*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)

Pour la détection qualitative des amplifications du gène ERBB2 humain et des satellites alpha du chromosome 17 par hybridation fluorescente *in situ* (FISH)

4250380P038QW

CE 0483 IVD

Dispositif médical de diagnostic *in vitro*

conformément à l'IVDR (UE) 2017/746

1. Utilisation prévue

La sonde Zyto*Light* SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe (**PL8**) est destinée à la détection qualitative des amplifications impliquant le gène humain ERBB2 ainsi qu'à la détection des satellites alpha du chromosome 17 dans des échantillons fixés au formol et inclus en paraffine, tels que le cancer du sein et le cancer de la jonction gastrique/gastro-œsophagienne, par hybridation in situ en fluorescence (FISH). La sonde est destinée à être utilisée en association avec le kit d'implementation ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (n° de produit Z-2028-5/-20).

Le produit est destiné à un usage professionnel uniquement. Tous les tests utilisant le produit doivent être réalisés dans un laboratoire d'anatomie pathologique certifié et agréé, sous la supervision d'un médecin pathologiste/généticien, par du personnel qualifié.

La sonde est destinée à être utilisée comme une aide au diagnostic différentiel et des mesures thérapeutiques ne doivent pas être prises sur la base du résultat de ce seul test.

2. Principe du test

L'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) permet la détection et la visualisation de séquences d'acide nucléique spécifiques dans une préparation cellulaire. Les fragments d'ADN marqués par fluorescence, appelés sondes FISH, et leurs brins d'ADN complémentaires dans les échantillons sont dénaturés et puis ré-appariés pendant l'hybridation. Par la suite, les fragments de sonde non spécifiques et non hybridés sont éliminés par des étapes de lavage stringent. Après une contre coloration de l'ADN avec du DAPI, les fragments de sondes hybridés sont visualisés au moyen d'un microscope à fluorescence équipé de filtres d'excitation et d'émission spécifiques aux fluorochromes avec lesquels les fragments de sondes FISH ont été marqués.

3. Réactifs fournis

Zyto*Light* SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe est composé de:

- Polynucléotides marqués au ZyGreen (excitation 503 nm/émission 528 nm) (~10,0 ng/µl), qui ciblent des séquences cartographiées en 17q12-q21.1* (chr17:37,572,531-38,181,308) hébergeant la région du gène ERBB2 (voir figure 1).
- Polynucléotides marqués au ZyOrange (excitation 547 nm/émission 572 nm) (~1,5 ng/µl), qui ciblent des séquences cartographiées dans 17p11.1-q11.1 spécifiques de la région centromérique satellite alpha D17Z1 du chromosome 17 (voir figure 1).
- Tampon d'hybridation à base de formol

* selon Human Genome Assembly GRCh37/hg19

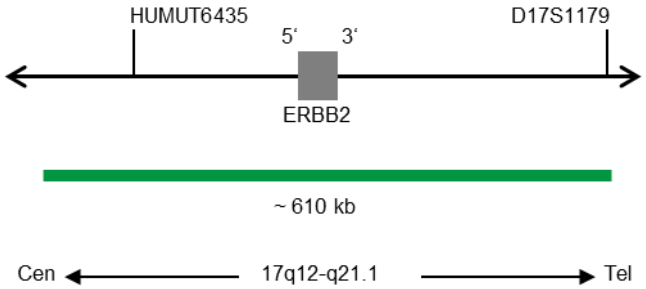

Fig. 1 : Carte de la sonde SPEC ERBB2 (pas à l'échelle)

La sonde Zyto*Light* SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe est disponible en deux tailles:

- Z-2015-50: 0,05 ml (5 réactions de 10 µl chacune)
- Z-2015-200: 0,2 ml (20 réactions de 10 µl chacune)

4. Matériel requis mais non fourni

- Zyto*Light* FISH-Tissue Implementation Kit (Prod. No. Z-2028-5/-20)
- Echantillons pour les contrôles positifs et négatifs
- Lames pour microscope, chargées positivement
- Bain-marie (37 °C, 98 °C)
- Système d'hybridation ou plaque chauffante
- Système d'hybridation ou chambre humide dans un four à hybridation
- Pipettes ajustables (10 µl, 25 µl)
- Pots ou bacs de coloration
- Chronomètre
- Thermomètre calibré
- Ethanol ou réactif à l'alcool
- Xylène
- Eau distillée ou déminéralisée
- Lamelles (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Ciment caoutchouc, par exemple : Fixogum Rubber Cement (Prod. N° E-4005-50/-125) ou similaire
- Microscope à fluorescence adéquatement entretenu (400-1000x)
- Huile à immersion compatible avec la microscopie à fluorescence
- Sets de filtres appropriés

5. Stockage et manipulation

Conserver entre 2 et 8 °C dans une position verticale et à l'abri de la lumière. Utiliser à l'abri de la lumière. Remettre dans les conditions de stockage immédiatement après utilisation. Ne pas utiliser les réactifs après leur date de péremption indiquée sur l'étiquette. Le produit est stable jusqu'à sa date de péremption indiquée sur l'étiquette lorsqu'il est utilisé dans les bonnes conditions.

