



**ZytoLight**

## **SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe**

**REF** Z-2015-50  $\Sigma$  5 (0,05 ml)

**REF** Z-2015-200  $\Sigma$  20 (0,2 ml)

За качествено откриване на ампликации на човешкия ген ERBB2 и алфа сателити на хромозома 17 чрез флуоресцентна *in situ* хибридизация (FISH)

4250380P038QW



Ин витро диагностично медицинско устройство  
в съответствие с IVDR (ЕС) 2017/746

### 1. Предвидена цел

Двучетната сонда ZytoLight SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe (PL8) е предназначена за качествено откриване на ампликации, включващи човешкия ген ERBB2, както и за откриване на алфа сателити на хромозома 17 във формалин-фиксиранни, включени в парафин проби, като рак на гърдата и рак на стомаха/гастроезофагеалната връзка, чрез флуоресцентна *in situ* хибридизация (FISH). Сондата е предназначена да се използва в комбинация с ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Prod. No Z-2028-5/-20).

Продуктът е предназначен само за професионална употреба. Всички тестове, при които се използва продуктът, трябва да се извършват в сертифицирана, лицензирана патологоанатомична лаборатория, под наблюдението на патолог/генетик квалифициран за съответната дейност.

Сондата е предназначена да се използва като помощно средство при диференциалната диагноза на рак на гърдата и рак на стомаха/гастроезофагеалната връзка и не трябва да се предприемат терапевтични мерки само въз основа на резултата от теста.

### 2. Принцип на изпитване

Техниката на флуоресцентната *in situ* хибридизация (FISH) позволява откриването и визуализирането на специфични последователности на нуклеинови киселини в клетъчни препарати. Флуоресцентно маркираните ДНК фрагменти, т.нар. сонди за FISH, и техните комплементарни целеви ДНК вериги в препаратите се ко-денатурират и впоследствие се оставят да се нагряват по време на хибридизацията. След това неспецифичните и несвързани фрагменти на сондата се отстраняват чрез стриктно измиване. След контраоцветяване на ДНК с DAPI хибридизирани фрагменти на сондата се визуализират с помощта на флуоресцентен микроскоп, оборудван с възбуждащи и емисионни филтри, специфични за флуорохромите, с които са маркирани директно фрагментите на FISH сондата.

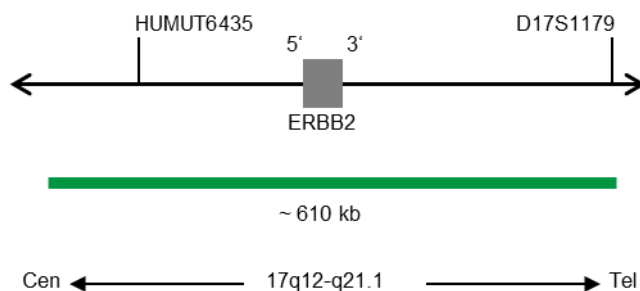
### 3. Предоставени реактиви

Светлината ZytoLight SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe се състои от:

- ZyGreen (възбуждане 503 nm/излъчване 528 nm) маркирани полинуклеотиди (~10,0 ng/μl), които са насочени към последователности, картографираны в 17q12-q21.1\* (chr17:37,572,531-38,181,308), в които се намира областта на гена ERBB2 (вж. фиг. 1).
- ZyOrange (възбуждане 547 nm/излъчване 572 nm) маркирани полинуклеотиди (~1,5 ng/μl), които са насочени към последователности, картографираны в 17p11.1-q11.1, специфични за алфа сателитната центромерна област D17Z1 на хромозома 17 (вж. фиг. 1).

