



ZytoDot SPEC ERBB2 Probe

REF C-3001-400

Σ 40 (0,4 ml)

Az emberi ERBB2 gén amplifikációinak minőségi kimutatására kromogén *in situ* hibridizációval (CISH)

4250380P055QW



In vitro diagnosztikai orvostechikai eszköz
az IVDR (EU) 2017/746 szerint

1. Rendeltetésszerű cél

A ZytoDot SPEC ERBB2 Probe (PD1) a humán ERBB2 gént érintő amplifikációk minőségi kimutatására szolgál formalinban rögzített, paraffinba ágyazott mintákban, például emlőrákban, kromogén *in situ* hibridizációval (CISH). A szondát a ZytoDot CISH Implementation Kit (Prod. No. C-3018-40) készlettel együtt kell használni.

A termék kizárólag professzionális használatra készült. A termékkel végzett valamennyi vizsgálatot minősített, engedéllyel rendelkező anatómiai patológiai laboratóriumban, patológus/humángenetikus felügyelete mellett, szakképzett személyzetnek kell elvégeznie.

A próba az emlőrák differenciáldiagnózisának segédeszközeként szolgál, és terápiás intézkedéseket nem szabad kizárólag a teszteredmény alapján kezdeményezni.

2. A vizsgálat elve

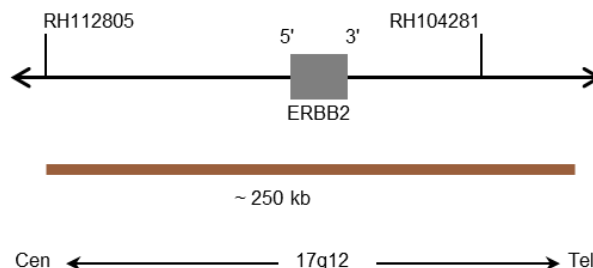
A kromogén *in situ* hibridizációs (CISH) technika lehetővé teszi specifikus nukleinsav-szekvenciák kimutatását és vizualizálását sejtkészítményekben. Hapten-jelölt nukleotidfragmentumok, úgynevezett CISH-szondák és a preparátumokban lévő komplementer célszekvenciák együttesen denaturálódnak, majd a hibridizáció során hagyják, hogy egymáshoz kapcsolódjanak. Ezt követően a nem specifikus és nem kötött szondafragmentumokat szigorú mosási lépésekkel távolítják el. A jelölt szonda duplexképződése elsődleges (nem jelölt) antitestekkel láthatóvá tehető, amelyeket másodlagos polimerizált enzimkonjugált antitestekkel detektálunk. Az enzimatis reakció kromogén szubsztátokkal színes csapadékok képződéséhez vezet. A sejtmag nukleáris festékekkel történő ellenfestése után a hibridizált szondafragmentumok fénymikroszkópiával láthatóvá válnak.

3. Rendelkezésre bocsátott reagensek

A ZytoDot SPEC ERBB2 Probe a következőkből áll:

- Digoxigeninnel jelölt polinukleotidok (~1,8 ng/μl), amelyek a 17q12* (chr17:37,725,661-37,973,541), az ERBB2 gén régióját rejtő szekvenciákat célozzák (lásd az 1. ábrát).
- Formamid alapú hibridizációs puffer

*a Human Genome Assembly szerint GRCh37/hg19



1. ábra: SPEC ERBB2 (nem méretarányos)

A ZytoDot SPEC ERBB2 Probe egy méretben kapható:

- C-3001-400: 0,4 ml (40 reakció, egyenként 10 μl)

4. Szükséges, de nem biztosított anyagok

- ZytoDot CISH Implementation Kit (Prod. No. C-3018-40)
- Pozitív és negatív kontrollminták
- Mikroszkópos tárgylemezek, pozitív töltésű
- Vízfürdő (80 °C, 98 °C)
- Hibridizáló vagy főzőlap
- Hibridizáló vagy pára kamra a hibridizációs kemencében
- Állítható pipetták (10 μl, 1000 μl)
- Festőedények vagy fürdők
- Időzítő
- Kalibrált hőmérő
- Etanol vagy reagens alkohol
- Xilol
- Metanol 100%
- Hidrogén-peroxid (H₂O₂) 30%
- Deionizált vagy desztillált víz
- fedőlemezek (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Gumicement, pl. Fixogum Rubber Cement (Prod. No. E-4005-50/-125) vagy hasonló.
- Megfelelően karbantartott fénymikroszkóp (400-630x)

