



ZytoDot 2C SPEC ERBB2/CEN 17 Probe

REF	C-3032-100	Σ	10 (0,1 ml)
REF	C-3032-400	Σ	40 (0,4 ml)

Kvalitatīvai cilvēka ERBB2 gēna amplifikāciju un hromosomas 17 alfa satelītu noteikšanai ar hromogēno *in situ* hibridizāciju (CISH)

4250380P078RA



In vitro diagnostikas medicīnas ierīce

saskaņā ar IVDR (ES) 2017/746

1. Paredzētais mērķis

ZytoDot 2C SPEC ERBB2/CEN 17 Probe (PD12) ir paredzēts kvalitatīvai cilvēka ERBB2 gēna amplifikāciju noteikšanai, kā arī hromosomas 17 alfa satelītu noteikšanai formalinā fiksētos, parafinā iestrādātos paraugos, piemēram, krūts vēža gadījumā, izmantojot hromogēno *in situ* hibridizāciju (CISH). Zonde ir paredzēta lietošanai kopā ar ZytoDot 2C CISH Implementation Kit (Produkta Nr. C-3044-10/-40).

Produkts ir paredzēts tikai profesionālai lietošanai. Visi testi, kuros izmanto šo produktu, jāveic sertificētā, licencētā anatomiskās patoloģijas laboratorijā, patologa/cilvēka ģenētiķa uzraudzībā, ko veic kvalificēts personāls.

Zondi paredzēts izmantot kā palīgīdzekli krūts vēža diferenciāldiagnostikā, un, pamatojoties tikai uz testa rezultātu, nevajadzētu uzsākt terapeitiskus pasākumus.

2. Testa princips

Hromogēnās *in situ* hibridizācijas (CISH) metode ļauj noteikt un vizualizēt specifiskas nukleīnskābju sekvences šūnu preparātos. Ar haptēniem marķēti nukleotīdu fragmenti, tā sauktās CISH zondes, un to komplementārās mērķa sekvences preparātos tiek kopdenaturētas un pēc tam hibridizācijas laikā tiek atdalītas. Pēc tam nespecifiskos un nesaistītos zondes fragmentus noņem ar stingrām mazgāšanas darbībām. Marķētās zondes duplexa veidošanos var vizualizēt, izmantojot primārās (nemarkētās) antivielas, ko nosaka ar sekundārajām polimerizētajām enzīmu konjugētajām antivielām. Enzīmu reakcija ar hromogēniem substrātiem izraisa krāsainu nogulšņu veidošanos. Pēc kodola iekrāsošanas ar kodola krāsvielu hibridizētos zondes fragmentus vizualizē gaismas mikroskopijā.

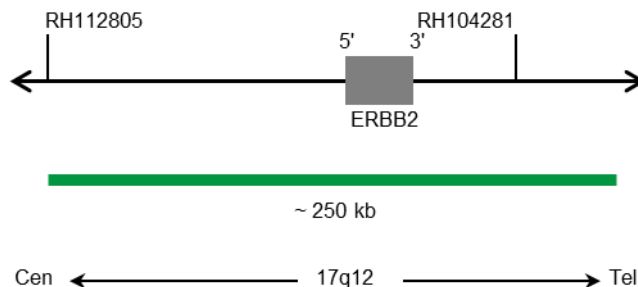
3. Sniegtie reaģenti

ZytoDot 2C SPEC ERBB2/CEN 17 Probe sastāv no:

- ar digoksigenīnu iezīmēti polinukleotīdi (~1,1 ng/μl), kas ir vērsti pret sekvenču, kas atrodas 17q12* (chr17:37,725,661-37,973,541), kurā atrodas ERBB2 gēna reģions. (skatīt 1. attēlu).
- Dinitrofenil-marķēti polinukleotīdi (~1,1 ng/μl), kas ir vērsti uz sekvenču, kas kartētas 17p11.1-q11.1, kas raksturīgas 17. hromosomas alfa satelīta centromeriskajam reģionam D17Z1 (skatīt 1. attēlu).

