



ZytoLight

CEN 17/SPEC ERBB2 Dual Color Probe

REF Z-2077-50 Σ 5 (0,05 ml)

REF Z-2077-200 Σ 20 (0,2 ml)

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

4250380P096RC



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

1. Предвидена цел

Двучетната сонда ZytoLight CEN 17/SPEC ERBB2 Dual Color Probe (PL36) е предназначена за качествено откриване на амплификации, включващи човешкия ген ERBB2, както и за откриване на алфа сателити на хромозома 17 във формалин-фиксираните, 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 хибридизираният 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.

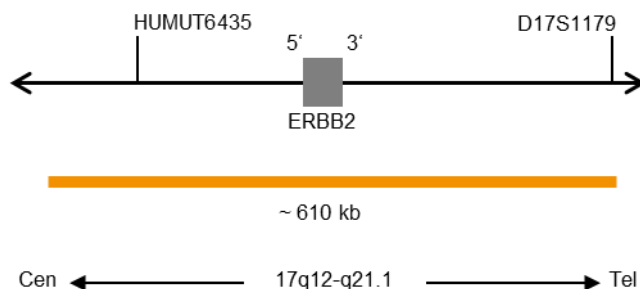
3. Предоставени реактиви

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

- ZyGreen (възбуждане 503 nm/излъчване 528 nm) маркирани полинуклеотиди (~4,5 ng/μl), които са насочени към последователности, картографираните в 17p11.1-q11.1, специфични за алфа сателитната центромерна област D17Z1 на хромозома 17 (вж. фиг. 1).
- ZyOrange (възбуждане 547 nm/излъчване 572 nm) маркирани полинуклеотиди (~4,5 ng/μl), които са насочени към последователности, картографираните в 17q12-q21.1* (chr17:37,572,531-38,181,308), в които се намира областта на гена ERBB2 (вж. фиг. 1).

- Хибридизационен буфер на базата на формамид

*според събирането на човешкия геном GRCh37/hg19



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

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

- Z-2077-50: 0,05 ml (5 реакции от по 10 μl всяка)
- Z-2077-200: 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)
- Хибридизатор или гореща плоча
- Хибридизатор 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](#).

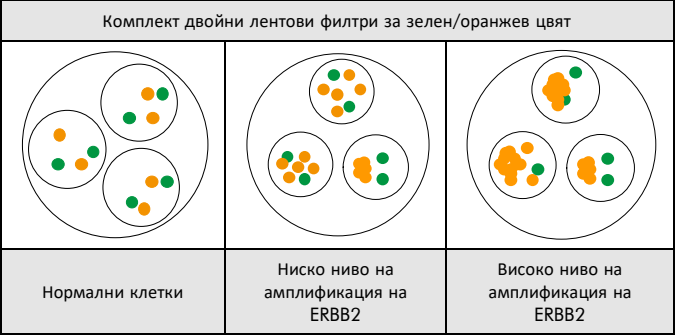
12. Тълкуване на резултатите

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

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: В клетките с амплификация на областта на гена ERBB2 се наблюдава увеличен брой оранжеви сигнали или оранжеви сигнални клъстери. (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 ≤ 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: | Рак на гърдата: 93% (95% CI 91.0 – 95.0) въз основа на двувариантен модел Рак на стомаха и рак на гастроезофагеалната връзка: 88% (95% CI 74.0 – 95.0) въз основа на двувариантен модел |
| Диагностична специфичност: | Рак на гърдата: 98% (95% CI 97.0 – 99.0) въз основа на двувариантен модел Рак на стомаха и рак на гастроезофагеалната връзка: 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 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</i> FISH-Tissue Implementation Kit. |
| 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</i> FISH-Tissue Implementation Kit. |
| 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 µm 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.
- 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

Моля, вижте 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 helptech@zytovision.com. За обобщение на безопасността и ефективността, моля, вижте www.zytovision.com.



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

Търговски марки:

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