ZytoLight
SPEC RET Dual Color Break Apart Probe

REF Z-2148-50 — 5 (0,05 ml)

REF Z-2148-200 — 20 (0,2 ml)

10q11.21'de insan RET genini içeren translokasyonların floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) ile kalitatif tespiti için

4250380P213QQ

CE 0483

IVD

İn vitro diagnostik tıbbi cihaz

IVDR (AB) 2017/746'ya göre

1. Hedeflenen amaç

ZytoLight SPEC RET Dual Color Break Apart Probe (**PL105**), küçük hücreli dışı akciğer kanseri (NSCLC) veya papiller tiroid karsinomu (PTC) gibi formalinle sabitlenmiş, parafine gömülü örneklerde 10q11.21'de insan RET genini içeren translokasyonların floresan in situ hibridizasyon (FISH) ile kalitatif tespiti için kullanılmak üzere tasarlanmıştır. Probun ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Ürün No. Z-2028-5/-20) ile birlikte kullanılması amaçlanmıştır.

Ürün sadece profesyonel kullanım için tasarlanmıştır. Ürünün kullanıldığı tüm testler sertifikalı, lisanslı bir anatomik patoloji laboratuvarında bir patolog/insan genetikçisinin gözetimi altında kalifiye personel tarafından gerçekleştirilmelidir.

Probun NSCLC veya PTC ayırıcı tanısına yardımcı olarak kullanılması amaçlanmıştır ve terapötik önlemler yalnızca test sonucuna göre başlatılmamalıdır.

2. Test prensibi

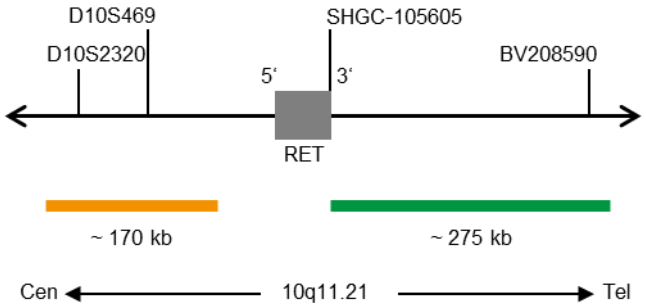
Floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) tekniği, hücre preparatlarında spesifik nükleik asit dizilerinin tespit edilmesini ve görüntülenmesini sağlar. FISH probları olarak adlandırılan floresan işaretli DNA parçaları ve preparatlardaki tamamlayıcı hedef DNA iplikleri birlikte denatüre edilir ve daha sonra hibridizasyon sırasında tavlanmasına izin verilir. Daha sonra, spesifik olmayan ve bağlanmamış prob parçaları sık yıkama adımları ile uzaklaştırılır. DNA'nın DAPI ile karşı boyanmasından sonra, hibridize prob parçaları, FISH prob parçalarının doğrudan etiketlendiği florokromlara özgü uyarma ve emisyon filtreleri ile donatılmış bir floresan mikroskobu kullanılarak görselleştirilir.

3. Sağlanan reaktifler

ZytoLight SPEC RET Dual Color Break Apart Probe oluşmaktadır:

- RET kırılma noktası bölgesinin distalinde 10q11.21* (chr10:43,626,274-43,902,346)içinde eşlenen dizileri hedefleyen ZyGreen (eksitasyon 503 nm/emisyon 528 nm) etiketli polinükleotidler (~10 ng/µl) (bkz. Şekil 1).
- RET kırılma noktası bölgesinin proksimalinde 10q11.21* (chr10:43,340,888-43,510,171) içinde eşlenen dizileri hedefleyen ZyOrange (eksitasyon 547 nm/emisyon 572 nm) işaretli polinükleotitler (~4,5 ng/µl) (bkz. Şekil 1).
- Formamid bazlı hibridizasyon tamponu

*İnsan Genomu Düzenlemesine göre GRCh37/hg19



Şekil 1: SPEC RET sonda haritası (ölçekli değil)

ZytoLight SPEC RET Dual Color Break Apart Probe iki boyutta mevcuttur:

- Z-2148-50: 0,05 ml (her biri 10 µl'lik 5 reaksiyon)
- Z-2148-200: 0,2 ml (her biri 10 µl'lik 20 reaksiyon)