- Hibridizācijas buferis uz formamīda bāzes

*askaņā ar Cilvēka genoma asambleju GRCh37/hg19



1. attēls: SPEC ERBB2 Zondes karte (bez mēroga)

ZytoDot 2C SPEC ERBB2/CEN 17 Probe ir pieejama divos izmēros:

- C-3032-100: 0,1 ml (10 reakcijas pa 10 μl katrā)
- C-3032-400: 0,4 ml (40 reakcijas pa 10 μl katrā)

4. Nepieciešamie, bet nepiegādātie materiāli

- ZytoDot 2C CISH Implementation Kit (Produkta Nr. C-3044-10/-40)
- Pozitīvās un negatīvās kontroles paraugi
- Mikroskopa priekšmetstikliņi, pozitīvi lādēti
- Ūdens vanna (80 °C, 98 °C)
- Hibridizers vai karstā plate
- Hibridizators vai mitruma kamera hibridizācijas krāsnī
- Regulējamas pipetes (10 μl, 1000 μl)
- Burku vai vannu krāsošana
- Taimeris
- Kalibrēts termometrs
- Etanols vai reaģentu spirts
- Ksilols
- Metanols 100%
- Ūdeņraža peroksīds (H₂O₂) 30%.
- Dejonizēts vai destilēts ūdens
- Pārklājumi (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Gumijas cements, piemēram, Fixogum Rubber Cement (Produkta Nr. E-4005-50/-125) vai līdzīgs.
- Atbilstoši uzturēts gaismas mikroskops (400-630x).

5. Uzglabāšana un pārvietošana

Uzglabāt 2-8 °C temperatūrā vertikālā stāvoklī. Uzreiz pēc lietošanas atgriezt glabāšanas apstākļos. Nelietot reaģentus pēc derīguma termiņa beigām, kas norādīts uz etiķetes. Produkts ir stabils līdz marķējumā norādītajam derīguma termiņam, ja ar to rīkojas atbilstoši.

6. Brīdinājumi un piesardzības pasākumi

- Pirms lietošanas izlasiet lietošanas instrukciju!
- Neizmantojiet reaģentus pēc derīguma termiņa beigām!
- Šis produkts satur veselībai kaitīgas un potenciāli infekciozas vielas (nelielā koncentrācijā un daudzumā). Izvairieties no tiešas saskares ar reaģentiem. Veikt atbilstošus aizsardzības pasākumus (lietot vienreizlietojamus cimdus, aizsargbrilles un laboratorijas apģērbu)!
- Par jebkuru nopietnu negadījumu, kas noticis saistībā ar izstrādājumu, ziņojiet ražotājam un kompetentajai iestādei saskaņā ar vietējiem noteikumiem!

- Ja reaģenti nonāk saskarē ar ādu, nekavējoties noskalojiet ādu ar lielu daudzumu ūdens!
- Profesionālam lietotājam pēc pieprasījuma ir pieejama materiālu drošības datu lapa.
- Neizmantojiet reaģentus atkārtoti, ja vien atkārtota izmantošana nav skaidri atļauta!
- Izvairieties no paraugu savstarpējas piesārņošanas, jo tas var izraisīt kļūdainus rezultātus.
- Hibridizācijas un mazgāšanas laikā paraugiem nedrīkst ļaut nožūt.

Bīstamības un piesardzības norādījumi:

Bīstamību noteicošais komponents ir formamīds.



Bīstamība

H351	Aizdomas par vēža izraisīšanu.
H360FD	Var kaitēt auglībai. Var kaitēt nedzimušajam bērnam.
H373	Ilgstoša vai atkārtota iedarbība var izraisīt orgānu bojājumus.
P201	Pirms lietošanas saņemiet īpašus norādījumus.
P202	Nestrādājiet ar to, kamēr nav izlasīti un izprasti visi drošības pasākumi.
P260	Neelpot putekļus/dūmus/gāzi/smidzeni/tvaikus/smidzeni.
P280	Valkājiet aizsargcimdus/aizsargapģērbu/acu/ sejas aizsardzību.
P308+P313	Ja ir apdraudēta vai ir bažas: Saņemiet medicīnisku padomu/pievērsiet uzmanību.
P405	Veikals ir aizslēgts.