- Хибридационен буфер на базата на формамид

\*според събирането на човешкия геном GRCh37/hg19



Фигура 1: SPEC ERBB2 Карта на сондата (без мащаб)

Светлината ZytoLight SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe се предлага в два размера:

- Z-2015-50: 0,05 ml (5 реакции от по 10 μl всяка)
- Z-2015-200: 0,2 ml (20 реакции от по 10 μl всяка)

### 4. Необходими материали, които не са осигурени

- ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Prod. No Z-2028-5/-20)
- Положителни и отрицателни контролни образци
- Микроскопски стъкла, положително заредени
- Водна баня (37 °C, 98 °C)
- Хибризатор или гореща плоча
- Хибризатор или камера за влажност в пещта за хибридизация
- Регулируеми пипети (10 μl, 25 μl)
- Оцветяване на буркани или вани
- Таймер
- Калибриран термометър
- Етанол или реактивен алкохол
- Ксилол
- Дейонизирана или дестилирана вода
- Покривни стъкла (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Каучуков цимент, напр. Fixogum Rubber Cement (Prod. No. E-4005-50/-125) или подобен
- Подходящо поддържан флуоресцентен микроскоп (400-1000x)
- Масло за потапяне, одобрено за флуоресцентна микроскопия
- Подходящи филтърни комплекти

### 5. Съхранение и обработка

Съхранявайте при температура 2-8 °C в изправено положение, защитено от светлина. Използвайте на защитено от светлина място. Върнете в условията на съхранение веднага след употреба. Не използвайте реагентите след изтичане на срока на годност, посочен на етикета. Продуктът е стабилен до датата на изтичане на срока на годност, посочена на етикета, когато се третира по подходящ начин.

## 6. Предупреждения и предпазни мерки

- Прочетете инструкциите за употреба преди да ги използвате!
- Не използвайте реагентите след изтичане на срока на годност!
- Този продукт съдържа вещества (в ниски концентрации и обеми), които са вредни за здравето и потенциално инфекциозни. Избягвайте всякакъв пряк контакт с реактивите. Вземете подходящи мерки за защита (използвайте ръкавици за еднократна употреба, защитни очила и лабораторно облекло)!
- Докладвайте за всеки сериозен инцидент, възникнал във връзка с продукта, на производителя и на компетентния орган съгласно местните разпоредби!
- Ако реагентите попаднат върху кожата, незабавно я изплакнете с голямо количество вода!
- При поискване за професионалния потребител се предоставя информационен лист за безопасност на материала.
- Не използвайте повторно реагентите, освен ако повторната употреба не е изрично разрешена!
- Избягвайте кръстосано замърсяване на пробите, тъй като това може да доведе до грешни резултати.
- Сондата не трябва да се излага на светлина, особено на силна светлина, за по-дълъг период от време, т.е. всички стъпки трябва да се извършват, когато е възможно, на тъмно и/или с помощта на светлоустойчиви съдове.

### Предупреждения за опасност и предпазни мерки:

Компонентът, определящ опасността, е формамид.



#### Опасност

H351	Подозира се, че причинява рак.
H360FD	Може да увреди плодovitостта. Може да увреди нероденото дете.
H373	Може да причини увреждане на органите при продължителна или многократна експозиция.
P201	Получете специални инструкции преди употреба.
P202	Не боравете с него, докато не прочетете и не разберете всички предпазни мерки за безопасност.
P260	Не вдишвайте прах/дим/газ/мъгла/изпарения/разпръскване.
P280	Носете защитни ръкавици/защитно облекло/защита на очите/защита на лицето.
P308+P313	Ако е изложен на риск или е засегнат: Потърсете медицинска помощ/внимание.
P405	Магазинът е заключен.

## 7. Ограничения

- За *in vitro* диагностична употреба.
- Само за професионална употреба.
- Само за неавтоматизирана употреба.
- Клиничната интерпретация на всяко положително оцветяване или липсата на такова трябва да се направи в контекста на клиничната анамнеза, морфологията, други хистопатологични критерии, както и други диагностични тестове. Патолог/генетик квалифициран за съответната дейност е длъжен да познава FISH сондите, реагентите, диагностичните панели и методите, използвани за получаване на оцветения препарат. Оцветяването трябва да се извършва в сертифицирана, лицензирана лаборатория под надзора на патолог/генетик квалифициран за съответната дейност е, който отговаря за прегледа на оцветените препарати и за осигуряване на адекватността на положителните и отрицателните контроли.

