



ZytoLight

SPEC ERBB2/D17S122 Dual Color Probe

| | | | |
|-----|------------|---|-------------|
| REF | Z-2190-50 | Σ | 5 (0.05 ml) |
| REF | Z-2190-200 | Σ | 20 (0.2 ml) |

A humán ERBB2 génamplifikáció és a D17S122 lókuszt 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 ERBB2/D17S122 Dual Color Probe (PL148) a humán ERBB2 génamplifikáció és a D17S122 lókuszt 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

Az ERBB2 gén (a.k.a. HER2 and NEU) a 17q12 kromoszóma régióban helyezkedik el és a 185-190 kDa molekulatömegű, celluláris növekedési faktor receptor p185 transzmembrán glikoproteint kódolja. A p185 fehérje az RTK (receptor tirozin kináz) szupercsalád EGFR (epidermális növekedési faktor receptor) alcsoportjába tartozik az EGFR1 (ERBB1, HER1), az ERBB3 (HER3) és ERBB4 (HER4) fehérjékkel együttvéve. Az emlő daganatok mintegy 20%-ában leírt ERBB2 proto-onkogén amplifikáció a betegség rossz prognózisával hozható összefüggésbe. Hasonló eredmények igazolhatók egyéb malignus daganatok, mint pl. petefészek tumorok, gyomor tumorok és nyálmirigy karcinómák esetében. A 17-es kromoszóma alfa-szatellita centromer régiót célzó fluoreszcens *in situ* hibridizáció bizonyos esetekben félrevezető lehet a régióban kialakult lehetséges nyérések vagy vesztesékek következtében. Ezekben az ASCO irányelvei szerint bizonytalannak tekintett esetekben reflexeszt elvégzése ajánlott a SPEC ERBB2/D17S122 Dual Color Probe felhasználásával.

3. Vizsgálati módszer

A fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) technika lehetővé teszi sejt preparátumok specifikus nukleinsav szekvenciáinak kimutatását és megjelenítését. A fluoreszcensen jelölt DNS fragmensek, úgynevezett FISH próbák vagy szondák és azok komplementer cél-DNS szárai a készítményekben együttesen denaturálódnak, majd a hibridizálás során

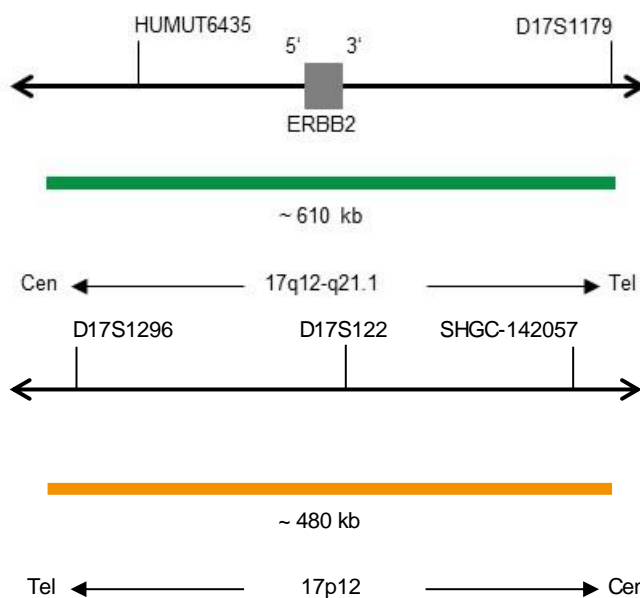
összekapcsolódnak. Ezután a nem specifikus és a nem kötődött próba darabok magas stringenciájú mosási lépésekkel kerülnek eltávolításra. A DNS DAPI háttérfestését követően a hibridizált szonda fragmentumok a közvetlenül rájuk kapcsolt specifikus fluorokrom molekulák segítségével excitációs és emissziós szűrőkkel felszerelt fluoreszcens mikroszkóppal vizualizálhatók.

4. Mellékelt reagenszek

A ZytoLight SPEC ERBB2/D17S122 Dual Color Probe készlet tartalma:

- ZyGreen (gerjesztő hullámhossz 503 nm/kibocsátási hullámhossz 528 nm) zöld festékekkel megjelölt polinukleotidok (~10.0 ng/μl), amelyek cél szekvenciái az ERBB2 gén régióját magába foglaló 17q12-q21.1* (chr17:37,572,531-38,181,308) kromoszóma régióban helyezkednek el (lásd 1. ábra).
- ZyOrange (gerjesztő hullámhossz 547 nm/kibocsátási hullámhossz 572 nm) narancssárga festékekkel megjelölt polinukleotidok (~4.5 ng/μl), amelyek cél szekvenciái a D17S122 lókuszt magába foglaló 17p12* (chr17:14,954,785-15,434,017) kromoszóma régióban helyezkednek el (lásd 1. ábra).
- Formamid alapú hibridizációs puffer

*a Human Genome Assembly szerint GRCh37/hg19



1. ábra: Fent: SPEC ERBB2 Próba térkép; Lent: SPEC D17S122 Próba térkép (nem méretarányos)

A ZytoLight SPEC ERBB2/D17S122 Dual Color Probe készlet két kiszerezésben elérhető:

- Z-2190-50: 0.05 ml (5 reakció egyenként 10 μl térfogattal)
- Z-2190-200: 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 párakamra
- Szabályozható pipetták (10 μl, 25 μl)
- Festőedények vagy fürdők
- Időzítő
- Kalibrált hőmérő
- Etanol
- Xilol
- Desztillált 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 lejárati időn túl. A termék a címkén feltüntetett lejárati ideig őrzi meg stabilitását megfelelően kezelés mellett.

