



**ZytoDot**  
**SPEC ERBB2 Probe Kit**

REF C-3003-40

Σ 40

За качествено откриване на амплификации на човешкия ген ERBB2 чрез хромогенна *in situ* хибридизация (CISH)

4250380N297W



Ин витро диагностично медицинско устройство  
в съответствие с IVDR (ЕС) 2017/746

**1. Предвидена употреба**

Сондата ZytoDot SPEC ERBB2 Probe Kit е предназначена за качествено откриване на амплификации на човешкия ген ERBB2 във фиксирани във формалин включени в парафин проби, като например рак на гърдата, чрез хромогенна *in situ* хибридизация (CISH). Сондата е предназначена да се използва в комбинация с ZytoDot CISH Implementation Kit (Прод. № -C301840).

Продуктът е предназначен само за професионална употреба. Всички тестове, при които се използва продуктът, трябва да се извършват в сертифицирана, лицензирана патологоанатомична лаборатория под наблюдението на патолог/човешки генетик квалифициран за съответната дейност.

Сондата е предназначена да се използва като помощно средство при диференциалната диагноза на рака на гърдата и не трябва да се предприемат терапевтични мерки само въз основа на резултата от теста.

**2. Принцип на изпитване**

Техниката на хромогенната *in situ* хибридизация (CISH) позволява откриването и визуализирането на специфични последователности от нуклеинови киселини в клетъчни препарати. Маркираните с хаптен нуклеотидни фрагменти, т.нар. сонди CISH, и техните комплементарни целеви последователности в препаратите се ко-денатурират и впоследствие се оставят да се отграват по време на хибридизацията. След това неспецифичните и несвързани сондови фрагменти се отстраняват чрез стриктно измиване. Дуплексното образуване на маркираната сонда може да се визуализира с помощта на първични (немаркирани) антитела, които се откриват с вторични полимеризирани ензимно конюгирани антитела. Ензимната реакция с хромогенни субстрати води до образуване на цветни утайки. След контраоцветяване на ядрото с ядрено багрило хибридизирани фрагменти на сондата се визуализират чрез светлинна микроскопия.

**3. Предоставени реактиви**

ZytoDot SPEC ERBB2 Probe Kit се предлага в един размер и се състои от:

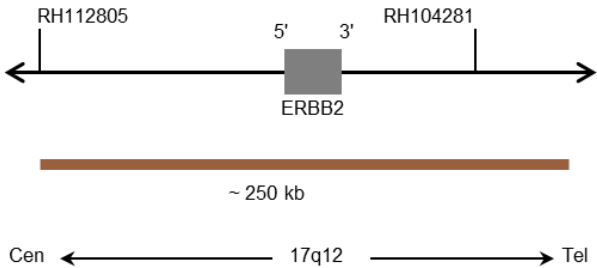
Код	Компонент	Количество	Контейнер
		Σ 40	
PT2	Heat Pretreatment Solution EDTA	500 ml	Бутилка с винтова капачка (голяма)
ES1	Pepsin Solution	4 ml	Бутилка с капкомер, бяла капачка
PD1	ZytoDot SPEC ERBB2 Probe	0,4 ml	Съд за реакция, кафяво капак
WB1	Wash Buffer SSC	560 ml	Бутилка с винтова капачка (голяма)
WB4	PBS/Tween	2x	Алуминиева опаковка
BS1	Blocking Solution	4 ml	Бутилка с капкомер, оранжева капачка
AB1	Mouse Anti-Dig	4 ml	Бутилка с капкомер, розова шапка
AB2	Anti-Mouse-HRP-Polymer	4 ml	Бутилка с капкомер, оранжева капачка
SB1a	DAB Solution A	0,3 ml	Бутилка с капкомер, зелена капачка
SB1b	DAB Solution B	10 ml	Бутилка с капкомер, сива капачка
CS1	Mayer's Hematoxylin Solution	20 ml	Бутилка с винтова капачка, черен
MT4	Mounting Solution (alcoholic)	4 ml	Бутилка с капкомер, кафяво
	Инструкции за употреба	1	

