



ZytoDot SPEC ERBB2 Probe

REF C-3001-400

Σ 40 (0,4 ml)

Na kvalitatívnu detekciu amplifikácií ľudského génu ERBB2 pomocou chromogénnej *in situ* hybridizácie (CISH)

4250380P055QW



Diagnostická zdravotnícka pomôcka in vitro
podľa IVDR (EÚ) 2017/746

1. Zamýšľaný účel

Sonda ZytoDot SPEC ERBB2 Probe (PD1) je určená na kvalitatívnu detekciu amplifikácií ľudského génu ERBB2 vo vzorkách fixovaných formalínom a vložených do parafrínu, ako je napríklad rakovina prsníka, pomocou chromogénnej *in situ* hybridizácie (CISH). Sonda je určená na použitie v kombinácii so súpravou ZytoDot CISH Implementation Kit (č. C-3018-40).

Výrobok je určený len na profesionálne použitie. Všetky testy s použitím výrobku by mal vykonávať kvalifikovaný personál v certifikovanom, licencovanom laboratóriu anatomickej patológie pod dohľadom patológa/ľudského genetika.

Sonda je určená ako pomôcka pri diferenciálnej diagnostike rakoviny prsníka a terapeutické opatrenia by sa nemali začínať len na základe výsledku testu.

2. Princíp testu

Technika chromogénnej *in situ* hybridizácie (CISH) umožňuje detekciu a vizualizáciu špecifických sekvencií nukleových kyselín v bunkových preparátoch. Hapténom označené nukleotidové fragmenty, tzv. sondy CISH, a ich komplementárne cieľové sekvencie v preparátoch sú počas hybridizácie spoločne denaturované a následne sa nechajú hybridizovať. Potom sa nešpecifické a nenaviazané fragmenty sond odstránia premytím. Tvorbu duplexu značenej sondy možno vizualizovať pomocou primárnych (neoznačených) protilátok, ktoré sa detekujú pomocou sekundárnych polymerizovaných protilátok konjugovaných s enzýmom. Enzymatická reakcia s chromogénnymi substrátmi vedie k tvorbe farebných precipitátov. Po kontrastnom farbení jadra jadrovým farbivom sa hybridizované fragmenty sondy vizualizujú svetelným mikroskopom.

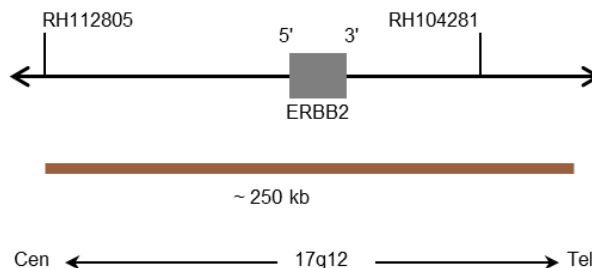
3. Poskytnuté reagentie

ZytoDot SPEC ERBB2 Probe sa skladá z:

- Polynukleotidy značené digoxigenínom (~1,8 ng/μl), ktoré sú zamerané na sekvencie mapujúce oblasť 17q12* (chr17:37,725,661-37,973,541), v ktorej sa nachádza oblasť génu ERBB2 (pozri obr. 1).

- Hybridizačný pufer na báze formamidu

*podľa zhromaždenia ľudského genómu GRCh37/hg19



Obr. 1: SPEC ERBB2 Mapa sondy (bez mierky)

Sonda ZytoDot SPEC ERBB2 Probe je k dispozícii v jednej veľkosti:

- C-3001-400: 0,4 ml (40 reakcií po 10 μl)

4. Požadované, ale neposkytované materiály

- ZytoDot CISH Implementation Kit (. C-3018-40)
- Pozitívne a negatívne kontrolné vzorky
- Mikroskopické sklíčka, kladne nabité
- Vodný kúpeľ (80 °C, 98 °C)
- Hybridizér alebo horúca platňa
- Hybridizátor alebo komora na udržiavanie vlhkosti v hybridizačnej peci
- Nastaviteľné pipety (10 μl, 1000 μl)
- Farbiace nádoby alebo kúpele
- Časovač
- Kalibrovaný teplomer
- Etanol alebo reagenčný alkohol
- Xylén
- Metanol 100%
- Peroxid vodíka (H₂O₂) 30%
- Deionizovaná alebo destilovaná voda
- Krycie sklíčka (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Gumové lepidlo, napr. Fixogum Rubber Cement (č. E-4005-50/-125) alebo podobné
- Primerane udržiavaný svetelný mikroskop (400-630x)

