



ZytoLight

CEN 17/SPEC ERBB2 Dual Color Probe

REF Z-2077-50 Σ 5 (0,05 ml)

REF Z-2077-200 Σ 20 (0,2 ml)

Az emberi ERBB2 génamplifikációk és a 17 kromoszóma alfa-szatellitiek minőségi kimutatására fluoreszcens *in situ* hibridizációval (FISH)

4250380P096RC



In vitro diagnosztikai orvostechikai eszköz
az IVDR (EU) 2017/746 szerint

1. Rendeltetészerű cél

A **ZytoLight CEN 17/SPEC ERBB2 Dual Color Probe (PL36)** a humán ERBB2 gént érintő amplifikációk minőségi kimutatására, valamint a 17-es kromoszóma alfa-szatellitiek kimutatására szolgál formalin-fixált, paraffinba ágyazott mintákban, például emlőrákban és gyomor/nyelőcső-nyelőcső-összeköttetési rákban, fluoreszcens *in situ* hibridizációval (FISH). A szonda a **ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit** (Prod. No. Z-2028-5/-20) készlettel együtt használható.

A termék kizárólag professzionális használatra készült. A termékkel végzett valamennyi vizsgálatot minősített, engedéllyel rendelkező anatómiai patológiai laboratóriumban, patológus/humángenetikus felügyelete mellett, szakképzett személyzetnek kell elvégeznie.

A próba az emlőrák és a gyomor/nyelőcsőrak differenciáldiagnózisának segédeszközeként szolgál, és terápiás intézkedéseket nem szabad kizárólag a teszteredmény alapján kezdeményezni.

2. A vizsgálat elve

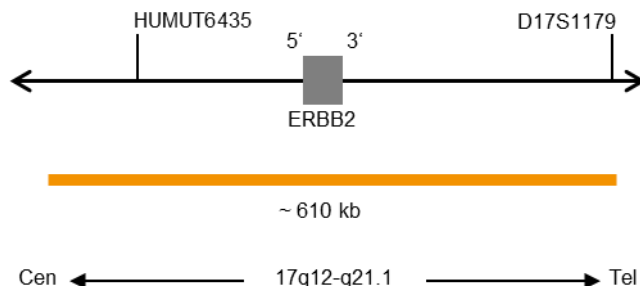
A fluoreszcens *in situ* hibridizációs (FISH) technika lehetővé teszi specifikus nukleinsav-szekvenciák kimutatását és vizualizálását sejtkészítményekben. A fluoreszcensen jelölt DNS-törödékek, az úgynevezett FISH-szondák és a preparátumokban lévő komplementer cél-DNS-szálak együttesen denaturálódnak, majd a hibridizáció során hagyják, hogy a DNS-törödékek egymáshoz kapcsolódjanak. Ezt követően a nem specifikus és nem kötött szondafragmentumokat szigorú mosási lépésekkel távolítják el. A DNS DAPI-val történő ellenfestése után a hibridizált szondafragmentumokat fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizualizáljuk, amely olyan gerjesztő és emissziós szűrőkkel van felszerelve, amelyek specifikusak azokra a fluorokromokra, amelyekkel a FISH-szondafragmentumokat közvetlenül jelölték.

3. Rendelkezésre bocsátott reagensek

A **ZytoLight CEN 17/SPEC ERBB2 Dual Color Probe** a következőkből áll:

- ZyGreen (gerjesztés 503 nm/emisszió 528 nm) jelölt polinukleotidok (~4,5 ng/ μ l), amelyek a 17q12-q21.1* (chr17:37,572,531-38,181,308), amelyek a 17p11.1-q11.1 kromoszóma D17Z1 alfa-szatellit centromerikus régiójára specifikus, 17p11.1-q11.1 szekvenciákat célozzák.
- ZyOrange (gerjesztés 547 nm/emisszió 572 nm) jelölésű polinukleotidok (~4,5 ng/ μ l), az ERBB2 génterületet tartalmazó szekvenciákat célozzák meg (lásd az 1. ábrát).
- Formamid alapú hibridizációs puffer