5. Tárolás és kezelés

2-8 °C-on, függőleges helyzetben tárolja. Használat után azonnal állítsa vissza a tárolási körülmények közé. Ne használja fel a reagenseket a címkén feltüntetett lejárati időn túl. A termék a címkén feltüntetett lejárati dátumig stabil, ha megfelelően kezelik.

6. Figyelmeztetések és óvintézkedések

- Használat előtt olvassa el a használati utasítást!
- Ne használja fel a reagenseket a lejárati idő lejártá után!
- Ez a termék (kis koncentrációban és mennyiségben) egészségre káros és potenciálisan fertőző anyagokat tartalmaz. Kerülje a reagensekkel való közvetlen érintkezést. Tegyen megfelelő védőintézkedéseket (használgon eldobható kesztyűt, védőszemüveget és laboratóriumi ruházatot)!
- A termékkel kapcsolatban bekövetkezett minden súlyos eseményt jelentsen a gyártónak és a helyi előírásoknak megfelelően az illetékes hatóságoknak!
- Ha a reagensek bőrrel érintkeznek, azonnal öblítse le a bőrt bőseges mennyiségű vízzel!
- A professzionális felhasználók számára kérésre biztonsági adatlap áll rendelkezésre.

- Ne használja újra a reagenseket, kivéve, ha az újrafelhasználás kifejezetten engedélyezett!
- Kerülje a minták keresztzennyeződését, mivel ez hibás eredményekhez vezethet.
- A minták nem száradhatnak meg a hibridizációs és mosási lépések alatt.

Veszélyre és óvintézkedésekre vonatkozó nyilatkozatok:

A veszélyt meghatározó komponens a formamid.



Veszély

H351	Feltehetően rákot okoz.
H360FD	Károsíthatja a termékenységet. Károsíthatja a magzatot.
H373	Hosszan tartó vagy ismételt expozíció esetén szervi károsodást okozhat.
P201	Használat előtt kérje be a speciális utasításokat.
P202	Ne kezelje, amíg az összes biztonsági óvintézkedést el nem olvasta és meg nem értette.
P260	Ne lélegezze be a port/füstöt/gázt/ködöt/gőzt/permetet.
P280	Viseljen védőkesztyűt/védő ruházatot/szemvédőt/arcvédőt.
P308+P313	HA ki van téve vagy érintett: Kérjen orvosi tanácsot/megfigyelést.
P405	Elzárva tárolandó.

7. Korlátozások

- *In vitro* diagnosztikai felhasználásra.
- Kizárólag professzionális használatra.
- Kizárólag nem automatizált használatra.
- A pozitív festődés klinikai értelmezését vagy annak hiányát a klinikai anamnézis, a morfológia, az egyéb szövettani kritériumok, valamint az egyéb diagnosztikai vizsgálatok összefüggésében kell elvégezni. A szakképzett patológus/humángenetikus felelőssége, hogy ismerje a CISH-szondákat, a reagenseket, a diagnosztikai paneleket és a festett preparátum előállításához használt módszereket. A festést minősített, engedélyezett laboratóriumban kell elvégezni, patológus/humángenetikus felügyelete mellett, aki felelős a festett tárgylemezek felülvizsgálatáért és a pozitív és negatív kontrollok megfelelőségének biztosításáért.
- A minták festése, különösen a jelintenzitás és a háttérfestés, függ a minta festést megelőző kezelésétől és feldolgozásától. A nem megfelelő fixálás, fagyasztás, felolvasztás, mosás, szárítás, melegítés, szeletelés vagy más mintákkal vagy folyadékokkal való szennyeződés artefaktumokat vagy hamis eredményeket eredményezhet. Az inkonzisztens eredmények a fixálási és beágyazási módszerek eltéréseiből, valamint a mintában rejlő szabálytalanságokból adódhatnak.
- A szonda csak a 3. fejezetben leírt lókuszok kimutatására használható. "Reagensek".
- A teljesítményt a jelen használati utasításban leírt eljárásokkal validálták. Ezen eljárások módosítása megváltoztathatja a teljesítményt, és azt a felhasználónak kell hitelesítenie. Ez az IVD csak akkor rendelkezik CE tanúsítvánnyal, ha az ebben a használati utasításban leírtak szerint, a rendeltetésszerű használat körében használják.

