



## ZytoDot SPEC ERBB2 Probe

REF C-3001-400

Σ 40 (0,4 ml)

Pro kvalitativní detekci amplifikací lidského genu ERBB2 pomocí chromogenní *in situ* hybridizace (CISH)

4250380P055QW



Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro  
podle IVDR (EU) 2017/746

### 1. Zamýšlený účel

Sonda ZytoDot SPEC ERBB2 Probe (PD1) je určena ke kvalitativní detekci amplifikací lidského genu ERBB2 ve formalínem fixovaných, do parafínu vložených vzorcích, jako je například karcinom prsu, pomocí chromogenní *in situ* hybridizace (CISH). Sonda je určena k použití v kombinaci se sadou ZytoDot CISH Implementation Kit (prod. č. C-3018-40).

Výrobek je určen pouze pro profesionální použití. Všechny testy s použitím výrobku by měly být prováděny v certifikované, licencované laboratoři anatomické patologie pod dohledem patologa/humánního genetika kvalifikovaným personálem.

Sonda je určena jako pomůcka pro diferenciální diagnostiku karcinomu prsu a léčebná opatření by neměla být zahájena pouze na základě výsledku testu.

### 2. Princip testu

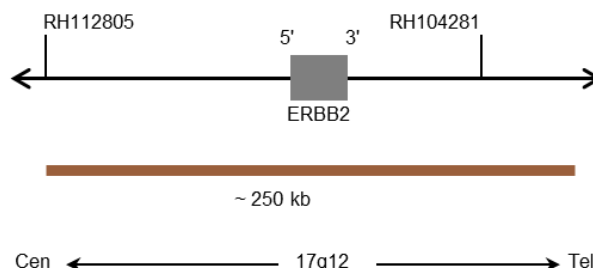
Technika chromogenní *in situ* hybridizace (CISH) umožňuje detekci a vizualizaci specifických sekvencí nukleových kyselin v buněčných preparátech. Nukleotidové fragmenty značené hapténem, tzv. sondy CISH, a jejich komplementární cílové sekvence v preparátech jsou při hybridizaci společně denaturovány a následně se nechají annealizovat. Poté se nespecifické a nenavázané fragmenty sond odstraní pomocí promývacích kroků. Tvorbu duplexu značené sondy lze vizualizovat pomocí primárních (neznačených) protilátek, které jsou detekovány sekundárními polymerizovanými protilátkami konjugovanými s enzymem. Enzymatická reakce s chromogenními substráty vede k tvorbě barevných precipitátů. Po protibarvení jádra jaderným barvivem se hybridizované fragmenty sondy vizualizují světelnou mikroskopií.

### 3. Dodaná činidla

ZytoDot SPEC ERBB2 Probe se skládá z:

- Polynukleotidy značené digoxigeninem (~1,8 ng/μl), které jsou zaměřeny na sekvence mapující oblast 17q12\* (chr17:37,725,661-37,973,541), v níž se nachází oblast genu ERBB2 (viz obr. 1).
- Formamidový hybridizační pufr

\*podle sestavy lidského genomu GRCh37/hg19



Obr. 1: SPEC ERBB2 Mapa sondy (bez měřítka)

ZytoDot SPEC ERBB2 Probe je k dispozici v jedné velikosti:

- C-3001-400: 0,4 ml (40 reakcí po 10 μl)

### 4. Požadované, ale neposkytované materiály

- ZytoDot CISH Implementation Kit (Prod. č. C-3018-40)
- Pozitivní a negativní kontrolní vzorky
- Mikroskopická sklíčka, kladně nabitá
- Vodní lázeň (80 °C, 98 °C)
- Hybridizér nebo horká deska
- Hybridizátor nebo vlhkostní komora v hybridizační peci
- Nastavitelné pipety (10 μl, 1000 μl)
- Barvicí nádoby nebo lázně
- Časovač
- Kalibrováný teploměr
- Etanol nebo reagenční alkohol
- Xylen
- Metanol 100%
- Peroxid vodíku (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30 %.
- Deionizovaná nebo destilovaná voda
- Krycí sklíčka (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Pryžový cement, např. Fixogum Rubber Cement (prod. č. E-4005-50/-125) -nebo podobný.
- Vhodně udržovaný světelný mikroskop (400-630x)

### 5. Skladování a manipulace

Skladujte při teplotě 2-8 °C ve vodorovné poloze. Ihned po použití vraťte do skladovacích podmínek. Nepoužívejte činidla po uplynutí doby použitelnosti uvedené na štítku. Při odpovídajícím zacházení je přípravek stabilní do data použitelnosti uvedeného na štítku.

