*Zyto**Light***
SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe

REF Z-2015-50	Σ 5 (0,05 ml)
REF Z-2015-200	Σ 20 (0,2 ml)

Pro kvalitativní detekci amplifikací lidského genu ERBB2 a alfa satelitů chromozomu 17 pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

4250380P038QW

CE 0483 IVD

Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro

podle IVDR (EU) 2017/746

1. Zamýšlený účel

Dvoubarevná sonda Zyto*Light* SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe (**PL8**) je určena ke kvalitativní detekci amplifikací lidského genu ERBB2 a detekci satelitů chromozomu 17 alfa ve formalínem fixovaných, do parafínu vložených vzorcích, jako je karcinom prsu a karcinom žaludku/gastroezofageálního spojení, pomocí fluorescenční in situ hybridizace (FISH). Sonda je určena k použití v kombinaci se sadou Zyto*Light* FISH-Tissue Implementation Kit (prod. č. Z-2028-5/-20).

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 karcinomu žaludku/gastroezofageálního spojení a léčebná opatření by neměla být zahájena pouze na základě výsledku testu.

2. Princip testu

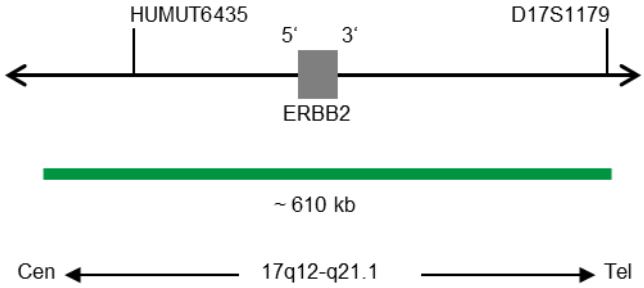
Technika fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) umožňuje detekci a vizualizaci specifických sekvencí nukleových kyselin v buněčných preparátech. Fluorescenčně značené fragmenty DNA, tzv. sondy FISH, a jejich komplementární cílové řetězce DNA v preparátech jsou při hybridizaci společně denaturovány a následně se nechají annealizovat. Poté se nespecifické a nenavázané fragmenty sond odstraní pomocí promývacích kroků. Po protibarvení DNA pomocí DAPI se hybridizované fragmenty sond vizualizují pomocí fluorescenčního mikroskopu vybaveného excitačními a emisními filtry specifickými pro fluorochromy, kterými byly fragmenty sond FISH přímo označeny.

3. Dodaná činidla

Zyto*Light* SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe se skládá z:

- polynukleotidy značené ZyGreen (excitace 503 nm/emise 528 nm) (~10,0 ng/µl), které jsou zaměřeny na sekvence mapující oblast 17q12-q21.1* (chr17:37,572,531-38,181,308), v níž se nachází oblast genu ERBB2 (viz obr. 1).
- ZyOrange (excitace 547 nm/emise 572 nm) značené polynukleotidy (~1,5 ng/µl), které cílí na sekvence mapující v 17p11.1-q11.1 specifické pro alfa satelitní centromerickou oblast D17Z1 chromozomu 17 (viz obr. 1).
- Formamidový hybridizační pufr

*podle sestavy lidského genomu GRCh37/hg19



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

Zyto*Light* SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe je k dispozici ve dvou velikostech:

- Z-2015-50: 0,05 ml (5 reakcí po 10 µl)
- Z-2015-200: 0,2 ml (20 reakcí po 10 µl)

4. Požadované, ale neposkytované materiály

- Zyto*Light* FISH-Tissue Implementation Kit (Prod. č. Z-2028-5/-20)
- Pozitivní a negativní kontrolní vzorky
- Mikroskopická sklíčka, kladně nabitá
- Vodní lázeň (37 °C, 98 °C)
- Hybridizér nebo horká deska
- Hybridizátor nebo vlhkostní komora v hybridizační peci
- Nastavitelné pipety (10 µl, 25 µl)
- Barvící nádoby nebo lázně
- Časovač
- Kalibrovaný teploměr
- Etanol nebo reagenční alkohol
- Xylen
- Deionizovaná nebo destilovaná voda
- Krycí sklíčka (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Pryžový cement, např. Fixogum Rubber Cement (prod. č. E-4005-50/125) nebo podobný.
- Vhodně udržovaný fluorescenční mikroskop (400-1000x)
- Ponorný olej schválený pro fluorescenční mikroskopii
- Vhodné sady filtrů