7. Ierobežojumi

- Lietošanai *in vitro* diagnostikā.
- Tikai profesionālai lietošanai.
- Tikai neautomatizētai lietošanai.
- Pozitīva krāsojuma vai tā neesamības klīniskā interpretācija jāveic, ņemot vērā klīnisko anamnēzi, morfoloģiju, citus histopatoloģiskos kritērijus, kā arī citus diagnostiskos testus. Kvalificēta patologa/cilvēka ģenētiķa pienākums ir pārzināt CISH zondes, reaģentus, diagnostikas paneļus un metodes, ko izmanto, lai iegūtu krāsoto preparātu. Krāsošana jāveic sertificētā, licencētā laboratorijā patologa/cilvēka ģenētiķa uzraudzībā, kurš ir atbildīgs par iekrāsoto priekšmetstikliņu pārskatīšanu un pozitīvās un negatīvās kontroles atbilstības nodrošināšanu.
- Parauga krāsošana, jo īpaši signāla intensitāte un fona krāsojums, ir atkarīga no parauga apstrādes un apstrādes pirms krāsošanas. Nepareiza fiksācija, sasaldēšana, atkausēšana, mazgāšana, žāvēšana, sildīšana, griezumam veidošana vai piesārņojums ar citiem paraugiem vai šķidrumiem var radīt artefaktus vai kļūdainus rezultātus. Neatbilstīgus rezultātus var izraisīt fiksācijas un iestrādes metožu atšķirības, kā arī paraugam raksturīgi nelidzenumi.
- Zondi drīkst izmantot tikai 3. nodalā aprakstīto lokusu noteikšanai. "Pieģādātie reaģenti".
- Darbība tika validēta, izmantojot šajā lietošanas instrukcijā aprakstītās procedūras. Šo procedūru modifikācijas var mainīt veiktspēju, un tās ir jāapstiprina lietotājam. Šis IVD ir sertificēts kā CE tikai tad, ja to lieto, kā aprakstīts šajā lietošanas instrukcijā, atbilstoši paredzētajam lietojumam.

8. Vietas, kas rada traucējumus

Ar ISH nav saderīgi šādi fiksatori:

- Buēna fiksatīvs
- B5 fiksators
- Skābie fiksatori (piemēram, pikronskābe).
- Zenkera fiksatīvs
- Alkoholi (ja tos lieto atsevišķi)

- Dzīvsudraba hlorīds
- Formaldehīda/cinka fiksators
- Olanda fiksatīvs līdzeklis
- Nebuferēts formalīns

9. Paraugu sagatavošana

Sagatavojiet paraugus, kā aprakstīts ZytoDot 2C CISH ieviešanas komplekta lietošanas instrukcijā.

10. Ierīces sagatavošanas apstrāde

Produkts ir gatavs lietošanai. Nav nepieciešams atjaunot, sajaukt vai atšķaidīt. Pirms lietošanas zondi jāuzsilda istabas temperatūrā (18-25 °C), jāaizsargā no gaismas. Pirms flakona atvēršanas samaisiet, virpuļojot un īsu brīdi pagriežot.

11. Analīzes procedūra

Parauga pirmapstrāde

Veiciet paraugu priekšapstrādi (piemēram, atvaskošanu, proteolīzi) saskaņā ar ZytoDot 2C CISH Implementation Kit lietošanas instrukciju.

Denaturācija un hibridizācija

- Uz katra iepriekš apstrādātā parauga ar pipeti uzpildiet 10 µl zondes.
 - Pārklājiet paraugus ar 22 x 22 mm lielu pārklājplāksnīti (izvairieties no burbuļu veidošanās) un aiztaisiet pārklājplāksnīti.
- Blīvēšanai ieteicams izmantot gumijas cementu (piemēram, Fixogum).*
- Novietojiet priekšmetstikliņus uz karstās plātes vai hibridizatora un denaturējiet paraugus 5 minūtes 79 °C temperatūrā.
 - Pārvietojiet priekšmetstikliņus mitruma kamerā un hibridizējiet uz nakti 37 °C temperatūrā (piemēram, hibridizācijas krāsnī).

