



ZytoLight

SPEC ALK/EML4 TriCheck Probe

REF	Z-2117-50	Σ	5 (0.05 ml)
REF	Z-2117-200	Σ	20 (0.2 ml)

Az ALK-EML4 génátrendező és kvalitatív kimutatása fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) módszerrel



In vitro diagnosztikai orvosi eszköz
a 98/79 / EK EU irányelv szerint

1. Javasolt alkalmazás

A ZytoLight SPEC ALK/EML4 TriCheck Probe (PL74) a humán 2p23.1-p23.3 kromoszóma régióban található ALK gén és a 2p21 kromoszóma régióban lokalizált EML4 gén átrendező és kvalitatív kimutatására szolgál fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) módszerrel formalinnal fixált, paraffinba ágyazott minták alkalmazására. A próbát a ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Kat. szám Z-2028-5/-20) készlet reagenssel kombinációban ajánlott használni.

Az eredmények értelmezését a beteg klinikai kórtörténetével összevetve kell elvégezni képzett patológus további klinikopatológiai véleményének figyelembe vételével.

2. Klinikai jelentőség

A próba alkalmazásával elkülöníthetők az EML4-ALK inverziók és transzlokációk, azoktól az ALK génátrendezőésektől, mint pl. az ALK-TFG vagy az ALK-KIF5B, amikben nem az EML4 szerepel partnereként. A 2-es kromoszóma rövid karjának inverziói [inv(2)(p21p23)] gyakran kimutathatók nem-kissejtes tüdő adenokarcinómában (NSCLC), s mindez az EML4-ALK fúziós transzkriptum kialakulásához vezet. Néhány tanulmány az EML4-ALK fúziós transzkriptum jelenlétét igazolta emlő, gyomor és kolorektális daganatokban is. Ezekben az inverziókban az ALK és EML4 lokuszok különböző töréspontjait igazolták. Vagyis az EML4-ALK transzkriptum számos variánsa ismert és mindegyik magában foglalja az ALK gén intracelluláris kináz doménjét. Az ALK kinázt célzó terápiák nagyon hatékony kezelési stratégiát jelentenek az EML4-ALK génátrendezőést hordozó NSCLC betegen. Ezáltal az EML4-ALK génátrendezőések fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) módszerrel történő specifikus kimutatása egy hasznos eszköz a diagnózisban és a megfelelő kezelés kiválasztásában az érintett betegcsoport számára.

3. Vizsgálati módszer

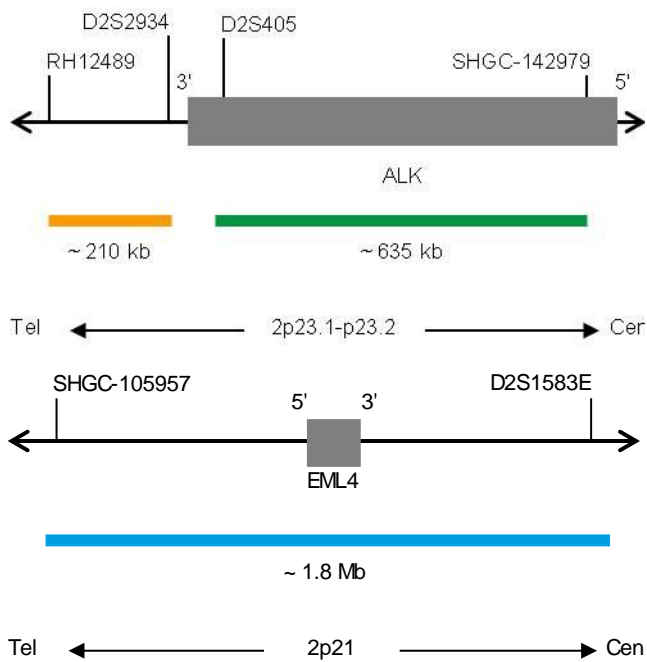
A fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) technika lehetővé teszi sejt preparátumok specifikus nukleinsav szekvenciáinak kimutatását és megjelenítését. A fluoreszcensen jelölt DNS fragmentumok, úgynevezett FISH próbák vagy szondák és azok komplementer cél-DNS szárai a készítményekben együttesen denaturálódnak, majd a hibridizálás során összekapcsolódnak. Ezután a nem specifikus és a nem kötődött próba darabok magas stringenciájú mosási lépésekkel kerülnek eltávolításra. A DNS DAPI háttérfestését követően a hibridizált szonda fragmentumok a közvetlenül rájuk kapcsolt specifikus fluorokrómmolekulák segítségével excitációs és emissziós szűrőkkel felszerelt fluoreszcens mikroszkóppal vizualizálhatók.

