



## ZytoDot 2C SPEC ERBB2/CEN 17 Probe

REF	C-3032-100	▽	10 (0.1 ml)
REF	C-3032-400	▽	40 (0.4 ml)

Für den qualitativen Nachweis von Amplifikationen des humanen ERBB2-Gens und Alpha-Satelliten von Chromosom 17 mittels chromogener *in-situ*-Hybridisierung (CISH)

4250380P078RA



In-vitro-Diagnostikum  
gemäß IVDR (EU) 2017/746

### 1. Verwendungszweck

Die ZytoDot 2C SPEC ERBB2/CEN 17 Probe (PD12) ist für den qualitativen Nachweis von Amplifikationen des humanen ERBB2-Gens sowie für den Nachweis von Alpha-Satelliten von Chromosom 17 in Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Geweben, wie z. B. Brustkrebs, durch chromogene *in-situ*-Hybridisierung (CISH) bestimmt. Die Sonde ist für die Verwendung in Kombination mit dem ZytoDot 2C CISH Implementation Kit (Prod. Nr. C-3044-10/-40) vorgesehen.

Das Produkt ist nur für den professionellen Gebrauch bestimmt. Alle Tests, bei denen das Produkt verwendet wird, sollten in einem zertifizierten, zugelassenen anatomisch-pathologischen Labor unter der Aufsicht eines Pathologen/Humangenetiklers von qualifiziertem Personal durchgeführt werden.

Die Sonde ist als Hilfsmittel für die Differentialdiagnose von Brustkrebs vorgesehen, und therapeutische Maßnahmen sollten nicht allein auf der Grundlage des Testergebnisses eingeleitet werden.

### 2. Prinzip der Methode

Die chromogene *in-situ*-Hybridisierung (CISH) erlaubt den Nachweis und die Visualisierung von spezifischen Nukleinsäuresequenzen in Zellpräparationen. Haptenmarkierte Nukleotid-Fragmente, sogenannte CISH-Sonden, und deren komplementäre Zielsequenzen in den Präparationen werden co-denaturiert und können anschließend während der Hybridisierung binden. Danach werden unspezifische und ungebundene Sondenfragmente durch Stringenzwaschschritte entfernt. Die Duplex-Bildung der markierten Sonde wird mittels primärer (nicht markierter) Antikörper sichtbar gemacht, welche von sekundären polymerisierten Enzym-konjugierten Antikörpern detektiert werden. Die enzymatische Reaktion mit den chromogenen Substraten führt zur Bildung von Farbpräzipitaten. Nach der Gegenfärbung des Zellkerns mit einer Zellkern-Färbung können die hybridisierten Sondenfragmente mit einem Lichtmikroskop visualisiert werden.

### 3. Enthaltene Reagenzien

Die ZytoDot 2C SPEC ERBB2/CEN 17 Probe besteht aus:

- Digoxigenin-markierten Polynukleotiden (~1.1 ng/μl), die gegen Sequenzen in 17q12\* (chr17:37,725,661-37,973,541) gerichtet sind, welche die ERBB2-Genregion enthalten (siehe Abb. 1).
- Dinitrophenyl-markierten Polynukleotiden (~1.1 ng/μl), die gegen Sequenzen in 17p11.1-q11.1 gerichtet sind, die spezifisch für die zentromerische Alpha-Satelliten-Region D17Z1 von Chromosom 17 sind.
- Hybridisierungsbuffer auf Basis von Formamid

\*nach Human Genome Assembly GRCh37/hg19

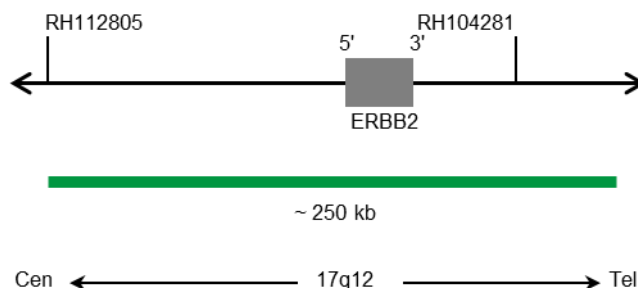


Abb. 1: SPEC ERBB2 Sondenlokalisierung (nicht maßstabsgetreu)

