



ZytoMation

ERBB2/CEN 17 Dual Color FISH Probe

REF Z-2292-5.1ML



20'ye kadar
(5.1 ml)

Otomatik Bond sistemlerinde floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) ile insan ERBB2 geni amplifikasyonlarının ve 17. kromozom alfa uydularının kalitatif tespiti için



Vücut dışında kullanılan (*in vitro*) tıbbi tanı cihazı
98/79/EC AB Yönetmeliğine göre

1. Kullanım amacı

ZytoMation ERBB2/CEN 17 Dual Color FISH Probe (PL246) insan meme kanseri ve mide kanseri dokuları gibi formalin-fikse, parafine gömülü örneklerde insan ERBB2 geni amplifikasyonlarının beraberinde 17. kromozom alfa uydularının floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) ile kalitatif tespitinde kullanılmak içindir. Bu prob, Leica Biosystems'ın otomatik Bond-MAX veya Bond III sistemlerinde Bond FISH Kit (DS9636) ile kombine olarak kullanılmak içindir.

Sonuçların yorumlanması hastanın diğer klinik ve patolojik verileri dikkate alınarak hastanın klinik geçmişi kapsamında yetkin bir patolog tarafından yapılmalıdır.

2. Klinik bağlantısı

ERBB2 (HER2 ve NEU olarak da bilinir) geni 17q12 kromozom bölgesinde yer alır ve bir hücrel büyüme faktörü reseptörü olarak çalışan 185-190 kDa'luk bir transmembran glikoprotein p185'i kodlar. p185 proteini, RTK (reseptör tirozin kinaz) üst ailesinin aynı zamanda EGFR'nin (ERBB1), ERBB3'ün (HER2) ve ERBB4'ün (HER4) de yer aldığı EGFR (epidermal büyüme faktörü reseptörü) alt grubundandır. Tüm meme kanseri örneklerinin yaklaşık %20'sinde gözlenen proto-onkogen ERBB2 amplifikasyonu hastalığın zayıf prognozu ile ilişkilendirilmiştir. Over kanseri, mide kanseri ve tükürük bezi karsinomları gibi çeşitli diğer malin neoplazmlar için de benzer sonuçlar elde edilmiştir.

3. Test prensibi

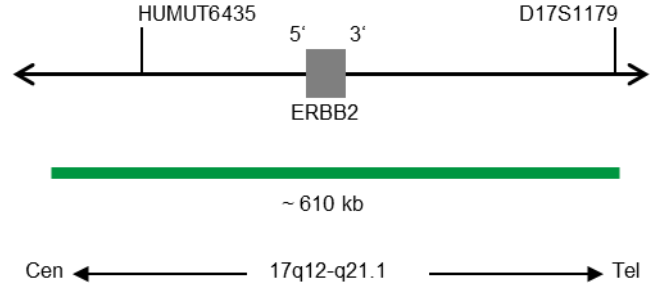
Floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) tekniği hücre preparatlarında spesifik nükleik asit dizilerinin tespit edilmesine ve görüntülenmesine izin verir. FISH probları denen floresan işaretli DNA fragmentleri ve bunların preparatlardaki komplementer hedef DNA iplikleri birlikte denatüre edilir ve sonra da hibridizasyon sırasında kaynaşmaları sağlar. Daha sonra da, spesifik olmayan ve bağlanma yapmayan prob fragmentleri güçlü yıkama adımları ile ortadan kaldırılır. DAPI ile DNA'nın zit boyanmasının ardından, hibridize olmuş prob fragmentleri, FISH prob fragmentlerinin doğrudan işaretlendiği florokromlara spesifik eksitasyon ve emisyon filtreleri bulunan bir floresan mikroskobu ile görüntülenir.