4. Gerekli ancak sağlanmayan malzemeler

- ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Ürün No. Z-2028-5/-20)
- Pozitif ve negatif kontrol numuneleri
- Mikroskop lamları, pozitif yüklü
- Su banyosu (37 °C, 98 °C)
- Hibridizatör veya sıcak plaka
- Hibridizasyon fırınında hibridizatör veya nem odası
- Ayarlanabilir pipetler (10 µl, 25 µl)
- Boyama kavanozları veya banyoları
- Zamanlayıcı
- Kalibre edilmiş termometre
- Etanol veya reaktif alkol
- Ksilen
- Deiyonize veya damıtılmış su
- Kapaklı Klipsler (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Kauçuk çimento, örneğin Fixogum Rubber Cement (Ürün No. E-4005-50/-125) veya benzeri
- Yeterince bakımı yapılmış floresan mikroskobu (400-1000x)
- Floresan mikroskobu için onaylı daldırma yağı
- Uygun filtre setleri

5. Depolama ve taşıma

2-8 °C'de dik konumda ışıktan koruyarak saklayın. Işıktan koruyarak kullanın. Kullanımdan hemen sonra saklama koşullarına geri döndürün. Etiket üzerinde belirtilen son kullanma tarihinden sonra reaktifleri kullanmayın. Ürün, uygun şekilde kullanıldığında etikette belirtilen son kullanma tarihine kadar stabildir.

6. Uyarılar ve önlemler

- Kullanmadan önce kullanım talimatlarını okuyun!
- Reaktifleri son kullanma tarihi geçtikten sonra kullanmayın!
- Bu ürün sağlığa zararlı ve potansiyel olarak bulaşıcı maddeler (düşük konsantrasyonlarda ve hacimlerde) içerir. Reaktiflerle doğrudan temastan kaçının. Uygun koruyucu önlemleri alın (tek kullanımlık eldivenler, koruyucu gözlükler ve laboratuvar giysileri kullanın)!
- Ürünle ilgili olarak meydana gelen her türlü ciddi olayı yerel yönetmeliklere uygun olarak üreticiye ve yetkili makama bildirin!
- Reaktifler ciltle temas ederse, cildi derhal bol miktarda suyla yıkayın!

- Profesyonel kullanıcılar için talep üzerine bir malzeme güvenlik bilgi formu temin edilebilir.
- Tekrar kullanıma açıkça izin verilmediği sürece reaktifleri tekrar kullanmayın!
- Hatalı sonuçlara yol açabileceğinden numunelerin çapraz kontaminasyonundan kaçının.
- Prob uzun süre ışığa, özellikle de güçlü ışığa maruz bırakılmamalıdır, yani tüm adımlar mümkünse karanlıkta ve/veya ışık geçirmez kaplar kullanılarak gerçekleştirilmelidir.

Tehlike ve önlem beyanları:

Tehlikeyi belirleyen bileşen formamiddir.

Tehlike

H351	Kansere neden olduğundan şüpheleniliyor.
H360FD	Doğurganlığa zarar verebilir. Doğmamış çocuğa zarar verebilir.
H373	Uzun süreli veya tekrarlı maruz kalma sonucu organlarda hasara neden olabilir.
P201	Kullanmadan önce özel talimatları alın.
P202	Tüm güvenlik önlemleri okunup anlaşılmadan elleçlemeyin.
P260	Toz/duman/gaz/sis/buhar/sprey solumayın.
P280	Koruyucu eldiven/koruyucu giysi/göz koruması/yüz koruması kullanın.
P308+P313	Maruz kaldıysanız veya endişeliyseniz: Tıbbi tavsiye/müdahale alın.
P405	Depo kilitli.

7. Sınırlamalar

- *İn vitro* diagnostik kullanım için.
- Sadece profesyonel kullanım içindir.
- Yalnızca otomatik olmayan kullanım içindir.
- Herhangi bir pozitif boyamanın klinik yorumu veya yokluğu, klinik öykü, morfoloji, diğer histopatolojik kriterler ve diğer tanısal testler bağlamında yapılmalıdır. FISH probları, reaktifleri, tanı panelleri ve boyalı preparatı üretmek için kullanılan yöntemler hakkında bilgi sahibi olmak kalifiye bir patolog/insan genetikçisinin sorumluluğundadır. Boyama, boyanmış slaytların gözden geçirilmesinden ve pozitif ve negatif kontrollerin yeterliliğinin sağlanmasından sorumlu olan bir patolog/insan genetikçisinin gözetimi altında sertifikalı, lisanslı bir laboratuvarda yapılmalıdır.
- Numune boyaması, özellikle sinyal yoğunluğu ve arka plan boyaması, boyamadan önce numunenin kullanımına ve işlenmesine bağlıdır. Uygun olmayan fiksasyon, dondurma, çözdürme, yıkama, kurutma, ısıtma, kesit alma veya diğer numuneler veya sıvılarla kontaminasyon artefaktlara veya yanlış sonuçlara neden olabilir. Tutarsız sonuçlar, fiksasyon ve gömme yöntemlerindeki farklılıkların yanı sıra numune içindeki doğal düzensizliklerden de kaynaklanabilir.
- Prob yalnızca bölüm 3'te açıklanan lokusları tespit etmek için kullanılmalıdır. "Sağlanan reaktifler".
- Performans, bu kullanım talimatlarında açıklanan prosedürler kullanılarak doğrulanmıştır. Bu prosedürlerde yapılacak değişiklikler performansı değiştirebilir ve kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır. Bu IVD, yalnızca bu kullanım talimatında açıklandığı şekilde amaçlanan kullanım kapsamında kullanıldığında CE sertifikasına sahiptir.