Die ZytoDot 2C SPEC ERBB2/CEN 17 Probe ist verfügbar in zwei Größen:

- C-3032-100: 0.1 ml (10 Reaktionen von je 10 μl)
- C-3032-400: 0.4 ml (40 Reaktionen von je 10 μl)

### 4. Benötigte, aber nicht bereitgestellte Materialien

- ZytoDot 2C CISH Implementation Kit (Prod. No. C-3044-10/-40)
- Positive und negative Kontrollproben
- Objektträger, positiv geladen
- Wasserbad (80°C, 98°C)
- Hybridizer oder Wärmeplatte
- Hybridizer oder Feuchtekkammer im Hybridisierungssofen
- Verstellbare Pipetten (10 μl, 1000 μl)
- Küvetten oder Färbetröge
- Stoppuhr
- Kalibriertes Thermometer
- Ethanol oder denaturierter Alkohol
- Xylol
- Methanol 100%
- Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30%
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser
- Deckgläser (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Naturkautschuk-Klebstoff, z.B. Fixogum Rubber Cement (Prod. Nr. E-4005-50/-125) oder Ähnliches
- Regelmäßig gewartetes Lichtmikroskop (400-630x)

### 5. Lagerung und Handhabung

Bei 2-8°C in aufrechter Position lagern. Unmittelbar nach Gebrauch wieder unter Lagerbedingungen aufbewahren. Keine Reagenzien nach Ablauf des auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatums verwenden. Das Produkt ist bei sachgemäßer Handhabung bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil.

### 6. Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Gebrauchsanweisung vor der Verwendung lesen!
- Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden!
- Dieses Produkt enthält Substanzen (in geringen Konzentrationen und Volumina), welche gesundheitsschädlich und potentiell infektiös sind. Jeder direkte Kontakt mit den Reagenzien muss vermieden werden. Entsprechende Schutzmaßnahmen (Verwendung von Einmalhandschuhen, Schutzbrille und Laborbekleidung) sind zu ergreifen!
- Schwerwiegende Vorfälle, die im Zusammenhang mit dem Produkt aufgetreten sind, in Übereinstimmung mit den örtlichen Vorschriften dem Hersteller sowie den zuständigen Behörden melden!

- Sollten Reagenzien mit der Haut in Kontakt kommen, die betroffenen Stellen sofort mit viel Wasser abspülen!
- Ein Sicherheitsdatenblatt ist auf Anfrage für den professionellen Anwender verfügbar.
- Reagenzien nicht wiederverwenden, außer die Wiederverwendung ist ausdrücklich erlaubt!
- Kreuzkontaminationen der Präparate vermeiden, da diese zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
- Die Präparate dürfen während der Hybridisierungs- und Waschstschritte nicht austrocknen!

#### Gefahren- und Sicherheitshinweise:

Die gefahrbestimmende Komponente ist Formamid.



#### Gefahr

H351	Kann vermutlich Krebs erzeugen.
H360FD	Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
H373	Kann die Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition.
P201	Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
P202	Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.
P260	Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen.
P280	Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
P308+P313	Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P405	Unter Verschluss aufbewahren.

#### 7. Einschränkungen

- Für die Verwendung als In-vitro-Diagnostikum.
- Nur für die professionelle Anwendung.
- Nur für den nicht-automatischen Gebrauch.
- Die klinische Interpretation jeglicher positiven Färbung bzw. deren Abwesenheit muss im Kontext mit der klinischen Anamnese, Morphologie, anderer histopathologischer Kriterien sowie weiterer diagnostischer Tests erfolgen. Es obliegt der Verantwortung eines qualifizierten Pathologen, mit CISH Sonden, Reagenzien, Diagnose-Panels und den zur Erstellung von gefärbten Präparaten verwendeten Methoden vertraut zu sein. Die Färbung ist in einem zertifizierten, lizenzierten Labor unter Aufsicht eines Pathologen durchzuführen, der für die Auswertung der Färbepreparate und für die Sicherstellung der Eignung von positiven und negativen Kontrollen verantwortlich ist.
- Die Färbung der Präparate, insbesondere die Signalintensität und die Hintergrundfärbung, ist abhängig von der Behandlung und Prozessierung der Präparate vor der Färbung. Unsachgemäßes Fixieren, Einfrieren, Auftauen, Waschen, Trocknen, Erhitzen, Schneiden oder Kontamination mit anderen Präparaten oder Flüssigkeiten können Artefakte oder falsche Ergebnisse verursachen. Inkonsistente Ergebnisse können von Variationen bei Fixierungs- und Einbettungsverfahren sowie von inhärenten Unregelmäßigkeiten innerhalb des Präparates resultieren.
- Die Sonde ist nur für den Nachweis der Loci, die in Kapitel 3 „Enthaltene Reagenzien“ beschrieben werden, zu verwenden.
- Die Leistung wurde unter Verwendung der in dieser Gebrauchsanweisung beschriebenen Verfahren validiert. Abweichungen von diesen Verfahren können die Leistung beeinflussen und müssen vom Anwender validiert werden. Dieses IVD ist nur dann CE-zertifiziert, wenn es wie in dieser Gebrauchsanweisung beschrieben im Rahmen der bestimmungsgemäßen Verwendung eingesetzt wird.

