



## ZytoLight SPEC ALK/EML4 TriCheck Probe

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

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

Na kvalitatívnu detekciu prestavieb zahŕňajúcich ľudský gén ALK na 2p23.1-p23.2 a ľudský gén EML4 na 2p21 pomocou fluorescenčnej *in situ* hybridizácie (FISH)

4250380P168RC



Diagnostická zdravotnícka pomôcka in vitro  
podľa IVDR (EÚ) 2017/746

### 1. Zamýšľaný účel

Sonda ZytoLight SPEC ALK/EML4 TriCheck Probe (PL74) je určená na kvalitatívnu detekciu prestavieb zahŕňajúcich ľudský gén ALK na 2p23.1-p23.2 a ľudský gén EML4 na 2p21 vo vzorkách fixovaných formalínom a vložených do parafrínu, ako je nemalobunkový karcinóm pľúc (NSCLC), pomocou fluorescenčnej *in situ* hybridizácie (FISH). Sonda je určená na použitie v kombinácii so súpravou ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (č. Z-2028-5/-20).

Výrobok je určený len na profesionálne použitie. Všetky testy s použitím výrobku by mal vykonávať kvalifikovaný personál v certifikovanom, licencovanom laboratóriu anatomickej patológie pod dohľadom patológa/humánneho genetika.

Sonda je určená ako pomôcka pri diferenciálnej diagnostike NSCLC a terapeutické opatrenia by sa nemali začínať len na základe výsledku testu.

### 2. Princíp testu

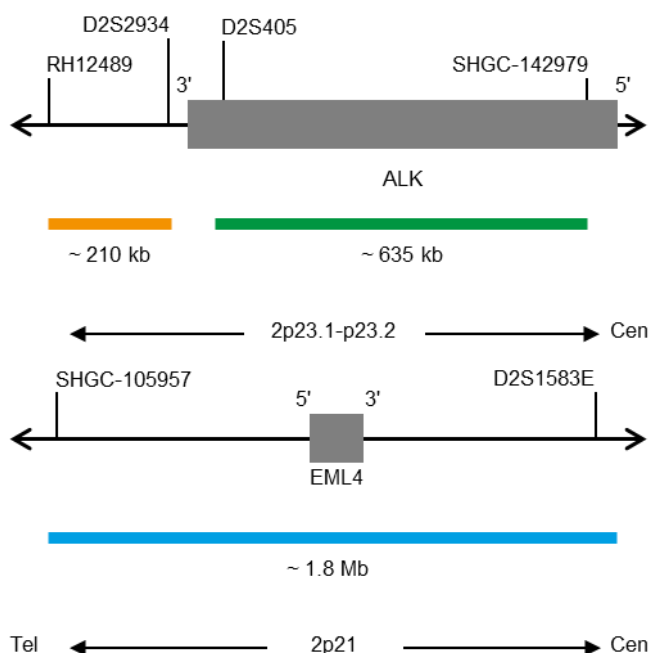
Technika fluorescenčnej *in situ* hybridizácie (FISH) umožňuje detekciu a vizualizáciu špecifických sekvencií nukleových kyselín v bunkových preparátoch. Fluorescenčne označené fragmenty DNA, tzv. sondy FISH, a ich komplementárne cieľové reťazce DNA v preparátoch sa počas hybridizácie spoločne kodenaturujú a následne nechajú hybridizovať. Potom sa nešpecifické a nenaviazané fragmenty sond odstránia premytím. Po kontrastnom farbení DNA pomocou DAPI sa hybridizované fragmenty sond vizualizujú pomocou fluorescenčného mikroskopu vybaveného excitačnými a emisnými filtermi špecifickými pre fluorochrómy, ktorými boli fragmenty sond FISH priamo označené.