Ir svarīgi, lai hibridizācijas laikā paraugi neizzūtu.

Pēc hibridizācijas

Veiciet pēchibridizācijas apstrādi (mazgāšana, noteikšana, pretkrāsošana, montāža, mikroskopēšana) saskaņā ar ZytoDot 2C CISH Implementation Kit lietošanas instrukciju.

12. Rezultātu interpretācija

Izmantojot ZytoDot 2C CISH ieviešanas komplektu, ar digoksigenīnu iezīmētu polinukleotīdu hibridizācijas signāli parādās kā tumši zaļas krāsas atšķirīgi punkti (ERBB2 gēna reģions), bet ar dinitrofenilu iezīmēti polinukleotīdi parādās kā spilgti sarkanas krāsas atšķirīgi punkti (CEN 17).

Normāla situācija: Normālu šūnu vai šūnu, kurās nav amplifikācijas, kas skar ERBB2 gēna reģionu, starpfāzēs parādās divi skaidri punktveida zaļi un divi skaidri punktveida sarkani signāli (skatīt 2. attēlu).

Neparasta situācija: Šūnās ar ERBB2 gēna reģiona amplifikāciju novērots palielināts zaļo signālu vai zaļo signālu kopu skaits (sk. 2. attēlu).

Pārklājošies signāli var parādīties kā brūni signāli.

Normālas šūnas	ERBB2 amplifikācija zemā līmenī	Augsta līmeņa ERBB2 amplifikācija

2. attēls: Paredzamie rezultāti normālos un aberantos kodolos

Dažos patoloģiskos paraugos var novērot citus signālu modeļus, kas nav iepriekš aprakstīti. Šie negaidītie signālu modeļi ir jāizpēta sīkāk.



Lūdzu, ņemiet vērā:

- Dekondensētā hromatīna dēļ atsevišķi CISH signāli var parādīties kā nelieli signālu klasteri. Tādējādi divi vai trīs vienāda lieluma signāli, kurus šķir attālums ≤ 1 signāla diametrs, jāuzskata par vienu signālu.
- Pirms signālu uzskaitīšanas paraugs jāšķenē, lai noteiktu iespējamo intratumorālo heterogenitāti 100 līdz 200 reizes palielinājumā.
- Signālu vizualizācija jāveic vismaz ar 400kārtīgu palielinājumu, lai iegūtu labi redzamus signālus. Hromosomu pārrāvumus konstatējot, zondēm ieteicams izmantot 630kārtīgu palielinājumu. Neizmantojiet kontrastu uzlabojošas filtru lēcas, jo tas var izkropļot signāla krāsu. Lai iegūtu spilgtu krāsu signālus, atveriet diafragmu. Novērtējot kodolu, noteikti fokusējiet uz augšu un uz leju, jo sarkanie un zaļie signāli var atrasties viens virs otra.
- Neizvērtējiet nekrozes zonas, pārklājošos kodolus, pārāk sagremotus kodolus un kodolus ar vāju signāla intensitāti.
- Mitozes dēļ papildu signāli var būt redzami pat nelielā nelielā nelielā šūnu daļā. Reizēm parafinā iestrādātos paraugos griešanas artefaktu dēļ var būt novērojami kodoli ar iztrūkstošiem signāliem.
- Negatīvu vai nespecifisku rezultātu var izraisīt vairāki faktori (skatīt 16. nodaļu "Problēmu novēršana").
- Lai pareizi interpretētu rezultātus, lietotājam šis produkts pirms lietošanas diagnostikas procedūrās ir jāapstiprina saskaņā ar valsts un/vai starptautiskajām vadlīnijām.

13. Ieteicamās kvalitātes kontroles procedūras

Lai uzraudzītu apstrādāto paraugu un testa reaģentu pareizu darbību, katrai analīzei ir jābūt pievienotai iekšējai un ārējai kontrolei. Ja iekšējās un/vai ārējās kontroles neuzrāda atbilstošu krāsojumu, rezultāti ar pacienta paraugiem jāuzskata par nederīgiem.

Iekšējā kontrole: Ne-neoplastiskas šūnas paraugā, kurām ir normāls signāla modelis, piemēram, fibroblasti.