8. Müdahale eden maddeler

Örnekte bulunan kırmızı kan hücreleri, sinyalin tanınmasını engelleyen otofloresans sergileyebilir.

Aşağıdaki fiksatifler FISH ile uyumlu değildir:

- Bouin'in fiksatifi
- B5 fiksatif
- Asidik fiksatifler (örn. pikrik asit)
- Zenker fiksatifi
- Alkoller (tek başına kullanıldığında)
- Merkürik klorür
- Formaldehit/çinko fiksatifi
- Hollande'ın sabitleyicisi
- Tamponlanmamış formalin

9. Numunelerin hazırlanması

Örnekleri ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit kullanım talimatlarında açıklandığı şekilde hazırlayın.

10. Cihazın hazırlık işlemi

Ürün kullanıma hazırdır. Sulandırma, karıştırma veya seyreltme gerekmez. Kullanmadan önce probu oda sıcaklığına (18-25 °C) getirin, ışıktan koruyun. Flakonu açmadan önce vorteksleyerek karıştırın ve kısa bir süre döndürün.

11. Tahlil prosedürü

Numune ön işlemi
ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit kullanım talimatlarına göre numune ön işlemini (mum alma, proteoliz) gerçekleştirin.

Denatürasyon ve hibridizasyon

1. Ön işlemden geçirilmiş her numuneye 10 µl prob pipetleyin.
2. Örnekleri 22 mm x 22 mm lamel ile kaplayın (sıkışmış kabarcıklardan kaçının) ve lameli kapatın.

Sızdırmazlık için kauçuk çimento (örn. Fixogum) kullanmanızı öneririz.

3. Lamları sıcak bir plakaya veya hibridizatöre yerleştirin ve numuneleri 75 °C'de 10 dakika denatüre edin.
4. Lamları bir nem odasına aktarın ve gece boyunca 37 °C'de hibridize edin (örn. bir hibridizasyon fırınında).

Hibridizasyon adımı sırasında numunelerin kurumaması çok önemlidir.

Hibridizasyon sonrası
Hibridizasyon sonrası işlemleri (yıkama, karşı boyama, floresan mikroskobu) ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit kullanım talimatlarına göre gerçekleştirin.

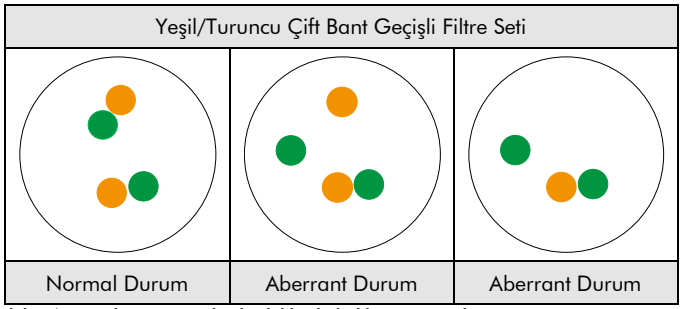
12. Sonuçların yorumlanması

Uygun filtre setleri kullanıldığında, probun hibridizasyon sinyalleri yeşil (RET kırılma noktası bölgesinin distalinde) ve turuncu (RET kırılma noktası bölgesinin proksimalinde) görünür.

Normal durum: Normal hücrelerin veya RET gen bölgesini içeren bir translokasyonu olmayan hücrelerin interfazlarında, iki yeşil/turuncu füzyon sinyali görülür (bkz. Şekil 2).