**C-3003-40 (40 tests):** Компонентите PD1, ES1, BS1, AB1, AB2, SB1a-b, CS1 и MT4 са достатъчни за 40 реакции. Компонентът PT2 е достатъчен за 7 буркана за оцветяване от 70 ml всеки. Компонентът WB1 е достатъчен за 8 буркана за оцветяване от по 70 ml всеки. Компонентът WB4 е достатъчен за 28 буркана за оцветяване от по 70 ml.

ZytoDot SPEC ERBB2 Probe се състои от:

- Маркирани с дигоксигенин полинуклеотиди (~1,8 ng/μl), които са насочени към последователности, картографирани в 17q12\* (chr17:37,725,661-37,973,541), където се намира областта на гена ERBB2 (вж. фиг. 1).
- Хибридизационен буфер на базата на формамид

\*според събирането на човешкия геном GRCh37/hg19



Фигура 1: SPEC ERBB2 Карта на сондата (без мащаб)

**4. Необходими материали, които не са осигурени**

- ZytoDot CISH Implementation Kit (Prod. No. C-3018-40)
- Положителни и отрицателни контролни образци
- Микроскопски стъкла, положително заредени
- Водна баня (80 °C, 98 °C)
- Хибридизатор или гореща плоча
- Хибридизатор или камера за влажност в пещта за хибридизация
- Регулируеми пипети (10 μl, 1000 μl)
- Оцветяване на буркани или вани
- Таймер
- Калибриран термометър
- Етанол или реактивен алкохол
- Ксилол
- Метанол 100%
- Водороден пероксид (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30%
- Дейонизирана или дестилирана вода

- Покривни стъкла (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Каучуков цимент, напр. Fixogum Rubber Cement (Prod. No. E-4005-50/-125) -или подобен
- Подходящо поддържан светлинен микроскоп (400-630x)

## 5. Съхранение и обработка

Съхранявайте при температура 2-8 °C в изправено положение. Върнете при условията на съхранение веднага след употреба. Не използвайте реагентите след изтичане на срока на годност, посочен на етикета. Продуктът е стабилен до датата на изтичане на срока на годност, посочена на етикета, когато се третира по подходящ начин.

## 6. Предупреждения и предпазни мерки

- Прочетете инструкциите за употреба преди да ги използвате!
- Не използвайте реагентите след изтичане на срока на годност!
- Този продукт съдържа вещества (в ниски концентрации и обеми), които са вредни за здравето и потенциално инфекциозни. Избягвайте всякакъв пряк контакт с реактивите. Вземете подходящи мерки за защита (използвайте ръкавици за еднократна употреба, защитни очила и лабораторно облекло)!
- Докладвайте за всеки сериозен инцидент, възникнал във връзка с продукта, на производителя и на компетентния орган съгласно местните разпоредби!
- Ако реагентите попаднат върху кожата, незабавно я изплакнете с голямо количество вода!
- При поискване за професионалния потребител се предоставя информационен лист за безопасност на материала.
- Не използвайте повторно реагентите, освен ако повторната употреба не е изрично разрешена!
- Избягвайте кръстосано замърсяване на пробите, тъй като това може да доведе до грешни резултати.
- Не трябва да се допуска изсъхване на образците по време на хибридизацията и промиването.

### Специално етикетирание на ES1:

EUN208	Съдържа Pepsin A. Може да предизвика алергична реакция.
EUN210	Информационен лист за безопасност ще бъде представен при поискване.

### Предупреждения за опасност и предпазни мерки за CS1 и WB4:

Тази сонда не е класифицирана като опасна в съответствие с Регламент (ЕО) № 1272/2008, 00.