#### 8. Störsubstanzen

Folgende Fixierungen sind nicht kompatibel mit ISH:

- Bouin Fixierung
- B5 Fixierung
- Saure Fixiermittel (z.B. Pikrinsäure)
- Zenker Fixierung
- Alkohole (bei alleiniger Verwendung)
- Quecksilberchlorid
- Formaldehyd/Zink Fixiermittel
- Hollande Fixierung
- Ungepuffertes Formalin

#### 9. Vorbereitung der Präparate

Die Präparatevorbehandlung ist wie in der Gebrauchsanweisung des [ZytoDot 2C CISH Implementation Kit](#) beschrieben durchzuführen.

#### 10. Vorbereitung der Reagenzien

Das Produkt ist gebrauchsfertig. Kein Rekonstituieren, Mischen oder Verdünnen ist notwendig. Die Sonde vor der Anwendung lichtgeschützt auf Raumtemperatur (18-25°C) bringen. Vor dem Öffnen durch Vortexen mischen und kurz herunterzentrifugieren.

#### 11. Testverfahren

##### Vorbereitung der Präparate

Die Präparatevorbehandlung (Entwaxen, Proteolyse) wie in der Gebrauchsanweisung des [ZytoDot 2C CISH Implementation Kit](#) beschrieben durchzuführen.

##### Denaturierung und Hybridisierung

1. 10 µl der Sonde auf jedes der vorbehandelten Präparate pipettieren.
  2. Die Präparate mit 22 mm x 22 mm Deckgläser abdecken (Einschluss von Luftbläschen vermeiden) und das Deckglas versiegeln.
- Wir empfehlen die Verwendung von Naturkautschuk-Klebstoff (z.B. Fixogum zum Versiegeln.*
3. Die Objektträger auf einer Wärmeplatte oder in einem Hybridizer platzieren und die Proben für 5 min bei 79 °C denaturieren.
  4. Die Objektträger in eine Feuchteammer im Hybridisierungsöfen überführen und übernacht bei 37 °C hybridisieren.

*Es ist wichtig, dass die Proben während des Hybridisierungsschritts nicht austrocknen.*

##### Post-Hybridisierung

Perform Die Post-Hybridisierung (Waschen, Detektion, Gegenfärbung, Eindecken, Mikroskopie) gemäß der Gebrauchsanweisung des [ZytoDot 2C CISH Implementation Kit](#) durchführen.

#### 12. Interpretation der Ergebnisse

Bei Verwendung des [ZytoDot 2C CISH Implementation Kits](#) erscheinen die Hybridisierungssignale der Digoxigenin-markierten Polynukleotide als dunkelgrün gefärbte eindeutige Punkte (ERBB2-Genregion) und Dinitrophenyl-markierte Polynukleotide erscheinen als hellrot gefärbte eindeutige Punkte (CEN 17).

**Normale Situation:** In Interphasen von normalen Zellen oder Zellen ohne eine Amplifikation der ERBB2-Genregion erscheinen zwei grüne und zwei rote eindeutig punktförmige Signale (siehe Abb. 2).

**Aberrante Situation:** In Zellen mit einer Amplifikation der ERBB2-Genregion können eine erhöhte Anzahl grüner Signale oder grüne Signalcluster beobachtet werden (siehe Abb. 2).

