



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)

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

4250380P078RA



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

1. Zamýšľaný účel

Sonda ZytoDot 2C SPEC ERBB2/CEN 17 Probe (PD12) je určená na kvalitatívnu detekciu amplifikácií ľudského génu ERBB2, ako aj na detekciu alfa satelitov chromozómu 17 vo vzorkách fixovaných formalínom a zaliatých do parafínu, ako je napríklad rakovina prsníka, pomocou chromogénnej *in situ* hybridizácie (CISH). Sonda je určená na použitie v kombinácii so súpravou ZytoDot 2C CISH Implementation Kit (č. -C304410/40).

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/humánneho 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 kodenaturované a následne sa nechajú hybridizovať. Potom sa nešpecifické a nenaviazané fragmenty sond odstránia postupným premývaním. 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 svetelnou mikroskopiou.

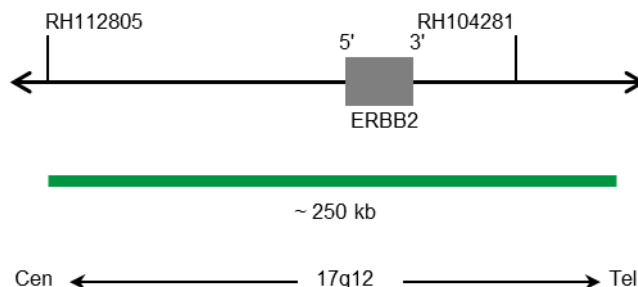
3. Poskytnuté činidlá

ZytoDot 2C SPEC ERBB2/CEN 17 Probe sa skladá z:

- Polynukleotidy značené digoxigenínom (~1,1 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).
- Polynukleotidy značené dinitrofenylom (~1,1 ng/μl), ktoré sú zamerané na sekvencie mapujúce 17p11.1-q11.1 špecifické pre alfa satelitnú centromerickú oblasť D17Z1 chromozómu 17 (pozri obr. 1).

- Hybridizačný pufer na báze formamidu

*podľa zhromaždenia ľudského genómu GRCh37/hg19



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

Sonda ZytoDot 2C SPEC ERBB2/CEN 17 Probe je k dispozícii v dvoch veľkostiach:

- C-3032-100: 0,1 ml (10 reakcií po 10 μl)
- C-3032-400: 0,4 ml (40 reakcií po 10 μl)

4. Požadované, ale neposkytované materiály

- ZytoDot 2C CISH Implementation Kit (č. C-3044-10/4-0)
- Pozitívne a negatívne kontrolné vzorky
- Mikroskopické sklíčka, kladne nabité
- Vodný kúpeľ (80 °C, 98 °C)
- Hybridizér alebo horúca platňa
- Hybridizér 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 (výrobné číslo 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 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!
- Vyhňte sa krížovej kontaminácii vzoriek, pretože to môže viesť k chybným výsledkom.
- Vzorky sa nesmú nechať vyschnúť počas hybridizácie a premývania.

Výstražné a bezpečnostné upozornenia:

Zložkou 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, reagencie, diagnostické panely a metódy používané na výrobu farbeného preparátu. Farbenie sa musí vykonávať v certifikovanom, licencovanom laboratóriu pod dohľadom patológa/ludského 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

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 2C CISH Implementation Kit.

10. Prípravné ošetrenie 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

Predbežná úprava vzorky

Vykonajte predbežnú úpravu vzorky (napr. odparafinovanie, proteolýzu) podľa návodu na použitie súpravy ZytoDot 2C 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 gumový cement (napr. Fixogum).*
3. Umiestnite sklíčka na horúcu platňu alebo hybridizér a vzorky denaturujte 5 minút pri 79 °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 (premytie, detekcia, kontrastné farbenie, montáž, mikroskopovanie) vykonajte podľa návodu na použitie súpravy ZytoDot 2C CISH Implementation Kit.

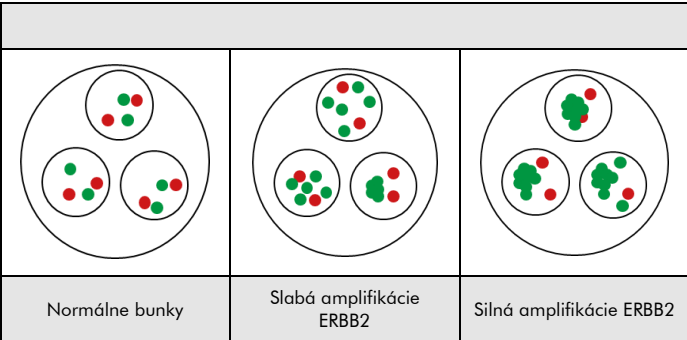
12. Interpretácia výsledkov

Pri použití súpravy ZytoDot 2C CISH Implementation Kit sa hybridizačné signály polynukleotidov značených digoxigenínom zobrazia ako tmavozelené odlišné body (oblasť génu ERBB2) a polynukleotidy značené dinitrofenylom sa zobrazia ako jasne červené odlišné body (CEN 17).