*a Human Genome Assembly szerint GRCh37/hg19



1. ábra: SPEC ERBB2 (nem méretarányos)

A **ZytoLight CEN 17/SPEC ERBB2 Dual Color Probe** két méretben kapható:

- Z-2077-50: 0,05 ml (5 reakció, egyenként 10 μ l)
- Z-2077-200: 0,2 ml (20 reakció, egyenként 10 μ l)

4. Szükséges, de nem biztosított anyagok

- ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit** (Prod. No. Z-2028-5/-20)
- Pozitív és negatív kontrollminták
- Mikroszkópos tárgylemezek, pozitív töltésű
- Vízfürdő (37 °C, 98 °C)
- Hibridizátor vagy főzőlap
- Hibridizáló vagy páraakarra a hibridizációs kemencében
- Állítható pipetták (10 μ l, 25 μ l)
- Festőedények vagy fűrdők
- Időzítő
- Kalibrált hőmérő
- Etanol vagy reagens alkohol
- Xilol
- Deionizált vagy desztillált víz
- fedőlemezek (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Gumicement, pl. **Fixogum Rubber Cement** (Prod. No.E-4005-50/-125) vagy hasonló.
- Megfelelően karbantartott fluoreszcens mikroszkóp (400-1000x)
- Fluoreszcens mikroszkópiához jóváhagyott merülőolaj
- Megfelelő szűrőkészletek

5. Tárolás és kezelés

2-8 °C-on, fénytől védett, függőleges helyzetben tárolja. Használja fénytől védve. Használat után azonnal állítsa vissza a tárolási körülmények közé. Ne használja fel a reagenseket a címkén feltüntetett lejárati időn túl. A termék a címkén feltüntetett lejárati dátumig stabil, ha megfelelően kezelik.

6. Figyelmeztetések és óvintézkedések

- Használat előtt olvassa el a használati utasítást!
- Ne használja fel a reagenseket a lejárati idő lejártá után!
- Ez a termék (kis koncentrációban és mennyiségben) egészségre káros és potenciálisan fertőző anyagokat tartalmaz. Kerülje a reagensekkel való közvetlen érintkezést. Tegyen megfelelő védőintézkedéseket (használjon eldobható kesztyűt, védőszemüveget és laboratóriumi ruházatot)!
- A termékkel kapcsolatban bekövetkezett minden súlyos eseményt jelentsen a gyártónak és a helyi előírásoknak megfelelően az illetékes hatóságoknak!

- Ha a reagensek bőrrel érintkeznek, azonnal öblítse le a bőrt bőséges mennyiségű vízzel!
- A professzionális felhasználók számára kérésre biztonsági adatlap áll rendelkezésre.
- Ne használja újra a reagenseket, kivéve, ha az újrafelhasználás kifejezetten engedélyezett!
- Kerülje a minták keresztszennyeződését, mivel ez hibás eredményekhez vezethet.
- A szondát nem szabad hosszabb ideig fénynek, különösen erős fénynek kitenni, azaz minden lépést lehetőség szerint sötétben és/vagy fényálló edényben kell elvégezni.

Veszélyre és óvintézkedésekre vonatkozó nyilatkozatok:

A veszélyt meghatározó komponens a formamid.



Veszély

H351	Feltehetően rákot okoz..
H360FD	Károsíthatja a termékenységet. Károsíthatja a magzatot.
H373	Hosszan tartó vagy ismételt expozíció esetén szervi károsodást okozhat.
P201	Használat előtt kérje be a speciális utasításokat.
P202	Ne kezelje, amíg az összes biztonsági óvintézkedést el nem olvasta és meg nem érte.
P260	Ne lélegezzen be a port/füstöt/gázt/ködöt/gőzt/permetet.
P280	Viseljen védőkesztyűt/védő ruházatot/szemvédőt/arcvédőt.
P308+P313	HA kitétt vagy érintett: Kérjen orvosi tanácsot/megfigyelést.
P405	Elzárva tárolandó

