



## ZytoLight SPEC ALK Dual Color Break Apart Probe

**REF** Z-2124-50  $\Sigma$  5 (0,05 ml)

**REF** Z-2124-200  $\Sigma$  20 (0,2 ml)

Az emberi ALK gén 2p23.1-p23.2-es génállományát érintő transzlokációk minőségi kimutatására fluoreszcens *in situ* hibridizációval (FISH)

4250380P181R4



In vitro diagnosztikai orvostechikai eszköz  
az IVDR (EU) 2017/746 szerint

### 1. Rendeltetészerű cél

A ZytoLight SPEC ALK Dual Color Break Apart Probe (PL81) a humán ALK gént érintő transzlokációk minőségi kimutatására szolgál a 2p23.1-p23.2 helyen, formalin-fixált, paraffinba ágyazott mintákban, például nem kisjeles tüdőrákban (NSCLC), fluoreszcens *in situ* hibridizációval (FISH). A szonda a ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Prod. No. Z-2028-5/-20) készlettel együtt használható.

A termék kizárólag professzionális használatra készült. A termékkel végzett valamennyi vizsgálatot minősített, engedéllyel rendelkező anatómiai patológiai laboratóriumban, patológus/humángenetikus felügyelete mellett, szakképzett személyzetnek kell elvégeznie.

A próba az NSCLC differenciáldiagnózisának segédeszközeként szolgál, és terápiás intézkedéseket nem szabad kizárólag a teszteredmény alapján kezdeményezni.

### 2. A vizsgálat elve

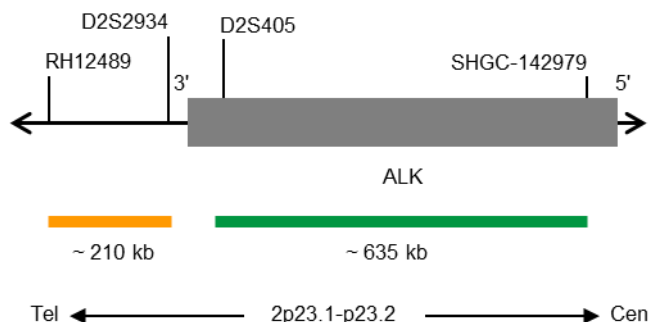
A fluoreszcens *in situ* hibridizációs (FISH) technika lehetővé teszi specifikus nukleinsav-szekvenciák kimutatását és vizualizálását sejt-készítményekben. A fluoreszcensen jelölt DNS-törédek, az úgynevezett FISH-szondák és a preparátumokban lévő komplementer cél-DNS-szálak együttesen denaturálódnak, majd a hibridizáció során hagyják, hogy a DNS-törédek egymáshoz kapcsolódjanak. Ezt követően a nem specifikus és nem kötött szondafragmentumokat szigorú mosási lépésekkel távolítják el. A DNS DAPI-val történő ellenfestése után a hibridizált szondafragmentumokat fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizualizáljuk, amely olyan gerjesztő és emissziós szűrőkkel van felszerelve, amelyek specifikusak azokra a fluorokromokra, amelyekkel a FISH-szondafragmentumokat közvetlenül jelölték.

### 3. Rendelkezésre bocsátott reagensek

A ZytoLight SPEC ALK Dual Color Break Apart Probe a következőkből áll:

- ZyGreen (gerjesztés 503 nm/emisszió 528 nm) jelölt polinukleotidok (~10 ng/μl), amelyek az ALK töréspont régióhoz közeli 2p23.1-p23.2\* (chr2:29,460,144-30,095,822) szekvenciákat célozzák meg (lásd az 1. ábrát).
- ZyOrange (gerjesztés 547 nm/emisszió 572 nm) jelölt polinukleotidok (~4,5 ng/μl), amelyek a 2p23.2\* (chr2:29,174,204-29,383,335), az ALK töréspont régiótól távoli szekvenciákat célozzák meg (lásd az 1. ábrát).
- Formamid alapú hibridizációs puffer