### 6. Upozornění a bezpečnostní opatření

- Před použitím si přečtěte návod k použití!
- Nepoužívejte činidla po uplynutí doby použitelnosti!
- Tento výrobek obsahuje látky (v nízkých koncentracích a objemech), které jsou zdraví škodlivé a potenciálně infekční. Vyvarujte se jakéhokoli přímého kontaktu s činidly. Přijměte vhodná ochranná opatření (používejte jednorázové rukavice, ochranné brýle a laboratorní oděv)!
- Jakoukoli závažnou událost, ke které došlo v souvislosti s výrobkem, nahláste výrobci a příslušnému úřadu v souladu s místními předpisy!
- Pokud se činidla dostanou do kontaktu s kůží, okamžitě ji opláchněte velkým množstvím vody!
- Pro profesionální uživatele je na vyžádání k dispozici bezpečnostní list materiálu.

- Reagencie nepoužívejte opakovaně, pokud není opakované použití výslovně povoleno!
- Vyvarujte se křížové kontaminace vzorků, protože to může vést k chybným výsledkům.
- Během hybridizace a promývání se vzorky nesmí nechat zaschnout.

#### Standardní věty o nebezpečnosti a pokyny pro bezpečné zacházení:

Složkou určující nebezpečnost je formamid.



#### Nebezpečí

|           |                                                                                     |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| H351      | Podezření, že způsobuje rakovinu.                                                   |
| H360FD    | Může poškodit plodnost. Může poškodit nenarozené dítě.                              |
| H373      | Může způsobit poškození orgánů při dlouhodobé nebo opakované expozici.              |
| P201      | Před použitím si vyžádejte zvláštní pokyny.                                         |
| P202      | Nemanipulujte s ním, dokud si nepřečtete a neporozumíte všem bezpečnostním pokynům. |
| P260      | Nedýchejte prach/dým/plyn/hmlu/výpary/stříkance.                                    |
| P280      | Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranu očí/ochranu obličeje.            |
| P308+P313 | Jste-li vystaveni nebo znepokojeni: Vyhledejte lékařskou pomoc/opatření.            |
| P405      | Sklad je uzamčený.                                                                  |

#### 7. Omezení

- Pro diagnostické použití *in vitro*.
- Pouze pro profesionální použití.
- Pouze pro neautomatizované použití.
- Klinická interpretace jakéhokoli pozitivního barvení nebo jeho nepřítomnosti musí být provedena v kontextu klinické anamnézy, morfologie, dalších histopatologických kritérií a také dalších diagnostických testů. Za znalost sond CISH, reagentů, diagnostických panelů a metod používaných k výrobě barveného preparátu odpovídá kvalifikovaný patolog/humánní genetik. Barvení musí být prováděno v certifikované licencované laboratoři pod dohledem patologa/humánního genetika, který je odpovědný za revizi obarvených preparátů a zajištění adekvátnosti pozitivních a negativních kontrol.
- Barvení vzorků, zejména intenzita signálu a barvení pozadí, závisí na manipulaci se vzorkem a jeho zpracování před barvením. Nesprávná fixace, zmrazení, rozmrazení, mytí, sušení, zahřívání, řezání nebo kontaminace jinými vzorky či tekutinami může vést k artefaktům nebo falešným výsledkům. Nekonzistentní výsledky mohou být důsledkem rozdílů v metodách fixace a vkládání, jakož i vrozených nepravidelností ve vzorku.
- Sonda by se měla používat pouze pro detekci lokusů popsanych v kapitole 3. "Dodávané reagentie".
- Výkon byl ověřen pomocí postupů popsanych v tomto návodu k použití. Úpravy těchto postupů mohou změnit výkon a musí být ověřeny uživatelem. Tento IVD je certifikován jako CE, pouze pokud je používán způsobem popsáním v tomto návodu k použití v rozsahu určeného použití.