7. Korlátozások

- *In vitro* diagnosztikai felhasználásra.
- Kizárólag professzionális használatra.
- Kizárólag nem automatizált használatra.
- A pozitív festődés klinikai értelmezését vagy annak hiányát a klinikai anamnézis, a morfológia, az egyéb szövettani kritériumok, valamint az egyéb diagnosztikai vizsgálatok összefüggésében kell elvégezni. A képzett patológus/humángenetikus felelőssége, hogy ismerje a FISH-szondákat, a reagenseket, a diagnosztikai paneleket és a festett preparátum előállításához használt módszereket. A festést tanúsított, engedélyezett laboratóriumban kell elvégezni, patológus/humángenetikus felügyelete mellett, aki felelős a festett tárgylemezek felülvizsgálatáért és a pozitív és negatív kontrollok megfelelőségének biztosításáért.
- A minták festése, különösen a jelintenzitás és a háttérfestés, függ a minta festést megelőző kezelésétől és feldolgozásától. A nem megfelelő fixálás, fagyasztás, felolvasztás, mosás, szárítás, melegítés, szeletelés vagy más mintákkal vagy folyadékokkal való szennyeződés artefaktumokat vagy hamis eredményeket eredményezhet. Az inkonzisztens eredmények a fixálási és beágyazási módszerek eltéréseiből, valamint a mintában rejlő szabálytalanságokból adódhatnak.
- A szonda csak a 3. fejezetben leírt lókuszkimutatására használható. "Reagensek".
- A teljesítményt a jelen használati utasításban leírt eljárásokkal validálták. Ezen eljárások módosítása megváltoztathatja a teljesítményt, és azt a felhasználónak kell hitelesítenie. Ez az IVD csak akkor rendelkezik CE tanúsítvánnyal, ha az ebben a használati utasításban leírtak szerint, a rendeltetészerű használat körében használják.

8. Interferenciát kiváltó anyagok

A mintában lévő vörösvértestek autofluoreszcenciát mutathatnak, ami akadályozza a jelfelismerést.

A következő fixálószerke nem kompatibilisek a FISH-vel:

- Bouin-fixáló
- B5 fixáló
- savas fixálók (pl. pikrinsav)
- Zenker-fixáló
- Alkohokok (önmagukban használva)
- Higany-klorid
- Formaldehid/cink fixáló
- Hollande fixáló
- Nem puffertelt formalin

9. A minták előkészítése

Készítse elő a mintákat a ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit használati utasításában leírtak szerint.

10. A készülék előkészítő kezelése

A termék használatra kész. Nincs szükség feloldásra, keverésre vagy hígításra. Használat előtt a szondát szobahőmérsékletre (18-25 °C) kell hozni, fénytől óvni kell. Az injekciós üveg felnyitása előtt vortexeléssel keverje össze, és rövid ideig forgassa le.

11. Vizsgálati eljárás

A minta előkezelése

Végezze el a minta előkezelését (viaszmentesítés, proteolízis) a ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit használati utasítása szerint.

Denaturáció és hibridizáció

1. Pipettázzon 10 µl szondát minden előkezelt mintára.
2. Fedje le a mintákat egy 22 mm x 22 mm-es fedőlappal (kerülje el a beszorult buborékokat), és zárja le a fedőlapot.

A tömítéshez *gumicement* (pl. *Fixogum*) használatát javasoljuk.

3. Helyezze a tárgylemezeket forró lemezre vagy hibridizátorra, és denaturálja a mintákat 10 percig 75 °C-on.
4. Helyezze át a tárgylemezeket egy páraakmárba, és hibridizáljon egy éjszakán át 37 °C-on (pl. hibridizációs kemencében).

Nagyon fontos, hogy a minták ne száradjanak ki a hibridizációs lépés során.

Hibridizáció utáni

Végezze el a hibridizáció utáni feldolgozást (mosás, ellenfestés, fluoreszcens mikroszkópia) a ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit használati utasítása szerint.