8. Interferenciát kiváltó anyagok

A következő fixálószer nem kompatibilisek az ISH-val:

- Bouin-fixálás
- B5 fixáló
- savas fixálószer (pl. pikrinsav)
- Zenker-fixáló
- Alkohokok (önmagukban használva)
- Higany-klorid
- Formaldehid/cink fixáló
- Hollande fixáló
- Nem pufferealt formalin

9. A minták előkészítése

Készítse elő a mintákat a ZytoDot CISH Implementation Kit használati utasításában leírtak szerint.

10. A készülék előkészítő kezelése

A termék használatra kész. Nincs szükség feloldásra, keverésre vagy hígításra. Használat előtt a szondát szobahőmérsékletre (18-25 °C) kell hozni, fénytől óvni kell. Az injekciós üveg felnyitása előtt vortexeléssel keverje össze, és rövid ideig forgassa le.

11. Vizsgálati eljárás

A minta előkezelése

Végezze el a minta előkezelését (pl. viaszmentesítés, proteolízis) a ZytoDot CISH Implementation Kit használati utasítása szerint.

Denaturáció és hibridizáció

1. Pipettázzon 10 µl szondát minden előkezelt mintára.
 2. Fedje le a mintákat egy 22 mm x 22 mm-es fedőlappal (kerülje el a beszorult buborékokat), és zárja le a fedőlapot.
- A tömítéshez *gumicement* (pl. *Fixogum*) használatát javasoljuk.
3. Helyezze a tárgylemezeket forró lemezre vagy hibridizátorra, és denaturálja a mintákat 5 percig 94-95 °C-on.
 4. Helyezze át a tárgylemezeket egy páraaknába, és hibridizáljon egy éjszakán át 37 °C-on (pl. hibridizációs kemencében).

Nagyon fontos, hogy a minták ne száradjanak ki a hibridizációs lépés során.

Hibridizáció utáni

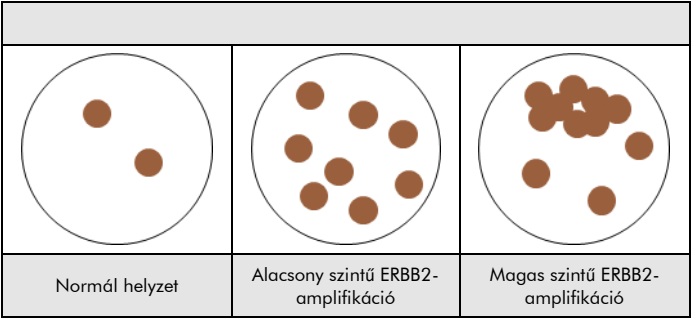
Végezze el a hibridizáció utáni feldolgozást (mosás, detektálás, ellenfestés, rögzítés, mikroszkópia) a ZytoDot CISH Implementation Kit használati utasítása szerint.

12. Az eredmények értelmezése

A ZytoDot CISH Implementation Kit használatával a digoxigeninnel jelölt polinukleotidok hibridizációs jelei barnától sötétbarnaig terjedő színben jelennek meg (ERBB2 gén régió).

Normál jelrendszer: A normális sejtek vagy az ERBB2 gén régióját érintő amplifikáció nélküli sejtek interfázisaiban két különálló, pont alakú barna jel jelenik meg (lásd a 2. ábrát).

Rendellenes jelrendszer: Az ERBB2 gén régiójának amplifikációjával vagy a 17-es kromoszóma poliszómiájával rendelkező sejtekben a barna jel vagy barna jel klaszterek számának növekedése figyelhető meg (lásd a 2. ábrát).



