



ZytoDot 2C SPEC ERBB2/CEN 17 Probe

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

İnsan ERBB2 gen amplifikasyonlarının ve kromozom 17 alfa satellitlerinin kromojenik *in situ* hibridizasyon (CISH) ile kalitatif tespiti için

4250380P078RA



In vitro diagnostik tıbbi cihaz
IVDR (AB) 2017/746'ya göre

1. Hedeflenen amaç

ZytoDot 2C SPEC ERBB2/CEN 17 Probe (PD12), insan ERBB2 genini içeren amplifikasyonların kalitatif tespiti ve meme kanseri gibi formalinle sabitlenmiş, parafine gömülü örneklerde kromojenik *in situ* hibridizasyon (CISH) yoluyla kromozom 17 alfa uydularının tespiti için kullanılmak üzere tasarlanmıştır. Probu ZytoDot 2C CISH Implementation Kit (Ürün No. C-3044-10/-40) ile birlikte kullanılması amaçlanmıştır.

Ürün sadece profesyonel kullanım için tasarlanmıştır. Ürünün kullanıldığı tüm testler sertifikalı, lisanslı bir anatomik patoloji laboratuvarında bir patolog/insan genetikçisinin gözetimi altında kalifiye personel tarafından gerçekleştirilmelidir.

Probu meme kanserinin ayırıcı tanısına yardımcı olarak kullanılması amaçlanmıştır ve terapötik önlemler yalnızca test sonucuna göre başlatılmamalıdır.

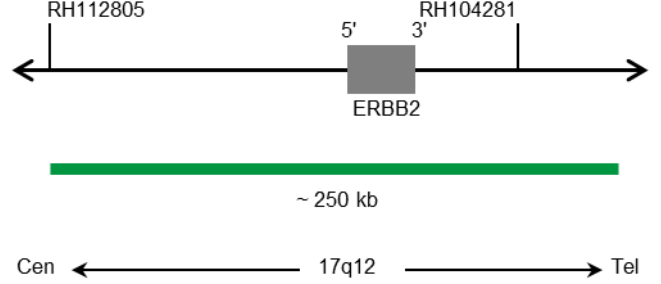
2. Test prensibi

Kromojenik *in situ* hibridizasyon (CISH) tekniği, hücre preparatlarında spesifik nükleik asit dizilerinin tespit edilmesini ve görüntülenmesini sağlar. CISH problemleri olarak adlandırılan hapten-ışaretili nükleotid fragmanları ve preparatlardaki tamamlayıcı hedef dizileri birlikte denatüre edilir ve daha sonra hibridizasyon sırasında tavlama işlemine izin verilir. Daha sonra, spesifik olmayan ve bağlanmamış prob parçaları sıkı yıkama adımları ile uzaklaştırılır. Işaretili probun dubleks oluşumu, ikincil polimerize enzim-konjuge antikörler tarafından tespit edilen birincil (ışaretsiz) antikörler kullanılarak görselleştirilebilir. Kromojenik substratlarla enzimatik reaksiyon, renkli çöktürmelerin oluşmasına yol açar. Çekirdeğin bir nükleer boya ile karşı boyanmasından sonra, hibridize prob parçaları ışık mikroskobu ile görselleştirilir.

3. Sağlanan reaktifler

ZytoDot 2C SPEC ERBB2/CEN 17 Probe oluşmaktadır:

- ERBB2 gen bölgesini barındıran 17q12'de (chr17:37,725,661-37,973,541) eşlenen dizileri hedefleyen dioksijenin ışaretili polinükleotidler (~1.1 ng/μl) (bkz. Şekil 1).
 - Kromozom 17'nin alfa uydusu sentromerik bölgesi D17Z1'e özgü 17p11.1-q11.1'de eşlenen dizileri hedefleyen dinitrofenil ışaretili polinükleotidler (~1,1 ng/μl) (bkz. Şekil 1).
 - Formamid bazlı hibridizasyon tamponu
- *İnsan Genomu Düzenlemesine göre GRCh37/hg19



Şekil 1: SPEC ERBB2 sonda haritası (ölçekli değil)