4. Mellékelt reagensok

The ZytoLight SPEC ALK/EML4 TriCheck Probe készlet tartalma:

- ZyGreen (gerjesztő hullámhossz 503 nm/kibocsátási hullámhossz 528 nm) zöld festékekkel megjelölt polinukleotidok (~10.0 ng/μl), amelyek cél szekvenciái az ALK gén töréspont régiójától proximálisan helyezkednek el a 2p23.1-p23.2* (chr2:29,460,144-30,095,822) kromoszóma régióban (lásd 1. ábra).
- ZyOrange (gerjesztő hullámhossz 547 nm/kibocsátási hullámhossz 572 nm) narancssárga festékekkel megjelölt polinukleotidok (~4.5 ng/μl), amelyek cél szekvenciái az ALK gén töréspont régiójától disztálisan helyezkednek el a 2p23.2* (chr2:29,174,204-29,383,335) kromoszóma régióban (lásd 1. ábra).
- ZyBlue (gerjesztő hullámhossz 418 nm/kibocsátási hullámhossz 467 nm) kék festékekkel megjelölt polinukleotidok (~37.0 ng/μl), amelyek cél szekvenciái az EML4 gén régióját magába foglaló 2p21* (chr2:41,573,525-43,349,624) kromoszóma régióban helyezkednek el (lásd 1. ábra).
- Formamid alapú hibridizációs puffer

*a Human Genome Assembly szerint GRCh37/hg19



1. ábra: Fent: SPEC ALK Próba térkép; Lent: SPEC EML4 Próba térkép (nem méretarányos)

A ZytoLight SPEC ALK/EML4 TriCheck Probe készlet két kiserelésben elérhető:

- Z-2117-50: 0.05 ml (5 reakció egyenként 10 μl térfogattal)
- Z-2117-200: 0.2 ml (20 reakció egyenként 10 μl térfogattal)

5. Szükséges, de nem biztosított anyagok

- ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Kat. szám Z-2028-5/-20)
- Pozitív és negatív kontrol minták
- Pozitívra töltött tárgylemezek
- Vízfürdő (37°C, 98°C)
- Hibridizációs kamra vagy fűtőblokk
- Hibridizációs pára kamra
- Szabályozható pipetták (10 µl, 25 µl)
- Festőedények vagy fürdők
- Időzítő
- Kalibrált hőmérő
- Etanol
- Xilol
- Deszillált vagy ionmentesített víz
- Fedőlemezek (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Gumicement pl., Fixogum Rubber Cement (Kat. szám. E-4005-50/-125) vagy hasonló ragasztó
- Megfelelően karbantartott fluoreszcens mikroszkóp (400-1000x)
- Fluoreszcens mikroszkópiához elfogadott immerziós olaj
- Megfelelő fluoreszcencia szűrő készletek

6. Tárolás és kezelés

Álló helyzetben 2-8°C között fénytől védve tárolandó. Erős fényt elkerülve használatos. Felhasználást követően azonnal a tárolási feltételek alkalmazandók. Ne használja a reagenseket a címkén feltüntetett lejáratú időn túl. A termék a címkén feltüntetett lejáratú ideig őrzi meg stabilitását megfelelően kezelés mellett.

7. Figyelmeztetések és óvintézkedések

- Használat előtt olvassa el a használati utasítást!
- Ne használja a reagenseket a lejáratú idő letelte után!
- Ez a termék olyan anyagokat tartalmaz (kis koncentrációban és térfogatban), amelyek az egészségre károsak és potenciálisan fertőzők. Kerülje a közvetlen érintkezést a reagensekkel. Tegyen megfelelő védőintézkedéseket (használjon eldobható kesztyűt, védőszemüveget és laboratóriumi öltözetet)!
- Ha a reagens bőrrel érintkezik, azonnal öblítse le bő vízzel!
- Foglalkozásszerű felhasználók részére igény esetén anyagbiztonsági adatlapot biztosítunk.
- A reagensek nem újra felhasználhatók.
- A minták keresztszennyeződését kerülni kell, mert ez hibás eredményhez vezethet.
- A próbát ne tegye ki fénynek, különösen hosszabb ideig tartó erős fénynek, azaz minden lépést, ha lehetséges, sötétben és/vagy fényálló tartókban hajtsa végre!

