



ZytoDot SPEC ERBB2 Probe

REF C-3001-400

Σ 40 (0.4 ml)

За качествено откриване на амплификации на човешкия ген ERBB2 чрез хромогенна *in situ* хибридизация (CISH)

4250380P055QW



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

1. Предвидена употреба

Сондата ZytoDot SPEC ERBB2 Probe (PD1) е предназначена за качествено откриване на амплификации на човешкия ген ERBB2 във фиксирани във формалин включени в парафин проби, като например рак на гърдата, чрез хромогенна *in situ* хибридизация (CISH). Сондата е предназначена да се използва в комбинация с ZytoDot CISH Implementation Kit (Прод. № -C301840).

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 рака на гърдата и не трябва да се предприемат терапевтични мерки само въз основа на резултата от теста.

2. Принцип на изпитване

Техниката на хромогенната *in situ* хибридизация (CISH) позволява откриването и визуализирането на специфични последователности от нуклеинови киселини в клетъчни препарати. Маркираните с хаптен нуклеотидни фрагменти, т.нар. сонди CISH, и техните комплементарни целеви последователности в препаратите се ко-денатурират и впоследствие се оставят да се отграват по време на хибридизацията. След това неспецифичните и несвързани сондови фрагменти се отстраняват чрез стриктно измиване. Дуплексното образуване на маркираната сонда може да се визуализира с помощта на първични (немаркирани) антитела, които се откриват с вторични полимеризирани ензимно конюгирани антитела. Ензимната реакция с хромогенни субстрати води до образуване на цветни утайки. След контраоцветяване на ядрото с ядрено багрило хибридризираните фрагменти на сондата се визуализират чрез светлинна микроскопия.

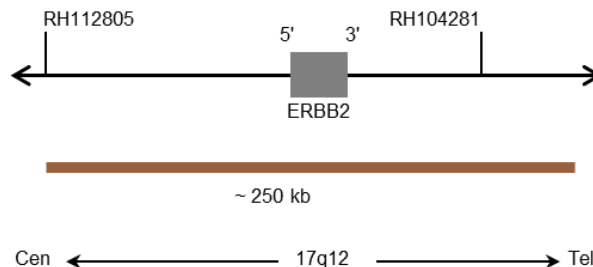
3. Предоставени реактиви

ZytoDot SPEC ERBB2 Probe се състои от:

- Маркирани с дигоксингенин полинуклеотиди (~1,8 ng/μl), които са насочени към последователности, картографиран в 17q12* (chr17:37,725,661-37,973,541), където 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)

ZytoDot SPEC ERBB2 Probe се предлага в един размер:

- C-3001-400: 0,4 ml (40 реакции от по 10 μl всяка)

4. Необходими материали, които не са осигурени

- ZytoDot CISH Implementation Kit (Prod. No. C-3018-40)
- Положителни и отрицателни контролни образци
- Микроскопски стъкла, положително заредени
- Водна баня (80 °C, 98 °C)
- Хибридизатор или гореща плоча
- Хибридизатор или камера за влажност в пещта за хибридизация
- Регулируеми пипети (10 μl, 1000 μl)
- Оцветяване на буркани или вани
- Таймер
- Калибриран термометър
- Етанол или реактивен алкохол
- Ксилол
- Метанол 100%
- Водороден пероксид (H₂O₂) 30%
- Дейониизирана или дестилирана вода
- Покривни стъкла (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Каучуков цимент, напр. Fixogum Rubber Cement (Prod. No. E-4005-50/-125) -или подобен
- Подходящо поддържан светлинен микроскоп (400-630x)

5. Съхранение и обработка

Съхранявайте при температура 2-8 °C в изправено положение. Върнете при 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.
- Не трябва да се допуска изсъхване на образците по време на хибридизацията и промиването.

Предупреждения за опасност и предпазни мерки:

Компонентът, определящ опасността, е формамид.



Опасно

H351	Предполага се, че причинява рак..
H360FD	Може да увреди оплодителната способност. Може да увреди плода.
H373	Може да причини увреждане на органите при продължителна или повтаряща се експозиция.
P201	Преди употреба се снабдете със специални инструкции.
P202	Не използвайте преди да сте прочели и разбрали всички предпазни мерки за безопасност.
P260	Не вдишвайте прах/пушек/газ/дим/ изпарения/ аерозоли.
P280	Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице/предпазни средства за защита на слуха.
P308+P313	ПРИ явна или предполагаема експозиция: Потърсете медицински съвет/помощ.
P405	Да се съхранява под ключ.

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. Квалифицираният патолог/ генетик квалифициран за съответната дейност. е длъжен да познава CISH 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.
- 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

Следните фиксатори са несъвместими с ISH:

- 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 пробите, както е описано в инструкциите за употреба на [ZytoDot CISH 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 (напр. обезпаразитяване, протеолиза) съгласно инструкциите за употреба на [ZytoDot CISH 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 5 min при 94-95 °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

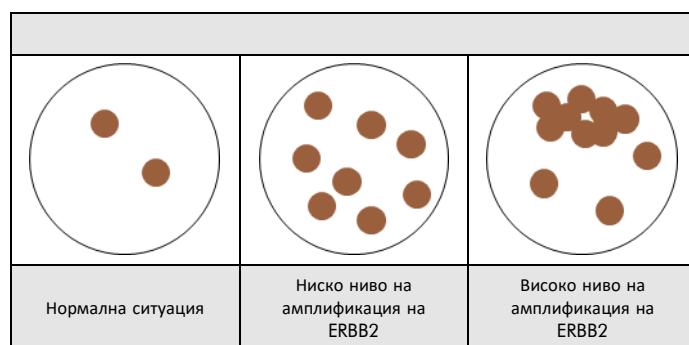
Извършете обработката след хибридизацията (измиване, откриване, контраоцветяване, монтиране, микроскопия) съгласно инструкциите за употреба на [ZytoDot CISH Implementation Kit](#).

