



F/exSH ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe

REF Z-2166-50 Σ 5 (0,05 ml)

REF Z-2166-200 Σ 20 (0,2 ml)

Na kvalitatívnu detekciu amplifikácií ľudského génu ERBB2 a alfa satelitov chromozómu 17 pomocou fluorescenčnej *in situ* hybridizácie (FISH)

4250380P232QU



Diagnostická zdravotnícka pomôcka in vitro

podľa IVDR (EÚ) 2017/746

1. Zamýšľaný účel

Sonda F/exSH ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe (PL122) je určená na kvalitatívnu detekciu amplifikácií ľudského génu ERBB2, ako aj na detekciu alfa satelitov chromozómu 17 vo vzorkách fixovaných formalínom a vložených do parafínu, ako je rakovina prsníka a rakovina žalúdka/gastroezofageálneho spojenia, pomocou fluorescenčnej *in situ* hybridizácie (FISH). Sonda je určená na použitie v kombinácii so súpravou F/exSH-Tissue Implementation Kit (č. Z-2182-5/-20).

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/humánneho genetika.

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

2. Princíp testu

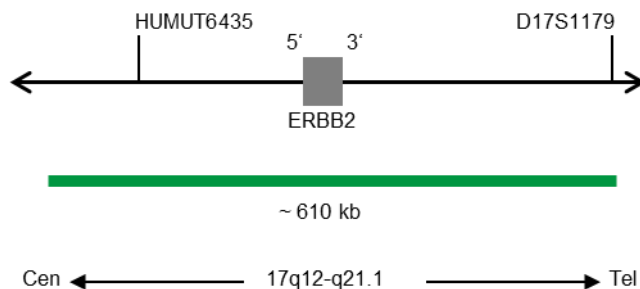
Technika fluorescenčnej *in situ* hybridizácie (FISH) umožňuje detekciu a vizualizáciu špecifických sekvencií nukleových kyselín v bunkových preparátoch. Fluorescenčne označené fragmenty DNA, tzv. sondy FISH, a ich komplementárne cieľové reťazce DNA v preparátoch sa počas hybridizácie spoločne kodenaturujú a následne nechajú hybridizovať. Potom sa nešpecifické a nenaviazané fragmenty sond odstránia premytím. Po protifarbení DNA pomocou DAPI sa hybridizované fragmenty sond vizualizujú pomocou fluorescenčného mikroskopu vybaveného excitačnými a emisnými filtermi špecifickými pre fluorochrómy, ktorými boli fragmenty sond FISH priamo označené.

3. Poskytnuté činidlá

F/exSH ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe sa skladá z:

- ZyGreen (excitácia 503 nm/emisia 528 nm) značené polynukleotidy (~10,0 ng/μl), ktoré sú zamerané na sekvencie mapujúce oblasť 17q12-q21.1* (chr17:37,572,531-38,181,308), v ktorej sa nachádza oblasť génu ERBB2 (pozri obr. 1).
- ZyOrange (excitácia 547 nm/emisia 572 nm) značené polynukleotidy (~1,0 ng/μl), ktoré sú zamerané na sekvencie mapujúce v 17p11.1-q11.1 špecifické pre alfa satelitnú centromerickú oblasť D17Z1 chromozómu 17 (pozri obr. 1).

*podľa Human Genome Assembly GRCh37/hg19



Obr. 1: ERBB2 Mapa sondy (bez mierky)

Sonda F/exSH ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe je k dispozícii v dvoch veľkostiach:

- Z-2166-50: 0,05 ml (5 reactions of 10 μl each)
- Z-2166-200: 0,2 ml (20 reactions of 10 μl each)

4. Požadované, ale neposkytované materiály

- F/exSH-Tissue Implementation Kit (č. Z-2182-5/-20)
- Pozitívne a negatívne kontrolné vzorky
- Mikroskopické sklíčka, kladne nabité
- Vodný kúpeľ (37 °C, 98 °C)
- Hybridizér alebo horúca platňa
- Hybridizér alebo komora na udržiavanie vlhkosti v hybridizačnej peci
- Nastaviteľné pipety (10 μl, 25 μl)
- Farbiace nádoby alebo kúpele
- Časovač
- Kalibrovateľný teplomer
- Etanol alebo reagenčný alkohol
- Xylén
- Deionizovaná alebo destilovaná voda
- Krycie sklíčka (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Gumové lepidlo, napr. Fixogum Rubber Cement (č. E-4005-50/-125) alebo podobný
- Primerane udržiavaný fluorescenčný mikroskop (400-1000x)
- Imerzný olej schválený pre fluorescenčnú mikroskopiu
- Vhodné súpravy filtrov

