlu).

Hibridizācijas buferis uz formamīda bāzes

\*askaņā ar Cilvēka genoma asambleju GRCh37/hg19



1. attēls: : Augšpusē: SPEC MDM4 zondes karte, apakšā: SPEC 1p12 zondes karte (bez mēroga)

ZytoLight SPEC ALK/EML4 TriCheck Probe ir pieejama divos izmēros:

- Z-2117-50: 0,05 ml (5 reakcijas pa 10 μl katrā)
- Z-2117-200: 0,2 ml (20 reakcijas pa 10 μl katrā)

### 4. Nepieciešamie, bet nepiegādātie materiāli

- ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Produkta Nr. Z-2028-5/-20)
- Pozitīvās un negatīvās kontroles paraugi
- Mikroskopa priekšmetstikliņi, pozitīvi lādēti
- Ūdens vanna (37 °C, 98 °C)
- Hibridizers vai karstā plate
- Hibridizators vai mitruma kamera hibridizācijas krāsnī
- Regulējamas pipetes (10 μl, 25 μl)
- Burku vai vannu krāsošana
- Taimeris
- Kalibrēts termometrs
- Etanols vai reaģentu spirts
- Ksilols
- Dejonizēts vai destilēts ūdens
- Pārklājumi (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Gumiņas cements, piemēram, Fixogum Rubber Cement (Produkta Nr. E-4005-50/-125) vai līdzīgs.
- Atbilstoši uzturēts fluorescences mikroskops (400-1000x).
- Fluorescences mikroskopijai apstiprināta iegremdēšanas eļļa
- Piemēroti filtru komplekti

## 5. Uzglabāšana un pārvietošana

Uzglabāt 2-8 °C temperatūrā vertikālā stāvoklī, pasargātā no gaismas. Lietojiet pasargātu no gaismas. Uzreiz pēc lietošanas atgriezt glabāšanas apstākļos. Nelietot reaģentus pēc derīguma termiņa beigām, kas norādīts uz etiķetes. Produkts ir stabils līdz marķējumā norādītajam derīguma termiņam, ja ar to rīkojas atbilstoši.

## 6. Brīdinājumi un piesardzības pasākumi

- Pirms lietošanas izlasiet lietošanas instrukciju!
- Neizmantojiet reaģentus pēc derīguma termiņa beigām!
- Šis produkts satur veselībai kaitīgas un potenciāli infekciozas vielas (nelielā koncentrācijā un daudzumā). Izvairieties no tiešas saskares ar reaģentiem. Veikt atbilstošus aizsardzības pasākumus (lietot vienreizlietojamus cimdus, aizsargbrilles un laboratorijas apģērbu)!
- Par jebkuru nopietnu negadījumu, kas noticis saistībā ar izstrādājumu, ziņojiet ražotājam un kompetentajai iestādei saskaņā ar vietējiem noteikumiem!
- Ja reaģenti nonāk saskarē ar ādu, nekavējoties noskalojiet ādu ar lielu daudzumu ūdens!
- Profesionālam lietotājam pēc pieprasījuma ir pieejama materiālu drošības datu lapa.
- Neizmantojiet reaģentus atkārtoti, ja vien atkārtota izmantošana nav skaidri atļauta!
- Izvairieties no paraugu savstarpējas piesārņošanas, jo tas var izraisīt kļūdainus rezultātus.
- Zondi ilgāku laiku nedrīkst pakļaut gaismas, īpaši spēcīgas gaismas iedarbībai, t. i., visi pasākumi, ja iespējams, jāveic tumsā un/vai izmantojot gaismas necaurlaidīgus traukus.

## Bīstamības un piesardzības norādījumi:

Bīstamību noteicošais komponents ir formamīds.



### Bīstamība

H351	Aizdomas par vēža izraisīšanu.
H360FD	Var kaitēt auglībai. Var kaitēt nedzimušajam bērnam.
H373	Ilgstoša vai atkārtota iedarbība var izraisīt orgānu bojājumus.
P201	Pirms lietošanas saņemiet īpašus norādījumus.
P202	Nestrādājiet ar to, kamēr nav izlasīti un izprasti visi drošības pasākumi.
P260	Neelpot putekļus/dūmus/gāzi/smīdzeni/tvaikus/smīdzeni.
P280	Valkājiet aizsargcimdus/aizsargapģērbu/acu/ sejas aizsardzību.
P308+P313	Ja ir apdraudēta vai ir bažas: Saņemiet medicīnisku konsultāciju/pievērsiet uzmanību.
P405	Veikals ir aizslēgts.