6. Avertissements et précautions

- Lire les instructions avant utilisation !
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
- Ce produit contient des substances (en faibles concentrations et volumes) nocifs pour la santé et potentiellement infectieux. Eviter le contact direct avec ces réactifs. Prenez les mesures de protection appropriées (utilisez des gants jetables, des lunettes de protection et des vêtements de laboratoire) !

- Signaler tout incident grave survenu en rapport avec le produit au fabricant et à l'autorité compétente, conformément à la réglementation locale!
- Si les réactifs entrent en contact avec la peau, rincer immédiatement avec beaucoup d'eau.
- Une fiche signalétique de sécurité à l'usage de l'utilisateur professionnel est disponible sur demande.
- Ne pas réutiliser les réactifs, sauf si la réutilisation est explicitement autorisée!
- Éviter la contamination croisée des échantillons car cela peut entraîner des résultats erronés.
- La sonde ne doit pas être exposée à la lumière, en particulier à une lumière intense, pendant une longue période ; chaque étape doit être faite, si possible, dans l'obscurité et/ou en utilisant des récipients opaques.

Mentions de danger et conseils de prudence :

Le composant dangereux déterminant est le formol.

Danger

H351	Susceptible de provoquer le cancer.
H360FD	Peut nuire à la fertilité. Peut nuire au fœtus.
H373	Risque présumé d'effets graves pour les organes à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée.
P201	Se procurer les instructions spéciales avant utilisation.
P202	Ne pas manipuler avant d'avoir lu et compris toutes les précautions de sécurité.
P260	Ne pas respirer les poussières/fumées/gaz/ brouillards/vapeurs/aérosols.
P280	Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
P308+P313	EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée: consulter un médecin.
P405	Garder sous clef.

7. Restrictions

- Destiné à une utilisation en diagnostic *in vitro*.
- Destiné à un usage professionnel uniquement.
- Pour une utilisation non automatisée uniquement
- L'interprétation clinique de toute coloration positive, ou de son absence, doit être faite en tenant compte de l'historique clinique du patient, de la morphologie, d'autres critères histopathologiques ainsi que d'autres tests de diagnostic. Il est de la responsabilité d'un médecin pathologiste/généticien qualifié de se familiariser avec les sondes FISH, les réactifs, les panels de diagnostic et les méthodes utilisées pour produire la préparation colorée. La coloration doit être effectuée dans un laboratoire certifié et agréé, sous la supervision d'un pathologiste/généticien qui est responsable de l'examen des lames colorées et de la vérification du bon fonctionnement des contrôles positifs et négatifs.
- La coloration de l'échantillon, en particulier l'intensité du signal et le bruit de fond, dépend de la manipulation et de la préparation de l'échantillon avant marquage. Une mauvaise fixation, congélation, décongélation, un mauvais lavage, séchage, chauffage, de mauvaises coupes, ou une contamination avec d'autres échantillons ou fluides peut produire des artéfacts et de faux résultats. Des résultats incohérents peuvent résulter des variations des méthodes de fixation et d'inclusion, ainsi que des irrégularités inhérentes à l'échantillon.
- La sonde doit être utilisée uniquement pour la détection du locus décrit au paragraphe 3. « Réactifs fournis ».
- Les performances ont été validées en utilisant les procédures décrites dans ce mode d'emploi. Des modifications de ces procédures peuvent altérer les performances et doivent être validées par l'utilisateur. Ce réactif IVD est uniquement certifié CE lorsqu'il est utilisé comme décrit dans ce mode d'emploi, dans le cadre de l'utilisation prévue.

8. Substances interférentes

Les globules rouges présents dans l'échantillon peuvent présenter une autofluorescence qui entrave la reconnaissance du signal.

Les fixateurs suivants sont incompatibles avec la FISH :

- Fixateur de Bouin
- Fixateur B5
- Fixateurs acides (par exemple l'acide picrique)
- Fixateur de Zenker
- Alcools (lorsqu'ils sont utilisés seuls)
- Chlorure de mercure
- Fixateur formaldéhyde/zinc
- Fixateur de Hollande
- Formol non tamponné

9. Préparation des échantillons

Préparer les échantillons en suivant les instructions d'utilisation de ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit.