\*a Human Genome Assembly szerint GRCh37/hg19



1. ábra: SPEC ALK (nem méretarányos)

A ZytoLight SPEC ALK Dual Color Break Apart Probe két méretben kapható:

- Z-2124-50: 0,05 ml (5 reakció, egyenként 10 μl)
- Z-2124-200: 0,2 ml (20 reakció, egyenként 10 μl)

### 4. Szükséges, de nem biztosított anyagok

- ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Prod. No. Z-2028-5/-20)
- Pozitív és negatív kontrollminták
- Mikroszkópos tárgylemezek, pozitív töltésű
- Vízfürdő (37 °C, 98 °C)
- Hibridizátor vagy főzőlap
- Hibridizáló vagy pára kamra a hibridizációs kemencében
- Állítható pipetták (10 μl, 25 μl)
- Festőedények vagy fűrdők
- Időzítő
- Kalibrált hőmérő
- Etanol vagy reagens alkohol
- Xilol
- Deionizált vagy desztillált víz
- fedőlemezek (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Gumicement, pl. Fixogum Rubber Cement (Prod. No.E-4005-50/-125) vagy hasonló.
- Megfelelően karbantartott fluoreszcens mikroszkóp (400-1000x)
- Fluoreszcens mikroszkópiához jóváhagyott merülőolaj
- Megfelelő szűrőkészletek

### 5. Tárolás és kezelés

2-8 °C-on, fénytől védett, függőleges helyzetben tárolja. Használja fénytől védve. Használat után azonnal állítsa vissza a tárolási körülmények közé. Ne használja fel a reagenseket a címkén feltüntetett lejárati időn túl. A termék a címkén feltüntetett lejárati dátumig stabil, ha megfelelően kezelik.

### 6. Figyelmeztetések és óvintézkedések

- Használat előtt olvassa el a használati utasítást!
- Ne használja fel a reagenseket a lejárati idő lejártá után!
- Ez a termék (kis koncentrációban és mennyiségben) egészségre káros és potenciálisan fertőző anyagokat tartalmaz. Kerülje a reagensekkel való közvetlen érintkezést. Tegyen megfelelő védőintézkedéseket (használjon eldobható kesztyűt, védőszemüveget és laboratóriumi ruházatot)!
- A termékkel kapcsolatban bekövetkezett minden súlyos eseményt jelentsen a gyártónak és a helyi előírásoknak megfelelően az illetékes hatóságoknak!

- Ha a reagensek bőrrel érintkeznek, azonnal öblítse le a bőrt bőséges mennyiségű vízzel!
- A professzionális felhasználók számára kérésre biztonsági adatlap áll rendelkezésre.
- Ne használja újra a reagenseket, kivéve, ha az újrafelhasználás kifejezetten engedélyezett!
- Kerülje a minták keresztszennyeződését, mivel ez hibás eredményekhez vezethet.
- A szondát nem szabad hosszabb ideig fénynek, különösen erős fénynek kitenni, azaz minden lépést lehetőség szerint sötétben és/vagy fényálló edényben kell elvégezni.

#### Veszélyre és óvintézkedésekre vonatkozó nyilatkozatok:

A veszélyt meghatározó komponens a formamid.



#### Veszély

H351	Feltehetően rákot okoz..
H360FD	Károsíthatja a termékenységet. Károsíthatja a magzatot.
H373	Hosszan tartó vagy ismételt expozíció esetén szervi károsodást okozhat.
P201	Használat előtt kérje be a speciális utasításokat.
P202	Ne kezelje, amíg az összes biztonsági óvintézkedést el nem olvasta és meg nem értette.
P260	Ne lélegezze be a port/füstöt/gázt/ködöt/gőzt/permetet.
P280	Viseljen védőkesztyűt/védő ruházatot/szemvédőt/arcvédőt.
P308+P313	HA kitétt vagy érintett: Kérjen orvosi tanácsot/megfigyelést.
P405	Elzárva tárolandó