## 7. Ierobežojumi

- Lietošanai *in vitro* diagnostikā.
- Tikai profesionālai lietošanai.
- Tikai neautomatizētai lietošanai.
- Pozitīva krāsojuma vai tā neesamības klīniskā interpretācija jāveic, ņemot vērā klīnisko anamnēzi, morfoloģiju, citus histopatoloģiskos kritērijus, kā arī citus diagnostiskos testus. Kvalificēta patologa/cilvēka ģenētiķa pienākums ir pārzināt FISH zondes, reaģentus, diagnostikas paneļus un metodes, ko izmanto, lai iegūtu krāsoto preparātu. Krāsošana jāveic sertificētā, licencētā laboratorijā patologa/cilvēka ģenētiķa uzraudzībā, kurš ir atbildīgs par iekrāsoto priekšmetstiklīņu pārskatīšanu un pozitīvās un negatīvās kontroles atbilstības nodrošināšanu.
- Parauga krāsošana, jo īpaši signāla intensitāte un fona krāsojums, ir atkarīga no parauga apstrādes un apstrādes pirms krāsošanas. Nepareiza fiksācija, sasaldēšana, atkausēšana, mazgāšana,

žāvēšana, sildīšana, griezum veidošana vai piesārņojums ar citiem paraugiem vai šķidrumiem var radīt artefaktus vai kļūdainus rezultātus. Neatbilstīgos rezultātus var izraisīt fiksācijas un iestrādes metožu atšķirības, kā arī paraugam raksturīgi nelīdzenumi.

- Zondi drīkst izmantot tikai 3. nodaļā aprakstīto lokusu noteikšanai. "Piegādātie reaģenti".
- Darbība tika validēta, izmantojot šajā lietošanas instrukcijā aprakstītās procedūras. Šo procedūru modifikācijas var mainīt veikspēju, un tās ir jāapstiprina lietotājam. Šis IVD ir sertificēts kā CE tikai tad, ja to lieto, kā aprakstīts šajā lietošanas instrukcijā, atbilstoši paredzētajam lietojumam.

## 8. Vietas, kas rada traucējumus

Paraugā esošajām sarkanajām asins šūnām var būt autofluorescence, kas kavē signāla atpazīšanu.

Ar FISH nav saderīgi šādi fiksatori:

- Buēna fiksatīvs
- B5 fiksators
- Skābie fiksatori (piemēram, pikronskābe).
- Zenkera fiksatīvs
- Alkoholi (ja tos lieto atsevišķi)
- Dzīvsudraba hlorīds
- Formaldehīda/cinka fiksators
- Olanda fiksatīvs līdzeklis
- Nebuferēts formalīns

## 9. Paraugu sagatavošana

Sagatavojiet paraugus, kā aprakstīts [ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit](#) lietošanas instrukcijā.

## 10. Ierīces sagatavošanas apstrāde

Produkts ir gatavs lietošanai. Nav nepieciešams atjaunot, sajaukt vai atšķaidīt. Pirms lietošanas zondi jāuzsilda istabas temperatūrā (18-25 °C), jāaizsargā no gaismas. Pirms flakona atvēršanas samaisiet, virpuļojot un īsi pagriežot.

## 11. Analīzes procedūra

### Parauga pirmapstrāde

Veiciet paraugu priekšapstrādi (deparafinēšana, proteolīze) saskaņā ar [ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit](#) lietošanas instrukciju.

### Denaturācija un hibridizācija

- Uz katra iepriekš apstrādātā parauga ar pipeti uzpildiniet 10 µl zondes.
  - Pārklājiet paraugus ar 22 x 22 mm lielu pārklājplāksnīti (izvairieties no burbuļu veidošanās) un aiztaisiet pārklājplāksnīti.
- Blīvēšanai ieteicams izmantot gumijas cementu (piemēram, Fixogum).*
- Novietojiet priekšmetstiklīņus uz karstās plātes vai hibridizatora un denaturējiet paraugus 10 minūtes 75 °C temperatūrā.
  - Pārvietojiet priekšmetstiklīņus mitruma kamerā un hibridizējiet uz nakti 37 °C temperatūrā (piemēram, hibridizācijas krāsnī).

*Ir svarīgi, lai hibridizācijas laikā paraugi neizžūtu.*

### Pēc hibridizācijas

Veiciet pēchibridizācijas apstrādi (mazgāšana, pretkrāsošana, fluorescences mikroskopija) saskaņā ar [ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit](#) lietošanas instrukciju.

