



ZytoDot 2C SPEC ERBB2/CEN 17 Probe

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

Pour la détection qualitative des amplifications du gène ERBB2 humain et des satellites alpha du chromosome 17 par hybridation chromogénique *in situ* (CISH)

4250380P078RA



Dispositif médical de diagnostic *in vitro*
conformément à l'IVDR (UE) 2017/746

1. Utilisation prévue

Le ZytoDot 2C SPEC ERBB2/CEN 17 Probe (PD12) est destiné à la détection qualitative des amplifications impliquant le gène humain ERBB2 ainsi qu'à la détection des satellites alpha du chromosome 17 dans des échantillons fixés au formol et inclus en paraffine, tels que le cancer du sein, par hybridation chromogénique *in situ* (CISH). La sonde est destinée à être utilisée en association avec le ZytoDot 2C CISH Implementation Kit (n° de produit C 3044 10/ 40).

Le produit est destiné à un usage professionnel uniquement. Tous les tests utilisant le produit doivent être réalisés dans un laboratoire d'anatomie pathologique certifié et agréé, sous la supervision d'un médecin pathologiste/généticien, par du personnel qualifié.

La sonde est destinée à être utilisée comme une aide au diagnostic différentiel du cancer du sein et des mesures thérapeutiques ne doivent pas être prises sur la base du seul résultat du test.

2. Principe du test

La technique d'hybridation chromogénique *in situ* (CISH) permet la détection et la visualisation de séquences d'acides nucléiques spécifiques dans des préparations cellulaires. Les fragments de nucléotides marqués par des haptènes, appelés sondes CISH, et leurs séquences cibles complémentaires dans les préparations sont codénaturés et ensuite hybridés pendant l'hybridation. Les fragments de sondes non spécifiques et non liés sont éliminés par des étapes de lavage stringent. La formation de duplex de la sonde marquée peut être visualisée en utilisant des anticorps primaires (non marqués), qui sont détectés par des anticorps secondaires polymérisés conjugués à une enzyme. La réaction enzymatique avec les substrats chromogènes conduit à la formation de précipités colorés. Après avoir contre-coloré le noyau avec un colorant nucléaire, les fragments de sonde hybridés sont visualisés au microscope optique.

3. Réactifs fournis

ZytoDot 2C SPEC ERBB2/CEN 17 Probe est composé de :

- Polynucléotides marqués à la digoxigénine (~1,1 ng/μl), qui ciblent des séquences cartographiées en 17q12* (chr17:37,725,661-37,973,541) hébergeant la région du gène ERBB2 (voir Fig. 1).
- Polynucléotides marqués au dinitrophényle (~1,1 ng/μl), qui ciblent des séquences cartographiées dans 17p11.1-q11.1 spécifiques de la région centromérique satellite alpha D17Z1 du chromosome 17 (voir Fig. 1).
- Tampon d'hybridation à base de formamide

* selon Human Genome Assembly GRCh37/hg19

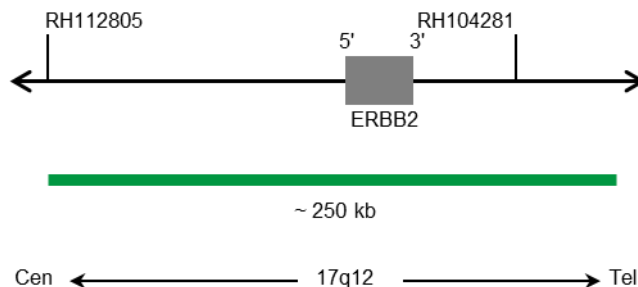


Fig. 1 : Carte de la sonde SPEC ERBB2 (pas à l'échelle)

La sonde ZytoDot 2C SPEC ERBB2/CEN 17 Probe est disponible en deux tailles:

- C-3032-100: 0,1 ml (10 réactions de 10 μl chacune)
- C-3032-400: 0,4 ml (40 réactions de 10 μl chacune)

4. Matériel requis mais non fourni

- ZytoDot 2C CISH Implementation Kit (Prod. No. C-3044-10/-40)
- Échantillons de contrôle positifs et négatifs
- Lames pour microscope, chargées positivement
- Bain-marie (80°C, 98°C)
- Appareil à hybridation ou plaque chauffante
- Appareil à hybridation ou chambre humide
- Pipettes ajustable (10 μl, 1000 μl)
- Bocaux ou bains de coloration
- Minuteur
- Thermomètre calibré
- Ethanol ou alcool
- Xylène
- Méthanol 100%
- Peroxide d'hydrogène (H₂O₂) 30%
- Eau dionisée ou distillée
- Lamelles (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Ciment caoutchouc, par exemple, Fixogum Rubber Cement (Prod. No. E-4005-50/-125) ou similaire
- Microscope lumineux correctement entretenu (400-630x)