12. Тълкуване на резултатите

При използване на [ZytoDot CISH Implementation Kit](#) хибридизационните сигнали на маркираните с дигоксигенин полинуклеотиди изглеждат кафяви до тъмнокафяви (област на гена ERBB2).

Нормална ситуация: В интерфазите на нормални клетки или на клетки без амплификация, включваща областта на гена ERBB2, се появяват два ясно изразени кафяви сигнала с форма на точка. (вж. фиг. 2).

Необичайна ситуация: В клетки с амплификация на областта на гена ERBB2 или полизомия на хромозома 17 се наблюдава увеличен брой на кафявите сигнали или клъстери от кафяви сигнали (вж. фигура 2).



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 декондензиращия хроматин единичните CISH 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.
- Преди изброяването на сигналите образецът трябва да се сканира за евентуална интратуморна хетерогенност при 100- до 200-кратно увеличение.
- Визуализацията на сигналите трябва да се извършва при най-малко 400-630-кратно увеличение, което води до лесно видими сигнали.
- Не оценявайте зони на некроза, припокриващи се ядра, прекалено разградени ядра и ядра със слаб интензитет на сигнала.
- Поради митозата допълнителни сигнали могат да се видят дори в малък процент от ненеопластичните клетки. Понякога в парафинови образци могат да се наблюдават ядра с липсващи сигнали поради артефакти при рязане.
- Отрицателният или неспецифичен резултат може да се дължи на множество фактори (вж. глава 16 "Отстраняване на неизправности").
- 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**

Ефективността на сондата е определена чрез сравнение със съответната одобрена от IVD FISH сонда..

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

14.2 Клинично представяне

Диагностична чувствителност:	100% (95% CI 83.2 – 100.0) срещу FISH, CISH
Диагностична специфичност:	100% (95% CI 83.2 – 100.0) срещу FISH, CISH

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
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
Недостатъчна подготовка на хромогенния субстрат	Вместо една капка от разтвора DAB A използвайте 30 μ l
Твърде дълго време за оцветяване	Избягвайте тъмно контраоцветяване, защото може да затъмни положителните сигнали от оцветяването.
Синьото покритие на контраста не е извършено правилно	Използвайте студена течеща вода от чешмата за посиняване; не използвайте топла или гореща вода, нито реактиви за посиняване.

Твърде силни сигнали

Възможна причина	Действие
Протеолитична предварителна обработка, провеждана твърде дълго	Оптимизирайте времето за инкубиране на пепсин, ако е необходимо, увеличете или намалете
Реакцията на субстрата е твърде интензивна	Съкратете времето за инкубиране на субстрата; не загрявайте разтвора на субстрата над 25 °C; инкубирайте само при стайна температура

Сигналите избледняват или се сливат

Възможна причина	Действие
Използвано е неподходящо решение за монтаж	Използвайте само монтажния разтвор, предоставен в комплекта, или монтажни разтвори на основата на ксилол, които не съдържат никакви примеси; не използвайте тиксо за покрития.

Неравномерни или само на някои места много леки петна

Възможна причина	Действие
Непълно обезпаразитяване	Използвайте пресни разтвори; проверете продължителността на обезпаразитяването
Твърде малък обем на реагента	Уверете се, че обемът на реактива е достатъчно голям, за да покрие тъканната област

Непоследователни резултати

Възможна причина	Действие
Недостатъчно изсушаване преди нанасяне на сондата	Удължаване на сушенето на въздух
Твърде много вода/буфер за промиване върху тъканта преди нанасянето на пепсин, антитела и/или цветни субстрати	Уверете се, че излишната течност е отстранена от тъканния участък, като я забършете или изтръскате от предметно стъкло. Малки количества остатъчна вода/буфер за промиване не пречат на теста.

Вариации в методите за фиксиране и вграждане на тъкани	Оптимизиране на методите за фиксиране и вграждане
Вариации в дебелината на тъканния участък	Оптимизиране на разделянето

Разрушена морфология

Възможна причина	Действие
Клетъчната или тъканната проба не е била правилно фиксирана	Оптимизиране на времето за фиксиране и фиксатора
Протеолитична предварителна обработка, която не се извършва твърде дълго	Намаляване на времето за инкубиране на пепсин

Сигнали за кръстосана хибридизация; зашумен фон

Възможна причина	Действие
Изсъхване на секциите по всяко време по време на или след хибридизацията	Избягвайте изсушаването на секциите; използвайте камера за влажност; запечатайте правилно покривното стъкло
Удължено време за инкубиране на субстрата	Съкращаване на времето за инкубиране на субстрата
Непълно обезпаразитяване	Използвайте пресни разтвори; проверете продължителността на депарафинирането
Твърде силна протеолитична предварителна обработка	Оптимизиране на времето за инкубиране на пепсин
Слайдове, охладени до стайна температура преди хибридизация	Прехвърлете бързо предметите за хибридизация на температурата.

Припокриващи се сигнали

Възможна причина	Действие
Неподходяща дебелина на тъканните разрези	Подготвяне на 3-5 μm микротомни разрези

Образците се издигат извън предметно стъкло

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

17. Литература

- Nie X, et al. (2013) *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*.
- 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 ZytoDot® са търговски марки на ZytoVision GmbH.