2. ábra: Várható eredmények normális és rendellenes sejtmagok esetén

Egyes rendellenes mintákban a fent leírtaktól eltérő jelminták is megfigyelhetők. Ezeket a váratlan jelmintákat tovább kell vizsgálni.

Kérjük, vegye figyelembe:

- A dekonzenzált kromatin miatt az egyes CISH-jelek kis jelhalmazokként jelenhetnek meg. Ezért két vagy három azonos méretű, ≤ 1 jelátmérővel elválasztott jelet egy jelnek kell tekinteni.
- A jelek megszámlálása előtt a mintát 100-200-szoros nagyítással meg kell vizsgálni az esetleges tumoron belüli heterogenitás szempontjából.
- A jelek vizualizálását legalább 400-630-szoros nagyítással kell elvégezni, ami könnyen látható jeleket eredményez.
- Ne értékelje a nekrotikus területeket, az átfedő magokat, a túlságosan megemésztett magokat és a gyenge jelintenzitású magokat.
- A mitózis miatt további jelek lehetnek láthatóak még a nem neoplasztikus sejtek kis százalékában is. Esetenként a paraffinba ágyazott mintákban a vágási műtermékek miatt hiányzó jelekkel rendelkező sejtmagok figyelhetők meg.
- A negatív vagy nem specifikus eredményt több tényező is okozhatja (lásd a 16. fejezet "Hibaelhárítás" című részét).
- Az eredmények helyes értelmezése érdekében a felhasználónak a nemzeti és/vagy nemzetközi irányelveknek megfelelően validálnia kell a terméket a diagnosztikai eljárásokban való felhasználás előtt.

13. Ajánlott minőségellenőrzési eljárások

A feldolgozott minták és a vizsgálati reagensok megfelelő teljesítményének ellenőrzése érdekében minden egyes vizsgálathoz belső és külső kontrollokat kell rendelni. Ha a belső és/vagy külső kontrollok nem mutatnak megfelelő festődést, a betegmintákkal kapott eredményeket érvénytelennek kell tekinteni.

Belső ellenőrzés: Nem neoplasztikus sejtek a mintán belül, amelyek normális jelmintázatot mutatnak, pl. fibroblasztok.

Külső vezérlés: Validált pozitív és negatív kontrollminták.

14. Teljesítményjellemzők

14.1 Analitikai teljesítmény

A próba teljesítményét a megfelelő IVD által jóváhagyott FISH-szondával való összehasonlítással határozták meg.

Analitikai érzékenység:	100% (95% CI 98.5 – 100.0)
Analitikai specifikusság:	100% (95% CI 97.0 – 100.0)

14.2 Klinikai teljesítmény

Diagnosztikai érzékenység:	100% (95% CI 83.2 – 100.0) vs. FISH, CISH
Diagnosztikai specifitás:	100% (95% CI 83.2 – 100.0) vs. FISH, CISH

15. Eltávolítás

A reagensok ártalmatlanítását a helyi előírásoknak megfelelően kell elvégezni.

16. Hibaelhárítás

A kezelési utasításoktól való bármilyen eltérés rosszabb festési eredményhez vagy egyáltalán nem festéshez vezethet. További információkért kérjük, olvassa el a www.zytovision.com/honlapot.

Gyenge jelek vagy egyáltalán nincs jel

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Nem megfelelően végzett proteolitikus előkezelés	Optimalizálja a pepszin inkubációs idejét, szükség esetén növelje vagy csökkentse azt.
Szonda párolgás	A hibridizáló használata esetén a nedves csíkok/vízzel töltött tartályok használata kötelező. Hibridizáló kemence használata esetén a párákamra használata kötelező. Ezenkívül a fedőlemezt teljesen le kell zárni, pl. Fixogummal, hogy megakadályozzuk a minta kiszáradását a hibridizáció során.
A kromogén szubsztát nem megfelelő előkészítése	Egy csepp DAB A oldat helyett használjunk 30 μ l-t.
Túl hosszú az ellenfestési idő	Kerülje a sötét ellenfestést, mert az elfedheti a pozitív festési jeleket.
Az ellenfesték kékítése nem megfelelően történik	A kékítéshez hideg folyó csapvizet használjon; ne használjon meleg vagy forró vizet vagy kékítő reagenseket.