ZytoDot 2C SPEC ERBB2/CEN 17 Probe iki boyutta mevcuttur:

- C-3032-100: 0,1 ml (her biri 10 μl'lik 10 reaksiyon)
- C-3032-400: 0,4 ml (her biri 10 μl'lik 40 reaksiyon)

4. Gerekli ancak sağlanmayan malzemeler

- ZytoDot 2C CISH Implementation Kit (Ürün No. C-3044-10/-40)
- Pozitif ve negatif kontrol numuneleri
- Mikroskop lamaları, pozitif yüklü
- Su banyosu (80 °C, 98 °C)
- Hibridizatör veya sıcak plaka
- Hibridizasyon fırınında hibridizatör veya nem odası
- Ayarlanabilir pipetler (10 μl, 1000 μl)
- Boyama kavanozları veya banyoları
- Zamanlayıcı
- Kalibre edilmiş termometre
- Etanol veya reaktif alkol
- Ksilen
- Metanol %100
- Hidrojen peroksit (H₂O₂) %30
- Deiyonize veya damıtılmış su
- Kapaklı Klipsler (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Kauçuk çimento, örneğin, Fixogum Rubber Cement (Ürün No. E-4005-50/-125) veya benzeri
- Yeterince bakımı yapılmış ışık mikroskobu (400-630x)

5. Depolama ve taşıma

2-8 °C'de dik konumda saklayın. Kullanımdan hemen sonra saklama koşullarına geri döndürün. Etiket üzerinde belirtilen son kullanma tarihinden sonra reaktifleri kullanmayın. Ürün, uygun şekilde kullanıldığında etikette belirtilen son kullanma tarihine kadar stabildir.

6. Uyarılar ve önlemler

- Kullanmadan önce kullanım talimatlarını okuyun!
- Reaktifleri son kullanma tarihi geçtikten sonra kullanmayın!
- Bu ürün sağlığa zararlı ve potansiyel olarak bulaşıcı maddeler (düşük konsantrasyonlarda ve hacimlerde) içerir. Reaktiflerle doğrudan temastan kaçınınız. Uygun koruyucu önlemleri alın (tek kullanımlık eldivenler, koruyucu gözlükler ve laboratuvar giysileri kullanın)!
- Ürünle ilgili olarak meydana gelen her türlü ciddi olayı yerel yönetmeliklere uygun olarak üreticiye ve yetkili makama bildirin!
- Reaktifler ciltle temas ederse, cildi derhal bol miktarda suyla yıkayın!
- Profesyonel kullanıcılar için talep üzerine bir malzeme güvenlik bilgi formu temin edilebilir.
- Tekrar kullanıma açıkça izin verilmediği sürece reaktifleri tekrar kullanmayın!

- Hatalı sonuçlara yol açabileceğinden numunelerin çapraz kontaminasyonundan kaçının.
- Hibridizasyon ve yıkama adımları sırasında numunelerin kurummasına izin verilmemelidir.

Tehlike ve önlem beyanları:

Tehlikeyi belirleyen bileşen formamiddir.



Tehlike

H351	Kansere neden olduğundan şüpheleniliyor.
H360FD	Doğurganlığa zarar verebilir. Doğmamış çocuğa zarar verebilir.
H373	Uzun süreli veya tekrarlı maruz kalma sonucu organlarda hasara neden olabilir.
P201	Kullanmadan önce özel talimatları alın.
P202	Tüm güvenlik önlemleri okunup anlaşılmeden elleçlemeyin.
P260	Toz/duman/gaz/sis/buhar/sprey solumayın.
P280	Koruyucu eldiven/koruyucu giysi/göz koruması/ yüz koruması kullanın.
P308+P313	Maruz kaldıysanız veya endişeliyseniz: Tıbbi tavsiye/müdahale alın.
P405	Depo kilitli.

