



F/exSH ALK/ROS1 DistinguISH Probe

REF Z-2203-50 ∇ 5 (0,05 ml)

REF Z-2203-200 ∇ 20 (0,2 ml)

2p23.1-p23.2'de insan ALK genini ve 6q22.1'de insan ROS1 genini içeren translokasyonların floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) ile kalitatif tespiti için

4250380P283RD



İn vitro diagnostik tıbbi cihaz

IVDR (AB) 2017/746'ya göre

1. Hedeflenen amaç

F/exSH ALK/ROS1 DistinguISH Probe (PL161), küçük hücreli dışı akciğer kanseri (NSCLC) gibi formalinle sabitlenmiş, parafine gömülü örneklerde 2p23.1-p23.2'de insan ALK genini ve 6q22.1'de insan ROS1 genini içeren translokasyonların floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) ile kalitatif tespiti için kullanılmak üzere tasarlanmıştır. Probu **F/exSH-Tissue Implementation Kit** (Ürün No. Z-2182-5/-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.

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

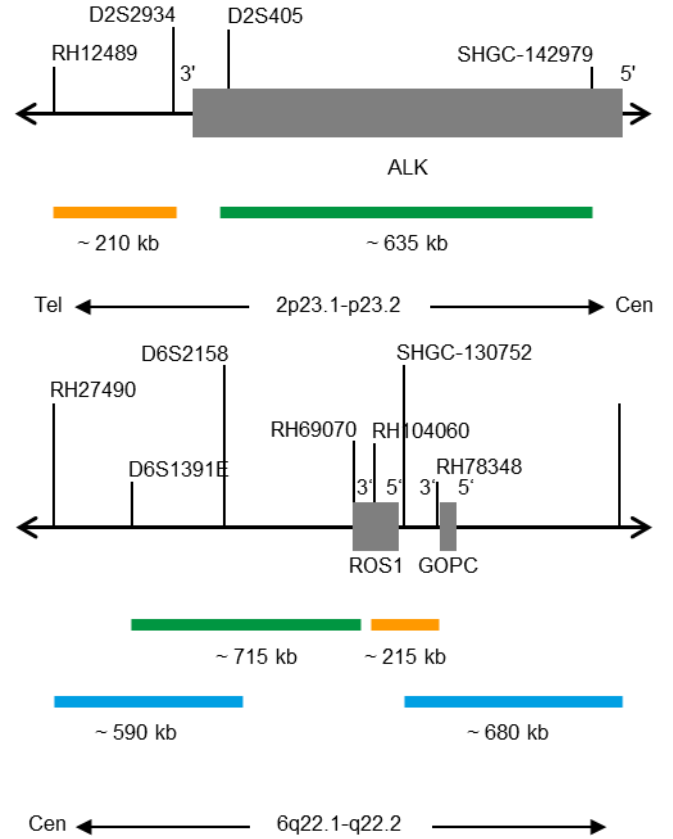
2. Test prensibi

Floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) tekniği, hücre preparatlarında spesifik nükleik asit dizilerinin tespit edilmesini ve görüntülenmesini sağlar. FISH problemleri olarak adlandırılan floresan işaretli DNA parçaları ve preparatlardaki tamamlayıcı hedef DNA iplikleri birlikte denatüre edilir ve daha sonra hibridizasyon sırasında tavlmasına 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 mikroskopu kullanılarak görselleştirilir.

3. Sağlanan reaktifler

F/exSH ALK/ROS1 DistinguISH Probe oluşmaktadır:

- ALK kırılma noktası bölgesinin proksimalindeki 2p23.1-p23.2* (chr2:29,460,144-30,095,822) ve ROS1 kırılma noktası bölgesinin proksimalindeki 6q22.1* (chr6:116,912,298-117,627,255) dizilerini hedefleyen ZyGreen (eksitasyon 503 nm/emisyon 528 nm) işaretli polinükleotidler (~10.0 ng/μl) (bkz. Şekil 1).
 - ALK kırılma noktası bölgesinin distalindeki 18q21.33-q22.1* (chr18:60,994,528-61,658,503) ve ROS1 kırılma noktası bölgesinin distalindeki 6q22.1* (chr6:117,659,135-117,871,701) dizilerini hedefleyen ZyOrange (eksitasyon 547 nm/emisyon 572 nm) işaretli polinükleotidler (~2.5 ng/μl) (bkz. Şekil 1).
 - ZyBlue (eksitasyon 418 nm/emisyon 467 nm) etiketli polinükleotidler (~70,0 ng/μl), 6q22.1* (chr6:116,671,642-117,260,761) proksimalinde ROS1 kırılma noktası bölgesinin yeşil etiketli ROS1 polinükleotidleri ile eş-lokalize olan ve 6q22.1-q22.2* (chr6:117,765,211-118,444,005) ROS1 kırılma noktası bölgesinin distalinde turuncu etiketli ROS1 polinükleotidleri ile birlikte lokalize olur (bkz. Şekil 1).
 - Formamid bazlı hibridizasyon tamponu
- *İnsan Genomu Düzenlemesine göre GRCh37/hg19



Şekil 1: Üst: SPEC ALK Prob haritası, Alt: SPEC ROS1 Prob haritası (ölçeklendirilmemiştir)

F/exSH ALK/ROS1 DistinguISH Probe iki boyutta mevcuttur:

- Z-2203-50: 0,05 ml (her biri 10 μl'lik 5 reaksiyon)
- Z-2203-200: 0,2 ml (her biri 10 μl'lik 20 reaksiyon)

4. Gerekli ancak sağlanmayan malzemeler

- F/exSH-Tissue Implementation Kit** (Ürün No. Z-2182-5/-20)
- Pozitif ve negatif kontrol numuneleri
- Mikroskop lamaları, 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
- 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)!
- Ürüne 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.
- Yeniden kullanıma açıkça izin verilmediği sürece reaktifleri yeniden 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

H319	Ciddi göz tahrişine neden olur.
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.
P260	Toz/duman/gaz/sis/buhar/sprey solumayın.
P280	Koruyucu eldiven/koruyucu giysi/göz koruması/yüz koruması kullanın.
P305+P351+P338	GÖZLE TEMASI HALİNDE: Su ile birkaç dakika dikkatlice durulayın. Varsa ve çıkarması kolaysa kontakt lensleri çıkarın. Durulamaya devam edin.
P308+P313	Maruz kaldıysanız veya endişeliyseniz: Tıbbi tavsiye/müdahale alın.
P337+P313	Göz tahrişi devam ederse: Tıbbi tavsiye/müdahale alın.

7. Sınırlamalar

- *In 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 tanı testleri bağlamında yapılmalıdır. FISH problemleri, 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, çözündürme, yıkama, kurutma, ısıtma, kesit alma veya diğer numuneler veya sıvılarla kontaminasyon artefaktlara veya yanlış sonuçlara neden olabilir. Tutsuz sonuçlar, fiksasyon ve gömme yöntemlerindeki farklılıkların yanı sıra numunedeki 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)
- Merkürük klorür
- Formaldehit/çinko fiksatifi
- Hollande'in sabitleyicisi
- Tamponlanmamış formalin

9. Numunelerin hazırlanması

Örnekleri F/exSH-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

F/exSH-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.
3. Sızdırmazlık için kauçuk çimento (örn. Fixogum) kullanmanızı öneririz.
3. Lamaları sıcak bir plakaya veya hibridizatöre yerleştirin ve numuneleri 75 °C'de 10 dakika denatüre edin.
4. Lamaları bir hibridizatöre ya da bir nem odasına ve hibridizasyon fırınına aktararak 37 °C'de 2 saatten 16 saate kadar (yani bir gece boyunca) hibridizasyon gerçekleştirin.

Hibridizasyon adımı sırasında numunelerin kurumaması çok önemlidir.