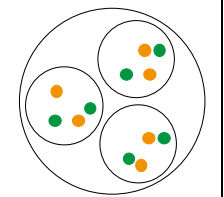
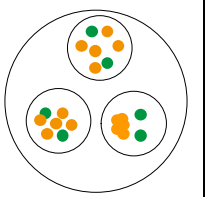
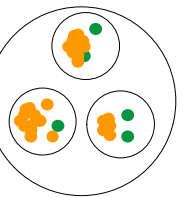
12. Az eredmények értelmezése

Megfelelő szűrőkészletek használatával a próba hibridizációs jelei zöld (CEN 17) és narancssárga (ERBB2 génterület) színűek.

Normál jelrendszer: A normál sejtek vagy az ERBB2 gén régióját érintő amplifikáció nélküli sejtek interfázisaiban két zöld és két narancssárga jel jelenik meg (lásd a 2. ábrát).

Rendellenes jelrendszer: Az ERBB2 gén régiójának amplifikációjával rendelkező sejtekben a narancssárga jelek vagy narancssárga jelcsoportok megnövekedett száma figyelhető meg. (lásd a 2. ábrát).

Az egymást átfedő jelek sárga jelzésként jelenhetnek meg.

Zöld/narancssárga kettős sávszűrő készlet		
		
Normál sejtek	Alacsony szintű ERBB2-amplifikáció	Magas szintű ERBB2-amplifikáció

2. ábra: Várható eredmények normális és rendellenes sejtmagok esetén

Egyes rendellenes mintákban a fent leírtaktól eltérő jelminták is megfigyelhetők. Ezeket a váratlan jelmintákat tovább kell vizsgálni.

Kérjük, vegye figyelembe:

- A dekonzenzált kromatin miatt az egyes FISH-jelek kis jelhalmazokként jelenhetnek meg. Ezért két vagy három azonos méretű, ≤ 1 jelátmérővel elválasztott jelet egy jelnek kell tekinteni.
- Ne értékelje az egymást átfedő magokat.
- Ne számolja meg a túlságosan megemésztett sejtmagokat (a sejtmagok belsejében látható sötét területekről ismerhető fel).
- Ne számolja az erős autofluoreszcenciájú sejtmagokat, amelyek akadályozzák a jelfelismerést.
- A negatív vagy nem specifikus eredményt több tényező is okozhatja (lásd a 16. fejezet "Hibaelhárítás" című részét).
- Az eredmények helyes értelmezése érdekében a felhasználónak a nemzeti és/vagy nemzetközi irányelveknek megfelelően validálnia kell a terméket a diagnosztikai eljárásokban való felhasználás előtt.

13. Ajánlott minőségellenőrzési eljárások

A feldolgozott minták és a vizsgálati reagensek megfelelő teljesítményének ellenőrzése érdekében minden egyes vizsgálathoz belső és külső kontrollokat kell rendelni. Ha a belső és/vagy külső kontrollok nem mutatnak megfelelő festődést, a betegmintákkal kapott eredményeket érvénytelennek kell tekinteni.

Belső ellenőrzés: Nem neoplasztikus sejtek a mintán belül, amelyek normális jelmintázatot mutatnak, pl. fibroblasztok.

Külső vezérlés: Validált pozitív és negatív kontrollminták.

14. Teljesítményjellemzők

14.1 Analitikai teljesítmény

A teljesítményt a *ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit* használati utasítása szerint értékelték.

Analitikai érzékenység:	100% (95% CI 98.5 – 100.0)
Analitikai specifikusság:	100% (95% CI 97.0 – 100.0)

14.2 Klinikai teljesítmény

Diagnosztikai érzékenység:	Mellrák: 93% (95% CI 91.0 – 95.0) kétváltozós modell alapján Gyomorrák és a gastrooesophagealis átmenet rákja: 88% (95% CI 74.0 – 95.0) kétváltozós modell alapján
Diagnosztikai specifikitás:	Mellrák: 98% (95% CI 97.0 – 99.0) kétváltozós modell alapján Gyomorrák és a gastrooesophagealis átmenet rákja: 95% (95% CI 92.0 – 97.0) kétváltozós modell alapján

15. Eltávolítás

A reagensek ártalmatlanítását a helyi előírásoknak megfelelően kell elvégezni.