5. Skladování a manipulace

Skladujte při teplotě 2-8 °C ve svislé poloze chráněné před světlem. Používejte chráněné před světlem. Ihned po použití vraťte do skladovacích podmínek. Nepoužívejte činidla po uplynutí doby použitelnosti uvedené na štítku. Při odpovídajícím zacházení je přípravek stabilní až 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, nahlaste 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.
- Sonda by neměla být delší dobu vystavena světlu, zejména silnému světlu, tj. všechny kroky by měly být prováděny pokud možno ve tmě a/nebo s použitím nádob odolných proti světlu.

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	Nevdechujte prach/dým/plyn/hmlu/výpary/stříkance.
P280	Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranu očí/ochranu obličeje.
P308+P313	Pokud je vystaven nebo znepokojen: 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 FISH, reagencií, 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 popsaných v kapitole 3. "Dodávané reagencie".
- Výkon byl ověřen pomocí postupů popsaných 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 popsaným v tomto návodu k použití v rozsahu určeného použití.

8. Rušivé látky

Červené krvinky přítomné ve vzorku mohou vykazovat autofluorescenci, která brání rozpoznání signálu.

Následující fixativa jsou s FISH 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 Zyto*Light* FISH-Tissue 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 (odvoskování, proteolýzu) podle návodu k použití sady Zyto*Light* FISH-Tissue 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 10 minut při teplotě 75 °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, protibarvení, fluorescenční mikroskopie) proveďte podle návodu k použití sady Zyto*Light* FISH-Tissue Implementation Kit.

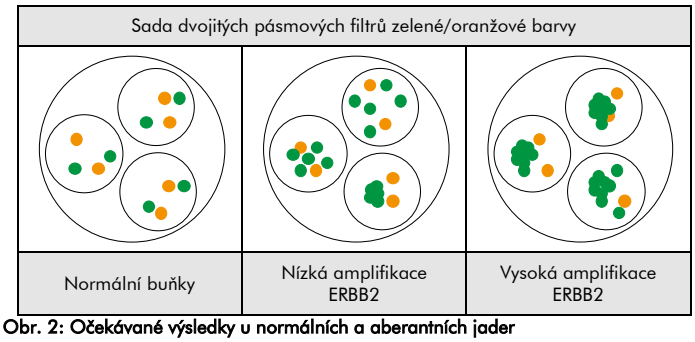
12. Interpretace výsledků

i použití vhodných sad filtrů se hybridizační signály sondy zobrazí zeleně (oblast genu ERBB2) a oranžově (CEN 17).

Normální situace: V interfázích normálních buněk nebo buněk bez amplifikace zahrnující oblast genu ERBB2 se objevují dva zelené a dva oranžové signály (viz obr. 2).

Neobvyklá situace: U buněk s amplifikací oblasti genu ERBB2 bude pozorován zvýšený počet zelených signálů nebo shluků zelených signálů (viz obr. 2).

Překrývající se signály se mohou zobrazovat jako žluté signály.



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 dekondenzovanému chromatinu se jednotlivé signály FISH mohou jevit jako malé shluky signálů. Dva nebo tři signály stejné velikosti, které jsou od sebe vzdáleny ≤ 1 průměr signálu, by se tedy měly počítat jako jeden signál.
- Nehodnoťte překrývající se jádra.
- Nepočítejte nadměrně strávená jádra (pozná se podle tmavých oblastí viditelných uvnitř jader).
- Nepočítejte jádra se silnou autofluorescencí, která brání rozpoznání signálu.
- 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

Výkon byl hodnocen podle návodu k použití sady ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit.

Analytická citlivost:	100% (95% CI 98.5 – 100.0)
Analytická specifičnost:	100% (95% CI 97.0 – 100.0)

Byla testována denní reprodukovatelnost, př čemž se porovnávaly výsledky získané od jednoho zkoušejícího v 10 různých dnech a hodnotila se shoda.