Veszélyek és óvintézkedések:

A legfőbb veszélyt jelentő összetevő a formamid.



Veszély

H351	Feltehetően rákot okoz.
H360FD	Károsíthatja a termékenységet. Károsíthatja a születendő gyermeket.
H373	Ismétlődő vagy hosszabb expozíció esetén károsíthatja a szerveket.
P201	Használat előtt ismerje meg az anyagra vonatkozó különleges utasításokat.
P202	Ne használja addig, amíg az összes biztonsági óvintézkedést el nem olvasta és meg nem értette.
P260	A por/füst/gáz/köd/gőzök/permet belélegzése tilos.
P280	Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő használata kötelező.
P308+P313	Expozíció vagy annak gyanúja esetén: orvosi ellátást kell kérni.
P405	Elzárva tárolandó.

8. Korlátozások

- *In vitro* diagnosztikai használatra.
- Csak szakképzett felhasználók részére.
- A pozitív reakció meglétének vagy hiányának klinikai értelmezését a klinikai kórtörténet, morfológia, egyéb hisztopatológiai kritériumok, valamint más diagnosztikai vizsgálatok függvényében végezze. A szakképzett patológus felelőssége a reakciók elkészítéséhez szükséges FISH szondák, reagensek, diagnosztikai panelek és módszerek megfelelő ismerete. A FISH festést egy hitelesített, szükséges engedéllyel rendelkező laboratóriumban kell végezni, patológus felügyelete mellett, aki felelős a festett lemezek áttekintéséért és a megfelelő pozitív és negatív kontrol reakciók biztosításáért.
- A minta festése, különösen a jelintenzitás és a háttérfestés erőssége a festést megelőző mintakezeléstől és feldolgozástól függ. A minta nem megfelelő fixálása, fagyasztása, felolvasztása, mosása, szárítása, melegítése, metszése vagy más mintákkal és folyadékokkal való keresztszennyezése műtermékek vagy hamis eredmények kialakulásához vezethet. Ellentmondó eredmények eredhetnek a minta rögzítési és beágyazási eltéréseiből, valamint magában a mintában rejlő egyenlőtlen feltételekből.
- A szondát csak a 4. "Mellékelt reagensek" fejezetben leírt lókuszkok kimutatásához szabad használni.
- A reagens teljesítménye a jelen használati utasításban leírt eljárások alkalmazásával került validálásra. Ezen eljárások módosítása a teljesítmény megváltozását okozhatja, amit a felhasználónak validálnia szükséges.

9. Interferenciát kiváltó anyagok

A mintában jelen lévő vörösvértestek autofluoreszcenciát mutathatnak akadályozva a megfelelő jelfelismerést.

Az alábbi fixálószerke nem alkalmazhatóak FISH reakcióhoz:

- Bouin fixáló
- B5 fixáló
- Savas fixálószerke (pl. pikrinsav)
- Zenker fixáló
- Alkohokok (önmagukban használva)
- Higanyklorid
- Formaldehid/cink fixáló
- Hollande fixáló
- Nem pufferolt formalin

10. A minták előkészítése

Ajánlások:

- Fixálja a mintát 10%-os semlegesre pufferelt formalinban 24 órán át szobahőmérsékleten (18-25°C-on).
- A minta mérete ≤ 0.5 cm³ legyen.
- Prémium minőségű paraffint használjon.
- A beágyazást 65°C alatti hőmérsékleten hajtsa végre.
- 2-4 µm vastagságú metszeteket készítsen.
- Pozitívan töltött tárgylemezeket használjon.
- Fixálja a metszetet a lemezre 2-16 órán át 50-60°C-os hőmérsékleten.