5. Skladovanie a manipulácia

Uchovávať pri teplote 2-8 °C vo zvislej polohe. Okamžite po použití vráťte do skladovacích podmienok. Nepoužívajte činidlá po dátume expirácie uvedenom na etike. Produkt je stabilný do dátumu expirácie uvedeného na etike, ak sa s ním zaobchádza primeraným spôsobom.

6. Upozornenia a bezpečnostné opatrenia

- Pred použitím si prečítajte návod na použitie!
- Nepoužívajte činidlá po uplynutí dátumu expirácie!
- Tento výrobok obsahuje látky (v nízkych koncentráciách a objemoch), ktoré sú zdraviu škodlivé a potenciálne infekčné. Vyhňte sa akémukoľvek priamemu kontaktu s činidlami. Vykonajte vhodné ochranné opatrenia (používajte jednorazové rukavice, ochranné okuliare a laboratórny odev)!
- Každý závažný incident, ku ktorému došlo v súvislosti s výrobkom, nahláste výrobcovi a príslušnému orgánu podľa miestnych predpisov!
- Ak sa činidlá dostanú do kontaktu s pokožkou, okamžite ju opláchnite veľkým množstvom vody!
- Pre profesionálnych používateľov je na požiadanie k dispozícii karta bezpečnostných údajov.
- Reagentie nepoužívajte opakovane, pokiaľ nie je opakované použitie výslovne povolené!

- Vyhnite sa krížovej kontaminácii vzoriek, pretože to môže viesť k chybným výsledkom.
- Počas hybridizácie a premývania sa vzorky nesmú nechať vyschnúť.

Výstražné a bezpečnostné upozornenia:

Komponent určujúcou nebezpečenstvo je formamid.



Nebezpečenstvo

H351	Podozrenie, že spôsobuje rakovinu.
H360FD	Môže poškodiť plodnosť. Môže poškodiť nenarodené dieťa.
H373	Môže spôsobiť poškodenie orgánov pri dlhodobej alebo opakovanej expozícii.
P201	Pred použitím si vyžiadať špeciálne pokyny.
P202	Nemanipulujte s ním, kým si neprečítate a nepochopíte všetky bezpečnostné opatrenia.
P260	Nevdychujte prach/dym/plyn/hmlu/výpary/sprej.
P280	Používajte ochranné rukavice/ochranný odev/ochranu očí/ochranu tváre.
P308+P313	Po expozícii alebo podozrení z nej: Vyhľadajte lekársku pomoc/starostlivosť.
P405	Skladujte uzamknuté.

7. Obmedzenia

- Na diagnostické použitie *in vitro*.
- Len na profesionálne použitie.
- Len na neautomatizované použitie.
- Klinická interpretácia akéhokoľvek pozitívneho farbenia alebo jeho neprítomnosti sa musí vykonať v kontexte klinickej anamnézy, morfológie, iných histopatologických kritérií, ako aj iných diagnostických testov. Kvalifikovaný patológ/humánny genetik je povinný poznať sondy CISH, reagenty, diagnostické panely a metódy používané na výrobu farbeného preparátu. Farbenie sa musí vykonávať v certifikovanom, licencovanom laboratóriu pod dohľadom patológa/humánneho genetika, ktorý je zodpovedný za preskúmanie farbených preparátov a zabezpečenie primeranosti pozitívnych a negatívnych kontrol.
- Zafarbenie vzorky, najmä intenzita signálu a zafarbenie pozadia, závisí od manipulácie so vzorkou a jej spracovania pred zafarbením. Nesprávna fixácia, zmrazenie, rozmrazenie, premývanie, sušenie, zahrievanie, rezanie alebo kontaminácia inými vzorkami alebo tekutinami môže spôsobiť artefakty alebo falošné výsledky. Nekonzistentné výsledky môžu byť dôsledkom rozdielov v metódach fixácie a vkladania, ako aj vnútorných nepravidielností vo vzorke.
- Sonda by sa mala používať len na detekciu lokusov opísaných v kapitole 3. "Dodávané činidlá".
- Výkon bol overený pomocou postupov opísaných v tomto návode na použitie. Úpravy týchto postupov môžu zmeniť výkon a musí ich overiť používateľ. Tento IVD je certifikovaný ako CE len vtedy, keď sa používa tak, ako je opísané v tomto návode na použitie v rozsahu určeného použitia.