Sich überlagernde Signale können als braune Signale erscheinen.

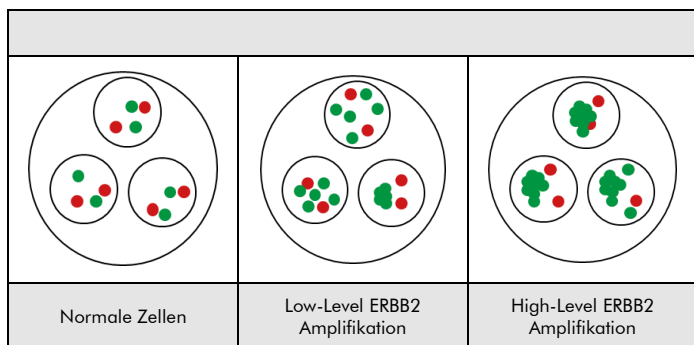


Abb. 2: Zu erwartende Ergebnisse in normalen und aberranten Zellkernen

Bei einigen aberranten Präparaten können andere Signalmuster als die oben beschriebenen beobachtet werden. Diese unerwarteten Signalmuster sollten weiter untersucht werden.

**Bitte beachten:**

- Aufgrund von dekondensiertem Chromatin können einzelne CISH-Signale als kleine Signal-Cluster erscheinen. Daher sollten zwei oder drei Signale der gleichen Größe mit einer Distanz von  $\leq 1$  Signaldurchmesser als ein Signal gewertet werden.
- Vor Auszählung der Signale sollte das Präparat auf jegliche mögliche intratumorale Heterogenität bei einer 100-200fachen Vergrößerung untersucht werden.
- Die Signale sollten mindestens mit einer 400fachen Vergrößerung visualisiert werden, sodass die Signale gut zu erkennen sind. Für Sonden zum Nachweis von Chromosomenbrüchen wird eine 630fache Vergrößerung empfohlen. Verwenden Sie keine kontrastverstärkenden Filterlinsen, da dies die Signalfarbe verzerren könnte. Um Signale in hellen Farben zu erhalten, öffnen Sie die Aperturblende. Stellen Sie sicher, dass Sie bei der Auswertung eines Zellkerns nach oben und unten fokussieren, da sich rote und grüne Signale übereinander befinden können.
- Keine nekrotischen Bereiche, sich überlagernde Zellkerne, überverdauten Zellkerne oder Zellkerne mit schwacher Signalintensität auswerten.
- Zusätzliche Signale können aufgrund von Mitose auch in einem kleinen Prozentsatz von nicht-neoplastischen Zellen auftreten. Aufgrund von Schnitt-Artefakten können bei Paraffin-eingebetteten Geweben gelegentlich Zellkerne mit fehlenden Signalen beobachtet werden.
- Ein negatives oder unspezifisches Ergebnis kann durch verschiedene Faktoren verursacht werden (siehe Kapitel 16 "Fehlerbehebung").
- Um die Ergebnisse korrekt zu interpretieren, muss der Anwender das Produkt vor der Anwendung in diagnostischen Verfahren unter Berücksichtigung nationaler und/oder internationaler Richtlinien validieren.

**13. Empfohlene Qualitätskontrollverfahren**

Um die korrekte Funktionsweise der verwendeten Präparate und Testreagenzien zu überwachen, sollte jeder Test von internen und externen Kontrollen begleitet werden. Falls interne und/oder externe Kontrollen keine adäquate Färbung zeigen, müssen die Ergebnisse der Patientenproben als ungültig angesehen werden.

**Interne Kontrolle:** Nicht-neoplastische Zellen innerhalb des Präparates, die ein normales Signalmuster aufweisen, z.B. Fibroblasten.

**Externe Kontrolle:** Validierte positive und negative Kontrollproben.

**14. Leistungsmerkmale**

**14.1 Analytische Leistung**

Die Leistung der Sonde wurde durch den Vergleich mit der entsprechenden IVD-zugelassenen FISH-Sonde bestimmt.