5. Stockage et manipulation

Conserver entre 2 et 8 °C dans une position verticale. Remettre dans les conditions de stockage immédiatement après utilisation. Ne pas utiliser les réactifs après leur date de péremption indiquée sur l'étiquette. Le produit est stable jusqu'à sa date de péremption indiquée sur l'étiquette lorsqu'il est utilisé dans les bonnes conditions.

6. Avertissements et précautions

- Lire les instructions avant utilisation !
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
- Ce produit contient des substances (en faibles concentrations et volumes) nocifs pour la santé et potentiellement infectieux. Éviter le contact direct avec ces réactifs. Prenez les mesures de protection appropriées (utilisez des gants jetables, des lunettes de protection et des vêtements de laboratoire) !
- Signaler tout incident grave survenu en rapport avec le produit au fabricant et à l'autorité compétente, conformément à la réglementation locale!
- Si les réactifs entrent en contact avec la peau, rincer immédiatement avec beaucoup d'eau.

- Une fiche signalétique de sécurité à l'usage de l'utilisateur professionnel est disponible sur demande.
- Ne pas réutiliser les réactifs, sauf si la réutilisation est explicitement autorisée!
- Éviter la contamination croisée des échantillons car cela peut entraîner des résultats erronés.
- Les spécimens ne doivent pas être laissés sécher pendant les étapes d'hybridation et de lavage.

Mentions de danger et conseils de prudence :

Le composant dangereux déterminant est le formol.



Danger

H351	Susceptible de provoquer le cancer.
H360FD	Peut nuire à la fertilité. Peut nuire au fœtus.
H373	Risque présumé d'effets graves pour les organes à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée.
P201	Se procurer les instructions spéciales avant utilisation.
P202	Ne pas manipuler avant d'avoir lu et compris toutes les précautions de sécurité.
P260	Ne pas respirer les poussières/ fumées/gaz/ brouillards/ vapeurs/ aérosols.
P280	Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
P308+P313	EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée : consulter un médecin.
P405	Garder sous clef.

7. Restrictions

- Destiné à une utilisation en diagnostic *in vitro*.
- Destiné à un usage professionnel uniquement.
- Pour une utilisation non automatisée uniquement.
- L'interprétation clinique de toute coloration positive, ou de son absence, doit être faite dans le contexte de l'histoire clinique, de la morphologie, des autres critères histopathologiques ainsi que des autres tests diagnostiques. Il est de la responsabilité d'un médecin pathologiste/généticien qualifié de se familiariser avec les sondes CISH, les réactifs, les panels de diagnostic et les méthodes utilisées pour produire la préparation colorée. La coloration doit être effectuée dans un laboratoire certifié et autorisé sous la supervision d'un pathologiste/généticien humain qui est responsable de l'interprétation des lames colorées et de vérifier l'adéquation des contrôles positifs et négatifs.
- La coloration de l'échantillon, en particulier l'intensité du signal et le bruit de fond, dépend de la manipulation et de la préparation de l'échantillon avant marquage. Une mauvaise fixation, congélation, décongélation, un mauvais lavage, séchage, chauffage, de mauvaises coupes, ou une contamination avec d'autres échantillons ou fluides peut produire des artefacts et de faux résultats. Des résultats incohérents peuvent résulter des variations des méthodes de fixation et d'inclusion, ainsi que des irrégularités inhérentes à l'échantillon.
- La sonde doit être utilisée uniquement pour la détection du locus décrit au paragraphe 3. « Réactifs fournis ».
- Les performances ont été validées en utilisant les procédures décrites dans ce mode d'emploi. Des modifications de ces procédures peuvent altérer les performances et doivent être validées par l'utilisateur. Ce produit IVD n'est certifié CE que lorsqu'il est utilisé comme décrit dans ce mode d'emploi, dans le cadre de l'utilisation prévue.

8. Substances interférentes

Les fixateurs suivants sont incompatibles avec la ISH :

- Fixateur de Bouin
- Fixateur B5
- Fixateurs acides (par exemple l'acide picrique)
- Fixateur de Zenker
- Alcools (lorsqu'ils sont utilisés seuls)
- Chlorure de mercure
- Fixateur formaldéhyde/zinc
- Fixateur de Hollande
- Formol non tamponné

9. Préparation des échantillons

Préparer les échantillons en suivant les instructions d'utilisation de [ZytoDot 2C CISH Implementation Kit](#).