8. Rušivé látky

Nasledujúce fixatíva sú nekompatibilné s ISH:

- Bouinovo fixačné činidlo
- Fixačné činidlo B5
- Kyslé fixačné prostriedky (napr. kyselina pikrová)
- Zenkerov fixatív
- Alkoholy (ak sa používajú samostatne)
- Chlorid ortuťnatý
- Formaldehydové/zinkové fixačné činidlo
- Hollandova fixácia
- Formálín bez pufru

9. Príprava vzoriek

Prípravte vzorky podľa návodu na použitie súpravy ZytoDot CISH Implementation Kit.

10. Prípravné ošetrovanie zariadenia

Výrobok je pripravený na použitie. Nie je potrebná rekonštitúcia, miešanie ani riedenie. Pred použitím uveďte sondu na izbovú teplotu (18 - 25 °C) a chráňte ju pred svetlom. Pred otvorením injekčnej liekovky premiešajte vortexovaním a krátko roztočte.

11. Postup analýzy

Predúprava vzorky

Vykonajte predúpravu vzorky (napr. odparafinovanie, proteolýzu) podľa návodu na použitie súpravy ZytoDot CISH Implementation Kit.

Denaturácia a hybridizácia

1. Pipetujte 10 µl sondy na každú vopred upravenú vzorku.
 2. Vzorky zakryte krycím sklíčkom s rozmermi 22 x 22 mm (zabráňte zachytávaniu bublín) a krycie sklíčko utesnite.
- Na utesnenie odporúčame použiť gumové lepidlo (napr. Fixogum).*
3. Umiestnite sklíčka na horúcu platňu alebo hybridizátor a vzorky denaturujte 5 minút pri 94-95 °C.
 4. Sklíčka preneste do vlhkej komory a hybridizujte cez noc pri 37 °C (napr. v hybridizačnej peci).

Je dôležité, aby vzorky počas hybridizácie nevyschli.

Po hybridizácii

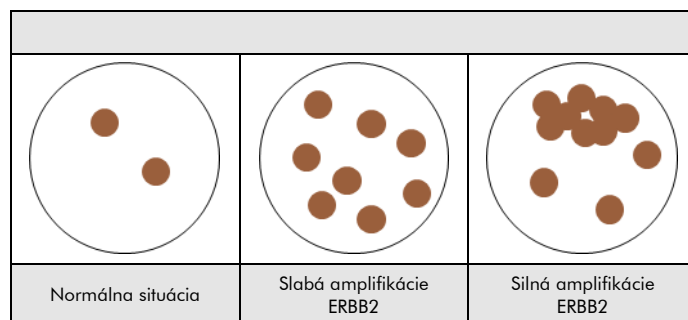
Spracovanie po hybridizácii (premývanie, detekcia, kontrastné farbenie, montáž, mikroskopovanie) vykonajte podľa návodu na použitie súpravy ZytoDot CISH Implementation Kit.

12. Interpretácia výsledkov

Pri použití súpravy ZytoDot CISH Implementation Kit sa hybridizačné signály polynukleotidov značených digoxigenínom zobrazujú hnedo až tmavohnedo (oblasť génu ERBB2).

Normálna situácia: V interfázach normálnych buniek alebo buniek bez amplifikácie zahŕňajúcej oblasť génu ERBB2 sa objavujú dva odlišné hnedé signály v tvare bodky (pozri obr. 2).