4. Sağlanan reaktifler

ZytoMation ERBB2/CEN 17 Dual Color FISH Probe şunları içerir:

- ZyGreen (eksitasyon 503 nm/emisyon 528 nm) işaretli polinükleotidler (~5,0 ng/μl) 17q12-q21.1* (chr17:37,572,531-38,181,308) konumunda bulunan ERBB2 gen bölgesini içeren dizileri hedef alır (bkz. Şekil 1).
- ZyOrange (eksitasyon 547 nm/emisyon 572 nm) işaretli polinükleotidler (~0,2 ng/μl) 17p11.1-q11.1 konumunda bulunan 17. kromozomun D17Z1 alfa uydusu sentromer bölgesine spesifik dizileri hedef alır.
- Formamid tabanlı hibridizasyon tamponu

*Human Genome Assembly GRCh37/hg19 'a göre.



Şekil 1: ERBB2 Probe yapısı (ölçekli değildir)

ZytoMation ERBB2/CEN 17 Dual Color FISH Probe tek şekilde temin edilir:

- Z-2292-5.1ML: 5,1 ml (her biri 240 μl olarak 20 reaksiyona kadar)

5. Gerekli diğer malzemeler

- Tam otomatik Bond-MAX sistemi (Leica Biosystems)
- Bond FISH Kit (DS9636)
- DAPI/DuraTect-Solution (MT-0007-0.8)
- Pozitif ve negatif kontrol örnekleri
- Mikroskop lamaları, pozitif yüklü
- Ayarlanabilir pipetler (25 μl, 1000 μl)
- Boyama kapları veya banyoları
- Zaman Sayacı
- Etanol veya reaktif dereceli alkol
- Deiyonize veya distile su
- Lamel (24 mm x 60 mm)
- Uygun donanımlı floresan mikroskobu (400-1000x)
- Floresan mikroskobu için onaylanmış immersiyon yağı
- Uygun filtre setleri

Gerekli diğer malzemeler hakkında daha fazla bilgi edinmek için ilgili tam otomatik boyama sisteminin kullanma kılavuzuna başvurun.

6. Saklama ve kullanma koşulları

2-8°C'de dik olarak ve ışıktan koruyarak saklayın.

ışıktan koruyarak kullanın. Kapağını açmadan önce şişeyi silkeleyerek sıvının kapaktan aşağı inmesini sağlayın. Kullandıktan sonra hemen saklama koşullarına ulaştırın. Reaktifleri etiketleri üzerinde belirtilen son kullanma tarihlerinden sonra kullanmayın. Ürün, uygun şekilde kullanıldığında ve saklandığında etiketi üzerinde belirtilen son kullanma tarihine kadar kullanılabilir.

7. Uyarılar ve önlemler

- Kullanmadan önce kullanma kılavuzunu okuyun!
- Son kullanma tarihi gelen ürünleri kullanmayın!
- Bu ürün manuel FISH prosedürlerinde kullanılmaz!
- Bu ürün sağlığa zararlı ve potansiyel olarak enfeksiyöz maddeler içerir (düşük konsantrasyonlarda ve hacimlerde). Reaktiflere doğrudan temas etmekten sakının. Uygun önlemleri alın (tek kullanımlık eldiven, koruyucu gözlük ve laboratuvar giysileri giyin)!
- Reaktifler cilt ile temas ederse cildi derhal bol miktarda su ile yıkayın!
- Profesyonel kullanıcılar için istedikleri takdirde ulaşabilecekleri bir güvenlik bilgi formu bulunmaktadır.
- Reaktifleri tekrar kullanmayın.
- Örnekler arasında çapraz kontaminasyon olmasından sakının, aksi halde hatalı sonuçlara yol açılabilir.
- Prob uzun süreli olarak ışığa, özellikle de güçlü ışığa maruz kalmamalıdır, yani, tüm adımlar mümkün olduğu ölçüde karanlıkta ve/veya ışık geçirmez kutular içinde yürütülmelidir!

Zararlılık ve önlem ifadeleri:

Zararlılık belirleyici bileşen Formamid'tir.