#### 8. Rušivé látky

Následující fixativa jsou s ISH neslučitelná:

- Bouinovo fixační činidlo
- fixační prostředek B5
- Kyselé fixační prostředky (např. kyselina pikrová)
- Zenkerův fixativ
- Alkoholy (při samostatném použití)
- Chlorid rtuťnatý

- Formaldehydové/zinkové fixační činidlo
- Hollandův fixativ
- Formalin bez pufru

#### 9. Příprava vzorků

Připravte vzorky podle návodu k použití sady ZytoDot CISH Implementation Kit.

#### 10. Přípravné ošetření zařízení

Výrobek je připraven k použití. Není třeba rekonstituce, míchání ani ředění. Před použitím uveďte sondu na pokojovou teplotu (18-25 °C), chraňte před světlem. Před otevřením lahvičky promíchejte vortexováním a krátce roztočte.

#### 11. Postup analýzy

##### Předúprava vzorků

Proveďte předběžnou úpravu vzorku (např. odvoskování, proteolýzu) podle návodu k použití sady ZytoDot CISH Implementation Kit.

##### Denaturace a hybridizace

1. Na každý předem ošetřený vzorek napipetujte 10 µl sondy.
  2. Vzorky zakryjte krycím sklíčkem o rozměrech 22 x 22 mm (zamezte zachycení bublin) a krycí sklíčko utěsněte.
- K utěsnění doporučujeme použít gumový cement (např. Fixogum).*
3. Umístěte sklíčka na horkou desku nebo hybridizátor a denaturujte vzorky po dobu 5 minut při 94-95 °C.
  4. Přeneste sklíčka do vlhké komory a hybridizujte přes noc při 37 °C (např. v hybridizační peci).

*Je důležité, aby vzorky během hybridizace nevyschly.*

##### Po hybridizaci

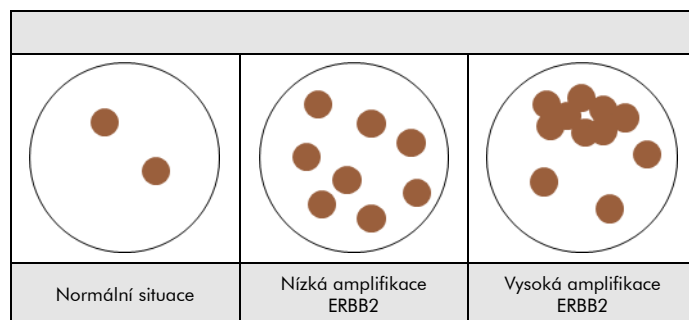
Zpracování po hybridizaci (promytí, detekce, protibarvení, montáž, mikroskopie) proveďte podle návodu k použití sady ZytoDot CISH Implementation Kit.

#### 12. Interpretace výsledků

Při použití sady ZytoDot CISH Implementation Kit se hybridizační signály polynukleotidů značených digoxigeninem jeví jako hnědé až tmavě hnědé (oblast genu ERBB2).

**Normální situace:** V interfázích normálních buněk nebo buněk bez amplifikace zahrnující oblast genu ERBB2 se objevují dva zřetelné hnědé signály ve tvaru teček (viz obr. 2).

**Neobvyklá situace:** U buněk s amplifikací oblasti genu ERBB2 nebo polysomií chromozomu 17 bude pozorován zvýšený počet hnědých signálů nebo hnědých signálních shluků (viz obr. 2).



Obr. 2: Očekávané výsledky u normálních a aberantních jader

U některých abnormálních vzorků mohou být pozorovány jiné vzorce signálu, než jsou popsány výše. Tyto neočekávané vzorce signálu by měly být dále zkoumány.