Hibridizasyon sonrası

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

12. Sonuçların yorumlanması

Uygun filtre setleri kullanıldığında, probun hibridizasyon sinyalleri yeşil (ALK ve ROS1 kırılma noktası bölgesinin proksimali), turuncu (ALK ve ROS1 kırılma noktası bölgesinin distali) ve mavi (ROS1 kırılma noktası bölgesinin proksimali ve distali) görünür.

Normal durum: ALK veya ROS1 gen bölgesini içeren bir yeniden düzenleme içermeyen normal hücrelerin veya hücrelerin interfazlarında, uygun bir çift bant geçişli filtre seti kullanıldığında dört yeşil/turuncu füzyon sinyali ve uygun bir tek bant geçişli filtre seti kullanıldığında iki mavi sinyal görünür (bkz. Şekil 2).

Anormal bir durum: Translokasyondan etkilenen bir ALK gen bölgesi, bir ayrı yeşil sinyal ve mavi sinyallerle birlikte lokalize olmayan bir ayrı turuncu sinyal ile gösterilir. İzole bir turuncu sinyal sonuclanan bir yeşil sinyalin kaybı, 5'-ALK dizilerinin silinmesinin sonucudur. Bir translokasyondan etkilenen bir ROS1 gen bölgesi, her biri mavi bir sinyal ile birlikte lokalize olan bir ayrı yeşil sinyal ve bir ayrı turuncu sinyal ile gösterilir. Mavi sinyalle birlikte lokalize olan izole bir yeşil sinyal sonuclanan bir turuncu sinyalin kaybı, ROS1 kesme noktası bölgesinin distalindeki bir delesyonun veya bu kromozomal bölgeyi etkileyen dengesiz bir translokasyonun sonucudur (bkz. Şekil 2).

Çakışan sinyaller sarı sinyaller olarak görünebilir.

	Yeşil/Turuncu Çift Bant Geçişli Filtre Seti	Mavi Tek Bant Geçişli Filtre Seti	Birleştirilmiş Resim veya Üçlü Bant Geçişli Filtre Seti
Normal Hücreler			
ALK yeniden düzenlemesi			
ROS1 yeniden düzenlemesi			

Şekil 2: Normal ve anormal çekirdeklere 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 göstermezse, 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)

14.2 Klinik performans

Tanısal duyarlılık:	100% (95% CI 87.7 - 100.0) vs ALK FISH 100% (95% CI 59.0 - 100.0) vs. ROS1 FISH
Teşhis özgüllüğü:	100% (95% CI 87.7 - 100.0) vs. ALK FISH 100% (95% CI 59.0 - 100.0) vs. ROS1 FISH

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
Numune uygun şekilde sabitlenmemiş	Sabitlenme süresini ve fiksatif optimize edin
Proteolitik ön işlem düzgün yapılmamış	Pepsin inkübasyon süresini optimize edin, gerekirse artırın veya azaltın
Buharlaştırma probu	Bir hibridizatör kullanırken, ıslak şeritlerin/su dolu tankların kullanılması zorunludur. Bir hibridizasyon fırını kullanıldığında, bir nem odasının kullanılması gereklidir. Ayrıca, hibridizasyon sırasında örneğin kurumasını önlemek için lamel Fixogum ile tamamen kapatılmalıdır.
Kullanılan uygunsuz filtre setleri	Probun flokromlarına uygun filtre setleri kullanın. <i>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.</i>

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
Numune uygun şekilde sabitlenmemiş	Sabitlenme süresini ve fiksatifini optimize edin
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 <u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (Ürün No. MT-0008-0.8) kullanın
DAPI inkübasyon süresi çok kısa	DAPI inkübasyon süresini ayarlayın

17. Edebiyat

- Ginestet F, *et al.* (2018) *Clin Lung Cancer* 19: e647-e653.
- Kievits T, *et al.* (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Wilkinson DG: In Situ Hybridization, A Practical Approach, *Oxford University Press* (1992) ISBN 0 19 963327 4.

18. Revizyonwww.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 F/exSH®, ZytoVision GmbH'nin ticari markalarıdır.