10. Traitement préparatoire du produit

Le produit est prêt à l'emploi. Il n'est pas nécessaire de le reconstituer, le mélanger ou le diluer. Mettre la sonde à température ambiante (18 à 25 °C) avant utilisation, à l'abri de la lumière. Avant d'ouvrir le tube, mélanger à l'aide d'un vortexeur et centrifuger brièvement.

11. Protocole

Prétraitement de l'échantillon
Effectuer le prétraitement de l'échantillon (déparaffinage et protéolyse) selon les instructions d'utilisation du ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit.

Dénaturation et hybridation

1. Mettre 10 µl de sonde sur chaque échantillon prétraité.
2. Couvrir les échantillons avec des lamelles de 22 mm x 22 mm (en évitant les bulles) et sceller les lamelles.

Nous recommandons d'utiliser un ciment caoutchouc (par exemple le Fixogum) pour sceller.

3. Placer les lames sur une plaque chauffante ou dans un système d'hybridation pour dénaturer les échantillons pendant 10 min à 75 °C.
4. Transférer les lames dans une chambre humide et hybrider toute la nuit à 37 °C (par exemple dans un four à hybridation).

Il est essentiel que les échantillons ne sèchent pas pendant l'étape d'hybridation.

Post-hybridation
Effectuer l'étape de post-hybridation (lavage, contre-coloration et visualisation au microscope à fluorescence) en suivant les instructions d'utilisation du ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit.

12. Interprétation des résultats

Avec l'utilisation de filtres appropriés, les signaux d'hybridation de la sonde apparaissent en vert (région du gène ERBB2) et en orange (CEN 17).

Situation normale : Dans les interphases de cellules normales ou de cellules sans amplification impliquant la région du gène ERBB2, deux signaux verts et deux signaux orange apparaissent (Voir figure 2).

Situation aberrante : Dans les cellules présentant une amplification de la région du gène ERBB2, on observe un nombre accru de signaux verts ou de grappes de signaux verts (Voir figure 2).

Les signaux qui se chevauchent peuvent apparaître comme des signaux jaunes

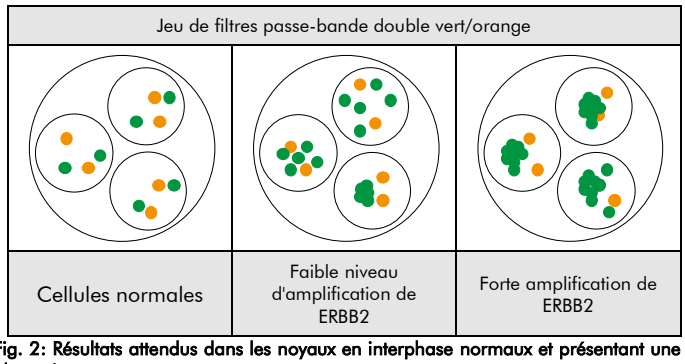

Fig. 2: Résultats attendus dans les noyaux en interphase normaux et présentant une aberration

D'autres modèles de signaux que ceux décrits ci-dessus peuvent être observés dans certains échantillons anormaux. Ces signaux inattendus doivent être examinés de manière plus approfondie.

Veuillez noter :

- En raison de la chromatine décondensée, les signaux FISH simples peuvent apparaître comme de petits groupes de signaux. Ainsi, deux ou trois signaux de même taille, séparés par une distance ≤ 1 au diamètre de signal, doivent être comptés comme un seul signal.
- Ne pas prendre en compte les chevauchements de noyaux.
- Ne pas compter les noyaux trop digérés (reconnaissables par des zones noires visibles dans le noyau).
- Ne pas compter des noyaux ayant une forte auto-fluorescence, ce qui entrave la reconnaissance du signal.
- Un résultat négatif ou non spécifique peut être causé par de multiples facteurs (voir chapitre 16 "Assistance").
- Afin d'interpréter correctement les résultats, l'utilisateur doit valider ce produit avant de l'utiliser dans des procédures de diagnostic conformément aux directives nationales et/ou internationales.

13. Procédures de contrôle qualité recommandées

Afin de surveiller les performances correctes des spécimens traités et des réactifs d'essai, chaque dosage doit être accompagné de contrôles internes et externes. Si les contrôles internes et / ou externes n'indiquent pas une coloration appropriée, les résultats avec les échantillons de patients doivent être considérés comme invalides.

Contrôle interne : Cellules non néoplasiques dans l'échantillon qui présentent un motif de signal normal, par exemple des fibroblastes.

Contrôle externe : Echantillons contrôles négatifs et positifs validés.

14. Caractéristiques de performances

14.1 Performance analytique

Les performances ont été évaluées conformément au mode d'emploi du kit ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit.

Sensibilité analytique:	100% (95% CI 98.5 – 100.0)
Spécificité analytique:	100% (95% CI 97.0 – 100.0)

La reproductibilité d'un jour à l'autre a été testée en comparant les résultats obtenus par un examinateur sur 10 jours différents et en évaluant la concordance.