Tehlike

H351	Kansere yol açma şüphesi var.
H360FD	Üremeye zarar verebilir. Doğmamış çocukta hasara yol açabilir.
H373	Uzun süreli veya tekrarlı maruz kalma sonucu organlarda hasara yol açabilir.
P201	Kullanmadan önce özel talimatları okuyun.
P202	Bütün önlem ifadeleri okunup anlaşılmadan elleçlemeyin.
P260	Tozunu/dumanını/gazını/sisini/buharını/spreyini solumayın.
P280	Koruyucu eldiven/koruyucu kıyafet/göz koruyucu/yüz koruyucu kullanın.
P308+P313	Maruz kalınma veya etkileşme halinde İSE: Tıbbi yardım/bakım alın.
P405	Kilit altında saklayın.

8. Sınırlamalar

- Yalnızca vücut dışı (*in vitro*) tıbbi tanı amaçlı kullanım içindir.
- Yalnızca profesyonel kullanım içindir.
- Herhangi bir pozitif boyanmanın veya boyanma olmamasının klinik yorumlaması başka tanı testleri ile birlikte klinik geçmiş, morfoloji ve diğer histopatolojik kriterler kapsamında yapılmalıdır. Preparatın boyanmasında kullanılan FISH problemleri, reaktifler, tanı panelleri ve yöntemleri hakkında bilgi sahibi olmak yetkin bir patoloğun sorumluluğudur. Boyama işlemi onaylı ve lisanslı bir laboratuvar, boyanmış lamaların incelenmesinden sorumlu olan ve pozitif ve negatif kontrollerin yeterliliğini garanti eden bir patoloğun gözetiminde yapılmalıdır.
- Örneğin boyanması, özellikle de sinyalin yoğunluğu ve zemin boyanması, örneğin boyamadan önce geçtiği işlem ve hazırlık süreçlerine bağlıdır. Kötü fiksasyon, dondurma, çözme, yıkama, kurutma, ısıtma, kesit alma veya diğer örneklerle ya da sıvılarla kontamine etme artefaktlara veya yanlış sonuçlara yol açabilir. Tutarsız sonuçlar fiksasyon ve gömme yöntemlerindeki değişkenliklerden ve de örneğin kendi içinde olan düzensizliklerden meydana gelebilir.
- Prob yalnızca 4. "Sağlanan reaktifler" bölümünde tanımlanan lokusların tespit edilmesi için kullanılmalıdır.
- Ürünün performansı tam otomatik Bond-MAX sistemi (Leica) ve bu kullanma kılavuzunda tanımlanan prosedürler kullanılarak doğrulanmıştır. Bu prosedürlerde yapılan değişiklikler CE-IVD performansını değiştirebilir ve doğrulanması kullanıcı tarafından yapılmalıdır. Bu IVD ürün, yalnızca bu kullanma kılavuzunda belirtilen

şekilde ve kullanım amacına uygun olarak kullanıldığında CE uygunluğuna sahiptir.

9. Etkileşimli maddeler

Örnek içinde bulunan alyuvarlar otofloresan gösterebilir ve sinyalin tanınmasına engel olabilir.

Aşağıdaki fiksatifler FISH ile uyumlu değildir:

- Bouin's fiksatif
- B5 fiksatif
- Asidik fiksatifler (örn., pikrik asit)
- Zenker's fiksatif
- Alkoller (tek başına kullanıldığında)
- Civa klorür
- Formaldehit/çinko fiksatif
- Hollande's fiksatif
- Tamponsuz formalin

10. Örneklerin hazırlanması

Öneriler:

- Oda sıcaklığında 24 saat %10 nötral tamponlu formalin ile fiksasyon (18-25°C).
- Örnek büyüklüğü $\leq 0.5 \text{ cm}^3$.
- En üst kalitede parafin kullanın.
- Gömme işlemi 65°C'den daha düşük sıcaklıklarda yapılmalıdır.
- Mikrotom ile 2-4 μm kalınlığında kesitler alın.
- Pozitif yüklü mikroskop lamaları kullanın.
- 50-60°C'de 2-16 saat fikse edin.

11. Ürünün kullanıma hazırlanması

Yeniden sulandırmaya, karıştırmaya veya dilüsyon yapmaya gerek yoktur. Kullanmadan önce probun oda sıcaklığına (18-25°C) ulaşmasına izin verin, ışıktan koruyun. Tüpü açmadan önce vorteks ile çalkalayın ve nazıkçe silkeleyerek sıvıyı şişenin aşığınsında toplayın.