- Оцветяването на образеца, особено интензивността на сигнала и фоновото оцветяване, зависи от обработката на образеца преди оцветяването. Неправилното фиксиране, замразяване, размразяване, измиване, сушене, нагряване, рязане или замърсяване с други проби или течности може да доведе до артефакти или фалшиви резултати. Несъответстващите резултати могат да се дължат на разлики в методите на фиксиране и вграждане, както и на присъщи на образеца нередности.
- Сондата трябва да се използва само за откриване на локуси, описани в глава 3. "Предоставени реактиви".
- Изпълнението е валидирано с помощта на процедурите, описани в тези инструкции за употреба. Модификациите на тези процедури могат да променят характеристиките и трябва да бъдат потвърдени от потребителя. Този IVD е сертифициран като CE само когато се използва, както е описано в тази инструкция за употреба в рамките на предвидената употреба.

## 8. Пречещи вещества

Присъстващите в пробата червени кръвни клетки могат да проявят автофлуоресценция, която пречи на разпознаването на сигнала.

Следните фиксатори са несъвместими с FISH:

- Фиксатив на Bouin
- Фиксатор B5
- Киселинни фиксатори (напр. пикринова киселина)
- Фиксатив на Zenker
- Алкохоли (когато се използват самостоятелно)
- Живачен хлорид
- Формалдехид/цинков фиксатор
- Фиксаторът на Оланд
- Небуфериран формалин

## 9. Подготовка на образци

Подгответе образците, както е описано в инструкциите за употреба на [ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit](#).

## 10. Подготвителна обработка на устройството

Продуктът е готов за употреба. Не се изисква възстановяване, смесване или разреждане. Преди употреба поставете сондата на стайна температура (18-25 °C), защитете я от светлина. Преди да отворите флакона, разбъркайте с вортекс и завъртете за кратко.

## 11. Процедура за анализ

### Предварителна обработка на пробите

Извършете предварителна обработка на пробите (обезпаразитяване, протеолиза) съгласно инструкциите за употреба на [ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit](#).

### Денатурация и хибридизация

1. Нанесете с пипета 10 µl от сондата върху всеки предварително обработен образец.
  2. Покрийте образците с покривно стъкло с размери 22 mm x 22 mm (избягвайте образуването на мехурчета) и запечатайте покривното стъкло.
- Препоръчваме ви да използвате гумен цимент (напр. *Fixogum*) за уплътняване.
3. Поставете предметни стъкла върху гореща плоча или хибридизатор и денатурирайте образците за 10 минути при 75 °C.
  4. Преместете предметни стъкла в камера за влажност и хибридизирайте за една нощ при 37 °C (напр. в пещ за хибридизация).

Важно е образците да не изсъхват по време на хибридизацията.

### След хибридизацията

Извършете обработката след хибридизацията (измиване, контраоцветяване, флуоресцентна микроскопия) съгласно инструкциите за употреба на [ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit](#).

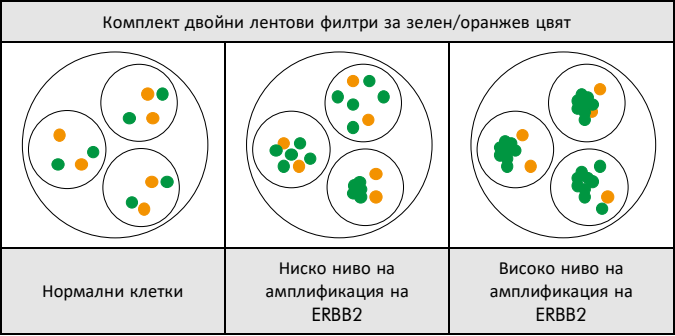
12. Тълкуване на резултатите

При използване на подходящи филтърни комплекти хибридизационните сигнали на сондата изглеждат зелени (област на гена ERBB2) и оранжеви (CEN 17).