### 3. Poskytnuté činidlá

ZytoLight SPEC ALK/EML4 TriCheck Probe sa skladá z:

- ZyGreen (excitácia 503 nm/emisia 528 nm) značené polynukleotidy (~10 ng/μl), ktoré sú zamerané na sekvencie mapujúce 2p23.1-p23.2\* (chr2:29,460,144-30,095,822) v blízkosti oblasti zlomu ALK (pozri obr. 1).
- ZyOrange (excitácia 547 nm/emisia 572 nm) značené polynukleotidy (~4,5 ng/μl), ktoré sú zamerané na sekvencie mapujúce 2p23.2\* (chr2:29,174,204-29,383,335) vzdialené od oblasti zlomu ALK (pozri obr. 1).
- ZyBlue (excitácia 418 nm/emisia 467 nm) značené polynukleotidy (~37,0 ng/μl), ktoré sú zamerané na sekvencie mapujúce oblasť in 2p21\* (chr2:41,573,525-43,349,624), v ktorej sa nachádza oblasť génu EML4 (pozri obr. 1).
- Hybridizačný pufer na báze formamidu

\*podľa Human Genome Assembly GRCh37/hg19



Obr. 1: Horná časť: Mapa sondy SPEC ALK, spodná časť: Mapa sondy SPEC EML4 (nie v mierke)

ZytoLight SPEC ALK/EML4 TriCheck Probe je k dispozícii v dvoch veľkostiach:

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

### 4. Požadované, ale neposkytované materiály

- ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (č. Z-2028-5/-20)
- Pozitívne a negatívne kontrolné vzorky
- Mikroskopické sklíčka, kladne nabité
- Vodný kúpeľ (37 °C, 98 °C)
- Hybridizér alebo horúca platňa
- Hybridizér alebo vlhká komora v hybridizačnej peci
- Nastaviteľné pipety (10 μl, 25 μl)
- Farbiace nádoby alebo kúpele
- Časovač
- Kalibrovaný teplomer
- Etanol alebo reagenčný alkohol
- Xylén
- Deionizovaná alebo destilovaná voda
- Krycie sklíčka (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Gumové lepidlo, napr. Fixogum Rubber Cement (č. E-4005-50/-125) alebo podobný
- Primerane udržiavaný fluorescenčný mikroskop (400-1000x)
- Imerný olej schválený pre fluorescenčnú mikroskopiu
- Vhodné súpravy filtrov

## 5. Skladovanie a manipulácia

Skladujte pri teplote 2 - 8 °C vo zvislej polohe chránenej pred svetlom. Používajte chránené pred svetlom. Okamžite po použití vráťte do skladovacích podmienok. Nepoužívajte činidlá po dátume expirácie uvedenom na etikete. Produkt je stabilný do dátumu expirácie uvedeného na etikete, ak sa s ním zaobchádza primeraným spôsobom.

## 6. Upozornenia a bezpečnostné opatrenia

- Pred použitím si prečítajte návod na použitie!
- Nepoužívajte činidlá po uplynutí dátumu expirácie!
- Tento výrobok obsahuje látky (v nízkych koncentráciách a objemoch), ktoré sú zdraviu škodlivé a potenciálne infekčné. Vyhnite sa akémukoľvek priamemu kontaktu s činidlami. Prijmite vhodné ochranné opatrenia (používajte jednorazové rukavice, ochranné okuliare a laboratórny odev)!
- Každý závažný incident, ku ktorému došlo v súvislosti s výrobkom, nahláste výrobcovi a príslušnému orgánu podľa miestnych predpisov!
- Ak sa činidlá dostanú do kontaktu s pokožkou, okamžite ju opláchnite veľkým množstvom vody!
- Pre profesionálnych používateľov je na požiadanie k dispozícii karta bezpečnostných údajov.
- Reagencie nepoužívajte opakovane, pokiaľ nie je opakované použitie výslovne povolené!
- Vyhnite sa krížovej kontaminácii vzoriek, pretože to môže viesť k chybným výsledkom.
- Sonda by nemala byť dlhší čas vystavená svetlu, najmä silnému svetlu, t. j. všetky kroky by sa mali vykonávať, ak je to možné, v tme a/alebo s použitím nádob odolných voči svetlu.

### Výstražné a bezpečnostné upozornenia:

Zložkou určujúcou nebezpečenstvo je formamid.