Ārējā vadība: Apstiprināti pozitīvie un negatīvie kontroles paraugi.

14. Veiktspējas raksturlielumi

14.1 Analītiskā veiktspēja

Zondes veiktspēju noteica, salīdzinot ar atbilstošo IVD apstiprināto FISH zondi.

Analītiskā jutība:	100% (95% CI 98.5 – 100.0)
Analītiskā specifika:	100% (95% CI 97.0 – 100.0)

14.2 Klīniskā veiktspēja

Diagnostikas jutīgums:	91% (95% CI 86.0 – 95.0) pamatojoties uz divdimensiju modeli
Diagnostikas specifiskums:	97% (95% CI 93.0 – 99.0) pamatojoties uz divdimensiju modeli

15. Izmešana

Reaģentu iznīcināšana jāveic saskaņā ar vietējiem noteikumiem.

16. Problēmu novēršana

Jebkura novirze no lietošanas instrukcijām var novest pie sliktākiem krāsošanas rezultātiem vai arī pie tā, ka krāsošana vispār nenotiek. Sīkāku informāciju skatiet www.zytovision.com.

vāji signāli vai to nav vispār

Iespējamais iemesls	Rīcība
Nepareizi veikta proteolītiskā pirmapstrāde	Optimizēt pepsīna inkubācijas laiku, vajadzības gadījumā to palielināt vai samazināt.

Zondes iztvaikošana	Ja izmantojat hibrīdizeru, obligāti jāizmanto slapjās svītras/ ar ūdeni piepildītas tvertnes. Izmantojot hibrīdizācijas krāsni, obligāti jāizmanto mitruma kamera. Turklāt, lai novērstu parauga izžūšanu hibrīdizācijas laikā, pārklājlapas pilnībā jāaizlīmē, piemēram, ar fiksogumu.
Pārāk ilgs pretkrāsošanas laiks	Izvairieties no tumša pretkrāsojuma, jo tas var aizēnot pozitīvos krāsošanas signālus.
Nepareizi veikta pretkrāsojuma zilināšana	Zilināšanai izmantojiet aukstu tekošu krāna ūdeni; nelietojiet siltu vai karstu ūdeni vai zilināšanas reaģentus.

Pārāk spēcīgi signāli

Iespējamais iemesls	Rīcība
Pārāk ilga proteolītiskā pirmapstrāde	Optimizēt pepsīna inkubācijas laiku, vajadzības gadījumā to palielināt vai samazināt.
AP-Red šķīduma inkubācijas laiks nav pareizs	Ja nepieciešams, inkubācijas laiku var saīsināt līdz 5 min. Substrāta šķīdumu nekarsēt augstāk par 25 °C; inkubēt tikai istabas temperatūrā.
HRP-zaļā šķīduma inkubācijas laiks nav pareizs	Ja nepieciešams, inkubācijas laiku var saīsināt līdz 7 min. Substrāta šķīdumu nekarsēt augstāk par 25 °C; inkubēt tikai istabas temperatūrā.

Pārāk vāji sarkanie signāli

Iespējamais iemesls	Rīcība
AP-Red šķīdums tika pakļauts tiešas gaismas iedarbībai	Sagatavojiet un izmantojiet AP-Red šķīdumu, pasargājot no spēcīgas tiešas gaismas.
AP-Red šķīdums tika sagatavots pārāk agri	Sagatavot pirms tūlītējas lietošanas
AP-Red šķīduma inkubācijas laiks nav pareizs	Ja nepieciešams, inkubācijas laiku var pagarināt līdz 15 min.
Nepietiekama hromogēnā substrāta sagatavošana	Nepalīeliniet A šķīduma tilpumu

Pārāk vāji zaļie signāli

Iespējamais iemesls	Rīcība
Pārāk ilgs mazgāšanas posmu inkubācijas laiks pēc krāsošanas ar HRP-Green.	Nepārsniedziet norādīto inkubācijas laiku
HRP-zaļā šķīduma inkubācijas laiks nav pareizs	Ja nepieciešams, inkubācijas laiku var pagarināt līdz 15 min.
Nepietiekama hromogēnā substrāta sagatavošana	Nepalīeliniet A šķīduma tilpumu