#### 7. Korlátozások

- *In vitro* diagnosztikai felhasználásra.
- Kizárólag professzionális használatra.
- Kizárólag nem automatizált használatra.
- A pozitív festődés klinikai értelmezését vagy annak hiányát a klinikai anamnézis, a morfológia, az egyéb szövettani kritériumok, valamint az egyéb diagnosztikai vizsgálatok összefüggésében kell elvégezni. A képzett patológus/humángenetikus felelőssége, hogy ismerje a FISH-szondákat, a reagenseket, a diagnosztikai paneleket és a festett preparátum előállításához használt módszereket. A festést tanúsított, engedélyezett laboratóriumban kell elvégezni, patológus/humángenetikus felügyelete mellett, aki felelős a festett tárgylemezek felülvizsgálatáért és a pozitív és negatív kontrollok megfelelőségének biztosításáért.
- A minták festése, különösen a jelintenzitás és a háttérfestés, függ a minta festést megelőző kezelésétől és feldolgozásától. A nem megfelelő fixálás, fagyasztás, felolvasztás, mosás, szárítás, melegítés, szeletelés vagy más mintákkal vagy folyadékokkal való szennyeződés artefaktumokat vagy hamis eredményeket eredményezhet. Az inkonzisztens eredmények a fixálási és beágyazási módszerek eltéréseiből, valamint a mintában rejlő szabálytalanságokból adódhatnak.
- A szonda csak a 3. fejezetben leírt lókuszkimutatására használható. "Reagensek".
- A teljesítményt a jelen használati utasításban leírt eljárásokkal validálták. Ezen eljárások módosítása megváltoztathatja a teljesítményt, és azt a felhasználónak kell hitelesítenie. Ez az IVD csak akkor rendelkezik CE tanúsítvánnyal, ha az ebben a használati utasításban leírtak szerint, a rendeltetészerű használat körében használják.

#### 8. Interferenciát kiváltó anyagok

A mintában lévő vörösvértestek autofluoreszcenciát mutathatnak, ami akadályozza a jelfelismerést.

A következő fixálószer nem kompatibilisek a FISH-vel:

- Bouin-fixáló
- B5 fixáló
- savas fixálók (pl. pikrinsav)
- Zenker-fixáló
- Alkohokok (önmagukban használva)
- Higany-klorid
- Formaldehid/cink fixáló
- Hollandé fixáló
- Nem puffereált formalin

#### 9. A minták előkészítése

Készítse elő a mintákat a [ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit](#) használati utasításában leírtak szerint.

#### 10. A készülék előkészítő kezelése

A termék használatra kész. Nincs szükség feloldásra, keverésre vagy hígításra. Használat előtt a szondát szobahőmérsékletre (18-25 °C) kell hozni, fénytől óvni kell. Az injekciós üveg felnyitása előtt vortexeléssel keverje össze, és rövid ideig forgassa le.

#### 11. Vizsgálati eljárás

##### A minta előkezelése

Végezze el a minta előkezelését (viaszmentesítés, proteolízis) a [ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit](#) használati utasítása szerint.

##### Denaturáció és hibridizáció

1. Pipettázzon 10 µl szondát minden előkezelt mintára.
2. Fedje le a mintákat egy 22 mm x 22 mm-es fedőlappal (kerülje el a beszorult buborékokat), és zárja le a fedőlapot.

A tömítéshez *gumicement* (pl. *Fixogum*) használatát javasoljuk.

3. Helyezze a tárgylemezeket forró lemezre vagy hibridizátorra, és denaturálja a mintákat 10 percig 75 °C-on.
4. Helyezze át a tárgylemezeket egy pára kamrába, és hibridizáljon egy éjszakán át 37 °C-on (pl. hibridizációs kemencében).

*Nagyon fontos, hogy a minták ne száradjanak ki a hibridizációs lépés során.*

##### Hibridizáció utáni

Végezze el a hibridizáció utáni feldolgozást (mosás, ellenfestés, fluoreszcens mikroszkópia) a [ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit](#) használati utasítása szerint.