## 12. Rezultātu interpretācija

Izmantojot atbilstošus filtru komplektus, zondes hibridizācijas signāli ir zaļi (proksimāli no ALK lūzuma punkta reģiona), oranži (distāli no ALK lūzuma punkta reģiona) un zili (EML4 gēna reģions).

**Normāla situācija:** Normālu šūnu starpējās bez EML4-ALK gēna reģiona pārkārtojuma parādās divi oranži/zaļi saplūšanas signāli un divi zili signāli (skatīt 2. attēlu).

**Neparasta situācija:** EML4-ALK inversiju norāda viens atsevišķs zaļš signāls, viens atsevišķs oranžs signāls un papildu zils signāls. Katrs atsevišķs zaļais un oranžais signāls koplokalizējas ar zilo signālu. ALK translokāciju, kas neietekmē EML4, norāda atsevišķi oranžais un zaļais signāls bez papildu zilā signāla. Uz EML4-ALK inversiju ar 5'- ALK sekvences izdžešanu norāda viena zaļā signāla zudums un izolētā oranžā signāla kolokalizācija ar papildu zilo signālu (sk. 2. attēlu).

Pārklājošies signāli var parādīties kā dzeltenīgi signāli.

	Zaļo/apelsīnu divjoslu filtru komplekts	Zilo vienjoslas filtru komplekts	Apvienotais attēls vai trīskāršu joslas filtru komplekts
Normālas šūnas			
EML4 - ALK inversija			
ALK translokācija - nav saistīta ar EML4			
EML4 - ALK inversija ar ALK 5' sekvences dzēšanu			

2. attēls: Paredzamie rezultāti normālos un aberantos kodolos

Dažos patoloģiskos paraugos var novērot citus signālu modeļus, kas nav iepriekš aprakstīti. Šie negaidītie signālu modeļi ir jāizpēta sīkāk.

**Lūdzu, ņemiet vērā:**

- Dekondensētā hromatīna dēļ atsevišķi FISH signāli var parādīties kā nelieli signālu klasteri. Tādējādi divi vai trīs vienāda lieluma signāli, kas ir atdalīti ar attālumu  $\leq 1$  signāla diametrs, jāuzskata par vienu signālu.
- Neizvērtējiet pārklājas kodolus.
- Neskaitiet pārīrītus kodolus (ko atpazīst pēc tumšiem laukumiem kodola iekšpusē).
- Neskaitiet kodolus ar spēcīgu auto-fluorescenci, kas traucē atpazīt signālu.
- Negatīvu vai nespecifisku rezultātu var izraisīt vairāki faktori (skatīt 16. nodaļu "Problēmu novēršana").
- Lai pareizi interpretētu rezultātus, lietotājam šis produkts pirms lietošanas diagnostikas procedūrās ir jāapstiprina saskaņā ar valsts un/vai starptautiskajām vadlīnijām.

**13. Ieteicamās kvalitātes kontroles procedūras**

Lai uzraudzītu apstrādāto paraugu un testa reaģentu pareizu darbību, katrai analīzei ir jābūt pievienotai iekšējai un ārējai kontrolei. Ja iekšējās un/vai ārējās kontroles neuzrāda atbilstošu krāsojumu, rezultāti ar pacienta paraugiem jāuzskata par nederīgiem.

**Iekšējā kontrole:** Ne-neoplastiskas šūnas paraugā, kurām ir normāls signāla modelis, piemēram, fibroblasti.

**Ārējā vadība:** Apstiprināti pozitīvās un negatīvās kontroles paraugi.

**14. Veiktspējas raksturlielumi**

**14.1 Analītiskā veiktspēja**

Veiktspēja tika novērtēta saskaņā ar ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit lietošanas instrukciju.

Analītiskā jutība:	100% (95% CI 98.5 – 100.0)
Analītiskā specifika:	100% (95% CI 97.0 – 100.0)

**14.2 Klīniskā veiktspēja**

Diagnostikas jutīgums:	95% (95% CI 91.0 – 98.0) pamatojoties uz divdimensiju modeli
Diagnostikas specifiskums:	95% (95% CI 89.0 – 98.0) pamatojoties uz divdimensiju modeli

**15. Izmešana**

Reaģentu iznīcināšana jāveic saskaņā ar vietējiem noteikumiem.

**16. Problēmu novēršana**

Jebkura novirze no lietošanas instrukcijām var novest pie sliktākiem krāsošanas rezultātiem vai arī pie tā, ka krāsošana vispār nenotiek. Sīkāku informāciju skatiet [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com).