10. Traitement préparatoire du produit

Le produit est prêt à l'emploi. Il n'est pas nécessaire de le reconstituer, le mélanger ou le diluer. Mettre la sonde à température ambiante (18 à 25 °C) avant utilisation, à l'abri de la lumière. Avant d'ouvrir le tube, mélanger à l'aide d'un vortexeur et centrifuger brièvement.

11. Protocole

Prétraitement de l'échantillon

Effectuer le prétraitement des échantillons (par exemple, déparaffinage, protéolyse) selon les instructions d'utilisation du [ZytoDot 2C CISH Implementation Kit](#).

Dénaturation et hybridation

1. Mettre 10 µl de sonde sur chaque échantillon prétraité.
 2. Couvrir les échantillons avec des lamelles de 22 mm x 22 mm (en évitant les bulles) et sceller les lamelles.
- Nous recommandons d'utiliser un ciment caoutchouc (par exemple le Fixogum) pour sceller.*
3. Placer les lames sur une plaque chauffante ou dans un système d'hybridation pour dénaturer les échantillons pendant 5 min à 79 °C.
 4. Transférer les lames dans une chambre humide et les hybrider pendant la nuit à 37 °C (par exemple, dans un four d'hybridation).

Il est essentiel que les échantillons ne sèchent pas pendant l'étape d'hybridation.

Post-hybridation

Effectuer le traitement post-hybridation (lavage, détection, contre-coloration, montage, microscopie) en suivant les instructions d'utilisation du [ZytoDot 2C CISH Implementation Kit](#).

12. Interprétation des résultats

En utilisant le [kit ZytoDot 2C CISH Implementation Kit](#), les signaux d'hybridation des polynucléotides marqués à la digoxigénine apparaissent sous forme de points distincts de couleur vert foncé (région du gène ERBB2), et les polynucléotides marqués à la dinitrophényle apparaissent sous forme de points distincts de couleur rouge vif (CEN 17).

Situation normale : Dans les interphases de cellules normales ou de cellules sans amplification impliquant la région du gène ERBB2, deux signaux distincts en forme de points verts et deux signaux distincts en forme de points rouges apparaissent (Voir figure 2).

Situation aberrante : Dans les cellules présentant une amplification de la région du gène ERBB2, on observe un nombre accru de signaux verts ou de grappes de signaux verts (Voir figure 2).

Les signaux qui se chevauchent peuvent apparaître comme des signaux bruns.

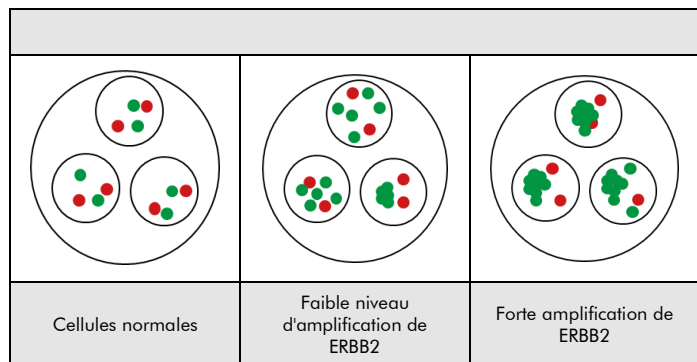


Fig. 2: Résultats attendus dans les noyaux en interphase normaux et présentant une aberration

D'autres modèles de signaux que ceux décrits ci-dessus peuvent être observés dans certains échantillons anormaux. Ces signaux inattendus doivent être examinés de manière plus approfondie.

Veillez noter :