Upozornění:

- Vzhledem k dekonzenzovanému chromatinu se jednotlivé signály CISH mohou jevit jako malé shluky signálů. Dva nebo tři signály stejné velikosti, oddělené vzdáleností ≤ 1 průměr signálu, by se tedy měly počítat jako jeden signál.
- Před vyčíslením signálu by měl být vzorek naskenován kvůli případné intratumorální heterogenitě při 100- až 200násobném zvětšení.
- Vizualizace signálů by měla být prováděna při minimálně 400- až 630násobném zvětšení, což vede ke snadno viditelným signálům.
- Nehodnoťte oblasti nekrózy, překrývající se jádra, nadměrně strávená jádra a jádra se slabou intenzitou signálu.
- V důsledku mitózy mohou být další signály viditelné i u malého procenta nenádorových buněk. Občas mohou být v parafinových vzorcích pozorována jádra s chybějícími signály v důsledku artefaktů při řezání.
- Negativní nebo nespecifický výsledek může být způsoben více faktory (viz kapitola 16 "Řešení problémů").
- Pro správnou interpretaci výsledků musí uživatel tento výrobek před použitím v diagnostických postupech validovat v souladu s národními a/nebo mezinárodními pokyny.

13. Doporučené postupy kontroly kvality

Aby bylo možné sledovat správnou funkčnost zpracovávaných vzorků a testovacích činidel, měla by být každá analýza doplněna interními a externími kontrolami. Pokud interní a/nebo externí kontroly neprokáží odpovídající zbarvení, je třeba výsledky se vzorky pacientů považovat za neplatné.

**Vnitřní kontrola:** Neoplastické buňky ve vzorku, které vykazují normální vzor signálu, např. fibroblasty.

**Externí ovládání:** Ověřené pozitivní a negativní kontrolní vzorky.

14. Výkonnostní charakteristiky

14.1 Analytický výkon

Výkonnost sondy byla stanovena porovnáním s odpovídající sondou FISH schválenou IVD.

|                         |                            |
|-------------------------|----------------------------|
| Analytická citlivost:   | 100% (95% CI 98.5 – 100.0) |
| Analytická specifčnost: | 100% (95% CI 97.0 – 100.0) |

14.2 Klinický výkon

|                           |                                           |
|---------------------------|-------------------------------------------|
| Diagnostická citlivost:   | 100% (95% CI 83.2 – 100.0) vs. FISH, CISH |
| Diagnostická specifčnost: | 100% (95% CI 83.2 – 100.0) vs. FISH, CISH |

15. Likvidace

Likvidace činidel musí být prováděna v souladu s místními předpisy.

16. Řešení problémů

Jakákoli odchylka od návodu k obsluze může vést k horším výsledkům barvení nebo k tomu, že barvení nebude vůbec provedeno. Další informace naleznete na [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com).

Slabý nebo žádný signál

| Možná příčina                                | Akce                                                                               |
|----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Nesprávně provedená proteolytická předúprava | Optimalizujte dobu inkubace pepsinu, v případě potřeby ji prodlužte nebo zkratzte. |

|                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Odpařování sondy                              | Při použití hybridizátoru je použití mokrých pruhů/nádrží naplněných vodou povinné. Při použití hybridizační pece je nutné použít vlhkou komoru. Kromě toho by měl být krycí list zcela uzavřen, např. pomocí Fixogumu, aby se zabránilo vysychání vzorku během hybridizace. |
| Nedostatečná příprava chromogenního substrátu | Namísto jedné kapky roztoku DAB A použijte 30 µl.                                                                                                                                                                                                                            |
| Příliš dlouhá doba proti barvení              | Vyhňte se tmavému protibarvení, protože může zakrýt pozitivní signály barvení.                                                                                                                                                                                               |
| Nesprávně provedené modření protibarviva      | K modření používejte studenou tekoucí vodu z vodovodu; nepoužívejte teplou nebo horkou vodu ani modřící činidla.                                                                                                                                                             |

Příliš silné signály

| Možná příčina                          | Akce                                                                                                             |
|----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Příliš dlouhá proteolytická předúprava | Optimalizujte dobu inkubace pepsinu, v případě potřeby ji prodlužte nebo zkratzte.                               |
| Reakce substrátu je příliš intenzivní  | Zkratzte dobu inkubace substrátu; nezahřívajte roztok substrátu nad 25 °C; inkubujte pouze při pokojové teplotě. |