7. Sınırlamalar

- *In vitro* diagnostik kullanım için.
- Sadece profesyonel kullanım içindir.
- Yalnızca otomatik olmayan kullanım içindir.
- Herhangi bir pozitif boyamanın klinik yorumu veya yokluğu, klinik öykü, morfoloji, diğer histopatolojik kriterler ve diğer tanısal testler bağlamında yapılmalıdır. CISH problemleri, reaktifleri, tanı panelleri ve boyalı preparatı üretmek için kullanılan yöntemler hakkında bilgi sahibi olmak kalifiye bir patolog/insan genetikçisinin sorumluluğundadır. Boyama, boyanmış slaytları gözden geçirmekten ve pozitif ve negatif kontrollerin yeterliliğini sağlamaktan sorumlu olan bir patolog/insan genetikçisinin gözetimi altında sertifikalı, lisanslı bir laboratuvarında yapılmalıdır.
- Numune boyaması, özellikle sinyal yoğunluğu ve arka plan boyaması, boyamadan önce numunenin kullanımına ve işlenmesine bağlıdır. Uygun olmayan fiksasyon, dondurma, çözdürme, yıkama, kurutma, ısıtma, kesit alma veya diğer numuneler veya sıvıların kontaminasyon artefaktlarına veya yanlış sonuçlara neden olabilir. Tutarsız sonuçlar, fiksasyon ve gömme yöntemlerindeki farklılıkların yanı sıra numune içindeki doğal düzensizliklerden de kaynaklanabilir.
- Prob sadece bölüm 3'te açıklanan lokusları tespit etmek için kullanılmalıdır. "Sağlanan reaktifler".
- Performans, bu kullanım talimatlarında açıklanan prosedürler kullanılarak doğrulanmıştır. Bu prosedürlerde yapılacak değişiklikler performansı değiştirebilir ve kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır. Bu IVD, yalnızca bu kullanım talimatında açıklandığı şekilde amaçlanan kullanım kapsamında kullanıldığında CE sertifikasına sahiptir.

8. Müdahale eden maddeler

Aşağıdaki fiksatifler ISH ile uyumlu değildir:

- Bouin'in fiksatifi
- B5 fiksatif
- Asidik fiksatifler (örn. pikrik asit)
- Zenker fiksatifi
- Alkoller (tek başına kullanıldığında)
- Merkürük klorür
- Formaldehit/çinko fiksatifi
- Hollande'nin sabitleyicisi
- Tamponlanmamış formalin

9. Numunelerin hazırlanması

Örnekleri ZytoDot 2C CISH Implementation Kit kullanım talimatlarında açıklandığı şekilde hazırlayın.

10. Cihazın hazırlık işlemi

Ürün kullanıma hazırdır. Sulandırma, karıştırma veya seyreltme gerekmez. Kullanmadan önce probu oda sıcaklığına (18-25 °C) getirin, ışıktan koruyun. Flakonu açmadan önce vorteksleyerek karıştırın ve kısa bir süre döndürün.

11. Tahlil prosedürü

Numune ön işlemi

ZytoDot 2C CISH Implementation Kit kullanım talimatlarına göre numune ön işlemini (örn. mum alma, proteoliz) gerçekleştirin.

Denatürasyon ve hibridizasyon

1. Ön işlemden geçirilmiş her numuneye 10 µl prob pipetleyin.
2. Örnekleri 22 mm x 22 mm lamel ile kaplayın (sıkışmış kabarcıklardan kaçının) ve lameli kapatın.

Sızdırmazlık için kauçuk çimento (örn. Fixogum) kullanmanızı öneririz.

3. Lamaları sıcak bir plakaya veya hibridizatöre yerleştirin ve örnekleri 79 °C'de 5 dakika boyunca denatüre edin.
4. Lamaları bir nem odasına aktarın ve gece boyunca 37 °C'de hibridize edin (örn. bir hibridizasyon fırınında).

Hibridizasyon adımı sırasında numunelerin kurumaması çok önemlidir.

Hibridizasyon sonrası

Hibridizasyon sonrası işlemleri (yıkama, tespit, karşı boyama, montaj, mikroskop) ZytoDot 2C CISH Implementation Kit kullanım talimatlarına göre gerçekleştirin.