Neštandardná situácia: V bunkách s amplifikáciou oblasti génu ERBB2 alebo polyzómiou chromozómu 17 sa pozoruje zvýšený počet hnedých signálov alebo zhlukov hnedých signálov (pozri obr. 2).



Obr. 2: Očakávané výsledky v normálnych a aberantných jadrách

V niektorých abnormálnych vzorkách možno pozorovať iné vzory signálov, ako sú opísané vyššie. Tieto neočakávané vzory signálov by mali byť ďalej preskúmané.

Upozornenie:

- Vzhľadom na dekonzenzovaný chromatin sa jednotlivé signály CISH môžu javiť ako malé zhluky signálov. Preto by sa dva alebo tri signály rovnakej veľkosti, oddelené vzdialenosťou ≤ 1 priemer signálu, mali považovať za jeden signál.
- Pred vyčíslením signálu by sa mala vzorka naskenovať kvôli prípadnej intratumorálnej heterogenite pri 100- až 200-násobnom zväčšení.



- Vizualizácia signálov by sa mala vykonávať aspoň pri 400- až 630-násobnom zväčšení, čo vedie k ľahko viditeľným signálom.
- Nehodnotte oblasti nekrózy, prekryvajúcich sa jadier, nadmerne natrávených jadier a jadier so slabou intenzitou signálu.
- V dôsledku mitózy môžu byť ďalšie signály viditeľné aj v malom percente nenádorových buniek. Príležitostne sa môžu v parafínových vzorkách pozorovať jadrá s chýbajúcimi signálmi v dôsledku artefaktov pri rezaní.
- Negatívny alebo nešpecifický výsledok môže byť spôsobený viacerými faktormi (pozri kapitolu 16 "Riešenie problémov").
- V záujme správnej interpretácie výsledkov musí používateľ tento výrobok pred použitím v diagnostických postupoch validovať podľa národných a/alebo medzinárodných smerníc.

13. Odporúčané postupy kontroly kvality

Na monitorovanie správneho fungovania spracovaných vzoriek a testovacích činidiel by mali byť ku každému testu pripojené interné a externé kontroly. Ak interné a/alebo externé kontroly nepreukážu vhodné zafarbenie, výsledky so vzorkami pacientov sa musia považovať za neplatné.

Interná kontrola: Nenádorové bunky vo vzorke, ktoré vykazujú normálny vzor signálu, napr. fibroblasty.

Externé ovládanie: Validované pozitívne a negatívne kontrolné vzorky.

14. Výkonnostné charakteristiky

14.1 Analytický výkon

Výkonnosť sondy sa určila porovnaním s príslušnou sondou FISH schválenou IVD.

Analytická citlivosť:	100% (95% CI 98.5 – 100.0)
Analytická špecifickosť:	100% (95% CI 97.0 – 100.0)

14.2 Klinický výkon

Diagnostická senzitivita:	100% (95% CI 83.2 – 100.0) vs. FISH, CISH
Diagnostická špecifita:	100% (95% CI 83.2 – 100.0) vs. FISH, CISH

15. Likvidácia

Likvidácia činidiel sa musí vykonávať v súlade s miestnymi predpismi.

16. Riešenie problémov

Akákoľvek odchýlka od návodu na obsluhu môže viesť k horším výsledkom farbenia alebo k tomu, že sa farbenie vôbec nevyskytne. Viac informácií nájdete na stránke www.zytovision.com.

Slabý signál alebo žiadny signál

Možná příčina	Akcia
Predbežná proteolytická úprava nebola vykonaná správne	Optimalizujte čas inkubácie pepsínu, v prípade potreby ho predĺžte alebo skráťte
Odparovanie sondy	Pri používaní hybridizéra je používanie vlhkých pásov/ nádrží naplnených vodou povinné. Pri používaní hybridizačnej pece je potrebné používať vlhkú komoru. Okrem toho by malo byť krycie sklo úplne utesnené, napr. pomocou Fixogumu, aby sa zabránilo vysychaniu vzorky počas hybridizácie
Nedostatočná príprava chromogénneho substrátu	Namiesto jednej kvapky roztoku DAB A použite 30 µl

Príliš dlhý čas kontrastného farbenia	Vyhňte sa tmavému kontrastnému farbeniu, pretože môže zakryť pozitívne signály farbenia
Nesprávne vykonané modrenie kontrastného farbiva	Na modrenie používajte studenú tečúcu vodu z vodovodu; nepoužívajte teplú alebo horúcu vodu ani modriace činidlá.

