



ZytoLight SPEC ALK Dual Color Break Apart Probe

REF Z-2124-50 Σ 5 (0,05 ml)

REF Z-2124-200 Σ 20 (0,2 ml)

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

4250380P181R4



Diagnostická zdravotnícka pomôcka in vitro

podľa IVDR (EÚ) 2017/746

1. Zamýšľaný účel

Sonda ZytoLight SPEC ALK Dual Color Break Apart Probe (PL81) je určená na kvalitatívnu detekciu translokácií zahŕňajúcich ľudský gén ALK na 2p23.1-p23.2 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 filtrami špecifickými pre fluorochrómy, ktorými boli fragmenty sond FISH priamo označené.

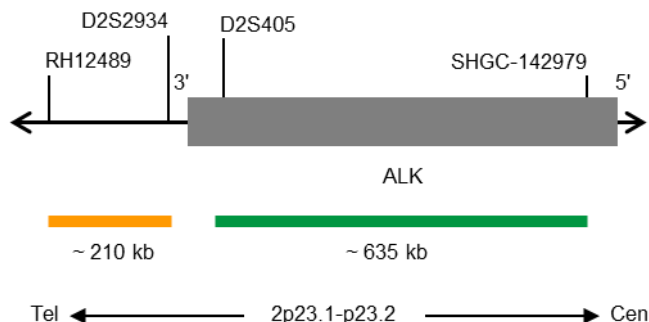
3. Poskytnuté činidlá

ZytoLight SPEC ALK Dual Color Break Apart 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).

Hybridizačný pufer na báze formamidu

*podľa Human Genome Assembly GRCh37/hg19



Obr. 1: SPEC ALK Mapa sondy (nie v mierke)

Sonda ZytoLight SPEC ALK Dual Color Break Apart Probe je k dispozícii v dvoch veľkostiach:

- Z-2124-50: 0,05 ml (5 reakcií po 10 μl)
- Z-2124-200: 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
- Kalibrovateľný 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)
- Imerzný 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
- Formálín bez pufru

9. Príprava vzoriek

Prípravte 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 (odparačovanie, proteolýzu) podľa návodu na použitie súpravy ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit.

Denaturácia a hybridizácia

1. Pipetujte 10 µl sondy na každú vopred upravenú vzorku.
2. 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).

3. Umiestnite sklíčka na horúcu platňu alebo hybridizér a vzorky denaturujte 10 minút pri teplote 75 °C.
4. 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.

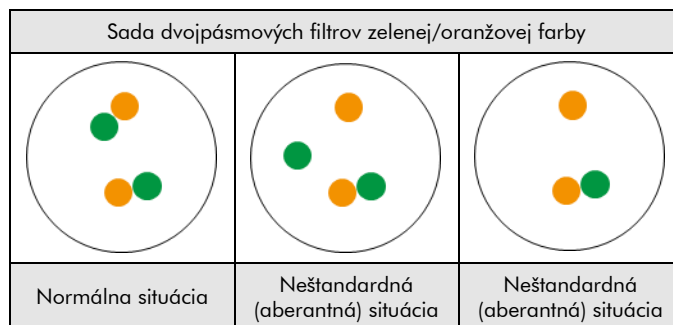
12. Interpretácia výsledkov

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

Normálna situácia: V interfázach normálnych buniek alebo buniek bez translokácie zahŕňajúcej oblasť génu ALK sa objavujú dva zeleno/oranžové fúzne signály (pozri obr. 2).

Neštandardná situácia: V interfázach normálnych buniek alebo buniek bez translokácie zahŕňajúcej oblasť génu ALK sa objavujú dva zeleno/oranžové fúzne signály. Inverzia EML4-ALK s deléciou 5'-ALK sekvencií je indikovaná jedným alebo viacerými izolovanými oranžovými signálmi (pozri obr. 2).

Prekrývajúce sa signály sa môžu zobrazovať ako žlté signály.



Obr. 2: Očakávané výsledky v normálnych a aberantných jadrách



Genomické aberácie spôsobené malými deléciami, duplikáciami alebo inverziami môžu mať za následok nenápadné signálne vzory.

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

Upozornenie:

- Kvôli dekondenzovanému chromatínu sa jednotlivé signály FISH môžu objaviť ako malé zhluky signálov. Preto by sa dva alebo tri signály rovnakej veľkosti, oddelené vzdialenosťou ≤ 1 priemer signálu, mali považovať za jeden signál.
- Nehodnotte prekrývajúce sa jadrá.
- Nepočítajte nadmerne natrávené jadrá (rozpozateľné 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.

Vnútorňá 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:	92.86% (95% CI 71.30 – 99.90) vs. IHC
Diagnostická špecifita:	100% (95% CI 71.30 – 99.90) vs. IHC

15. Likvidácia

Likvidácia činidiel sa musí vykonávať v súlade s miestnymi predpismi.

16. Riešenie problémov

Akákkoľvek 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.

Slabé signály alebo žiadne signály

Možná příčina	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 ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit
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. <i>Sady filtrov s trojpásmovou priepustnosťou poskytujú menej svetla v porovnaní so sadami filtrov s jedнопásmovou alebo dvojпásmovou priepustnosťou. V dôsledku toho sa signály pri použití týchto trojpásmových filtračných súprav môžu javiť slabšie</i>

Křížové hybridizačné signály; silné pozadie

Možná příčina	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 ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit
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	Prípravte 2-4 µm rezy mikrotomom

Vzorka vypláva zo sklička

Možná příčina	Akcia
Príliš silná proteolytická predúprava	Skrátenie inkubačného času pepsínu

Slabá protifarbivá

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

17. Literatúra

- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Skov BG, et al. (2017) *Histopathology* 70: 889-895.
- Wilkinson DG: In Situ Hybridization, A Practical Approach, *Oxford University Press* (1992) ISBN 0 19 963327 4.

18. Revízia



www.zytovision.com

Najnovší návod na použitie, ako aj návod na použitie v rôznych jazykoch nájdete na stránke www.zytovision.com.

Naši odborníci sú pripravení odpovedať na vaše otázky.
Obráťte sa na help@zytovision.com
Prehľad o bezpečnosti a výkonnosti nájdete na www.zytovision.com.



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

Ochranné známky:

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