16. Hibaelhárítás

A kezelési utasításoktól való bármilyen eltérés rosszabb festési eredményhez vagy egyáltalán nem festéshez vezethet. További információkért kérjük, olvassa el a www.zytovision.com/honlapot.

Gyenge jelek vagy egyáltalán nincs jel

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Nem megfelelően rögzített sejt- vagy szövetszövetminta	Optimalizálja a rögzítési időt és a fixálószeret, vagy alkalmazzon poszt-fixálási lépést a <i>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</i> kézikönyvének "Assay procedure" részében leírtak szerint.
Nem megfelelően végzett proteolitikus előkezelés	Optimalizálja a pepszin inkubációs idejét, szükség esetén növelje vagy csökkentse azt.
Szonda párologás	A hibridizáló használata esetén a nedves csikok/vízzel töltött tartályok használata kötelező. Hibridizáló kemence használata esetén a párakamra használata kötelező. Ezenkívül a fedőlemez teljesen le kell zárni, pl. Fixogummal, hogy megakadályozzák a minta kiszáradását a hibridizáció során.
Nem megfelelő szűrőkészletek használata	Használjon a szonda fluorokrómjainak megfelelő szűrőkészleteket. <i>A háromszoros sávszűrő-készletek kevesebb fényt biztosítanak az egy- vagy kétsávszűrő-készletekhez képest. Következésképpen a jelek halványabbnak tűnhetnek e háromsávú szűrőkészletek használatával.</i>

Kereszt hibridizációs jelek; zajos háttér

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Nem teljes viaszmentesítés	Használjon friss oldatokat; ellenőrizze a viaszmentesítés időtartamát.
Túl erős proteolitikus előkezelés	Csökkentse a pepszin inkubációs idejét
A tárgylemezeket hibridizáció előtt szobahőmérsékletre kell hűteni.	A tárgylemezeket gyorsan helyezze át 37 °C-ra

Morfológia romlott

Lehetséges ok	Javasolt teendő
A sejt- vagy szövetszövetminta nem megfelelően rögzítették	Optimalizálja a rögzítési időt és a fixálószeret, vagy alkalmazzon poszt-fixálási lépést a <i>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</i> kézikönyvének "Assay procedure" részében leírtak szerint.
Nem megfelelően végzett proteolitikus előkezelés	Optimalizálja a pepszin inkubációs idejét, szükség esetén csökkentse azt.
Élégtelen szárítás a szonda felhelyezése előtt	A levegőn való szárítás idejének növelése

Átfedő magok

Lehetséges ok	Javasolt teendő
A szöveti metszetek nem megfelelő vastagsága	Készítsünk 2-4 µm-es mikrotomos metszeteket

A minta lebeg a tárgylemezről

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Túl erős proteolitikus előkezelés	Csökkentse a pepszin inkubációs idejét

Gyenge ellenfesték

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Alacsony koncentrációjú DAPI-oldat	Használjon helyette <u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (Prod. No. MT-0008-0.8).
Túl rövid DAPI inkubációs idő	A DAPI inkubációs idő beállítása

17. Irodalom

- 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.
- Holtten-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.
- Page R, et al. (2022) *PloS one* 17(6): e0270139
- 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. Felülvizsgálatwww.zytovision.com

A legfrissebb használati utasításokat, valamint a különböző nyelvű használati utasításokat a www.zytovision.com oldalon találja.

Szakértőink készséggel válaszolnak kérdéseire.

Kérjük vegye fel velünk a kapcsolatot a helptech@zytovision.com címen.

A biztonságról és a teljesítményről szóló összefoglalót lásd a következő oldalon www.zytovision.com.



ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/ Németország
Telefon: +49 471 4832-300
Fax: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
E-mail: info@zytovision.com

Védjegyek:

A ZytoVision® és a ZytoLight® a ZytoVision GmbH védjegyei.