**Нормална ситуация:** В интерфазите на нормални клетки или клетки без амплификация, включваща областта на гена ERBB2, се появяват два зелени и два оранжеви сигнала. (вж. фиг. 2).

**Необичайна ситуация:** клетките с амплификация на областта на гена ERBB2 се наблюдава увеличен брой зелени сигнали или клъстери от зелени сигнали (вж. фигура 2).

Припокриващите се сигнали могат да се появят като жълти сигнали.



Фиг. 2: Очаквани резултати при нормални и аберантни ядра

В някои необичайни проби могат да се наблюдават други модели на сигнали, различни от описаните по-горе. Тези неочаквани сигнални модели трябва да бъдат допълнително изследвани.

Моля, обърнете внимание:

- Поради декондензирания хроматин единичните FISH сигнали могат да се появят като малки сигнални клъстери. Следователно два или три сигнала с еднакъв размер, разделени на разстояние  $\leq 1$  диаметър на сигнала, трябва да се считат за един сигнал.
- Не оценявайте припокриващи се ядра.
- Не бройте прекалено разградените ядра (разпознава се по тъмните области, които се виждат вътре в ядрата).
- Не бройте ядрата със силна автофлуоресценция, която пречи на разпознаването на сигнала.
- Отрицателен или неспецифичен резултат може да се дължи на множество фактори (вж. глава 16 "Отстраняване на проблеми").
- За да се интерпретират правилно резултатите, потребителят трябва да валидира този продукт преди използването му в диагностични процедури в съответствие с националните и/или международните насоки.

13. Препоръчителни процедури за контрол на качеството

За да се следи за правилното функциониране на обработените проби и тестовите реактиви, всеки анализ трябва да се придружава от вътрешни и външни контроли. Ако вътрешните и/или външните контроли не демонстрират подходящо оцветяване, резултатите с проби от пациенти трябва да се считат за невалидни.

**Вътрешен контрол:** Ненеопластични клетки в образеца, които имат нормален сигнал, напр. фибробласти.

**Външно управление:** Валидирани положителни и отрицателни контролни образци.

14. Работни характеристики

14.1 Аналитично представяне

Изпълнението беше оценено съгласно инструкциите за употреба на комплекта *ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit*.

Аналитична чувствителност:	100% (95% CI 98.5 – 100.0)
Аналитична специфичност:	100% (95% CI 97.0 – 100.0)

14.2 Клинично представяне

Диагностична чувствителност:	<b>Рак на гърдата:</b> 93% (95% CI 91.0 – 95.0) въз основа на двувариантен модел <b>Рак на стомаха и рак на гастроезофагеалната връзка:</b> 88% (95% CI 74.0 – 95.0) въз основа на двувариантен модел
Диагностична специфичност:	<b>Рак на гърдата:</b> 98% (95% CI 97.0 – 99.0) въз основа на двувариантен модел <b>Рак на стомаха и рак на гастроезофагеалната връзка:</b> 95% (95% CI 92.0 – 97.0) въз основа на двувариантен модел

15. Изхвърляне

Изхвърлянето на реагентите трябва да се извършва в съответствие с местните разпоредби.

16. Отстраняване на неизправности

Всяко отклонение от инструкциите за работа може да доведе до по-лоши резултати при оцветяването или до липса на оцветяване. Моля, вижте [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com) за повече информация.

Слаби сигнали или липса на такива

Възможна причина	Действие
Клетъчна или тъканна проба не е фиксирана правилно	Оптимизирайте времето за фиксиране и фиксатора или приложете стъпка след фиксиране, както е описано в "процедура за анализ" в ръководството за <i>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</i> .
Протеолитичната предварителна обработка не е извършена правилно	Оптимизирайте времето за инкубиране на пепсин, ако е необходимо, увеличете или намалете
Изпаряване на сондата	Когато използвате хибридизатор, използването на мокрите ленти/напълнените с вода резервоари е задължително. При използване на пещ за хибридизация е задължително използването на камера за влажност. Освен това покривното стъкло трябва да се запечата напълно, напр. с Fixogum, за да се предотврати изсъхването на пробата по време на хибридизацията
Използвани неподходящи филтърни комплекти	Използвайте филтърни комплекти, подходящи за флуохромите на сондата. <i>Комплектите филтри с тройни ленти осигуряват по-малко светлина в сравнение с комплектите филтри с една или две ленти. Следователно сигналите могат да изглеждат по-слаби, ако се използват тези комплекти от трилентови филтри</i>