### Nebezpečenstvo

H351	Podozrenie, že spôsobuje rakovinu.
H360FD	Môže poškodiť plodnosť. Môže poškodiť nenarodené dieťa.
H373	Môže spôsobiť poškodenie orgánov pri dlhodobej alebo opakovanej expozícii.
P201	Pred použitím si vyžiadať špeciálne pokyny.
P202	Nemanipulujte s ním, kým si neprečítate a nepochopíte všetky bezpečnostné opatrenia.
P260	Nevdychujte prach/dym/plyn/hmlu/výpary/sprej.
P280	Používajte ochranné rukavice/ochranný odev/ochranu očí/ochranu tváre.
P308+P313	Po expozícii alebo podozrení z nej: Vyhľadajte lekársku pomoc/starostlivosť.
P405	Skladujte uzamknuté.

## 7. Obmedzenia

- Na diagnostické použitie *in vitro*.
- Len na profesionálne použitie.
- Len na neautomatizované použitie.
- Klinická interpretácia akéhokoľvek pozitívneho farbenia alebo jeho neprítomnosti sa musí vykonať v kontexte klinickej anamnézy, morfológie, iných histopatologických kritérií, ako aj iných diagnostických testov. Je zodpovednosťou kvalifikovaného patológa/humánneho genetika, aby poznal sondy FISH, reagencie, diagnostické panely a metódy použité na výrobu farbeného preparátu. Farbenie sa musí vykonávať v certifikovanom, licencovanom laboratóriu pod dohľadom patológa/humánneho genetika, ktorý je zodpovedný za preskúmanie farbených preparátov a zabezpečenie primeranosti pozitívnych a negatívnych kontrol.
- Zafarbenie vzorky, najmä intenzita signálu a zafarbenie pozadia, závisí od manipulácie so vzorkou a jej spracovania pred zafarbením.

Nesprávna fixácia, zmrazenie, rozmrazenie, umývanie, sušenie, zahrievanie, rezanie alebo kontaminácia inými vzorkami alebo tekutinami môže spôsobiť artefakty alebo falošné výsledky. Nekonzistentné výsledky môžu byť dôsledkom rozdielov v metódach fixácie a vkladania, ako aj vnútorných nepravidielností vo vzorke.

- Sonda by sa mala používať len na detekciu lokusov opísaných v kapitole 3. "Dodávané činidlá".
- Výkon bol overený pomocou postupov opísaných v tomto návode na použitie. Úpravy týchto postupov môžu zmeniť výkon a musí ich overiť používateľ. Tento IVD je certifikovaný ako CE len vtedy, keď sa používa tak, ako je opísané v tomto návode na použitie v rozsahu určeného použitia.

## 8. Rušivé látky

Červené krvinky prítomné vo vzorke môžu vykazovať autofluorescenciu, ktorá bráni rozpoznaniu signálu.

Nasledujúce fixatíva sú nekompatibilné s FISH:

- Bouinovo fixačné činidlo
- Fixačné činidlo B5
- Kyslé fixačné prostriedky (napr. kyselina pikrová)
- Zenkerov fixatív
- Alkoholy (ak sa používajú samostatne)
- Chlorid ortuťnatý
- Formaldehydové/zinkové fixačné činidlo
- Hollandova fixácia
- Formalín bez pufru

## 9. Príprava vzoriek

Pripravte vzorky podľa návodu na použitie súpravy ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit.

## 10. Prípravné ošetrenie zariadenia

Výrobok je pripravený na použitie. Nie je potrebná rekonštitúcia, miešanie ani riedenie. Pred použitím uveďte sondu na izbovú teplotu (18 - 25 °C) a chráňte ju pred svetlom. Pred otvorením liekovky premiešajte vortexovaním a krátko roztočte.

## 11. Postup analýzy

### Predbežná úprava vzorky

Vykonajte predbežnú úpravu vzorky (odparafinovanie, proteolýzu) podľa návodu na použitie súpravy ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit.

### Denaturácia a hybridizácia

- Pipetujte 10 µl sondy na každú vopred upravenú vzorku.
  - Vzorky zakryte krycím sklíčkom s rozmermi 22 x 22 mm (zabráňte zachytávaniu bublín) a krycie sklíčko utesnite.
- Na utesnenie odporúčame použiť gumové lepidlo (napr. Fixogum).*
- Umiestnite sklíčka na horúcu platňu alebo hybridizér a vzorky denaturujte 10 minút pri teplote 75 °C.
  - Sklíčka preneste do vlhkej komory a hybridizujte cez noc pri 37 °C (napr. v hybridizačnej peci).