	Pourcentage d'accord
échantillon négatif	100%
échantillon positif	100%

La répétabilité a été testée en comparant les résultats répétés obtenus par un examinateur sur 10 jours différents et en évaluant la concordance.

	Pourcentage d'accord
échantillon négatif	100%
échantillon positif	100%

14.2 Performance clinique

Sensibilité diagnostique:	**Cancer du sein:** 93% (95% CI 91.0 – 95.0) sur la base d'un modèle à deux variables **Cancer gastrique et cancer de la jonction gastro-œsophagienne:** 88% (95% CI 74.0 – 95.0) sur la base d'un modèle à deux variables
Spécificité diagnostique:	**Cancer du sein:** 98% (95% CI 97.0 – 99.0) sur la base d'un modèle à deux variables **Cancer gastrique et cancer de la jonction gastro-œsophagienne:** 95% (95% CI 92.0 – 97.0) sur la base d'un modèle à deux variables

15. Elimination

L'élimination des réactifs doit être effectuée conformément à la réglementation locale.

16. Assistance

Tout écart par rapport au mode d'emploi peut conduire à des résultats de coloration inférieurs ou à aucune coloration du tout. Se référer www.zytovision.com pour plus d'information

Faible signal ou aucun signal

Cause possible	Action
L'échantillon de cellules ou de tissu n'est pas correctement fixé	Optimiser le temps de fixation et le fixateur utilisé ou ajouter une étape de post-fixation en suivant le « Protocole » du manuel du ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit
Le prétraitement protéolytique n'est pas effectué correctement	Optimiser le temps d'incubation de la pepsine, l'augmenter ou le diminuer si nécessaire
Evaporation de la sonde	Lors de l'utilisation d'un système d'hybridation, l'utilisation des bandes humides/réservoirs remplis d'eau est obligatoire. Lors de l'utilisation d'un four à hybridation, il faut utiliser une chambre humide. En outre, la lamelle doit être complètement scellée, par exemple avec du Fixogum, afin d'empêcher le séchage de l'échantillon lors de l'hybridation
Mauvais sets de filtres utilisés	Utiliser les sets de filtres appropriés aux fluorochromes de la sonde. *Les sets de filtres à triple bande passante offrent moins de luminosité par rapport aux sets de filtres à simple ou double bande passante. Par conséquent, les signaux peuvent sembler plus faibles en utilisant les sets de filtres à triple bande passante*

Signaux d'hybridation croisée ; bruit de fond

Cause possible	Action
Déparaffinage incomplet	Utiliser de nouvelles solutions ; vérifier le temps de déparaffinage
Prétraitement protéolytique trop important	Réduire le temps d'incubation de la pepsine
Les lames sont refroidies à température ambiante avant l'hybridation	Transférer les lames rapidement à 37 °C

Morphology degraded

Cause possible	Action
Les échantillons de cellules ou de tissus n'ont pas été fixés correctement	Optimiser le temps de fixation et le fixateur ou ajouter une étape de post-fixation en suivant le « Protocole » du manuel ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit
Le prétraitement protéolytique n'est pas effectué correctement	Optimiser le temps d'incubation de la pepsine, le diminuer si nécessaire
Séchage insuffisant avant l'application de la sonde	Prolonger le séchage à l'air

Noyaux chevauchants

Cause possible	Action
Epaisseur inappropriée des sections de tissu	Préparer des coupes au microtome de 2-4 µm d'épaisseur

Echantillon glissant sur la lame

Cause possible	Action
Prétraitement protéolytique trop fort	Réduire le temps d'incubation de la pepsine

Contre coloration faible

Cause possible	Action
Solution DAPI faiblement concentrée	Utiliser à la place le produit DAPI/DuraTect-Solution (ultra) (Prod. No. MT-0008-0.8)
Temps d'incubation avec le DAPI trop court	Ajuster le temps d'incubation avec le DAPI

17. Bibliographie

- 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. Revision

Revision	Description du changement
4.1.1	Changement d'organisme notifié 14. Caractéristiques de performances Ajouter la précision

www.zytovision.com

Se référer www.zytovision.com pour les instructions les plus récentes ou pour les instructions les plus récentes dans différentes langues

Nos experts sont disponibles pour répondre à vos questions.
Merci de nous contacter à helptech@zytovision.com
Pour un résumé des performances et de la sécurité, se référer à www.zytovision.com.

ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/Allemagne
Téléphone : +49 471 4832-300
Fax : +49 471 4832-509
www.zytovision.com
Courriel : info@zytovision.com

Marques déposées :
ZytoVision® et ZytoLight® sont des marques déposées de ZytoVision GmbH.