5. Skladovanie a manipulácia

Skladujte pri teplote 2 - 8 °C vo zvislej polohe chránenej pred svetlom. Používajte chránené pred svetlom. Okamžite po použití vráťte do skladovacích podmienok. Nepoužívajte činidlá po dátume expirácie uvedenom na etikete. Produkt je stabilný do dátumu expirácie uvedeného na etikete, 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. Vyhnite sa akémukoľvek priamemu kontaktu s činidlami. Prijmite 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.
- Reagencie nepoužívajte opakovane, pokiaľ nie je opakované použitie výslovne povolené!
- Zabráňte krížovej kontaminácii vzoriek, pretože to môže viesť k chybným výsledkom.
- Sonda by nemala byť dlhší čas vystavená svetlu, najmä silnému svetlu, t. j. všetky kroky by sa mali vykonávať, ak je to možné, v tme a/alebo s použitím nádob odolných voči svetlu.

Výstražné a bezpečnostné upozornenia:

Zložkou určujúcou nebezpečenstvo je formamid.



Nebezpečenstvo

H319	Spôsobuje vážne podráždenie očí.
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 vyžiadajte špeciálne pokyny.
P260	Nevdychujte prach/dym/plyn/hmlu/výpary/spreje.
P280	Používajte ochranné rukavice/ochranný odev/ochranu očí/ochranu tváre.
P305+P351+P338	Pri zasiahnutí očí: Opatrne niekoľko minút vyplachujte vodou. Odstráňte kontaktné šošovky, ak sú prítomné a je to ľahké. Pokračujte vo vyplachovaní.
P308+P313	Po expozícii alebo podozrení z nej: Vyhľadajte lekársku pomoc/starostlivosť.
P337+P313	Ak podráždenie očí pretrváva: Vyhľadajte lekársku pomoc/opatrenie.

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. Je zodpovednosťou kvalifikovaného patológa/humánneho genetika, aby poznal sondy FISH, reagencie, diagnostické panely a metódy použité 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, umývanie, 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

Červené krvinky prítomné vo vzorke môžu vykazovať autofluorescenciu, ktorá bráni rozpoznaniu signálu.

Nasledujúce fixatíva sú nekompatibilné s FISH:

- 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 [F/exlSH-Tissue 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 liekovky premiešajte vortexovaním a krátko scentrifugujte.

11. Postup analýzy

Predbežná úprava vzorky

Vykonajte predbežnú úpravu vzorky (odparaťovanie, proteolýzu) podľa návodu na použitie súpravy [F/exlSH-Tissue 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 hybridizér a vzorky denaturujte 10 minút pri teplote 75 °C.
 4. Hybridizáciu vykonávajte 2 h až 16 h (t. j. cez noc) pri teplote 37 °C prenesením preparátov do hybridizéra alebo do vlhkej komory a hybridizačnej pece.

Je dôležité, aby vzorky počas hybridizácie nevyschli.

Po hybridizácii

Spracovanie po hybridizácii (premytie, kontrastné farbenie, fluorescenčná mikroskopia) vykonajte podľa návodu na použitie súpravy [F/exlSH-Tissue Implementation Kit](#).

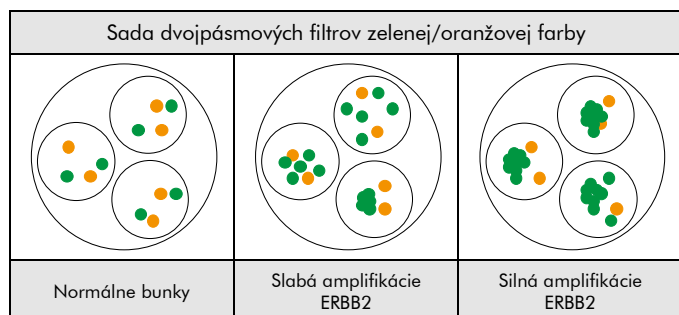
12. Interpretácia výsledkov

Pri použití vhodných súprav filtrov sa hybridizačné signály sondy zobrazujú zelené (oblasť génu ERBB2) a oranžové (CEN 17).