### Предупреждения за опасност и предпазни мерки за BS1, AB1, AB2, PT2, и WB1:

Компонентът, определящ опасността, е смес от: 5-хлоро-2-метил-4-изотиазолин-3-он [EC № 247-500-7] и 2-метил-2Н-изотиазол-3-он [EC № 220-239-6] (3:1).



#### Предупреждение

H317	Може да причини алергична кожна реакция.
P261	Избягвайте вдишване на прах/пушек/газ/дим/изпарения/аерозоли
P272	Да не се изнася замърсено работно облекло извън работното помещение.
P280	Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице.
P302+P352	ПРИ КОНТАКТ С КОЖАТА: Измийте обилно с вода/...
P333+P313	При поява на кожно дразнене или обрив на кожата: Потърсете медицински съвет/помощ.

P362+P364 Свалете замърсеното облекло и го изперете преди повторна употреба.

### Предупреждения за опасност и предпазни мерки за SB1a:

Компонентът, определящ опасността, е бифенил 3,3',4,4'-тетраилтетраамин; диаминобензидин.



#### Опасност

H350	Може да причини рак
P201	Преди употреба се снабдете със специални инструкции.
P202	Не използвайте преди да сте прочели и разбрали всички предпазни мерки за безопасност.
P280	Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице.
P308+P313	ПРИ явна или предполагаема експозиция: Потърсете медицински съвет/помощ.
P405	Да се съхранява под ключ.

### Предупреждения за опасност и предпазни мерки за SB1b:

Компонентът, определящ опасността, е смес от: 5-хлоро-2-метил-4-изотиазолин-3-он [EC № 247-500-7] и 2-метил-2Н-изотиазол-3-он [EC № 220-239-6] (3:1).



#### Опасност

H317	Може да причини алергична кожна реакция.
H360D	Избягвайте вдишване на прах/пушек/газ/дим/изпарения/аерозоли
P201	Да не се изнася замърсено работно облекло извън работното помещение.
P261	Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице.
P280	ПРИ КОНТАКТ С КОЖАТА: Измийте обилно с вода/...
P302+P352	При поява на кожно дразнене или обрив на кожата: Потърсете медицински съвет/помощ.
P308+P313	Свалете замърсеното облекло и го изперете преди повторна употреба.
P362+P364	Може да причини алергична кожна реакция.

### Предупреждения за опасност и предпазни мерки за MT4:

Компонентът, определящ опасността, е ксилол.



#### Предупреждение

H226	Запалими течност и пари.
H312+H332	Вреден при контакт с кожата или при вдишване.
H315	Предизвиква дразнене на кожата.
H319	Предизвиква сериозно дразнене на очите.
H335	Може да предизвика дразнене на дихателните пътища.
H373	Може да причини увреждане на органите при продължителна или повтаряща се експозиция
P210	Да се пази от топлина, нагорещени повърхности, искри, открит пламък, и други източници на запалване. Тютюнопушенето забранено.
P260	Не вдишвайте прах/пушек/газ/дим/изпарения/аерозоли

P280	Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице/предпазни средства за защита на слуха.
P305+P351 + P338	ПРИ КОНТАКТ С ОЧИТЕ: промивайте внимателно с вода в продължение на няколко минути. Свалете контактните лещи, ако има такива и доколкото това е възможно. Продължете с изплакването.
P337+P313	При продължително дразнене на очите: Потърсете медицински съвет/помощ.
P403+P235	Да се съхранява на добре проветриво място. Да се съхранява на хладно.
EUN208	Съдържа methyl 2-methylprop-2-enoate; methyl 2-methylpropenoate; methyl methacrylate. Може да предизвика алергична реакция.

#### Предупреждения за опасност и предпазни мерки PD1:

Компонентът, определящ опасността, е формамид.