12. Çalışma prosedürü

ZytoMation ERBB2/CEN 17 Dual Color FISH Probe tam otomatik boyama sisteminde ilgili FISH kitleri ve FISH protokolleri ile kullanılmak içindir. Daha fazla bilgi için lütfen kullanılan sistemin kullanma talimatlarına başvurun.

Örneğin ön işlemi

Örneğin ön işlemini (parafin giderme, proteoliz) tam otomatik boyama sisteminin kullanma kılavuzuna göre yapın.

Örneğe bağlı olarak protokolda ayarlamalar yapmak gerekebilir. Önerilen protokollerin dışına çıkan protokollerin doğrulanması kullanıcı tarafından yapılmalıdır.

Denatürasyon ve hibridizasyon

Enzim sindirimi ve ısı ile ön işlem için kullanıcının örneğe bağlı olarak önceden doğruladığı koşullara uygun bir protokolü kullanın.

1. Örneklerin denatürasyonunu 75°C'de 20 dakika olarak ayarlayın.
Denatürasyon protokolü olarak otomatik Bond-MAX sisteminin kullanma talimatında anlatılan şekilde yeni bir protokol oluşturun.
2. Örneklerin hibridizasyonunu 45°C'de 2 saat olarak ayarlayın.
Hibridizasyon protokolü olarak otomatik Bond-MAX sisteminin kullanma talimatında anlatılan şekilde yeni bir protokol oluşturun.
3. Kullanma kılavuzuna uygun olarak lamaları, FISH problemlerini, dilüe enzimi ve BOND FISH Kit'i sisteme yükleyin.
4. Boyama işlemi tamamlandığında lamaları cihazdan alın. Lamaları ışıktan koruyun.
5. %70, %90 ve %100 etanolde birer dakika dehidrasyon yapın.
6. Örnekleri karanlık ortamda havada kurutun.
7. Lamaların üzerine 25 μl DAPI/DuraTect-Solution (MT7) pipetleyin. Hava kabarcığı bırakmadan örneği bir lamel ile (24 mm x 60 mm) kapatın. Karanlıkta 15 dakika inkübe edin.

Ucu kesilerek genişletilmiş bir pipet ucu kullanılarak daha kolay pipetleme yapılabilir. Uzun süre ışığa maruz kalmasından sakının.

8. Lamı karanlıkta muhafaza edin. Uzun süreli saklama 2-8°C'de olmalıdır.
9. Örneğin incelenmesi floresan mikroskopunda yapılır.

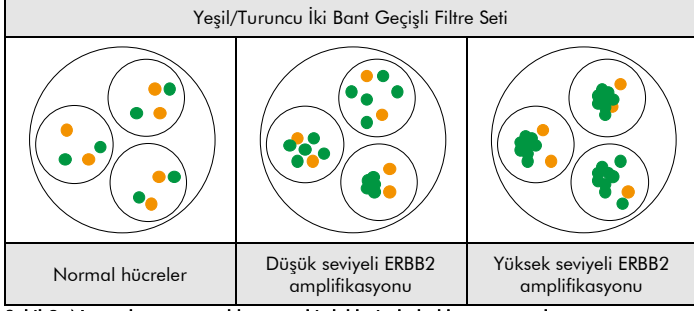
13. Sonuçların yorumlanması

Uygun filtre setleri kullanıldığında probun hibridizasyon sinyalleri yeşil (ERBB2 gen bölgesi) ve turuncu (CEN 17) olarak gözlenir.

Normal durum: Normal hücrelerin veya ERBB2 gen bölgesini içeren amplifikasyonu olmayan hücrelerin interfazlarında iki yeşil ve iki turuncu sinyal gözlenir (bknz. Şekil 2).

Anormal durum: ERBB2 gen bölgesinde amplifikasyon olan hücrelerde daha fazla sayıda yeşil sinyal veya yeşil sinyal kümelenmeleri gözlenir (bknz. Şekil 2).

Üst üste gelen sinyaller sarı renkli sinyaller olarak görülebilir.



