*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)

Per il rilevamento qualitativo delle amplificazioni del gene ERBB2 umano e dei satelliti alfa del cromosoma 17 mediante ibridazione *in situ* fluorescente (FISH)

4250380P038QW

CE 0483

IVD

Dispositivo medico – diagnostico in vitro

in conformità al regolamento IVDR (EU) 2017/746

1. Scopo previsto

La sonda Zyto*Light* SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe (**PL8**) è destinata all'individuazione qualitativa di amplificazioni che coinvolgono il gene ERBB2 umano e all'individuazione di satelliti alfa del cromosoma 17 in campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina, come il cancro al seno e il cancro della giunzione gastrica/gastroesofagea, mediante ibridazione *in situ* fluorescente (FISH). La sonda è destinata ad essere utilizzata in combinazione al kit Zyto*Light* FISH-Tissue Implementation Kit (codice n° Z-2028-5/-20).

Il prodotto è destinato esclusivamente ad uso professionale. Tutti i test che utilizzano il prodotto devono essere eseguiti da personale qualificato in un laboratorio di anatomia patologica certificato e autorizzato, sotto la supervisione di un patologo/genetista umano.

La sonda deve essere utilizzata come ausilio per la diagnosi differenziale del cancro al seno e della giunzione gastrica/gastroesofagea e le misure terapeutiche non devono essere avviate sulla base del solo risultato del test.

2. Principio del metodo

La tecnica di ibridazione in situ fluorescente (FISH) consente la rilevazione e la visualizzazione di sequenze nucleotidiche specifiche in preparazioni cellulari. I frammenti di DNA marcati in modo fluorescente, chiamati sonde FISH, e i loro frammenti di DNA complementare nelle preparazioni sono co-denaturati e riuniti durante l'ibridazione. Successivamente, i frammenti di sonda non specifici e non legati, sono rimossi con lavaggi stringenti. Dopo la controcolorazione del DNA con DAPI, i frammenti di sonda ibridati sono visualizzati utilizzando il microscopio a fluorescenza equipaggiato con filtri specifici per i fluorocromi con cui sono direttamente marcati i frammenti di sonde FISH.

3. Reagenti forniti

La Zyto*Light* SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe è composta da:

- Polinucleotidi (~10 ng/µl) marcati con ZyGreen (eccitazione 503 nm/emissione 528 nm), le cui sequenze target mappano in 17q12-q21.1* (chr17:37,572,531-38,181,308) che ospitano la regione del gene ERBB2 (vedere Fig. 1).
- Polinucleotidi (~1,5 ng/µl) marcati con ZyOrange (eccitazione 547 nm/emissione 572 nm), che mirano a sequenze mappate in 17p11.1-q11.1 specifiche per la regione centromerica del satellite alfa D17Z1 del cromosoma 17.
- Tampone di ibridazione a base di formammide

*conformemente all'Human Genome Assembly GRCh37/hg19

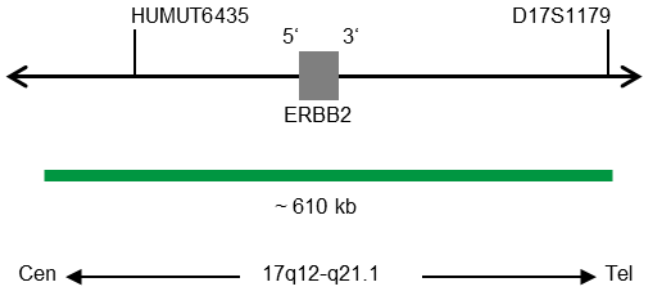

Fig. 1: SPEC ERBB2 Mappa della sonda (non in scala)

La Zyto*Light* SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe è disponibile in due dimensioni:

- Z-2015-50: 0,05 ml (5 reazioni da 10 µl ciascuna)
- Z-2015-200: 0,2 ml (20 reazioni da 10 µl ciascuna)

4. Materiali richiesti ma non forniti

- Zyto*Light* FISH-Tissue Implementation Kit (Codice prodotto Z-2028-5/-20)
- Campione controllo positivo e negativo
- Vetrini portaoggetto a carica positiva
- Bagno termostatato (37°C, 98°C)
- Ibridizzatore o piastra calda
- Ibridizzatore o camera umida in stufa di ibridazione
- Pipette a volume variabile (10 µl, 25 µl)
- Vaschette di colorazione
- Timer
- Termometro calibrato
- Etanolo o reagente alcolico
- Xilene
- Acqua deionizzata o distillata
- Vetrini coprioggetto (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Colla per vetrini, per esempio Fixogum Rubber Cement (codice prodotto E-4005-50/-125) o simili
- Microscopio a fluorescenza (400-1000x)
- Olio a immersione per fluorescenza
- Set di filtri appropriato

5. Conservazione e stoccaggio

Conservare a 2-8°C in posizione verticale e protetta dalla luce. Utilizzare proteggendo dalla luce. Riportare alle condizioni di stoccaggio indicate subito dopo l'utilizzo. Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza indicata in etichetta. Il prodotto è stabile fino alla data di scadenza indicata in etichetta, se correttamente conservato.