#### Опасно

H351	Предполага се, че причинява рак..
H360FD	Може да увреди оплодителната способност. Може да увреди плода.
H373	Може да причини увреждане на органите при продължителна или повтаряща се експозиция.
P201	Преди употреба се снабдете със специални инструкции.
P202	Не използвайте преди да сте прочели и разбрали всички предпазни мерки за безопасност.
P260	Не вдишвайте прах/пушек/газ/дим/ изпарения/ аерозоли.
P280	Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице/предпазни средства за защита на слуха.
P308+P313	ПРИ явна или предполагаема експозиция: Потърсете медицински съвет/помощ.
P405	Да се съхранява под ключ.

#### 7. Ограничения

- За *in vitro* диагностична употреба.
- Само за професионална употреба.
- Само за неавтоматизирана употреба.
- Клиничната интерпретация на всяко положително оцветяване или липсата на такова трябва да се направи в контекста на клиничната анамнеза, морфологията, други хистопатологични критерии, както и други диагностични тестове. Квалифицираният патолог/ генетик квалифициран за съответната дейност. е длъжен да познава CISH сондите, реагентите, диагностичните панели и методите, използвани за получаване на оцветения препарат. Оцветяването трябва да се извършва в сертифицирана, лицензирана лаборатория под надзора на патолог/ генетик квалифициран за съответната дейност.
- Оцветяването на образеца, особено интензивността на сигнала и фоновото оцветяване, зависи от обработката на образеца преди оцветяването. Неправилното фиксиране, замразяване, размразяване, измиване, сушене, нагряване, рязане или замърсяване с други проби или течности може да доведе до артефакти или фалшиви резултати. Несъответстващите резултати могат да се дължат на разлики в методите на фиксиране и вграждане, както и на присъщи на образеца нередности.
- Сондата трябва да се използва само за откриване на локуси, описани в глава 3. "Предоставени реактиви".

- Изпълнението е валидирано с помощта на процедурите, описани в тези инструкции за употреба. Модификациите на тези процедури могат да променят характеристиките и трябва да бъдат потвърдени от потребителя. Този IVD е сертифициран като CE само когато се използва, както е описано в тази инструкция за употреба в рамките на предвидената употреба.

#### 8. Пречещи вещества

Следните фиксатори са несъвместими с ISH:

- Фиксатив на Bouin
- Фиксатор B5
- Киселинни фиксатори (напр. пикринова киселина)
- Фиксатив на Zenker
- Алкохоли (когато се използват самостоятелно)
- Живачен хлорид
- Формалдехид/цинков фиксатор
- Фиксаторът на Оланд
- Небуферизиран формалин

#### 9. Подготовка на образци

Препоръки:

- Избягвайте кръстосано замърсяване на пробите, тъй като това може да доведе до грешни резултати.
- Фиксиране в 10% неутрално буферизиран формалин за 24 часа при стайна температура (RT, 18°C-25°C).
- Размер на извадката  $\leq 0,5 \text{ cm}^3$ .
- Използвайте висококачествен парафин.
- Вграждането трябва да се извършва при температури, по-ниски от 65°C.
- Подгответе 3-5  $\mu\text{m}$  микротомни разрези.
- Използвайте положително заредени микроскопски стъкла.
- Фиксиране на тъканни разрези за 2-16 часа при 50-60°C

#### 10. Подготвителна обработка на устройството

PBS/Tween (WB4) трябва да се приготви съгласно инструкциите в точка 11. "Процедура за анализ". Всички останали реактиви от комплекта са готови за употреба. Не се изисква възстановяване, смесване или разреждане.

Преди употреба поставете сондата на стайна температура (18-25 °C), защитете я от светлина. Преди да отворите флакона, разбъркайте с вортекс и завъртете за кратко.