*Je dôležité, aby vzorky počas hybridizácie nevyschli.*

### Po hybridizácii

Spracovanie po hybridizácii (premytie, kontrastné farbenie, fluorescenčná mikroskopia) vykonajte podľa návodu na použitie súpravy ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit.

## 12. Interpretácia výsledkov

Pri použití vhodných súprav filtrov sa hybridizačné signály sondy zobrazujú zelené (proximálne od oblasti bodu zlomu ALK), oranžové (distálne od oblasti bodu zlomu ALK) a modré (oblasť génu EML4).

**Normálna situácia:** V interfázach normálnych buniek bez prestavby oblasti génu EML4-ALK sa objavujú dva oranžovo/zelené fúzne signály a dva modré signály (pozri obr. 2).

**Neštandardná situácia:** Inverziu EML4-ALK indikuje jeden samostatný zelený signál, jeden samostatný oranžový signál a prídavný modrý signál. Každý samostatný zelený a oranžový signál sa spoločne kolokalizuje s modrým signálom. Translokácia ALK, ktorá nazahŕňa EML4, je indikovaná oddelenými oranžovými a zelenými signálmi bez prídavného modrého signálu. Inverzia EML4-ALK s odstránením 5'-sekvencií ALK je indikovaná stratou jedného zeleného signálu a kolokalizáciou izolovaného oranžového signálu s prídavným modrým signálom (pozri obr. 2).

Prekrývajúce sa signály sa môžu zobrazovať ako žlté signály.

	Sada dvoj pásomných filtrov zelenej/oranžovej farby	Sada modrých jednopásomných filtrov	Zlúčený obraz alebo sada trojpásomných filtrov
Normal cells			
EML4 - ALK inverzia			
Translokácia ALK - nezahŕňa EML4			
EML4 - ALK inverzia s deléciou 5' ALK sekvencií			

Obr. 2: Očakávané výsledky v normálnych a aberantných jadrách

V niektorých abnormálnych vzorkách možno pozorovať iné vzory signálov, ako sú opísané vyššie. Tieto neočakávané vzory signálov by mali byť ďalej preskúmané.

**Upozornenie:**

- Kvôli dekonenzovanému chromátinu sa jednotlivé signály FISH môžu objaviť ako malé zhluky signálov. Preto by sa dva alebo tri signály rovnakej veľkosti, oddelené vzdialenosťou  $\leq 1$  priemer signálu, mali považovať za jeden signál.
- Nehodnotte prekrývajúce sa jadrá.
- Nepočítajte nadmerne natrávené jadrá (rozpoznateľné podľa tmavých oblastí viditeľných vo vnútri jadier).
- Nepočítajte jadrá so silnou autofluorescenciou, ktorá bráni rozpoznaní signálu.
- Negatívny alebo nešpecifický výsledok môže byť spôsobený viacerými faktormi (pozri kapitolu 16 "Riešenie problémov").
- V záujme správnej interpretácie výsledkov musí používateľ tento výrobok pred použitím v diagnostických postupoch validovať podľa národných a/alebo medzinárodných smerníc.

**13. Odporúčané postupy kontroly kvality**

Na monitorovanie správneho fungovania spracovaných vzoriek a testovacích činidiel by mali byť ku každému testu pripojené interné a externé kontroly. Ak interné a/alebo externé kontroly nepreukážu vhodné zafarbenie, výsledky so vzorkami pacientov sa musia považovať za neplatné.

**Vnútoraná kontrola:** Nenádorové bunky vo vzorke, ktoré vykazujú normálny vzor signálu, napr. fibroblasty.

**Externé ovládanie:** Validované pozitívne a negatívne kontrolné vzorky.

**14. Výkonnostné charakteristiky**

**14.1 Analytický výkon**

Výkon sa hodnotil podľa návodu na použitie súpravy *ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit*.