Сигнали за кръстосана хибридизация; зашумен фон

Възможна причина	Действие
Непълно обезпаразитяване	Използвайте пресни разтвори; проверете продължителността на депарафинирането
Твърде силна протеолитична предварителна обработка	Намаляване на времето за инкубиране на пепсин
Слайдове, охладени до стайна температура преди хибридизация	Преместете предметите бързо в 37 °C

**Разрушена морфология**

Възможна причина	Действие
Клетъчната или тъканната проба не е фиксирана правилно	Оптимизирайте времето за фиксиране и фиксатора или приложете стъпка след фиксиране, както е описано в "процедура за анализ" в ръководството за <i>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</i> .
Протеолитичната предварителна обработка не е извършена правилно	Оптимизирайте времето за инкубиране на пепсин, ако е необходимо, намалете го
Недостатъчно изсушаване преди нанасяне на сондата	Удължаване на сушенето на въздух

**Припокриващи се ядра**

Възможна причина	Действие
Неподходяща дебелина на тъканните разрези	Подготвяне на 2-4 $\mu\text{m}$ микротомни разрези

**Образците се издигат извън предметно стъкло**

Възможна причина	Действие
Твърде силна протеолитична предварителна обработка	Намаляване на времето за инкубиране на пепсин

**Слабо контрастно оцветяване**

Възможна причина	Действие
Нискоконцентриран разтвор на DAPI	Вместо това използвайте <u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (Prod. No. MT-0008-0.8)
Твърде кратко време за инкубиране на DAPI	Регулиране на времето за инкубиране на DAPI

**17. Литература**

- Brockhoff G, et al. (2016) *Histopathology* 69: 635-646.
- Gajaria PK, et al. (2020) *Indian J Pathol Microbiol* 63: 1
- Hwang CC, et al. (2011) *Histopathology* 59: 984-992.
- Holten-Rossing H, et al. (2015) *Breast Cancer Res Treat* 152: 367-375.
- Jensen SG, et al. (2020) *Apmis* 128: 573-582.
- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Köseoglu RD, et al. (2019) *Eur J Breast Health* 15: 43.
- Nielsen SL, et al. (2017) *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 25: 320-328.
- Page R, et al. (2022) *PloS one* 17(6): e0270139
- Pfarr N, et al. (2017) *Genes Chromosomes Cancer* 56: 255-265.
- Schindlbeck C, et al. (2010) *J Cancer Res Clin Oncol* 136: 1029-1037.
- Staněk L, et al. (2014) *Mol Med Rep* 10: 2669-2674.
- Tabarestani S, et al. (2015) *Asian Pac J Cancer Prev* 16: 7997-8002.
- Wilkinson DG: In Situ Hybridization, A Practical Approach, *Oxford University Press* (1992) ISBN 0 19 963327 4.

**18. Ревизия**
[www.zytovision.com](http://www.zytovision.com)

Моля, вижте [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com) за най-новите инструкции за употреба, както и за инструкции за употреба на различни езици.

Нашите експерти са на разположение, за да отговорят на въпросите ви. Моля, свържете се с [help@zytovision.com](mailto:help@zytovision.com) За обобщение на безопасността и ефективността, моля, вижте [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com).



ZytoVision GmbH  
Fischkai 1  
27572 Bremerhaven/ Германия  
Телефон: +49 471 4832-300  
Факс: +49 471 4832-509  
[www.zytovision.com](http://www.zytovision.com)  
Имейл: [info@zytovision.com](mailto:info@zytovision.com)

**Търговски марки:**

ZytoVision® и ZytoLight® са търговски марки на ZytoVision GmbH.