**vāji signāli vai to nav vispār**

Iespējamais iemesls	Rīcība
Šūnu vai audu paraugs nav pareizi fiksēts	Optimizējiet fiksācijas laiku un fiksatoru vai izmantojiet pēcfiksācijas posmu, kā aprakstīts <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</u> rokasgrāmatas sadaļā "pārbaudes procedūra".
Nepareizi veikta proteolītiskā pirmapstrāde	Optimizēt pepsīna inkubācijas laiku, vajadzības gadījumā to palielināt vai samazināt.
Zondes iztvaikošana	Ja izmantojat hibrīdizeru, obligāti jāizmanto slapjās svītras/ ar ūdeni piepildītas tvertnes. Izmantojot hibrīdizācijas krāsni, obligāti jāizmanto mitruma kamera. Turklāt, lai novērstu parauga izžūšanu hibrīdizācijas laikā, pārklājlapas pilnībā jāaizlīmē, piemēram, ar fiksogumu.
Neatbilstoši izmantotie filtru komplekti	Izmantojiet zondes fluohromiem atbilstošus filtru komplektus. <i>Tīrs joslu caurlaides filtru komplekti nodrošina mazāk gaismas salīdzinājumā ar vienas vai divu joslu caurlaides filtru komplektiem. Līdz ar to, izmantojot šos trīsjoslu filtru komplektus, signāli var šķist vājāki.</i>

**Krustveida hibrīdizācijas signāli; trokšņains fons**

Iespējamais iemesls	Rīcība
Nepilnīga deparafinēšana	Izmantojiet svaigus šķīdumus; pārbaudiet deparafinēšanas ilgumu.
Pārāk spēcīga proteolītiskā pirmapstrāde	Pepsīna inkubācijas laika samazināšana
Slaidi pirms hibrīdizācijas atdzesēti līdz istabas temperatūrai	Ātri pārvietojiet priekšmetstiklīņus 37 °C temperatūrā

**Morfoloģijas degradācija**

Iespējamais iemesls	Rīcība
Šūnu vai audu paraugs nav pareizi fiksēts	Optimizējiet fiksācijas laiku un fiksatoru vai izmantojiet pēcfiksācijas posmu, kā aprakstīts <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</u> rokasgrāmatas sadaļā "pārbaudes procedūra".
Nepareizi veikta proteolītiskā pirmapstrāde	Optimizēt pepsīna inkubācijas laiku, vajadzības gadījumā to samazināt.
Nepietiekama žāvēšana pirms zondes uzklāšanas	Pagarināt žāvēšanu gaisā

**Pārklājošies kodoli**

Iespējamais iemesls	Rīcība
Neatbilstošs audu griezumuma biezums	Sagatavojiet 2-4 µm mikrotoma griezumus

**Paraugs peld no priekšmetstiklīna**

Iespējamais iemesls	Rīcība
Pārāk spēcīga proteolītiskā pirmapstrāde	Pepsīna inkubācijas laika samazināšana

**Vājš pretkrāsojums**

Iespējamais iemesls	Rīcība
Zema koncentrācijas DAPI šķīdums	Tā vietā izmantojiet <u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (Produkta Nr. MT-0008-0.8).
Pārāk īss DAPI inkubācijas laiks	Pielāgojiet DAPI inkubācijas laiku

**17. Literatūra**

- 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. Pārskatīšana**

Pārskatīšana	Izmaiņu apraksts
2.2.1	14.2 Klīniskā veikspēja Atjaunināti veikspējas dati


[www.zytovision.com](http://www.zytovision.com)

Jaunākās lietošanas instrukcijas, kā arī lietošanas instrukcijas dažādās valodās skatīt [vietnē www.zytovision.com](http://www.zytovision.com).

Mūsu eksperti ir gatavi atbildēt uz jūsu jautājumiem.

Lūdzu, sazinieties ar [helptech@zytovision.com](mailto:helptech@zytovision.com)

Drošības un veikspējas kopsavilkumu skatiet šādā dokumentā [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com).



ZytoVision GmbH

Fischkai 1

27572 Bremerhäfena/ Vācija

Tālrunis: +49 471 4832-300

Fakss: +49 471 4832-509

[www.zytovision.com](http://www.zytovision.com)

E-pasts: [info@zytovision.com](mailto:info@zytovision.com)

**Preču zīmes:**

ZytoVision® un ZytoLight® ir ZytoVision GmbH preču zīmes.