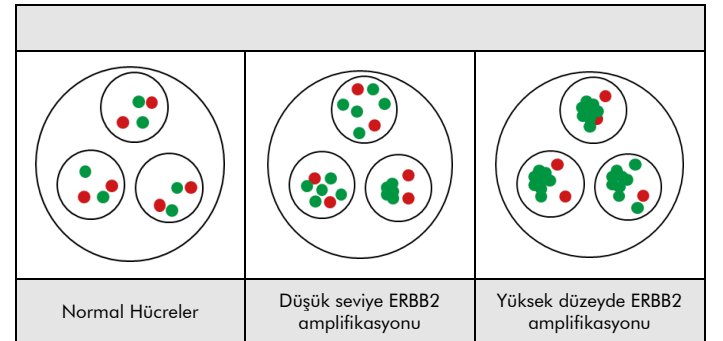
12. Sonuçların yorumlanması

ZytoDot 2C CISH Implementation Kit kullanıldığında, Digoxigenin ile işaretlenmiş polinükleotidlerin hibridizasyon sinyalleri koyu yeşil renkli belirgin noktalar (ERBB2 gen bölgesi) ve Dinitrofenil ile işaretlenmiş polinükleotidler parlak kırmızı renkli belirgin noktalar (CEN 17) olarak görünür.

Normal durum: Normal hücrelerin veya ERBB2 gen bölgesini içeren bir amplifikasyon içermeyen hücrelerin interfazlarında, iki farklı nokta şeklinde yeşil ve iki farklı nokta şeklinde kırmızı sinyal görünür (bkz. Şekil 2).

Anormal bir durum: ERBB2 gen bölgesinde amplifikasyon olan hücrelerde, artan sayıda yeşil sinyal veya yeşil sinyal kümeleri gözlenecektir (bkz. Şekil 2).

Çakışan sinyaller kahverengi sinyaller olarak görünebilir.



Şekil 2: Normal ve anormal çekirdeklere beklenen sonuçlar

Bazı anormal numunelerde yukarıda açıklananlardan farklı sinyal modelleri gözlemlenebilir. Bu beklenmedik sinyal modelleri daha fazla araştırılmalıdır.

Lütfen unutmayın:

- Dekondense kromatin nedeniyle, tek CISH sinyalleri küçük sinyal kümeleri olarak görülebilir. Bu nedenle, ≤ 1 sinyal çapı mesafeyle ayrılmış aynı boyuttaki iki veya üç sinyal tek bir sinyal olarak sayılmalıdır.
- Sinyal sayımından önce, numune 100 ila 200 kat büyütme ile olası intratümörül heterojenite açısından taranmalıdır.
- Sinyallerin görselleştirilmesi en az 400 kat büyütme ile yapılmalı ve kolayca görülebilen sinyaller elde edilmelidir. Kromozomal kırılmaları tespit eden problemler için 630 kat büyütme önerilir. Sinyal rengini bozabileceğinden kontrast artırıcı filtre lensleri kullanmayın. Parlak renklere sinyaller elde etmek için diyafram açıklığını açın. Bir çekirdeği değerlendirirken yukarı ve aşağı odaklandığınızdan emin olun, çünkü kırmızı ve yeşil sinyaller birbirinin üzerinde bulunabilir.
- Nekroz alanlarını, üst üste binen çekirdekleri, aşırı sindirilmiş çekirdekleri ve zayıf sinyal yoğunluğuna sahip çekirdekleri değerlendirmeyin.
- Mitoz nedeniyle, neoplastik olmayan hücrelerin küçük bir yüzdesinde bile ek sinyaller görülebilir. Bazen, parafine gömülü örneklerde kesme artefaktları nedeniyle eksik sinyalli çekirdekler gözlenebilir.
- Negatif veya spesifik olmayan bir sonuç birden fazla faktörden kaynaklanabilir (bkz. Bölüm 16 "Sorun Giderme").
- Sonuçların doğru bir şekilde yorumlanabilmesi için, kullanıcı bu ürünü tanı prosedürlerinde kullanmadan önce ulusal ve/veya uluslararası kılavuzlara göre doğrulamalıdır.