Şekil 2: Normal ve anormal hücre çekirdeklerinde beklenen sonuçlar

Bazı anormal örneklerde yukarıda belirtilenden farklı bir sinyal modeli oluşturabilen başka sinyal dağılımları gözlenebilir ve bu varyant yeniden düzenlenmelerini gösterir. Beklenmeyen sinyal modelleri daha fazla araştırılmalıdır.

Lütfen dikkat edin:

- Kromatinin yoğunluğunu kaybetmesinden dolayı tek FISH sinyalleri küçük kümeler gibi görünebilir. Bu yüzden, aralarında 1 sinyal çapından daha düşük veya ona eşit mesafe bulunan aynı büyüklükteki iki veya üç sinyal tek sinyal sayılmalıdır.
- Üst üste olan hücre çekirdeklerini değerlendirmeyin.
- Aşırı sindirilmiş hücre çekirdeklerini (çekirdek içinde görülen karanlık alanlar sayesinde belli olur) saymayın.
- Güçlü otofloresan gösteren hücre çekirdeklerini saymayın; bunlar sinyal tanınmasına engel olurlar.
- Negatif veya spesifik olmayan bir sonuç çok sayıda etken sebebiyle meydana gelebilir (17. Bölüme bakınız).
- Sonuçları doğru yorumlamak için kullanıcı bu ürünü tanı prosedürlerinde kullanmadan önce ulusal ve/veya uluslar arası yönergelerle göre doğrulanmalıdır.

14. Önerilen kalite kontrol prosedürleri

İşlenen örneklerin ve test reaktiflerinin doğru performans gösterdiklerini izlemek için her deneye iç ve dış kontroller dahil edilmelidir. İç ve/veya dış kontroller uygun boyanma göstermezse hasta örnekleri ile alınan sonuçlar geçersiz kabul edilmelidir.

İç kontrol: Örnek içindeki normal sinyal modeli gösteren neoplastik olmayan hücreler, örn., fibroblastlar.

Dış kontrol: Doğrulanmış pozitif ve negatif kontrol örnekleri.

15. Performans özellikleri

Probu performansı eşdeğeri olan IVD onaylı FISH probu ile karşılaştırılarak belirlendi. %100 uyum görüldü.

Doğruluk: Doğruluk %100 olarak hesaplanmıştır.

Analitik duyarlılık: Analitik duyarlılık %100 olarak hesaplanmıştır.

Analitik özgüllük: Analitik özgüllük %100 olarak hesaplanmıştır.

16. Atık bertarafı

Reaktiflerin bertarafı yerel düzenlemelere uygun olarak yapılmalıdır.

17. Sorun giderme

Çalışma talimatlarına uyulmaması hatalı sonuçların alınmasına veya sonuç alınamamasına sebep olabilir.

Zayıf sinyaller veya hiç sinyal bulunmaması

Olası sebep	Önlem
Hedef dizi bulunmuyor	Uygun kontroller kullanın
Hücre veya doku örneği doğru fikse olmamış	Fiksasyon süresini ve fiksatif optimize edin
Proteolitik ön işlem doğru yapılmamış	Enzim konsantrasyonunu ve inkübasyon süresini optimize edin, gerekirse artırın veya azaltın
Eski dehidrasyon solüsyonları	Taze dehidrasyon solüsyonları hazırlayın
Floresan mikroskopu yanlış ayarlanmış	Doğru ayarlayın
Uygun olmayan filtre setleri kullanılmış	Probu florokromlarına uygun filtre setleri kullanın. <i>Üç bant geçişli filtre setleri tek veya iki bant geçişli filtrelere göre daha az ışık sağlar. Sonuç olarak, bu üç bant geçişli filtre setleri kullanıldığında sinyaller daha zayıf görünebilir</i>
Probların/floforların ışıktan zarar görmesi	Hibridizasyon ve yıkama adımlarını karanlıkta yapın

Çapraz hibridizasyon sinyalleri; kötü zemin

Olası sebep	Önlem
Proteolitik ön işlem çok güçlü	Pepsin inkübasyon süresini azaltın