Anormal bir durum: Bir translokasyondan etkilenen bir RET gen bölgesi, bir ayrı yeşil sinyal ve bir ayrı turuncu sinyal ile gösterilir. İzole yeşil sinyaller, RET kırılma noktası bölgesinin proksimalindeki delesyonların sonucudur. CCDC6 gibi yakın genleri içeren inversiyonlar, sadece ince sinyal ayrımı nedeniyle gözlemlenemeyebilir (bkz. Şekil 2).

Çakışan sinyaller sarı sinyaller olarak görünebilir.



Şekil 2: Normal ve anormal çekirdeklerde beklenen sonuçlar

Küçük delesyonlar, duplikasyonlar veya inversiyonlardan kaynaklanan genomik sapmalar göze çarpmayan sinyal modellerine neden olabilir.

Bazı anormal numunelerde yukarıda açıklananlardan farklı sinyal modelleri gözlemlenebilir. Bu beklenmedik sinyal modelleri daha fazla araştırılmalıdır.

Lütfen unutmayın:

- Dekondense kromatin nedeniyle, tek FISH sinyalleri küçük sinyal kümeleri olarak görünebilir. Bu nedenle, ≤ 1 sinyal çapı mesafeyle ayrılmış aynı boyuttaki iki veya üç sinyal tek bir sinyal olarak sayılmalıdır.
- Örtüşen çekirdekleri değerlendirmeyin.
- Aşırı sindirilmiş çekirdekleri saymayın (çekirdeklerin içinde görünen koyu alanlarla tanınır).
- Sinyal tanımayı engelleyen güçlü oto-floresanslı çekirdekleri saymayın.
- Negatif veya spesifik olmayan bir sonuç birden fazla faktörden kaynaklanabilir (bkz. Bölüm 16 "Sorun Giderme").
- Sonuçların doğru bir şekilde yorumlanabilmesi için, kullanıcı bu ürünü tanı prosedürlerinde kullanmadan önce ulusal ve/veya uluslararası kılavuzlara göre doğrulamalıdır.

13. Önerilen kalite kontrol prosedürleri

İşlenmiş numunelerin ve test reaktiflerinin doğru performansını izlemek için, her tahlile dahili ve harici kontroller eşlik etmelidir. Dahili ve/veya harici kontroller uygun boyamayı gösteremezse, hasta numuneleriyle elde edilen sonuçlar geçersiz kabul edilmelidir.

Dahili kontrol: Örnek içinde normal sinyal paterni sergileyen neoplastik olmayan hücreler, örneğin fibroblastlar.

Harici kontrol: Onaylanmış pozitif ve negatif kontrol numuneleri.

14. Performans özellikleri

14.1 Analitik performans

Performans, *ZytoLight* FISH-Tissue Implementation Kit'in kullanım talimatlarına göre değerlendirilmiştir.

Analitik hassasiyet:	100% (95% CI 98.5 – 100.0)
Analitik özgüllük:	100% (95% CI 97.0 – 100.0)

Günden Güne Tekrar Üretilebilirlik, bir denetçinin 10 farklı günde elde ettiği sonuçları karşılaştırarak ve uyumu değerlendirerek test edilmiştir.

	Yüzde Anlaşma
nnegatif numune	100%
pozitif numune	100%

Tekrarlanabilirlik, bir denetçiden 10 farklı günde elde edilen tekrarlanan sonuçlar karşılaştırılarak ve uyum değerlendirilerek test edilmiştir.

	Yüzde Anlaşma
nnegatif numune	100%
pozitif numune	100%

14.2 Klinik performans

Tanısal duyarlılık:	**NSCLC:** 93% (95% CI 82.0 – 97.0) iki değişkenli bir modele dayalı **PTC:** 100% (95% CI 82.70 – 98.00) vs. RT-PCR 96.67% (95% CI 89.80 – 98.50) vs. RT-ddPCR, RT-qPCR, NGS
Teşhis özgüllüğü:	**NSCLC:** 97% (95% CI 95.0 – 99.0) iki değişkenli bir modele dayalı **PTC:** 92.16% (95% CI 82.70 – 98.00) vs. RT-PCR 95.06% (95% CI 89.80 – 98.50) vs. RT-ddPCR, RT-qPCR, NGS

15. Bertaraf

Reaktiflerin imhası yerel yönetmeliklere uygun olarak gerçekleştirilmelidir.

16. Sorun Giderme

Kullanım talimatlarından herhangi bir sapma, düşük boyama sonuçlarına veya hiç boyama olmamasına neden olabilir. Daha fazla bilgi için lütfen www.zytovision.com adresine bakın.