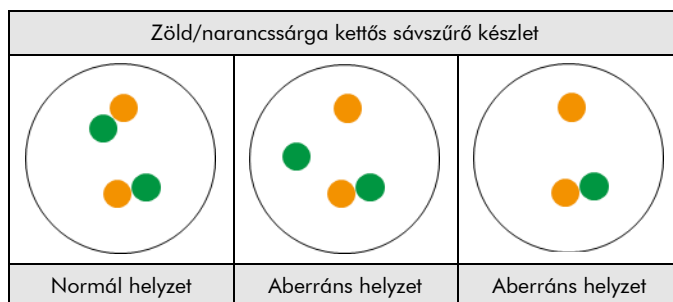
#### 12. Az eredmények értelmezése

Megfelelő szűrőkészletek használatával a próba hibridizációs jelei zöld színűek (a ALK töréspont régiótól proximálisan) és narancssárgák (a ALK töréspont régiótól distálisan).

**Normál jelrendszer:** A normál sejtek vagy a ALK génterületet érintő transzlokáció nélküli sejtek interfázisaiban két zöld/narancs fúziós jel jelenik meg (lásd a 2. ábrát).

**Rendellenes jelrendszer:** Egy transzlokáció által érintett ALK génterületet egy különálló zöld és egy különálló narancssárga jel jelez. Az 5'-ALK szekvenciák deléciójával járó EML4-ALK inverziót egy vagy több izolált narancssárga jel jelzi (lásd a 2. ábrát).

*Az egymást átfedő jelek sárga jelzésként jelenhetnek meg.*



## 2. ábra: Várható eredmények normális és rendellenes sejtmagok esetén

A kis deléciók, duplikációk vagy inverziók okozta genomiális aberrációk feltűnésmentes jelmintákat eredményezhetnek.

Egyes rendellenes mintákban a fent leírtaktól eltérő jelminták is megfigyelhetők. Ezeket a váratlan jelmintákat tovább kell vizsgálni.

### Kérjük, vegye figyelembe:

- A dekonzenzált kromatin miatt az egyes FISH-jelek kis jelhalmazokként jelenhetnek meg. Ezért két vagy három azonos méretű,  $\leq 1$  jelátmérővel elválasztott jelet egy jelnek kell tekinteni.
- Ne értékelje az egymást átfedő magokat.
- Ne számolja meg a túlságosan megemésztett sejtmagokat (a sejtmagok belsejében látható sötét területekről ismerhető fel).
- Ne számolja az erős autofluoreszcenciájú sejtmagokat, amelyek akadályozzák a jelfelismerést.
- A negatív vagy nem specifikus eredményt több tényező is okozhatja (lásd a 16. fejezet "Hibaelhárítás" című részét).
- Az eredmények helyes értelmezése érdekében a felhasználónak a nemzeti és/vagy nemzetközi irányelveknek megfelelően validálnia kell a terméket a diagnosztikai eljárásokban való felhasználás előtt.

## 13. Ajánlott minőségellenőrzési eljárások

A feldolgozott minták és a vizsgálati reagensek megfelelő teljesítményének ellenőrzése érdekében minden egyes vizsgálathoz belső és külső kontrollokat kell rendelni. Ha a belső és/vagy külső kontrollok nem mutatnak megfelelő festődést, a betegmintákkal kapott eredményeket érvénytelennek kell tekinteni.

**Belső ellenőrzés:** Nem neoplasztikus sejtek a mintán belül, amelyek normális jelmintázatot mutatnak, pl. fibroblasztok.

**Külső vezérlés:** Validált pozitív és negatív kontrollminták.

## 14. Teljesítményjellemzők

### 14.1 Analitikai teljesítmény

A teljesítményt a ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit használati utasítása szerint értékelték.

<b>Analitikai érzékenység:</b>	100% (95% CI 98.5 – 100.0)
<b>Analitikai specifikusság:</b>	100% (95% CI 97.0 – 100.0)

### 14.2 Klinikai teljesítmény

<b>Diagnosztikai érzékenység:</b>	92.86% (95% CI 71.30 – 99.90) vs. IHC
<b>Diagnosztikai specifikitás:</b>	100% (95% CI 71.30 – 99.90) vs. IHC

## 15. Eltávolítás

A reagensek ártalmatlanítását a helyi előírásoknak megfelelően kell elvégezni.