13. Önerilen kalite kontrol prosedürleri

İşlenmiş numunelerin ve test reaktiflerinin doğru performansını izlemek için, her tahlile dahili ve harici kontroller eşlik etmelidir. Dahili ve/veya harici kontroller uygun boyamayı gösteremezse, hasta numuneleriyle elde edilen sonuçlar geçersiz kabul edilmelidir.

Dahili kontrol: Örnek içinde normal sinyal paterni sergileyen neoplastik olmayan hücreler, örneğin fibroblastlar.

Harici kontrol: Onaylanmış pozitif ve negatif kontrol numuneleri.

14. Performans özellikleri**14.1 Analitik performans**

Proben performansı, ilgili IVD onaylı FISH probu ile karşılaştırılarak belirlenmiştir.

Analitik hassasiyet:	100% (95% CI 98.5 – 100.0)
Analitik özgüllük:	100% (95% CI 97.0 – 100.0)

14.2 Klinik performans

Tanısal duyarlılık	91% (95% CI 86.0 – 95.0) iki değişkenli bir modele dayalı
Teşhis özgüllüğü:	97% (95% CI 93.0 – 99.0) iki değişkenli bir modele dayalı

15. Bertaraf

Reaktiflerin imhası yerel yönetmeliklere uygun olarak gerçekleştirilmelidir.

16. Sorun Giderme

Kullanım talimatlarından herhangi bir sapma, düşük boyama sonuçlarına veya hiç boyama olmamasına neden olabilir. Daha fazla bilgi için lütfen www.zytovision.com adresine bakın.

Zayıf sinyaller veya hiç sinyal yok

Olası neden	Eylem
Proteolitik ön işlem düzgün yapılmamış	Pepsin inkübasyon süresini optimize edin, gerekirse artırın veya azaltın
Buharlaştırma probu	Bir hibridizatör kullanırken, ıslak şeritlerin/su dolu tankların kullanılması zorunludur. Bir hibridizasyon fırını kullanıldığında, bir nem odasının kullanılması gereklidir. Ayrıca, hibridizasyon sırasında numunenin kurumasını önlemek için lamel, örneğin Fixogum ile tamamen kapatılmalıdır

Karşı boyama süresi çok uzun	Koyu karşı boyamadan kaçının, çünkü pozitif boyama sinyallerini gizleyebilir
Karşı lekenin mavileştirilmesi düzgün yapılmamış	Mavileştirme için soğuk akan musluk suyu kullanın; ılık veya sıcak su veya mavileştirme reaktifleri kullanmayın

Sinyaller çok güçlü

Olası neden	Eylem
Proteolitik ön işlemin çok uzun sürmesi	Pepsin inkübasyon süresini optimize edin, gerekirse artırın veya azaltın
AP-Kırmızı Çözelti inkübasyon süresi doğru değil	Gerekirse inkübasyon süresi 5 dakikaya kadar kısaltılabilir. Substrat çözeltisini 25 °C'nin üzerinde ısıtmayın; sadece oda sıcaklığında inkübe edin
HRP-Green çözeltisi inkübasyon süresi doğru değil	Gerekirse inkübasyon süresi 7 dakikaya kadar kısaltılabilir. Substrat çözeltisini 25 °C'nin üzerinde ısıtmayın; sadece oda sıcaklığında inkübe edin

Kırmızı sinyaller çok zayıf

Olası neden	Eylem
AP-Kırmızı Çözelti güçlü doğrudan ışığa maruz bırakıldı	AP-Red Solüsyonunu güçlü doğrudan ışıktan koruyarak hazırlayın ve kullanın
AP-Kırmızı Çözelti çok erken hazırlandı	Hemen kullanmadan önce hazırlayın
AP-Kırmızı Çözelti inkübasyon süresi doğru değil	Gerekirse, inkübasyon süresi 15 dakikaya kadar uzatılabilir
Kromojenik substratın yetersiz hazırlanması	Çözelti A'nın hacmini artırmayın