7. Figyelmeztetések és óvintézkedések

- Használat előtt olvassa el a használati utasítást!
- Ne használja a reagenseket a lejárati 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 reagens nem újra felhasználható.
- 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 hajtson 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 engedélyekkel 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 fixálószerek nem alkalmazhatóak FISH reakcióhoz:

- Bouin fixáló
- B5 fixáló
- Savas fixálószerek (pl. pikrinsav)
- Zenker fixáló
- Alkohokok (önmagukban használva)
- Híganyklorid
- 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 $\leq 0.5 \text{ cm}^3$ 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 fiólat 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

1. Pipetázzon 10 μl próbát az előkezelt minták megfelelő területére.
 2. 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.*
3. Helyezze be a tárgylemezeket fűtőblokkba vagy hibridizációs kamrába és denaturálja a mintákat 75°C-on 10 percen át.
 4. Helyezze a tárgylemezeket hibridizációs páramrába 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.

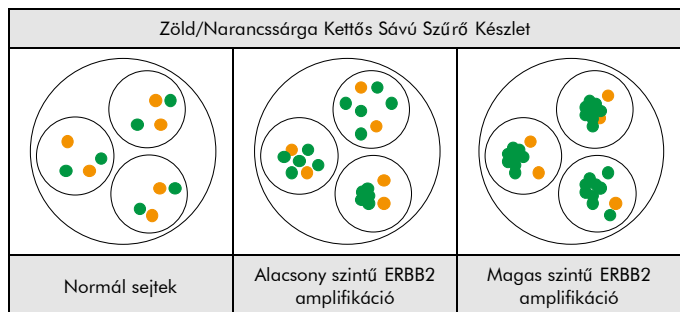
13. Az eredmények kiértékelése

Megfelelő fluoreszcencia szűrő készletek használatával a próbák hibridizációs jelei zöld (ERBB2 gén régió) és narancssárga (D17S122 lókus) színűnek látszódnak.

Normál jelrendszer: Normál sejtek interfázisos sejtmagjaiban vagy ERBB2 gén régió amplifikáció nélküli sejtekben két zöld jel és két narancssárga színű jel látható (lásd 2. ábra).

Rendellenes jelrendszer: Az ERBB2 gén régió amplifikációjával rendelkező sejtekben megnövekedett számú zöld jel vagy zöld jel klaszter figyelhető meg (lásd 2. ábra).

Az egymással átfedő jelek citromsárgának tűnhetnek.



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 géntrendeződésre utal. Ezen nem várt szignál mintázatok további vizsgálatokat igényelhetnek.

Kérjük, vegye figyelembe:

- A dekoncentrált kromatinszerkezet következtében egyes FISH jelek kis szignál klaszterekként jelentkezhetnek. Így kettő vagy három egyforma méretű szignál egymástól ≤ 1 szignál átmérő távolsággal elválva 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 lókusokhoz 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 specificitás: Az analitikai specificitás meghatározásához a próba működését normál férfi kariotípusú minták metafázis készítményein határozták meg. Minden vizsgált mintában a próbák csak a várt cél lókusokhoz hibridizálódtak, más lókusokhoz nem kötődtek. Ezért az analitikai specificitás 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 fixálószerrel vagy alkalmazzon utófixálási lépést a <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</u> kézikönyvének "vizsgálati eljárásában" leírtak szerint |
| A melegítés előkezelési, 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 fedőlemez 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 szűrő k. 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 |

Keresztreagáló 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 <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</u> 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 <u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (Kat.szám MT-0008-0.8) terméket |
| A DAPI festés inkubációs ideje túl rövid | Állítsa be megfelelően a DAPI festés inkubációs idejét |

18. Hivatkozások

- Baselga J, et al. (1999) *Semin Oncol* 26: 78-83.
- Brunello E, et al. (2012) *Histopathology* 60: 482-8.
- Brunner K, et al. (2010) *Anal Quant Cytol Histol* 32: 78-89.
- Coussens L, et al. (1985) *Science* 230: 1132-9.
- Ethel T, et al. (2012) *Br J Cancer* 106: 719-26.
- Hwang CC, et al. (2011) *Histopathology* 59: 984-92.
- Hynes NE & Stern DF (1994) *Biochim Biophys Acta* 1198: 165-84.
- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Moelans CB, et al. (2011) *Crit Rev Oncol Hematol* 80: 380-92.
- Park JB, et al. (1989) *Cancer Res* 49: 6605-9.
- Popescu NC, et al. (1989) *Genomics* 4: 362-6.
- Sassen A, et al. (2008) *Breast Cancer Res* 10: R2.
- Slamon DJ, et al. (1987) *Science* 235: 177-82.
- Voutsas IF, et al. (2013) *Int J Radiat Biol* 89: 319-25.
- Wilkinson DG: *In Situ Hybridization, A Practical Approach, Oxford University Press* (1992) ISBN 0 19 963327 4.
- Wolff AC, et al. (2013) *J Clin Oncol* 31: 3997-4013.

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.