Analytische Sensitivität:	100% (95% CI 98.5 – 100.0)
Analytische Spezifität:	100% (95% CI 97.0 – 100.0)

**14.2 Klinische Leistung**

Diagnostische Sensitivität	91% (95% CI 86.0 – 95.0) auf der Grundlage eines bivariaten Modells
Diagnostische Spezifität	97% (95% CI 93.0 – 99.0) auf der Grundlage eines bivariaten Modells

**15. Entsorgung**

Die Entsorgung der Reagenzien muss in Übereinstimmung mit den örtlichen Vorschriften erfolgen.

**16. Fehlerbehebung**

Jede Abweichung von der Gebrauchsanweisung kann zu schwachen bis gar keinen Färbungen führen. Weitere Informationen erhalten Sie unter [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com).

**Schwache oder keine Signale**

Mögliche Ursache	Lösung
Proteolytische Vorbehandlung nicht optimal	Die Inkubationszeit mit Pepsin optimieren, falls notwendig erhöhen oder reduzieren
Verdunstung der Sonde	Bei der Nutzung eines Hybridizers ist die Verwendung von feuchten Vliesstreifen/Wassertanks erforderlich. Bei der Nutzung eines Hybridisierofens muss eine Feuchtekkammer verwendet werden. Zusätzlich sollte das Deckglas, z.B. mit Fixogum, vollständig versiegelt werden, um ein Austrocknen der Präparat während der Hybridisierung zu verhindern.
Dauer der Gegenfärbung zu lang	Dunkle Gegenfärbungen vermeiden, da diese positive Signale verdecken könnten
Bläuen der Gegenfärbung nicht ausreichend durchgeführt	Für das Bläuen kaltes Leitungswasser verwenden; kein warmes bzw. heißes Wasser oder Bläuungsreagenzien verwenden

**Signale sind zu stark**

Mögliche Ursache	Lösung
Dauer der proteolytischen Vorbehandlung zu lang	Die Inkubationszeit mit Pepsin optimieren, falls notwendig erhöhen oder reduzieren
Inkubationszeit mit AP-Red Solution nicht korrekt	Falls erforderlich kann die Inkubationszeit bis auf 5 min verkürzt werden; die Substratlösung nicht über 25°C erhitzen; nur bei Raumtemperatur inkubieren
Inkubationszeit mit HRP-Green Solution nicht korrekt	Falls erforderlich, kann die Inkubationszeit bis auf 7 min verkürzt werden; die Substratlösung nicht über 25°C erhitzen; nur bei Raumtemperatur inkubieren

**Rote Signale zu schwach**

Mögliche Ursache	Lösung
AP-Red Solution wurde starkem direktem Licht ausgesetzt	AP-Red Solution vor starkem direktem Licht geschützt vorbereiten und verwenden
AP-Red Solution wurde zu früh vorbereitet	Vor der sofortigen Verwendung vorbereiten
Inkubationszeit mit AP-Red Solution nicht korrekt	Falls erforderlich kann die Inkubationszeit bis zu 15 min verlängert werden
Unzureichende Vorbereitung des chromogenen Substrates	Das Volumen von Solution A nicht erhöhen

**Grüne Signale zu schwach**

Mögliche Ursache	Lösung
Inkubationszeit der Waschschritte nach der Färbung mit HRP-Green zu lang	Die angegebenen Inkubationszeiten nicht überschreiten
Inkubationszeit mit HRP-Green Solution nicht korrekt	Falls erforderlich kann die Inkubationszeit bis zu 15 min verlängert werden
Unzureichende Vorbereitung des chromogenen Substrates	Das Volumen von Solution A nicht erhöhen

**Signale verblassen oder verschmelzen**

Mögliche Ursache	Lösung
Verwendung eines ungeeigneten Eindeckmediums	Nur das Eindeckmedium, welches mit dem Kit zur Verfügung gestellt wird, oder Xylol-basierte Eindeckmedien frei von Unreinheiten verwenden; keine Eindeckfolie verwenden
Schnitte wurden nicht ausreichend dehydriert	Frische Ethanol- und Xylol-Lösungen verwenden, nur Xylol mit „reiner“ Qualität verwenden