#### 11. Процедура за анализ

##### 11.1 Ден 1

##### Подготвителни стъпки

- (1) *Пригответе серия от етанол (70%, 90% и 100% разтвори на етанол):* Разредете 100% етанол с дейонизирана или дестилирана вода. Тези разтвори могат да се съхраняват в подходящи съдове и да се използват повторно.
- (2) *Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2):* Загрейте до 98°C в покрит буркан за оцветяване.
- (3) *Приготвяне на 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:* Разредете 1 част 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в 9 части 100% метанол.
- (4) *ZytoDot CISH Probe:* Доставете на стайна температура (RT) преди употреба.

##### Предварителна обработка (обезпаразитяване/протеолиза)

- (1) Инкубирайте предметите за 10 минути при 70°C (напр. върху гореща плоча).
- (2) Инкубирайте предметите за 2 пъти по 5 минути в ксилол.
- (3) Инкубирайте предметни стъкла за 3 пъти по 3 минути в 100% етанол.
- (4) Инкубирайте предметите за 5 минути в 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- (5) Измийте предметите 2 пъти по 1 мин. в дейонизирана или дестилирана вода.
- (6) Инкубирайте за 15 минути в предварително затоплен Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2) при 98°C.

Използвайте осем предметни стъкла за всеки буркан за оцветяване (ако е необходимо, добавете фиктивни стъкла).

- (7) Незабавно прехвърлете предметни стъкла в дейонизирана или дестилирана вода и ги промийте за 2 пъти по 2 мин.

- (8) Нанесете (на капки) Pepsin Solution (ES1) върху образеца и го инкубирайте за 5-15 минути при 37°C в камера с висока влажност.

**ES1** може да образува утайки, които не влияят на качеството. Като общо правило препоръчваме да се определи оптималното време за протеолиза в предварителни тестове.

- (9) Потопете предметни стъкла в дейонизирана или дестилирана вода.  
(10) Дехидратация при: 70%, 90% и 100% етанол, всяка за 1 мин.  
(11) Изсушете участъците на въздух.

**Забележка:** Уверете се, че участъците са напълно изсъхнали, преди да нанесете сондата.

#### Денатурация и хибризация

- (1) Нанесете с пипета 10 µl от сондата върху всеки предварително обработен образец.  
(2) Покрийте образците с покривно стъкло с размери 22 mm x 22 mm (избягвайте образуването на мехурчета) и запечатайте покривното стъкло.

Препоръчваме ви да използвате гумен цимент (напр. Fixogum) за уплътняване.

- (3) Поставете предметни стъкла върху гореща плоча или хибризатор и денатурирайте образците за 5 минути при 94-95°C.  
(4) Преместете предметите в камера за влажност и хибризирайте за една нощ при 37°C (напр. в пещ за хибризация).

Важно е образците да не изсъхват по време на хибризацията.

### 11.2 Ден 2

#### Подготвителни стъпки

- (1) Wash Buffer SSC (WB1): За промиване на стрингенса, загряйте до 80°C в покрит буркан за оцветяване. **WB1** може да образува преципитати при 2-8°C, които не влияят на качеството и трябва да се разтворят при нагряване.  
(2) Приготвяне на Wash Buffer PBS/Tween: Добавете 1 таблетка PBS/Tween (WB4) в 1000 ml дейонизирана или дестилирана вода и разтворете.

Wash Buffer PBS/Tween е стабилен в продължение на една седмица, когато се съхранява при 2-8°C.

- (3) Blocking Solution (BS1), Mouse-Anti-DIG (AB1), Anti-Mouse-HRP-Polymer (AB2), DAB Solution A (SB1a), DAB Solution B (SB1b), Mayer's Hematoxylin Solution (CS1), Mounting Solution (alcoholic) (MT4): Доставка на стайна температура преди употреба.

#### Последваща хибризация и откриване

- (1) Внимателно отстранете гумения цимент или лепилото.  
(2) Отстранете покривното стъкло, като потопите предметите в Wash Buffer SSC (WB1) при стайна температура за 5 мин.

**WB1** оже да се използва еднократно. Съхранявайте при 2-8°C за максимум една седмица.

- (3) Измийте предметите за 5 минути в Wash Buffer SSC (WB1) при 80°C.