Yeşil sinyaller çok zayıf

Olası neden	Eylem
HRP-Green ile boyamadan sonra herhangi bir yıkama adımının inkübasyon süresi çok uzun	Verilen inkübasyon sürelerini aşmayın
HRP-Green çözeltisi inkübasyon süresi doğru değil	Gerekirse, inkübasyon süresi 15 dakikaya kadar uzatılabilir
Kromojenik substratın yetersiz hazırlanması	Çözelti A'nın hacmini artırmayın

Sinyaller kaybolur veya birleşir

Olası neden	Eylem
Uygun olmayan bir montaj çözümü kullanılmıştır	Yalnızca kitle birlikte verilen montaj solüsyonunu veya herhangi bir yabancı madde içermeyen ksilen bazlı montaj solüsyonlarını kullanın; lamel bandı kullanmayın
Kesitler uygun şekilde dehidrate edilmemiş	Taze etanol ve ksilen çözeltileri kullanın; yalnızca "saf" kalitede ksilen kullanın

Düzensiz veya bazı kısımlarda sadece çok hafif lekelenme

Olası neden	Eylem
Eksik mum alma	Taze solüsyonlar kullanın; mum alma sürelerini kontrol edin
Reaktif hacmi çok küçük	Reaktif hacminin doku alanını kaplayacak kadar büyük olduğundan emin olun

Tutarsız sonuçlar

Olası neden	Eylem
Prob uygulamasından önce yetersiz kurutma	Hava ile kurutmayı uzatın
Pepsin, antikorlar ve/veya renk substratlarının uygulanmasından önce doku üzerinde çok fazla su/yıkama tamponu	Fazla sıvının doku kesitinden lekeleyerek veya lamdan sallayarak uzaklaştırıldığından emin olun. Az miktarda kalan su/yıkama tamponu testi etkilemez
Doku fiksasyonu ve gömme yöntemlerindeki varyasyonlar	Sabitleme ve gömme yöntemlerini optimize edin
Doku kesit kalınlığındaki değişimler	Kesit almayı optimize edin

Morfoloji bozulmuş

Olası neden	Eylem
Hücre veya doku örneği uygun şekilde sabitlenmemiş	Sabitleme süresini ve fiksatifini optimize edin
Proteolitik ön işlemin çok uzun süre yapılması	Pepsin inkübasyon süresini azaltın

Çapraz hibridizasyon sinyalleri; gürültülü arka plan

Olası neden	Eylem
Hibridizasyon sırasında veya sonrasında herhangi bir zamanda kurumuş kesitler	Kesitlerin kurummasını önleyin; nem odası kullanın; lamelleri uygun şekilde kapatın
Uzatılmış substrat inkübasyon süresi	Substrat inkübasyon süresini kısaltın
Eksik mum alma	Taze solüsyonlar kullanın; mum alma süresini kontrol edin
Proteolitik ön işlem çok güçlü	Pepsin inkübasyon süresini optimize edin
Hibridizasyondan önce oda sıcaklığına soğutulmuş slaytlar	Lamları hızlı bir şekilde hibridizasyon sıcaklığına aktarın

Çakışan sinyaller

Olası neden	Eylem
Doku kesitlerinin uygun olmayan kalınlığı	3-5 µm mikrotom kesitleri hazırlayın

Numune lam üzerinde yüzer

Olası neden	Eylem
Proteolitik ön işlem çok güçlü	Pepsin inkübasyon süresini kısaltın

17. Edebiyat

- 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. Revizyon

www.zytovision.com

En güncel kullanım talimatları ve farklı dillerdeki kullanım talimatları için lütfen www.zytovision.com adresine bakın.

Uzmanlarımız sorularınızı yanıtlamak için hazırdır. Lütfen helptech@zytovision.com ile iletişime geçin. Güvenlik ve performans özeti için lütfen bkz. www.zytovision.com.



ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/ Almanya
Telefon numarası: +49 471 4832-300
Faks: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
E-posta: info@zytovision.com

Ticari markalar:

ZytoVision® ve ZytoDot®, ZytoVision GmbH'nin ticari markalarıdır.