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

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

Prekrývajúce sa signály sa môžu zobraziť ako hnedé 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 sa mali ďalej skúmať.



Upozornenie:

- Vzhľadom na dekonzenzovaný chromaín 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-násobnom zväčšení, čo vedie k ľahko viditeľným signálom. Pre sondy detekujúce chromozomálne zlomy sa odporúča 630-násobné zväčšenie. Nepoužívajte šošovky s filtrom zvyšujúcim kontrast, pretože by to mohlo skresliť farbu signálu. Ak chcete získať signály v jasných farbách, otvorte clonu. Pri hodnotení jadra nezabudnite zaostriť nahor a nadol, pretože červené a zelené signály sa môžu nachádzať nad sebou.
- Nehodnoťte oblasti nekrozy, prekrývajúcich sa jadier, nadmerne strávených 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.

Vnútna 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:	91% (95% CI 86.0 – 95.0) na základe dvojrozmerného modelu
Diagnostická špecifita:	97% (95% CI 93.0 – 99.0) na základe dvojrozmerného modelu

15. Likvidácia

Likvidácia činidiel sa musí vykonávať v súlade s miestnymi predpismi.

16. Riešenie problémov

Akákkoľvek 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 hybridizéru je používanie vlhkých pásov/nádří naplnených vodou povinné. Pri používaní hybridizačnej pece je potrebné používať komoru s vlhkosťou. Okrem toho by malo byť krycie skličko úplne utesnené, napr. pomocou Fixogumu, aby sa zabránilo vysychaniu vzorky počas hybridizácie
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
Čas inkubácie roztoku AP-Red nie je správny	V prípade potreby možno inkubačný čas skrátiť na 5 minút. Roztok substrátu nezahrievajte nad 25 °C; inkubujte len pri izbovej teplote
Čas inkubácie roztoku HRP-Green nie je správny	V prípade potreby možno inkubačný čas skrátiť na 7 minút. Roztok substrátu nezahrievajte nad 25 °C; inkubujte len pri izbovej teplote

Príliš slabé červené signály

Možná příčina	Akcia
Roztok AP-Red bol vystavený silnému priamemu svetlu	Roztok AP-Red pripravujte a používajte chránený pred silným priamym svetlom
Roztok AP-Red bol pripravený príliš skoro	Pripravte pred okamžitým použitím
Čas inkubácie roztoku AP-Red nie je správny	V prípade potreby je možné inkubáciu predĺžiť až na 15 min.
Nedostatočná príprava chromogénneho substrátu	Nezvyšujte objem roztoku A

Príliš slabé zelené signály

Možná příčina	Akcia
Príliš dlhý čas inkubácie pri každom kroku premývania po farbení pomocou HRP-Green	Neprekračujte uvedený inkubačný čas
Čas inkubácie roztoku HRP-Green nie je správny	V prípade potreby je možné inkubáciu predĺžiť až na 15 min.
Nedostatočná príprava chromogénneho substrátu	Nezvyšujte objem roztoku A

Signály zanikajú alebo sa spájajú

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

rezy neboli správne dehydrované	Používajte čerstvé roztoky etanolu a xylénu; používajte iba xylén "čistej" kvality
---------------------------------	--

Nerovnomerné alebo v niektorých častiach len veľmi ľahké zafarbenie

Možná príčina	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 príčina	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 zvyškovj vody/preplachovacieho pufru neinterferujú s testom
Rozdiely v metódach fixácie a vkladania tkaniva	Optimalizácia metód fixácie a vkladania
Zmeny v hrúbke tkanivového rezu	Optimalizácia delenia na sekcie

Zhoršená morfológia

Možná príčina	Akcia
Vzorka buniek alebo tkaniva nebola správne fixovaná	Optimalizácia času fixácie a fixačného prostriedku
Proteolytická predúprava sa uskutočnila príliš dlho	Skrátenie času inkubácie pepsínu

Křížové hybridizačné signály; silné pozadie

Možná příčina	Akcia
Sekcie vysušené kedykoľvek počas hybridizácie alebo po nej	Zabráňte vysušeniu rezov; použite vlhkú komoru na; riadne utesnite krycie sklíčko
Predĺžený čas inkubácie substrátu	Skrátenie času inkubácie substrátu
Neúplné odparafinovanie	Používajte čerstvé roztoky; skontrolujte trvanie odparafinovania
Príliš silná proteolytická predúprava	Optimalizujte čas inkubácie pepsínu
Sklíčka 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

- 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 Technol 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. 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.