Използвайте осем предметни стъкла в буркан за оцветяване (ако е необходимо, добавете фиктивни стъкла).

- (4) Промийте предметите 2 пъти по 1 минута в дейонизирана или дестилирана вода.  
(5) Потопете предметите в Wash Buffer PBS/Tween.  
(6) Нанесете Blocking Solution (BS1) (1-2 капки на предметно стъкло) върху предметни стъкла и инкубирайте за 10 min при RT..  
(7) Отстранете Blocking Solution (BS1), но не изплаквайте!  
(8) Нанесете Mouse-Anti-DIG (AB1) 1-2 капки на предметно стъкло) върху предметни стъкла и инкубирайте за 30 min при RT.  
(9) Промийте предметите 3 пъти по 1 мин. в PBS/Tween.  
(10) Нанесете Anti-Mouse-HRP-Polymer (AB2) (1-2 капки на предметно стъкло) върху предметни стъкла и инкубирайте за 30 min при RT.  
(11) Промийте предметите 3 пъти по 1 мин. в PBS/Tween.  
(12) Пригответе DAB Solution (работен разтвор): напълнете 1 ml DAB Solution B (SB1b) в градуирана чаша и добавете една капка (30 µl) DAB Solution A (SB1a). Разбъркайте добре.  
(13) Нанесете DAB Solution (1-2 капки на предметно стъкло) върху предметни стъкла и инкубирайте за 30 min при RT.  
(14) Прехвърлете предметни стъкла в буркан за оцветяване и измийте 2 мин. под студена течаща чешмяна вода.  
(15) Оцветете образците за 5-10 сек. с Mayer's Hematoxylin Solution (CS1).  
(16) Прехвърлете предметни стъкла в буркан за оцветяване и измийте 2 мин. под студена течаща чешмяна вода.

- (17) Дехидратирайте в: 70 %, 90 % и 100 % етанол, всяка за 1 мин.  
(18) Инкубиране на предметни стъкла за 2 пъти по 2 min в ксилол (използвайте много чист ксилол).  
(19) Избягвайки уловените мехурчета, покрийте пробите с покривно стъкло (22 mm x 22 mm; 24 mm x 32 mm), като използвате Mounting Solution (alcoholic) (MT4). Изчакайте 20-30 min, за да се обездвижи покривалото.

Използването на отрязан накрайник на пипета, за да се увеличи размерът на отвора, може да улесни процеса на пипетиране.

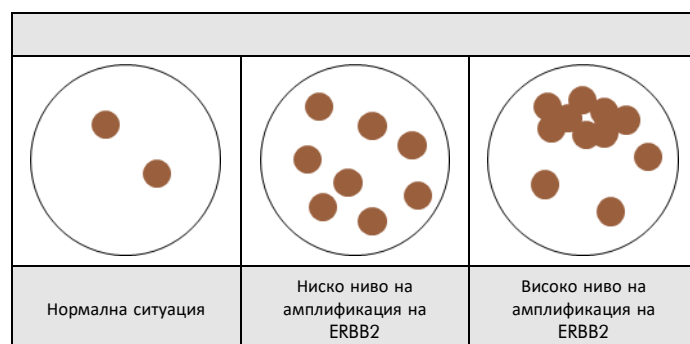
- (20) Оценете оцветените проби чрез светлинна микроскопия.

### 12. Тълкуване на резултатите

При използване на ZytoDot CISH Implementation Kit хибризацияционните сигнали на маркираните с диоксигенин полинуклеотиди изглеждат кафяви до тъмнокафяви (област на гена ERBB2).

**Нормална ситуация:** В интерфазите на нормални клетки или на клетки без амплификация, включваща областта на гена ERBB2, се появяват два ясно изразени кафяви сигнала с форма на точка (вж. фиг. 2).