**Ungleichmäßige oder teils nur sehr leichte Färbung**

Mögliche Ursache	Lösung
Unvollständiges Entparaffinieren	Frische Lösungen verwenden, Dauer des Entparaffinierens überprüfen
Volumen der Reagenzien zu gering	Sicherstellen, dass das Volumen der Reagenzien groß genug ist, um den Bereich des Gewebes zu bedecken

**Inkonsistente Ergebnisse**

Mögliche Ursache	Lösung
Unzureichende Trocknung vor Applikation der Sonde	Lufttrocknung verlängern
Zu viel Wasser/Waschpuffer auf dem Gewebe vor Applikation von Pepsin, Antikörpern und/oder Farbsubstraten	Überschüssige Flüssigkeit durch Abklopfen oder Abschütteln des Objektträgers von dem Gewebeschnitt entfernen. Kleinere Mengen an restlichem Wasser/Waschpuffer beeinträchtigen nicht den Test
Variierende Methoden der Gewebefixierung oder Einbettung	Methoden der Fixierung und Einbettung optimieren
Variierende Gewebedicke	Schneiden optimieren

**Degradierte Morphologie**

Mögliche Ursache	Lösung
Zell- oder Gewebeproben sind nicht optimal fixiert	Die Fixierzeit und das Fixiermittel optimieren
Proteolytische Vorbehandlung zu stark	Die Inkubationszeit mit Pepsin reduzieren

**Kreuzhybridisierungssignale, Hintergrundsignale**

Mögliche Ursache	Lösung
Schnitte sind irgendwann während oder nach der Hybridisierung ausgetrocknet	Das Austrocknen der Schnitte vermeiden; Feuchtekammern verwenden; Deckglas sorgfältig abdichten
Verlängerte Inkubationszeit des Substrates	Inkubationszeit des Substrates verkürzen
Unvollständiges Entparaffinieren	Frische Lösungen verwenden, Dauer des Entparaffinierens überprüfen
Proteolytische Vorbehandlung zu stark	Inkubationszeit von Pepsin optimieren

Objektträger sind vor der Hybridisierung auf Raumtemperatur abgekühlt	Die Objektträger zügig auf Hybridisierungstemperatur überführen
---	---

**Überlagernde Zellkerne**

Mögliche Ursache	Lösung
Ungeeignete Dicke der Gewebeschnitte	3-5 µm dicke Mikrotomschnitte anfertigen

**Präparat löst sich vom Objektträger**

Mögliche Ursache	Lösung
Proteolytische Vorbehandlung ist zu stark	Inkubationszeit mit Pepsin reduzieren

**17. Literatur**

- Ali AHM, et al. (2019) *Open Access Maced J Med Sci* 7: 1917.
- Bhargava R, et al. (2005) *Am J Clin Pathol* 123: 237-43.
- Hwang CC, et al. (2011) *Histopathology* 59: 984-92.
- Kurihara N, et al. (2019) *J Clin Pathol* 72: 603-608.
- Mayr D, et al. (2009) *Histopathology* 55: 716-23.
- Miligy IM, et al. (2019) *Br J Cancer* 120: 1075-1082.
- Nie X, et al. (2013) *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 33: 379-84.
- Pfarr N, et al. (2017) *Genes chromosomes cancer* 56: 255-264.
- Saito Y, et al. (2016) *Sci Rep* 6: 1-8.
- Schiavon BN, et al. (2012) *Am J Surg Pathol.*: 1489-1496
- 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.
- Wolf FF, et al. (2015) *J Bras Patol Med Lab* 51: 407-414.

**18. Revision**

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

Die aktuellste Gebrauchsanweisung sowie Gebrauchsanweisungen in verschiedenen Sprachen finden Sie unter [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com).

Unsere Experten stehen Ihnen für Ihre Fragen zur Verfügung. Bitte kontaktieren Sie [helptech@zytovision.com](mailto:helptech@zytovision.com). Einen Kurzbericht über Sicherheit und Leistung finden Sie unter [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com).



ZytoVision GmbH  
Fischkai 1  
27572 Bremerhaven/ Germany  
Telefon: +49 471 4832-300  
Fax: +49 471 4832-509  
[www.zytovision.com](http://www.zytovision.com)  
Email: [info@zytovision.com](mailto:info@zytovision.com)

**Warenzeichen:**

ZytoVision® und ZytoDot® sind Warenzeichen der ZytoVision GmbH.