Túl erős jelek

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Túl hosszú ideig végzett proteolitikus előkezelés	Optimalizálja a pepszin inkubációs idejét, szükség esetén növelje vagy csökkentse azt.
A szubsztát reakció túl intenzív	Rövidítse le a szubsztát inkubációs idejét; ne melegítse a szubsztátoldatot 25 °C fölé; csak szobahőmérsékleten inkubálja.

A jelek elhalványulnak vagy összeolvadnak

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Nem megfelelő szerelési megoldást használtak	Kizárólag a készlethez mellékelt rögzítő oldatot vagy minden szennyeződéstől mentes xilén alapú rögzítő oldatot használjon; ne használjon fedőszalagot.

Egyenetlen vagy egyes részeken csak nagyon enyhe foltosodás

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Nem teljes viaszmentesítés	Használjon friss oldatokat; ellenőrizze a viaszmentesítési időt/időtartamát.
Túl kicsi a reagens térfogata	Győződjön meg arról, hogy a reagens térfogata elég nagy ahhoz, hogy a szöveti területet lefedje.

Ellentmondásos eredmények

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Elégtelen szárítás a szonda felhelyezése előtt	Légszárítás meghosszabbítása
Túl sok víz/mosópuffer a szöveten a pepszin, az antitestek és/vagy a színezékszubsztrátumok felvitele előtt.	Győződjön meg arról, hogy a felesleges folyadékot a szövetszelvényről a tárgylemezről való leitatással vagy lerázással eltávolítja. A kis mennyiségű maradék víz/mosópuffer nem zavarja a vizsgálatot.
A szövetek rögzítési és beágyazási módszereinek változatai	A rögzítési és beágyazási módszerek optimalizálása
A szövetszelvény vastagságának változása	Optimalizálja a szekcionálást

Morfológia romlott

Lehetséges ok	Javasolt teendő
A sejt- vagy szövetmintát nem rögzítették megfelelően	A rögzítési idő és a fixálószer optimalizálása
Nem túl hosszú ideig végzett proteolitikus előkezelés	Csökkentse a pepszin inkubációs idejét

Kereszt hibridizációs jelek; zajos háttér

Lehetséges ok	Javasolt teendő
A szelvények a hibridizáció során vagy után bármikor kiszáradhattak.	Kerülje a szelvények kiszáradását; használjon pára kamrát; zárja le megfelelően a fedőlapot.
Meghosszabbított szubsztrát inkubációs idő	A szubsztrát inkubációs idejének lerövidítése
Nem teljes viaszmentesítés	Használjon friss oldatokat; ellenőrizze a viaszmentesítés időtartamát.
Túl erős proteolitikus előkezelés	A pepszin inkubációs idejének optimalizálása
A tárgylemezeket hibridizáció előtt szobahőmérsékletre kell hűteni.	A tárgylemezeket gyorsan helyezze át hibridizációs hőmérsékletre

Átfedő jelek

Lehetséges ok	Javasolt teendő
A szöveti metszetek nem megfelelő vastagsága	Készítsünk 3-5 μ m-es mikrotomos metszeteket

A minta lebeg a tárgylemezről

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Túl erős proteolitikus előkezelés	A pepszin inkubációs idő lerövidítése

17. Irodalom

- 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. Felülvizsgálat
www.zytovision.com

A legfrissebb használati utasításokat, valamint a különböző nyelvű használati utasításokat a www.zytovision.com oldalon találja.

Szakértőink készséggel válaszolnak kérdéseire.

Vegye fel velünk a kapcsolatot a help@zytovision.com címen.

A biztonságról és a teljesítményről szóló összefoglalót lásd a következő oldalon www.zytovision.com.



ZytoVision GmbH

Fischkai 1

27572 Bremerhaven/ Németország

Telefon: +49 471 4832-300

Fax: +49 471 4832-509

www.zytovision.com

E-mail: info@zytovision.com

Védjegyek:

A ZytoVision® és a ZytoDot® a ZytoVision GmbH védjegyei.