6. Avvertenze e precauzioni

- Leggere le istruzioni prima dell'utilizzo!
- Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza!
- Questo prodotto contiene sostanze (in bassa concentrazione e volume) che sono nocive per la salute e potenzialmente infette. Evitare qualsiasi contatto diretto con i reagenti. Prendere le adeguate misure di precauzione (utilizzare I guanti, gli occhiali di protezione e il camice da laboratorio)!
- Segnalare qualsiasi incidente grave relativo al prodotto al produttore e all'autorità competente in conformità alle normative locali.

- Se il reagente dovesse entrare in contatto con la pelle, risciacquare subito abbondantemente!
- La scheda di sicurezza è disponibile su richiesta per usi professionali.
- Non riutilizzare i reagenti, a meno che il riutilizzo sia esplicitamente consentito.
- Evitare la cross-contaminazione dei campioni, in quanto questo potrebbe portare a risultati sbagliati.
- La sonda non deve essere esposta alla luce, in particolare modo a luci intense, per lunghi periodi di tempo; per esempio, tutti I passaggi dovrebbero essere svolti, se possibile, al buio o utilizzando contenitori scuri.

Frasi di pericolo e prudenza:

Il componente pericoloso è la formammide.

Pericolo

H351	Sospettato di provocare il cancro.
H360FD	Può nuocere alla fertilità. Può nuocere al feto.
H373	Può provocare danni agli organi in caso di esposizione prolungata o ripetuta.
P201	Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso.
P202	Non manipolare prima di avere letto e compreso tutte le avvertenze.
P260	Non respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol.
P280	Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.
P308+P313	IN CASO di esposizione o di possibile esposizione, consultare un medico.
P405	Conservare sotto chiave.

7. Limitazioni

- Per uso diagnostico *in vitro*.
- Solo per usi professionali.
- Solo per utilizzo non automatico.
- L'interpretazione clinica di qualsiasi colorazione positiva o meno deve essere condotta considerando il contesto della storia clinica, della morfologia, di altri criteri istopatologici e di altri test diagnostici. È responsabilità di un patologo/genetista umano qualificato avere familiarità con le sonde ISH, i reagenti, i pannelli diagnostici e i metodi utilizzati per la colorazione del preparato. La colorazione deve essere eseguita in un laboratorio certificato e autorizzato sotto la supervisione di un patologo/genetista umano che è responsabile della revisione dei vetrini colorati e della garanzia dell'adeguatezza dei controlli positivi e negativi.
- La colorazione, in particolar modo l'intensità del segnale e il rumore di fondo, dipende da come il campione è stato gestito e processato prima della colorazione stessa. Una fissazione impropria, il congelamento, lo scongelamento, il lavaggio, l'asciugatura, il riscaldamento, il sezionamento o la contaminazione con un altro campione o fluido può produrre artefatti o falsi risultati. Risultati incoerenti possono derivare da variazioni nei metodi di fissazione e inclusione.
- La sonda dovrebbe essere usata solo per identificare I loci descritti nella sezione 3 "Reagenti forniti".
- Le prestazioni sono state convalidate utilizzando le procedure descritte in queste istruzioni per l'uso. Le modifiche a queste procedure potrebbero alterare le prestazioni e devono essere convalidate dall'utente. Questo prodotto IVD è certificato come CE solo se utilizzato come descritto in queste istruzioni nell'ambito dell'uso previsto.

8. Sostanze interferenti

I globuli rossi presenti nel campione potrebbero esibire auto fluorescenza che disturba l'identificazione dei segnali.

I seguenti fissativi non sono compatibili con la FISH:

- Fissativo di Bouin
- Fissativo B5
- Fissativi acidi (per esempio, acido picrico)
- Fissativo di Zenker
- Alcoli (quando utilizzati da soli)
- Mercurio cloruro
- Formaldeide zincata
- Fissativo di Hollande
- Formalina non tamponata

9. Preparazione dei campioni

Allestire I campioni come descritto nelle istruzioni per l'uso del ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit.

10. Trattamento preparatorio del prodotto

Il prodotto è pronto all'uso. Non deve essere ricostituito, mescolato o diluito. Portare la sonda a temperatura ambiente (18-25°C) prima dell'uso, proteggere dalla luce. Prima di aprire la vial, vortexare e centrifugare brevemente.