- En raison de la chromatine décondensée, les signaux CISH individuels peuvent apparaître sous forme de petits groupes de signaux. Ainsi, deux ou trois signaux de même taille, séparés par une distance ≤ 1 diamètre de signal, doivent être comptés comme un seul signal.
- Avant le dénombrement des signaux, l'échantillon doit être scanné pour détecter toute hétérogénéité intratumorale éventuelle à un grossissement de 100 à 200 fois.
- La visualisation des signaux doit être effectuée avec un grossissement d'au moins 400 fois, afin que les signaux soient facilement visibles. Un grossissement de 630 fois est recommandé pour les sondes détectant des cassures chromosomiques. N'utilisez pas de lentilles à filtre améliorant le contraste, car cela pourrait déformer la couleur du signal. Pour obtenir des signaux de couleurs vives, ouvrez le diaphragme d'ouverture. Veillez à faire la mise au point de haut en bas lorsque vous évaluez un noyau, car les signaux rouge et vert peuvent être superposés..
- Ne pas évaluer les zones de nécrose, les noyaux chevauchants, les noyaux surdigérés et les noyaux à faible intensité de signal.
- En raison de la mitose, des signaux supplémentaires peuvent être visibles même dans un faible pourcentage de cellules non néoplasiques. Parfois, des noyaux avec des signaux manquants peuvent être observés dans des spécimens enrobés de paraffine en raison d'artefacts de coupe.
- Un résultat négatif ou non spécifique peut être causé par de multiples facteurs (voir chapitre 16. "Assistance").
- Afin d'interpréter correctement les résultats, l'utilisateur doit valider ce produit avant de l'utiliser dans des procédures de diagnostic conformément aux directives nationales et/ou internationales.

13. Procédures de contrôle qualité recommandées

Afin de surveiller les performances correctes des spécimens traités et des réactifs d'essai, chaque dosage doit être accompagné de contrôles internes et externes. Si les contrôles internes et / ou externes n'indiquent pas une coloration appropriée, les résultats avec les échantillons de patients doivent être considérés comme invalides.

Contrôle interne : Cellules non néoplasiques dans l'échantillon qui présentent un motif de signal normal, par exemple des fibroblastes.

Contrôle externe : Echantillons contrôles négatifs et positifs validés.

14. Caractéristiques de performances

14.1 Performance analytique

La performance de la sonde a été déterminée par comparaison avec la sonde FISH correspondante approuvée par le DIV.

Sensibilité analytique:	100% (95% CI 98.5 – 100.0)
Spécificité analytique:	100% (95% CI 97.0 – 100.0)

14.2 Performance clinique

Sensibilité diagnostique:	91% (95% CI 86.0 – 95.0) sur la base d'un modèle à deux variables
Spécificité diagnostique:	97% (95% CI 93.0 – 99.0) based on a bivariate mode sur la base d'un modèle à deux variables l

15. Elimination

L'élimination des réactifs doit être effectuée conformément à la réglementation locale.

16. Assistance

Tout écart par rapport au mode d'emploi peut conduire à des résultats de coloration inférieurs ou à aucune coloration du tout. Veuillez consulter le site www.zytovision.com pour plus d'informations.

Faible signal ou aucun signal

Cause possible	Action
Le prétraitement protéolytique n'est pas effectué correctement	Optimiser le temps d'incubation de la pepsine, l'augmenter ou le diminuer si nécessaire
Evaporation de la sonde	Lors de l'utilisation d'un système d'hybridation, l'utilisation des bandes humides/réservoirs remplis d'eau est obligatoire. Lors de l'utilisation d'un four à hybridation, il faut utiliser une chambre humide. En outre, la lamelle doit être complètement scellée, par exemple avec du Fixogum, afin d'empêcher le séchage de l'échantillon lors de l'hybridation
Temps de contre coloration trop long	Évitez la contre-coloration sombre, car elle peut masquer les signaux de coloration positive
Le bleuissement de la contre-coloration n'a pas été effectué correctement	Utilisez l'eau courante froide du robinet ; n'utilisez pas d'eau chaude ou tiède, ni de réactifs

Des signaux trop forts

Cause possible	Action
Prétraitement protéolytique effectué trop longtemps	Optimiser le temps d'incubation de la pepsine, l'augmenter ou le diminuer si nécessaire
La durée d'incubation de AP-Red Solution n'est pas correcte	Si nécessaire, la durée d'incubation peut être réduite à 5 min. Ne pas chauffer la solution de substrat à plus de 25°C ; incubé uniquement à température ambiante
Le temps d'incubation de HRP-Green solution n'est pas correct	Si nécessaire, la durée d'incubation peut être réduite à 7 min. Ne pas chauffer la solution de substrat à plus de 25°C ; incubé uniquement à température ambiante

Seuls les signaux rouges sont trop faibles

Cause possible	Action
AP-Red Solution a été exposée à une forte lumière directe	Préparer et utiliser AP-Red Solution à l'abri d'une forte lumière directe
AP-Red Solution a été préparée trop tôt	Préparer avant l'utilisation immédiate
La durée d'incubation de AP-Red Solution n'est pas correcte	Si nécessaire, la durée d'incubation peut être prolongée jusqu'à 15 min
Préparation insuffisante du substrat chromogène	Ne pas augmenter le volume de la solution A