11. A reagens előkészítése

A termék azonnal felhasználható (RTU). Nem szükséges feloldani, átkeverni vagy tovább hígítani. Használat előtt hozza szobahőmérsékletre (18-25°C) fénytől védve. Mielőtt kinyitná a próbát tartalmazó fiolát vortexeléssel keverje össze és rövid ideig centrifugálja.

12. A vizsgálati eljárás

A minta előkezelése

A minta előkezelését (paraffin-mentesítés, proteolitikus emésztés) a ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit készlet használati utasításának megfelelően végezze.

Denaturáció és hibridizáció

- Pipettázzon 10 µl próbát az előkezelt minták megfelelő területeire.
- Helyezzen fel egy 22 mm x 22 mm-es üveg fedőlemezt a próbakeverékre (akadályozza meg a légbuborékok képződését) és tömítéssel zárja le a fedőlemezt.

Javasoljuk, hogy gumicementet (pl. Fixogum-ot) használjon a tömítéshez.

- Helyezze be a tárgylemezeket fűtőblokkba vagy hibridizációs kamrába és denaturálja a mintákat 75°C-on 10 percen át.
- Helyezze a tárgylemezeket hibridizációs páramutatóba és a hibridizációhoz inkubálja őket 37°C-on egy éjszakán át.

Lényeges, hogy a minták ne száradjanak ki a hibridizációs lépés folyamán.

Poszt-hibridizáció

Végezzen poszt-hibridizációs eljárást (mosást, háttérfestést és fluoreszcens mikroszkópos értékelést) a ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit készlet használati utasításának megfelelően.

13. Az eredmények kiértékelése

Megfelelő fluoreszcencia szűrő készletek használatával a próbák hibridizációs jelei zöld (az ALK gén töréspontjától proximálisan eső régió), narancssárga (az ALK gén töréspontjától disztálisan eső régió) és kék (EML4 gén régió) színűnek látszódnak.

Normál jelrendszer: Normál sejtek EML4-ALK génátrendezés nélküli, interfázisos sejtmagjaiban két narancssárga/zöld színű fúziós jel és két kék jel látható (lásd 2. ábra).

Rendellenes jelrendszer: Az EML4-ALK inverzió meglétét egy egymástól elkülönült zöld és narancssárga, valamint egy-egy addicionális kék jel mutatja. Ebben az esetben az elkülönült zöld és narancssárga jelekhez ko-lokalizált kék jelek tartoznak. Az ALK transzlokált, de nem EML4 érintett esetekben az elkülönült narancs és zöld jelekhez nem tartozik addicionális kék jel. Az 5'-ALK szekvencia deléciójával bíró EML4-ALK inverziót az egyik zöld jel vesztése és a különálló narancssárga jel addicionális kék jellel való ko-lokalizációja mutatja. (lásd 2. ábra).

Az egymással átfedő jelek citromsárgának tűnhetnek.

	Zöld/Narancs Kettős Sávú Szűrő Készlet	Kék Egyes Sávú Szűrő Készlet	Összevont Kép vagy Hármas Sávú Szűrő Készlet
Normál sejtek			
EML4 – ALK inverzió			
ALK transzlokáció – EML4 érintettség nélkül			
EML4 – ALK inverzió 5' ALK szekvencia delécióval			

2. ábra: Várt eredmények normál és rendellenes sejtmagok esetén

Néhány abnormális mintában a fent leírt két típustól eltérő jelmintázat-eloszlás figyelhető meg, mely egyéb variáns génátrendezésre utal. Ezen nem várt szignál mintázatok további vizsgálatokat igényelhetnek.

Kérjük, vegye figyelembe:

- A dekonzenzált kromatinszerkezet következtében egyes FISH jelek kis szignál klaszterekként jelentkezhetnek. Így kettő vagy három egyforma méretű szignál egymástól ≤ 1 szignál átmérő távolsággal elválasztva egy szignálnak számolandó.

- Ne értékeljen egymással átfedésben levő sejtmagokat.
- Ne számolja a túlemésztett sejtmagokat (amelyek a sejttagon belüli sötét területek alapján ismerhetők fel).
- Ne számolja az erős autofluoreszcenciával rendelkező sejtmagokat, ami a jelek felismerését gátolhatja.
- Negatív vagy nem specifikus eredményt számos tényező kiválthat (lásd a 17. fejezetet).
- Az eredmények helyes interpretálása érdekében a terméket a diagnosztikai eljárásokban történő felhasználás előtt a felhasználónak validálnia kell a nemzeti és/vagy nemzetközi iránymutatások szerint.