11. Procedura di lavoro

Pretrattamento del campione
Pretrattare il campione (sparaffinatura, proteolisi) conformemente alle istruzioni per l'uso del kit ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit.

Denaturazione e ibridazione

1. Pipettare 10 µl di sonda su ciascun campione pretrattato.
2. Coprire i campioni con un vetrino copriogetto (22 x 22) mm (evitare la formazione di bolle) e sigillare il copriogetto.

Raccomandiamo di utilizzare una colla per vetrini (per esempio, Fixogum).

3. Porre i vetrini su piastra calda o su ibridizzatore e denaturare i campioni per 10 min. a 75 °C.
4. Trasferire i vetrini in camera umida e ibridare overnight a 37°C (per esempio in una stufa da ibridazione).

È fondamentale che I campioni non si asciughino durante la fase di ibridazione.

Post-ibridazione
Procedere coi passaggi post-ibridazione (lavaggio, controcolorazione e microscopia fluorescente) come indicato nelle istruzioni d'uso del kit ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit.

12. Interpretazione dei risultati

Con l'uso di set di filtri appropriati, i segnali di ibridazione della sonda appaiono verdi (regione del gene ERBB2) e arancioni (CEN 17).

Situazione normale: Nelle interfasi di cellule normali o di cellule senza amplificazione che coinvolgono la regione del gene ERBB2, compaiono due segnali verdi e due arancioni (vedere Fig. 2).

Situazione aberrante: Nelle cellule con un'amplificazione della regione del gene ERBB2 si osserva un numero maggiore di segnali verdi o di gruppi di segnali verdi (vedere Fig. 2).

I segnali che si sovrappongono possono apparire come segnali gialli.

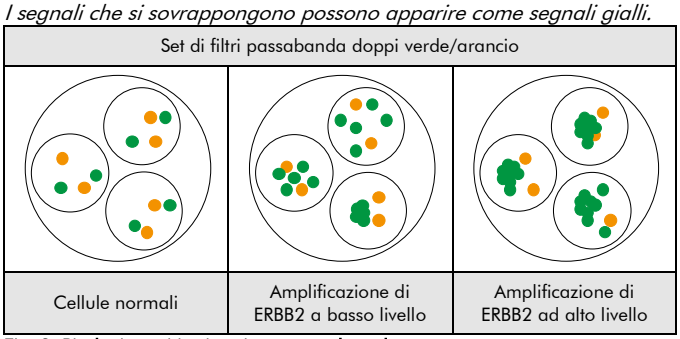

Fig. 2: Risultati attesi in situazione normale e aberrante

Altri pattern di segnali oltre a quelli descritti sopra si potrebbero osservare in alcuni campioni anormali. Questi pattern di segnali inconsueti dovrebbero essere ulteriormente indagati.

Note:

- A causa della cromatina decondensata, il singolo segnale FISH può apparire come un piccolo cluster. Due o tre segnali della stessa misura, separate da una distanza ≤ 1 del diametro di un segnale, dovrebbero essere contati come un singolo segnale.
- Non valutare i nuclei sovrapposti.
- Non contare nuclei over-digeriti (identificabili da una regione scura all'interno del nucleo).
- Non contare i nuclei con una forte auto fluorescenza, che impedisce l'identificazione dei segnali.
- Un risultato negativo o non specifico potrebbe essere causato da multipli fattori (vedere capitolo 16 "Risoluzione dei problemi").
- Al fine di una corretta interpretazione dei risultati, l'utilizzatore deve validare questo prodotto prima del suo utilizzo in procedure diagnostiche secondo le linee guida nazionali e internazionali.

13. Procedure di Controllo qualità raccomandate

Al fine di monitorare la corretta performance del campione processato e testare i reagenti, ogni test dovrebbe essere associato a controlli interni e esterni. Se i controlli interni e/o esterni non forniscono colorazioni appropriate, i risultati con i campioni dei pazienti devono essere considerati non validi.

Controllo interno: Cellule non neoplastiche all'interno di un campione che mostra un pattern normale di segnali.

Controllo esterno: Campioni di controlli positivi e negativi validati.

14. Caratteristiche di performance

14.1 Prestazioni analitiche

Le prestazioni sono state valutate in base alle istruzioni per l'uso del ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit.

Sensibilità analitica:	100% (95% CI 98.5 – 100.0)
Specificità analitica:	100% (95% CI 97.0 – 100.0)

La riproducibilità da giorno a giorno è stata testata confrontando i risultati ottenuti da un esaminatore in 10 giorni diversi e valutando l'accordo.