Doku morfolojisi bozulmuş

Olası sebep	Önlem
Hücre veya doku örneği doğru fikse olmamış	Fiksasyon süresini ve fiksatif optimize edin
Proteolitik ön işlem doğru yapılmamış	Enzim konsantrasyonunu ve inkübasyon süresini optimize edin, gerekirse artırın veya azaltın
Isı ön işlemi doğru yapılmamış	Isı ön işlemini optimize edin

Hücre çekirdekleri üst üste gelmiş

Olası sebep	Önlem
Doku kesitlerinin kalınlıkları uygun değil	2-4 µm kalınlığında mikrotom kesitleri alın

Örnek lama iyi yapışmamış

Olası sebep	Önlem
Lamin kaplaması uygun değil	Uygun lamalar kullanın
Doku kesiti yeterince kurutulmamış	Boyamadan önce dokuların yeterince kurumaları için süreyi ayarlayın
Doğru şekilde nötral tamponlanmamış formalin ile fiksasyon yapılmış	Yüksek kaliteli nötral tamponlu formalin kullanın

Zayıf zıt boyanma

Olası sebep	Önlem
DAPI solüsyonunun konsantrasyonu düşük	DAPI/DuraTect-Solution (ultra) (Ürün No. MT-0008-0.8) kullanın
DAPI inkübasyon süresi çok kısa	DAPI inkübasyon süresini ayarlayın

18. Literatür

- Baselga J, et al. (1999) *Semin Oncol* 26: 78-83.
- Brunello E, et al. (2012) *Histopathology* 60: 482-8.
- Brunner K, et al. (2010) *Anal Quant Cytol Histol* 32: 78-89.
- Cochet A, et al. (2012) *J Nucl Med* 53: 512-20.
- Coussens L, et al. (1985) *Science* 230: 1132-9.
- Ettl T, et al. (2012) *Hum Pathol* 43: 921-31.
- Ettl T, et al. (2012) *Br J Cancer* 106: 719-26.
- Fasching P, et al. (2011) *BMC Cancer* 11: 486.
- Haas M, et al. (2011) *Virchows Arch* 458: 403-11.
- Hillig T, et al. (2012) *APMIS* 120: 1000-7.
- Humbert O, et al. (2012) *Ann Oncol* 23: 2572-7.
- Hwang CC, et al. (2011) *Histopathology* 59: 984-92.
- Hynes NE & Stern DF (1994) *Biochim Biophys Acta* 1198: 165-84.
- Jäger M, et al. (2009) *Cancer Res* 69: 4270-6.
- Lang D, et al. (2008) *Diagn Pathol* 3: 49ff.
- Lehmann-Che L, et al. (2011) *Br J Cancer* 104: 1739-46.
- Ly M, et al. (2012) *Oncology* 83: 257-63.
- Moelans CB, et al. (2011) *Crit Rev Oncol Hematol* 80: 380-92.
- Oliveira-Costa JP, et al. (2011) *Diagn Pathol* 6: 73.
- Park JB, et al. (1989) *Cancer Res* 49: 6605-9.
- Parris TZ, et al. (2010) *Clin Cancer Res* 16: 3860-74.
- Perrone G, et al. (2012) *PLoS One* 7: e43110.
- Popescu NC, et al. (1989) *Genomics* 4: 362-6.
- Sassen A, et al. (2008) *Breast Cancer Res* 10: R2.
- Sassen A, et al. (2009) *Breast Cancer Res* 11: R50.
- Schindlbeck C, et al. (2010) *J Cancer Res Clin Oncol* 136: 1029-37.
- Slamon DJ, et al. (1987) *Science* 235: 177-82.
- Vollmann-Zwerenz A, et al. (2010) *Cytometry Part A* 77: 387-99.
- Voutsas IF, et al. (2013) *Int J Radiat Biol* 89: 319-25.

Uzmanlarımız sorularınızı yanıtlamaya hazırdır.
Lütfen helptech@zytovision.com adresine yazınız.



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

Ticari markalar:

ZytoVision® ve ZytoMation® ZytoVision GmbH'nin ticari markalarıdır.