Normálna situácia: V interfázach normálnych buniek alebo buniek bez amplifikácie zahŕňajúcej oblasť génu ERBB2 sa zobrazujú dva zelené a dva oranžové signály (pozri obr. 2).

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

Prekrývajúce sa signály sa môžu zobrazovať ako žlté signály.



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 FISH 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.
- Nehodnotte prekrývajúce sa jadrá.
- Nepočítajte nadmerne natrávené jadrá (rozpoznať podľa tmavých oblastí viditeľných vo vnútri jadier).
- Nepočítajte jadrá so silnou autofluorescenciou, ktorá bráni rozpoznaní signálu.
- 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.

Vnútorňá 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

Výkon sa hodnotil podľa návodu na použitie súpravy F/ISH-Tissue Implementation Kit.

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

14.2 Klinický výkon

Diagnostická senzitivita:	Rakovina prsníka: 93% (95% CI 91.0 – 95.0) na základe dvojrozmerného modelu Rakovina žalúdka a rakovina gastroezofageálneho spojenia: 88% (95% CI 74.0 – 95.0) na základe dvojrozmerného modelu
Diagnostická špecifita:	Rakovina prsníka: 98% (95% CI 97.0 – 99.0) na základe dvojrozmerného modelu Rakovina žalúdka a rakovina gastroezofageálneho spojenia: 95% (95% CI 92.0 – 97.0) na základe dvojrozmerného modelu

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 príčina	Akcia
Vzorka nebola správne upevnená	Optimalizácia času fixácie a fixačného prostriedku
Predbežná proteolytická úprava nebola vykonaná správne	Optimalizujte čas inkubácie pepsínu, v prípade potreby ho predĺžte alebo skráťte
Odparovanie sondy	Pri používaní hybridizéru 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.
Použitie nevhodných súprav filtrov	Použite sady filtrov vhodné pre fluochrómy sondy. <i>Sady filtrov s trojpásmovou priepustnosťou poskytujú menej svetla v porovnaní so sadami filtrov s jednopásmovou alebo dvoj pásmovou priepustnosťou. V dôsledku toho sa signály pri použití týchto trojpásmových filtračných súprav môžu javiť slabšie.</i>

Křížové hybridizačné signály; zašumené pozadie

Možná príčina	Akcia
Neúplné odparafinovanie	Používajte čerstvé roztoky; skontrolujte trvanie odparafinovania
Príliš silná proteolytická predúprava	Skrátiť čas inkubácie pepsínu
Sklička pred hybridizáciou ochladená na izbovú teplotu	Sklička rýchlo presuňte na teplotu 37 °C

Zhoršená morfológia

Možná príčina	Akcia
Vzorka nebola správne upevnená	Optimalizácia času fixácie a fixačného prostriedku
Predbežná proteolytická úprava nebola vykonaná správne	Optimalizujte čas inkubácie pepsínu, v prípade potreby ho skráťte
Nedostatočné vysušenie pred aplikáciou sondy	Predĺženie sušenia na vzduchu

Prekrývajúce sa jadrá

Možná príčina	Akcia
Nevhodná hrúbka tkanivových rezov	Prípravte 2-4 μ m rezy mikrotomom

Vzorka vypláva zo sklička

Možná príčina	Akcia
Príliš silná proteolytická predúprava	Skrátenie inkubačného času pepsínu

Slabá protifarbivá

Možná příčina	Akcia
Nízko koncentrovaný roztok DAPI	Namiesto toho použite <u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (č. produktu MT-0008-0.8)
Príliš krátky čas inkubácie DAPI	Úprava času inkubácie DAPI

17. Literatúra

- 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.
- 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. Revízia
www.zytovision.com

Najnovší návod na použitie, ako aj návod na použitie v rôznych jazykoch nájdete na [stránke www.zytovision.com](http://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 F/exlSH® sú ochranné známky spoločnosti ZytoVision GmbH.