14. Ajánlott minőségellenőrzési eljárások

A feldolgozott minták és a vizsgálati reagensek pontos hatékonyságának felmérése érdekében minden vizsgálathoz belső és külső kontrol festéseket kell végezni. Amennyiben a belső és/vagy külső pozitív kontrol reakciók nem mutatnak megfelelő festődést, akkor a beteg vizsgált mintájának eredményét érvénytelennek kell tekinteni.

Belső kontrol: Az elemzett mintában lévő nem neoplasztikus sejtek (pl. fibroblasztok) normál szignál mintázatot mutatnak.

Külső kontrol: Validált pozitív és negatív kontrol minták.

15. Teljesítményjellemzők

Pontosság: A próba hibridizációjának helyét normál férfi kariotípusú minták metafázis készítményein határozták meg. Minden vizsgált mintában a próba kizárólag a várt lókuszhoz hibridizálódott. Nem figyeltek meg további jeleket vagy kereszthibridizációt. Így a pontosság 100%-nak számítható.

Analitikai érzékenység: Az analitikai érzékenység meghatározásához a próba működését normál férfi kariotípusú minták metafázis készítményein határozták meg. Valamennyi sejtmag a várt normális jelmintázatot mutatta az összes vizsgált mintában. Ezért az analitikai érzékenységet 100%-osnak becsülték.

Analitikai specifikitás: Az analitikai specifikitás meghatározásához a próba működését normál férfi kariotípusú minták metafázis készítményein határozták meg. Minden vizsgált mintában a próbák csak a várt cél lókuszhoz hibridizálódtak, más lókuszhoz nem kötődtek. Ezért az analitikai specifikitás 100%-nak számítható.

16. Hulladékkezelés

A reagensek hulladékként történő elhelyezését az országos szabályozásokkal összhangban kell elvégezni.

17. Hibaelhárítás

A használati utasítástól való bármilyen eltérés gyengébb vagy akár teljesen negatív festési eredményekhez vezethet.

Gyenge jel vagy nincs jel

Valószínűsíthető ok	Javasolt teendő
A célszekvencia nem kimutatható	Használjon megfelelő kontrolokat
A sejt- vagy szövetminta nem megfelelően fixálódott	Optimalizálja a fixálás idejét és a fixálószeret vagy alkalmazzon utófixálási lépést a <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</u> kézikönyvének "vizsgálati eljárásában" leírtak szerint
A melegítés előkezelt, az emésztési, a denaturációs, a hibridizációs vagy a magas stringenciájú mosás hőmérséklete nem megfelelő	Kalibrált hőmérővel ellenőrizze a használt műszaki berendezések hőmérsékletét
Nem megfelelő proteolitikus előkezelés	Optimalizálja a pepszines emésztés inkubációs idejét, szükség esetén növelje vagy csökkentse azt

A próbakeverék párolgása	Hibridizációs pára kamra használata esetén a nedvesített csíkok/vízrel töltött tartályok használata kötelező. Hibridizációs fűtőblokk használata esetén gondoskodjon megfelelő páratartalomról. Ezenkívül a fedőlemezt teljesen le kell zárni, például Fixogum ragasztóval, a minta kiszáradását a hibridizáció során elkerülendő
A magas stringenciájú mosópuffer koncentrációja túl alacsony	Ellenőrizze a magas stringenciájú mosópuffer koncentrációját
Régi dehidratáló oldatok	Készítsen friss dehidratáló oldatokat
A fluoreszcens mikroszkóp nem működik megfelelően	Ellenőrizze a mikroszkópot
Nem megfelelő szűrőkészletet használ	Használjon a fluorokrómoknak megfelelő szűrőkészleteket. <i>A hármas szűrő szett készletek kevesebb fényt biztosítanak, mint a mono- vagy kettős szűrők. Ennek következtében a jelek a hármas szűrő szett készlet használatával gyengébbek lehetnek</i>
A próbák/fluorokrómok fény által károsodhattak	A hibridizációt és a mosási lépéseket sötétben végezze