	Percentuale di accordo
campione negativo	100%
campione positivo	100%

La ripetibilità è stata testata confrontando i risultati replicati ottenuti da un esaminatore in 10 giorni diversi e valutando l'accordo.

	Percentuale di accordo
campione negativo	100%
campione positivo	100%

14.2 Prestazioni cliniche

Sensibilità diagnostica:	**Cancro al seno:** 93% (95% CI 91.0 – 95.0) basato su un modello bivariato **Giunzione gastrica/gastroesofagea:** 88% (95% CI 74.0 – 95.0) basato su un modello bivariato
Specificità diagnostica:	**Cancro al seno:** 98% (95% CI 97.0 – 99.0) basato su un modello bivariato **Giunzione gastrica/gastroesofagea:** 95% (95% CI 92.0 – 97.0) basato su un modello bivariato

15. Smaltimento

Lo smaltimento dei reagenti deve avvenire in accordo alle regolamentazioni locali.

16. Risoluzione dei problemi

Qualsiasi modifica dalle istruzioni operative può comportare risultati di colorazione inferiori o a nessuna colorazione. Fare riferimento a www.zytovision.com per altre informazioni.

Segnali deboli o mancanti

Possibile causa	Azione
Campioni cellulari o tissutali non correttamente fissati	Ottimizzare il tempo di fissazione e il fissativo o aggiungere un passaggio di post-fissazione come descritto in "procedure" del manuale d'uso del kit ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit
Trattamento proteolitico non condotto in modo adeguato	Ottimizzare il tempo di incubazione in pepsina, aumentandolo o diminuendolo, se necessario
Evaporazione della sonda	Se si utilizza l'ibridatore, è obbligatorio l'utilizzo di strisce umide o di taniche preriempite d'acqua. Se si utilizza una stufa d'ibridazione, usare una camera umida. Inoltre il coprioggetto deve essere completamente sigillato, per esempio con Fixogum, per prevenire che il campione si asciughi durante l'ibridazione
Utilizzo di set di fluorescenza non corretto	Utilizzare un set di filtri appropriato per i fluorocromi della sonda. *Il filtro triplo fornisce meno luce rispetto al filtro singolo o doppio. I segnali possono quindi apparire più tenui utilizzando il filtro triplo.*

Segnali di cross ibridazione; rumori di fondo

Possibile causa	Azione
Sparaffinatura incompleta	Utilizzare soluzioni fresche; controllare la durata della sparaffinatura
Pretrattamento proteolitico troppo forte	Ridurre il tempo di incubazione in pepsina
Vetrini raffreddati a temperature ambiente prima dell'ibridazione	Trasferire i vetrini rapidamente a 37°C

Morfologia degradata

Possibile causa	Azione
Il campione cellulare o tissutale non è stato fissato correttamente	Ottimizzare il tempo di fissazione e il fissativo o aggiungere un passaggio di post-fissazione come descritto in "procedure" nel manuale d'uso del kit ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit
Pretrattamento proteolitico non condotto correttamente	Ottimizzare il tempo di incubazione in pepsina, aumentandolo o diminuendolo se necessario
Asciugatura insufficiente prima dell'applicazione della sonda	Aumentare i tempi di asciugatura

Nuclei sovrapposti

Possibile causa	Azione
Inadeguato spessore della sezione di tessuto	Preparare sezioni al microto dello spessore di 2-4 µm

Campione galleggiante sul vetrino

Possibile causa	Azione
Pretrattamento proteolitico troppo forte	Ridurre il tempo di incubazione in pepsina

Controcolorazione debole

Possibile causa	Azione
Bassa concentrazione di soluzione DAPI	Utilizzare DAPI/DuraTect-Solution (ultra) (Codice prodotto MT-0008-0.8)
Tempo di incubazione in DAPI troppo breve	Aggiustare il tempo di incubazione in DAPI

17. Letteratura

- 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. Revisione

Revisione	Descrizione della modifica
4.1.1	Modifica dell'organismo notificato 14. Caratteristiche di performance aggiungere precisione

www.zytovision.com

Fare riferimento al sito www.zytovision.com per le istruzioni d'uso più recenti e per le istruzioni d'uso nelle diverse lingue.

I nostri esperti sono disponibili per rispondere alle vostre domande.
Contattare per cortesia helptech@zytovision.com
Per il riassunto delle prestazioni e della sicurezza del prodotto, fare riferimento a www.zytovision.com.

ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/ Germania
Tel.: +49 471 4832-300
Fax: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
Email: info@zytovision.com

Marchi registrati:
ZytoVision® e Zyto*Light*® sono marchi registrati da ZytoVision GmbH.