Signály slabnou nebo se slučují

| Možná příčina                         | Akce                                                                                                                                     |
|---------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Bylo použito nevhodné montážní řešení | Používejte pouze montážní roztok dodaný se sadou nebo montážní roztoky na bázi xyleny bez jakýchkoli nečistot; nepoužívejte krycí pásku. |

Nerovnoměrné nebo v některých částech jen velmi lehké skvrny

| Možná příčina             | Akce                                                                        |
|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| Nedokonalé odparafinování | Používejte čerstvé roztoky; zkontrolujte dobu trvání odparafinování.        |
| Příliš malý objem činidla | Ujistěte se, že objem činidla je dostatečně velký, aby pokryl oblast tkáně. |

Nekonzistentní výsledky

| Možná příčina                                                                                                           | Akce                                                                                                                                                                      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Nedostatečné vysušení před aplikací sondy                                                                               | Prodloužení sušení na vzduchu                                                                                                                                             |
| Příliš velké množství vody/proplachovacího pufru na tkáni před aplikací pepsinu, protilátka a/nebo barevných substrátů. | Ujistěte se, že je přebytečná tekutina z tkáňového řezu odstraněna rozeřením nebo setřesením ze sklíčka. Malá množství zbytkové vody/mycího pufru neinterferují s testem. |
| Rozdíly v metodách fixace a vkládání tkání                                                                              | Optimalizace metod fixace a vkládání                                                                                                                                      |
| Změny v tloušťce tkáňového řezu                                                                                         | Optimalizace řezu                                                                                                                                                         |

**Zhoršená morfologie**

| Možná příčina                                             | Akce                                            |
|-----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Vzorek buněk nebo tkáně nebyl řádně fixován               | Optimalizace doby fixace a fixačního prostředku |
| Předběžná proteolytická úprava se neprovádí příliš dlouho | Zkrácení doby inkubace pepsinu                  |

**Křížové hybridizační signály; rušivé pozadí**

| Možná příčina                                             | Akce                                                                               |
|-----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Sekce vyschly kdykoli během hybridizace nebo po ní.       | Zabraňte vysychání řezů; použijte komoru s vlhkostí; řádně utěsněte krycí sklíčko. |
| Prodloužená doba inkubace substrátu                       | Zkrácení doby inkubace substrátu                                                   |
| Nedokonalé odparafinování                                 | Používejte čerstvé roztoky; zkontrolujte délku odparafinování                      |
| Příliš silná proteolytická předúprava                     | Optimalizace doby inkubace pepsinu                                                 |
| Sklíčka se před hybridizací ochladí na pokojovou teplotu. | Rychle přeneste sklíčka na hybridizační teplotu                                    |

**Překrývající se signály**

| Možná příčina                    | Akce                                                       |
|----------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Nevhodná tloušťka tkáňových řezů | Připravte si řezy mikrotomem o velikosti 3-5 $\mu\text{m}$ |

**Vzorek vyplave ze sklíčka**

| Možná příčina                         | Akce                            |
|---------------------------------------|---------------------------------|
| Příliš silná proteolytická předúprava | Zkrácení inkubační doby pepsinu |

**17. Literatura**

- 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. Revize**
[www.zytovision.com](http://www.zytovision.com)

Nejnovější návod k použití a návod k použití v různých jazycích naleznete na adrese [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com).

Naši odborníci jsou připraveni zodpovědět vaše dotazy.

Kontaktujte prosím [help@zytovision.com](mailto:help@zytovision.com)

Shrnutí bezpečnosti a výkonnosti naleznete na stránce [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com).



ZytoVision GmbH

Fischkai 1

27572 Bremerhaven/ Německo

Telefon: +49 471 4832-300

Fax: +49 471 4832-509

[www.zytovision.com](http://www.zytovision.com)

E-mail: [info@zytovision.com](mailto:info@zytovision.com)

**Ochranné známky:**

ZytoVision® a *ZytoDot*® jsou ochranné známky společnosti ZytoVision GmbH.