Analytická citlivosť:	100% (95% CI 98.5 – 100.0)
Analytická špecifickosť:	100% (95% CI 97.0 – 100.0)

**14.2 Klinický výkon**

Diagnostická senzitivita:	95% (95% CI 91.0 – 98.0) na základe dvojrozmerného modelu
Diagnostická špecifita:	95% (95% CI 89.0 – 98.0) na základe dvojrozmerného modelu

**15. Likvidácia**

Likvidácia činidiel sa musí vykonávať v súlade s miestnymi predpismi.

**16. Riešenie problémov**

Akákoľvek odchýlka od návodu na obsluhu môže viesť k horším výsledkom farbenia alebo k tomu, že sa farbenie vôbec nevyskytne. Viac informácií nájdete na stránke [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com).

**Slabé signály alebo žiadne signály**

Možná príčina	Akcia
Vzorka buniek alebo tkaniva nie je správne fixovaná	Optimalizujte čas fixácie a fixačné činidlo alebo použite postfixačný krok, ako je opísané v "postupe analýzy" v príručke <i>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</i>
Predbežná proteolytická úprava nebola vykonaná správne	Optimalizujte čas inkubácie pepsínu, v prípade potreby ho predĺžte alebo skráťte
Odparovanie sondy	Pri používaní hybridizéra je používanie vlhkých pásov/nádrží naplnených vodou povinné. Pri používaní hybridizačnej pece je potrebné používať vlhkú komoru. Okrem toho by malo byť krycie sklo úplne utesnené, napr. pomocou Fixogumu, aby sa zabránilo vysychaniu vzorky počas hybridizácie
Použitie nevhodných súprav filtrov	Použite sady filtrov vhodné pre fluochrómy sondy. Sady filtrov s trojpásomovou priepustnosťou poskytujú menej svetla v porovnaní so sadami filtrov s jednopásomovou alebo dvoj pásomovou priepustnosťou. V dôsledku toho sa signály pri použití týchto trojpásomových filtračných súprav môžu javiť slabšie

**Krízové hybridizačné signály; silné pozadie**

Možná príčina	Akcia
Neúplné odparafínovanie	Používajte čerstvé roztoky; skontrolujte trvanie odparafínovania
Príliš silná proteolytická predúprava	Skrátenie inkubačného času pepsínu
Sklička pred hybridizáciou ochladená na izbovú teplotu	Sklička rýchlo presuňte na teplotu 37 °C

**Zhoršená morfológia**

Možná příčina	Akcia
Vzorka buniek alebo tkaniva nebola správne fixovaná	Optimalizujte čas fixácie a fixačné činidlo alebo použite postfixačný krok, ako je opísané v "postupe analýzy" v príručke <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</u>
Predbežná proteolytická úprava nebola vykonaná správne	Optimalizujte čas inkubácie pepsínu, v prípade potreby ho skráťte
Nedostatočné vysušenie pred aplikáciou sondy	Predĺženie sušenia na vzduchu

**Prekrývajúce sa jadrá**

Možná příčina	Akcia
Nevhodná hrúbka tkanivových rezov	Pripravte 2-4 µm rezy mikrotomom

**Vzorka vypláva zo sklíčka**

Možná příčina	Akcia
Príliš silná proteolytická predúprava	Skrátenie inkubačného času pepsínu

**Slabá protifarbivá**

Možná příčina	Akcia
Nízko koncentrovaný roztok DAPI	Namiesto toho použite <u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (č. produktu MT-0008-0.8)
Príliš krátky čas inkubácie DAPI	Úprava času inkubácie DAPI

**17. Literatúra**

- 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. Revízia**

Revízia	Popis zmeny
2.2.1	14.2 Klinický výkon Údaje o výkone boli aktualizované


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

Na najnovší návod na použitie, ako aj návod na použitie v rôznych jazykoch nájdete na stránke [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com).

Naši odborníci sú pripravení odpovedať na vaše otázky.

Obráťte sa na [help@zytovision.com](mailto:help@zytovision.com)

Prehľad o bezpečnosti a výkonnosti nájdete na [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com).



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

**Ochranné známky:**

ZytoVision® a ZytoLight® sú ochranné známky spoločnosti ZytoVision GmbH.