Príliš silné signály

Možná příčina	Akcia
Proteolytická predúprava vykonávaná príliš dlho	Optimalizujte čas inkubácie pepsínu, v prípade potreby ho predĺžte alebo skráťte
Reakcia substrátu je príliš intenzívna	Skrátiť čas inkubácie substrátu; roztok substrátu nezahrievať nad 25 °C; inkubovať len pri izbovej teplote

Signály zanikajú alebo sa spájajú

Možná příčina	Akcia
Bolo použité nevhodné montovacie médium	Používajte len montážny roztok dodaný so súpravou alebo montážne roztoky na báze xylénu bez akýchkoľvek nečistôt; nepoužívajte kryciu pásku

Nerovnomerné alebo v niektorých častiach len veľmi ľahké zafarbenie

Možná příčina	Akcia
Neúplné odparafinovanie	Používajte čerstvé roztoky; skontrolujte dĺžku trvania odparafinovania
Príliš malý objem činidla	Uistite sa, že objem činidla je dostatočne veľký na pokrytie plochy tkaniva

Nekonzistentné výsledky

Možná příčina	Akcia
Nedostatočné vysušenie pred aplikáciou sondy	Predĺženie sušenia na vzduchu
Príliš veľa vody/preplachovacieho pufru na tkanive pred aplikáciou pepsínu, protilátok a/alebo farebných substrátov	Uistite sa, že prebytočná tekutina je z tkanivového rezu odstránená odsávaním alebo vytriasaním zo sklíčka. Malé množstvá zvyškovej vody/preplachovacieho pufru neinterferujú s testom
Rozdiely v metódach fixácie a vkladania tkaniva	Optimalizácia metód fixácie a vkladania
Zmeny v hrúbke tkanivového rezu	Optimalizácia rezania vzorky

Zhoršená morfológia

Možná příčina	Akcia
Vzorka buniek alebo tkaniva nebola správne fixovaná	Optimalizácia času fixácie a fixačného prostriedku
Proteolytická predúprava sa nevykonáva vhodný časový interval	Skrátenie času inkubácie pepsínu

Krížové hybridizačné signály; silné pozadie

Možná příčina	Akcia
Sekcie vysušené kedykoľvek počas hybridizácie alebo po nej	Zabráňte vysušeniu rezov; použite vlhkú komoru; riadne utesnite krycie sklíčko
Predĺžený čas inkubácie substrátu	Skrátenie času inkubácie substrátu
Neúplné odparafínovanie	Používajte čerstvé roztoky; skontrolujte trvanie odparafínovania
Príliš silná proteolytická predúprava	Optimalizujte čas inkubácie pepsínu
Sklíčka sú pred hybridizáciou ochladené na izbovú teplotu	Rýchlo presuňte sklíčka na hybridizačnú teplotu

Prekrývajúce sa signály

Možná příčina	Akcia
Nevhodná hrúbka tkanivových rezov	Pripravte 3-5 μm rezy mikrotomom

Vzorka vypláva zo sklíčka

Možná příčina	Akcia
Príliš silná proteolytická predúprava	Skrátenie inkubačného času pepsínu

17. Literatúra

- 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. Revízia
www.zytovision.com

Najnovší návod na použitie, ako aj návod na použitie v rôznych jazykoch nájdete na stránke www.zytovision.com.

Naši odborníci sú pripravení odpovedať na vaše otázky.

Obráťte sa na help@zytovision.com

Prehľad o bezpečnosti a výkonnosti nájdete na www.zytovision.com.



ZytoVision GmbH

Fischkai 1

27572 Bremerhaven/ Nemecko

Telefón: +49 471 4832-300

Fax: +49 471 4832-509

www.zytovision.com

E-mail: info@zytovision.com

Ochranné známky:

ZytoVision® a ZytoDot® sú ochranné známky spoločnosti ZytoVision GmbH.