	Procentuální shoda
negativní vzorek	100%
pozitivní vzorek	100%

Opakovatelnost byla testována porovnáním opakovaných výsledků získaných od jednoho zkoušejícího v 10 různých dnech a vyhodnocením shody.

	Procentuální shoda
negativní vzorek	100%
pozitivní vzorek	100%

14.2 Klinický výkon

Diagnostická citlivost:	**Rakovina prsu:** 93% (95% CI 91.0 – 95.0) na základě dvourozměrného modelu **Karcinom žaludku a gastroezofageálního spojení:** 88% (95% CI 74.0 – 95.0) na základě dvourozměrného modelu
Diagnostická specifičnost:	**Rakovina prsu:** 98% (95% CI 97.0 – 99.0) na základě dvourozměrného modelu **Karcinom žaludku a gastroezofageálního spojení** 95% (95% CI 92.0 – 97.0) na základě dvourozměrného modelu

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.

Slabý nebo žádný signál

Možná příčina	Akce
Vzorek buněk nebo tkáně není správně fixován	Optimalizujte dobu fixace a fixační činidlo nebo použijte postfixační krok, jak je popsáno v "postupu analýzy" v příručce k sadě ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit.
Nesprávně provedená proteolytická předúprava	Optimalizujte dobu inkubace pepsinu, v případě potřeby ji prodlužte nebo zkraťte.
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.
Použití nevhodných sad filtrů	Použijte sady filtrů vhodné pro fluochromy sondy. *Sady třípásmových filtrů poskytují méně světla ve srovnání se sadami jednopásmových nebo dvoupásmových filtrů. V důsledku toho se signály při použití těchto sad třípásmových filtrů mohou jevit slabší.*

Křížové hybridizační signály; rušivé pozadí

Možná příčina	Akce
Nedokonalé odparafinování	Používejte čerstvé roztoky; zkontrolujte délku odparafinování
Příliš silná proteolytická předúprava	Zkrácení inkubační doby pepsinu
Sklíčka se před hybridizací ochladí na pokojovou teplotu.	Sklíčka rychle přeneste na teplotu 37 °C

Zhoršená morfologie

Možná příčina	Akce
Vzorek buněk nebo tkáně nebyl správně fixován	Optimalizujte dobu fixace a fixační činidlo nebo použijte postfixační krok, jak je popsáno v "postupu analýzy" v příručce k sadě ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit.

Nesprávně provedená proteolytická předúprava	Optimalizujte dobu inkubace pepsinu, v případě potřeby ji zkraťte.
Nedostatečné vysušení před aplikací sondy	Prodloužení sušení na vzduchu

Překrývající se jádra

Možná příčina	Akce
Nevhodná tloušťka tkáňových řezů	Příprava řezů o velikosti 2-4 µm z mikrotomu

Vzorek vyplave ze sklíčka

Možná příčina	Akce
Příliš silná proteolytická předúprava	Zkrácení inkubační doby pepsinu

Slabá protibarva

Možná příčina	Akce
Nízkokoncentrovaný roztok DAPI	Místo toho použijte roztok DAPI/DuraTect-Solution (ultra) (prod. č. MT-0008-0.8).
Příliš krátká doba inkubace DAPI	Úprava doby inkubace DAPI

17. Literatura

- 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.
- Köseoğlu 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. Revize

Revize	Popis změny
4.1.1	Změna notifikovaného subjektu 14. Výkonnostní charakteristiky př idat př esnost

www.zytovision.com

Nejnovější návod k použití a návod k použití v různých jazycích naleznete na adrese www.zytovision.com.

Naši odborníci jsou připraveni zodpovědět vaše dotazy.
Kontaktujte prosím helptech@zytovision.com
Shrnutí bezpečnosti a výkonnosti naleznete na stránce www.zytovision.com.

ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/ Německo
Telefon: +49 471 4832-300
Fax: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
E-mail: info@zytovision.com

Ochranné známky:
ZytoVision® a Zyto*Light*® jsou ochranné známky společnosti ZytoVision GmbH.