## 16. Hibaelhárítás

A kezelési utasításoktól való bármilyen eltérés rosszabb festési eredményhez vagy egyáltalán nem festéshez vezethet. További információkért kérjük, olvassa el a [www.zytovision.com/honlapot](http://www.zytovision.com/honlapot).

### Gyenge jelek vagy egyáltalán nincs jel

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Nem megfelelően rögzített sejt- vagy szövetminta	Optimalizálja a rögzítési időt és a fixálószeret, vagy alkalmazzon poszt-fixálási lépést a <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</u> kézikönyvének "Assay procedure" részében leírtak szerint.

Nem megfelelően végzett proteolitikus előkezelés	Optimalizálja a pepszin inkubációs idejét, szükség esetén növelje vagy csökkentse azt.
Szonda párologás	A hibridizáló használata esetén a nedves csíkok/vízzel töltött tartályok használata kötelező. Hibridizáló kemence használata esetén a páraakna használata kötelező. Ezenkívül a fedőlemezt teljesen le kell zárni, pl. Fixogummal, hogy megakadályozzuk a minta kiszáradását a hibridizáció során.
Nem megfelelő szűrőkészletek használata	Használjon a szonda fluorokrómjainak megfelelő szűrőkészleteket. <i>A háromszoros sávszűrő-készletek kevesebb fényt biztosítanak az egy- vagy kétsávszűrő-készletekhez képest. Következésképpen a jelek halványabbnak tűnhetnek e háromsávú szűrőkészletek használatával.</i>

### Kereszt hibridizációs jelek; zajos háttér

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Nem teljes viaszmentesítés	Használjon friss oldatokat; ellenőrizze a viaszmentesítés időtartamát.
Túl erős proteolitikus előkezelés	Csökkentse a pepszin inkubációs idejét
A tárgylemezeket hibridizáció előtt szobahőmérsékletre kell hűteni.	A tárgylemezeket gyorsan helyezze át 37 °C-ra

### Morfológia romlott

Lehetséges ok	Javasolt teendő
A sejt- vagy szövetmintát nem megfelelően rögzítették	Optimalizálja a rögzítési időt és a fixálószeret, vagy alkalmazzon poszt-fixálási lépést a <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</u> kézikönyvének "Assay procedure" részében leírtak szerint.
Nem megfelelően végzett proteolitikus előkezelés	Optimalizálja a pepszin inkubációs idejét, szükség esetén csökkentse azt.
Elégtelen szárítás a szonda felhelyezése előtt	A levegőn való szárítás idejének növelése

### Átfedő magok

Lehetséges ok	Javasolt teendő
A szöveti metszetek nem megfelelő vastagsága	Készítsünk 2-4 $\mu\text{m}$ -es mikrotomos metszeteket

### A minta lebeg a tárgylemezről

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Túl erős proteolitikus előkezelés	Csökkentse a pepszin inkubációs idejét

**Gyenge ellenfesték**

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Alacsony koncentrációjú DAPI-oldat	Használjon helyette <u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (Prod. No. MT-0008-0.8).
Túl rövid DAPI inkubációs idő	A DAPI inkubációs idő beállítása

**17. Irodalom**

- 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. Felülvizsgálat**

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

A legfrissebb használati utasításokat, valamint a különböző nyelvű használati utasításokat a [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com) oldalon találja.

Szakértőink készséggel válaszolnak kérdéseire.

Kérjük vegye fel velünk a kapcsolatot a [help@zytovision.com](mailto:help@zytovision.com) címen.

.

A biztonságról és a teljesítményről szóló összefoglalót lásd a következő oldalon [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com).



ZytoVision GmbH  
Fischkai 1  
27572 Bremerhaven/ Németország  
Telefon: +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)

**Védjegyek:**

A ZytoVision® és a ZytoLight® a ZytoVision GmbH védjegyei.