Signālu izzušana vai apvienošana

Iespējamais iemesls	Rīcība
Ir izmantots nepiemērots montāžas risinājums	Izmantojiet tikai komplektā iekļauto montāžas šķidrumu vai uz ksilēna bāzes gatavotus montāžas šķidrumus, kas nesatur nekādus piemaisījumus; neizmantojiet pārklājlapas lenti.
Sekcijas nebija pienācīgi dehidrētas	Izmantojiet svaigus etanola un ksilēna šķidrumus; izmantojiet tikai "tīras" kvalitātes ksilēnu.

Nevienmērīgi vai dažviet tikai ļoti viegli traipi

Iespējamais iemesls	Rīcība
Nepilnīga deparafinēšana	Izmantojiet svaigus šķidrumus; pārbaudiet deparafinēšanas ilgumu.
Pārāk mazs reaģenta tilpums	Pārliecinieties, ka reaģenta tilpums ir pietiekami liels, lai pārklātu audu laukumu.

Nevienmērīgi rezultāti

Iespējamais iemesls	Rīcība
Nepietiekama žāvēšana pirms zondes uzklāšanas	Pagarināt žāvēšanu gaisā
Pārāk daudz ūdens/mazgāšanas bufera uz audiem pirms pepsīna, antivielu un/vai krāsu substrātu lietošanas.	Pārliecinieties, ka no audu griezumā ir noņemts liekais šķidrums, to noslaucot vai sakratot no priekšmetstikliņa. Nelieli ūdens/mazgāšanas bufera atlikumi netraucē testam.
Audu fiksācijas un iestrādāšanas metožu variācijas	Optimizēt fiksācijas un iestrādes metodes
Audu griezumā biezuma izmaiņas	Optimizēt griezumā sadalīšanu

Morfoloģijas degradācija

Iespējamais iemesls	Rīcība
Šūnu vai audu paraugs nav pareizi fiksēts	Optimizēt fiksācijas laiku un fiksatoru
Proteolītiskā pirmapstrāde nav veikta pārāk ilgi	Pepsīna inkubācijas laika samazināšana

Krustveida hibridizācijas signāli; trokšņains fons

Iespējamais iemesls	Rīcība
Sekcijas izžuvas jebkurā laikā hibridizācijas laikā vai pēc tās.	Izvairieties no sekciju izžušanas; izmantojiet mitruma kameru; pienācīgi noslēdziet vāku.
Ilgāks substrāta inkubācijas laiks	Substrāta inkubācijas laika saīsināšana
Nepilnīga deparafinēšana	Izmantojiet svaigus šķidrumus; pārbaudiet deparafinēšanas ilgumu.
Pārāk spēcīga proteolītiskā pirmapstrāde	Pepsīna inkubācijas laika optimizēšana

Slaidi pirms hibridizācijas atdzesēti līdz istabas temperatūrai	Ātri pārvietojiet priekšmetstiklīņus hibridizācijas temperatūrā
---	---

Signālu pārklāšanās

Iespējamais iemesls	Rīcība
Neatbilstošs audu griezumā biezums	Sagatavojiet 3-5 μm mikrotoma griezumus

Paraugs peld no priekšmetstikliņa

Iespējamais iemesls	Rīcība
Pārāk spēcīga proteolītiskā pirmapstrāde	Pepsīna inkubācijas laika saīsināšana

17. Literatūra

- 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. Pārskatīšana



www.zytovision.com

Jaunākās lietošanas instrukcijas, kā arī lietošanas instrukcijas dažādās valodās skatīt [vietnē www.zytovision.com](http://www.zytovision.com).

Mūsu eksperti ir gatavi atbildēt uz jūsu jautājumiem. Lūdzu, sazinieties ar help@zytovision.com Drošības un veikspējas kopsavilkumu skatiet šādā dokumentā www.zytovision.com.



ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhäfena/ Vācija
Tālrunis: +49 471 4832-300
Fakss: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
E-pasts: info@zytovision.com

Preču zīmes:
ZytoVision® un ZytoDot® ir ZytoVision GmbH preču zīmes.