Keresztreakáló fluoreszcens jelek; magas háttérzaj

Valószínűsíthető ok	Javasolt teendő
A paraffin-mentesítés nem megfelelő	Használjon friss oldatokat; ellenőrizze a paraffin-mentesítés időtartamát
Túl erős proteolitikus előkezelés	Csökkentse a pepszines inkubáció idejét
Túlságosan nagy a próba mennyisége az adott területre	Csökkentse a próba mennyiségét a hibridizációs terület arányához mérten, cseppenként ossza szét a próbát elkerülve a túlkonzentrálódást
A tárgylemezek szobahőmérsékletűre hűltek a hibridizációt megelőzőleg	Tegye a tárgylemezeket mielőbb 37°C-ra
A magas stringenciájú mosópuffer koncentrációja túl magas	Ellenőrizze a magas stringenciájú mosópuffer koncentrációját
A hibridizációt követő mosási lépés hőmérséklete túl alacsony	Ellenőrizze a hőmérsékletet; szükség esetén emelje azt
A minták kiszáradnak az egyes inkubációs lépések között	A fedőlemezek leragasztásával akadályozza meg a kiszáradást és az inkubációt nedvesített körülmények között végezze

Károsodott szöveti morfológia

Valószínűsíthető ok	Javasolt teendő
A sejt- vagy szövetszövetminta nem megfelelően fixálódott	Optimalizálja a fixálás idejét és a fixálószerrel vagy alkalmazzon utófixálási lépést a ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit kézikönyvének "vizsgálati eljárásában" leírtak szerint
Nem megfelelő proteolitikus előkezelés	Optimalizálja a pepszines emésztés inkubációs idejét, szükség esetén növelje vagy csökkentse azt
A minta elégtelen száradása a próba alkalmazása előtt	Növelje a levegőn történő száradás idejét

Átfedő sejtmagok

Valószínűsíthető ok	Javasolt teendő
A metszetek vastagsága nem megfelelő	Készítsen 2-4 µm vastagságú metszeteket

A metszet leúszik a tárgylemezről

Valószínűsíthető ok	Javasolt teendő
A tárgylemez bevonata nem megfelelő	Használjon megfelelő tárgylemezeket
Túl erős proteolitikus előkezelés	Csökkentse a pepszines emésztés inkubációs idejét

Gyenge háttérfestés

Valószínűsíthető ok	Javasolt teendő
Alacsony koncentrációjú DAPI oldat	Használja a DAPI/DuraTect-Solution (ultra) (Kat.szám MT-0008-0.8) terméket
A DAPI festés inkubációs ideje túl rövid	Állítsa be megfelelően a DAPI festés inkubációs idejét

18. Hivatkozások

- Inamura K, et al. (2009) *Mod Pathol* 22: 508-15.
- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Koivunen JP, et al. (2008) *Clin Cancer Res* 14: 4275-83.
- Lawce HJ & Olson S (2013) *J Assoc Genet Technol* 39: 66-71.
- Martelli MP, et al. (2009) *Am J Pathol* 174: 661-70.
- Perner S, et al. (2008) *Neoplasia* 10: 298-302.
- Preusser M, et al. (2013) *Lung Cancer* 80: 278-83.
- Rodig SJ, et al. (2009) *Clin Cancer Res* 15: 5216-23.
- Sasaki T, et al. (2010) *Eur J Cancer* 46: 1773-80.
- Schildgen V, et al. (2012) *Per Med* 9: 801-3.
- Schildhaus HU, et al. (2013) *Mod Pathol* 26: 1468-77.
- Schoppmann SF, et al. (2013) *Eur J Cancer* 49: 1876-81.
- Thunnissen E, et al. (2012) *Virchows Arch* 461: 245-57.
- Von Laffert M, et al. (2013) *Lung Cancer* 81: 200-6.
- Wilkinson DG: *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.

Szakembereink készséggel válaszolnak kérdéseikre.

Vegye fel velünk a kapcsolatot a helptech@zytovision.com címen.



ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/ Németország
Phone: +49 471 4832-300
Fax: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
Email: info@zytovision.com

Védjegy:

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