Zayıf sinyaller veya hiç sinyal yok

Olası neden	Eylem
Hücre veya doku örneği uygun şekilde sabitlenmemiş	Fiksasyon süresini ve fiksatifi optimize edin veya *ZytoLight* FISH-Tissue Implementation Kit kılavuzunun "tahlil prosedürü" bölümünde açıklandığı gibi bir post-fiksasyon adımı uygulayın
Proteolitik ön işlem düzgün yapılmamış	Pepsin inkübasyon süresini optimize edin, gerekirse artırın veya azaltın
Buharlaşma probu	Bir hibridizatör kullanırken, ıslak şeritlerin/su dolu tankların kullanılması zorunludur. Bir hibridizasyon fırını kullanıldığında, bir nem odasının kullanılması gereklidir. Ayrıca, hibridizasyon sırasında numunenin kurumasını önlemek için lamel, örneğin Fixogum ile tamamen kapatılmalıdır
Kullanılan uygunsuz filtre setleri	Probun flokromlarına uygun filtre setleri kullanın. *Üçlü bant geçiren filtre setleri, tekli veya ikili bant geçiren filtre setlerine kıyasla daha az ışık sağlar. Sonuç olarak, bu üçlü bant geçiren filtre setleri kullanıldığında sinyaller daha soluk görünebilir*

Çapraz hibridizasyon sinyalleri; gürültülü arka plan

Olası neden	Eylem
Eksik mum alma	Taze solüsyonlar kullanın; mum alma süresini kontrol edin
Proteolitik ön işlem çok güçlü	Pepsin inkübasyon süresini azaltın
Hibridizasyondan önce oda sıcaklığına soğutulmuş slaytlar	Lamları hızlı bir şekilde 37 °C'ye aktarın

Morfoloji bozulmuş

Olası neden	Eylem
Hücre veya doku örneği uygun şekilde sabitlenmemiştir	Fiksasyon süresini ve fiksatifi optimize edin veya *ZytoLight* FISH-Tissue Implementation Kit kılavuzunun "tahlil prosedürü" bölümünde açıklandığı gibi bir post-fiksasyon adımı uygulayın

Proteolitik ön işlem düzgün yapılmamış	Pepsin inkübasyon süresini optimize edin, gerekirse azaltın
Prob uygulamasından önce yetersiz kurutma	Hava ile kurutmayı uzatın

Örtüşen çekirdekler

Olası neden	Eylem
Doku kesitlerinin uygun olmayan kalınlığı	2-4 µm mikrotom kesitleri hazırlayın

Numune lam üzerinde yüzer

Olası neden	Eylem
Proteolitik ön işlem çok güçlü	Pepsin inkübasyon süresini azaltın

Zayıf karşı leke

Olası neden	Eylem
Düşük konsantrasyonlu DAPI çözeltisi	Bunun yerine DAPI/DuraTect-Solution (ultra) (Ürün No. MT-0008-0.8) kullanın
DAPI inkübasyon süresi çok kısa	DAPI inkübasyon süresini ayarlayın

17. Edebiyat

- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet 53*: 134-6.
- Lee SE, et al. (2015) *Mod Pathol 28*: 468-479.
- Lira ME, et al. (2014) *J Mol Diagn 16*: 229-243.
- Liu Y, et al. (2021) *J Clin Endocrinol Metab 106*: e1129-e1138.
- Musholt TJ, et al. (2019) *Eur J Surg Oncol 45*: 1018-1024.
- Pecciarini L, *et al.* (2023) *Cells.*
- Piton N, et al. (2018) *Lab Invest 98*: 371-379.
- Rogers TM, et al. (2017*) Sci Rep 7*: 1-8.
- Wilkinson DG: In Situ Hybridization, A Practical Approach, *Oxford University Press* (1992) ISBN 0 19 963327 4.

18. Revizyon

Revizyon	Onaylanmış kuruluş değişikliği
4.1.1	Onaylanmış kuruluş değişikliği 14. Performans özellikleri doğruluk ekleme

www.zytovision.com

En güncel kullanım talimatları ve farklı dillerdeki kullanım talimatları için lütfen www.zytovision.com adresine bakın.

Uzmanlarımız sorularınızı yanıtlamak için hazırdır.
Lütfen helptech@zytovision.com ile iletişime geçin
Güvenlik ve performans özeti için lütfen bkz. www.zytovision.com.

ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/ Almanya
Telefon numarası: +49 471 4832-300
Faks: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
E-posta: info@zytovision.com

Ticari markalar:
ZytoVision® ve Zyto*Light*® , ZytoVision GmbH'nin ticari markalarıdır.