**Необичайна ситуация:** В клетки с амплификация на областта на гена ERBB2 или полизомия на хромозома 17 се наблюдава увеличен брой на кафявите сигнали или клъстери от кафяви сигнали (вж. фигура 2).



Фиг. 2: Очаквани резултати при нормални и аберантни ядра

В някои необичайни проби могат да се наблюдават други модели на сигнали, различни от описаните по-горе. Тези неочаквани сигнални модели трябва да бъдат допълнително изследвани.

#### Моля, обърнете внимание:

- Поради декондензирания хроматин единичните CISH сигнали могат да се появят като малки сигнални клъстери. Следователно два или три сигнала с еднакъв размер, разделени на разстояние ≤ 1 диаметър на сигнала, трябва да се считат за един сигнал.
- Преди изброяването на сигналите образецът трябва да се сканира за евентуална интратуморна хетерогенност при 100- до 200-кратно увеличение.
- Визуализацията на сигналите трябва да се извършва при най-малко 400-630-кратно увеличение, което води до лесно видими сигнали.
- Не оценявайте зони на некроза, припокриващи се ядра, прекалено разградени ядра и ядра със слаб интензитет на сигнала.
- Поради митозата допълнителни сигнали могат да се видят дори в малък процент от ненеопластичните клетки. Понякога в парафинови образци могат да се наблюдават ядра с липсващи сигнали поради артефакти при разязе.
- Отрицателният или неспецифичен резултат може да се дължи на множество фактори (вж. глава 16 "Отстраняване на неизправности").
- За да се интерпретират правилно резултатите, потребителят трябва да валидира този продукт преди използването му в диагностични процедури в съответствие с националните и/или международните насоки.

### 13. Препоръчителни процедури за контрол на качеството

За да се следи за правилното функциониране на обработените проби и тестовите реактиви, всеки анализ трябва да се придружава от вътрешни и външни контроли. Ако вътрешните и/или външните контроли не демонстрират подходящо оцветяване, резултатите с проби от пациенти трябва да се считат за невалидни.

**Вътрешен контрол:** Ненеопластични клетки в образеца, които имат нормален сигнал, напр. фибробласти.





**Външно управление:** Валидирани положителни и отрицателни контролни образци.

14. Работни характеристики

14.1 Аналитично представяне

Ефективността на сондата е определена чрез сравнение със съответната одобрена от IVD FISH сонда.

Аналитична чувствителност:	100% (95% CI 98.5 – 100.0)
Аналитична специфичност:	100% (95% CI 97.0 – 100.0)

14.2 Клинично представяне

Диагностична чувствителност:	100% (95% CI 83.2 – 100.0) срещу FISH, CISH
Диагностична специфичност:	100% (95% CI 83.2 – 100.0) срещу FISH, CISH

15. Изхвърляне

Изхвърлянето на реагентите трябва да се извършва в съответствие с местните разпоредби.

16. Отстраняване на неизправности

Всяко отклонение от инструкциите за работа може да доведе до по-лоши резултати при оцветяването или до липса на оцветяване. Моля, вижте [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com) за повече информация.

Слаби сигнали или липса на такива

Възможна причина	Действие
Протеолитичната предварителна обработка не е извършена правилно	Оптимизирайте времето за инкубиране на пепсин, ако е необходимо, увеличете или намалете
Изпаряване на сондата	Когато използвате хибризатор, използването на мокрите ленти/напълнените с вода резервоари е задължително. При използване на пещ за хибридизация е задължително използването на камера за влажност. Освен това покривното стъкло трябва да се запечата напълно, напр. с Fixogum, за да се предотврати изсъхването на пробата по време на хибридизацията
Недостатъчна подготовка на хромогенния субстрат	Вместо една капка от разтвора DAB A използвайте 30 µl
Твърде дълго време за оцветяване	Избягвайте тъмно контраоцветяване, защото може да затъмни положителните сигнали от оцветяването.
Синьото покритие на контраста не е извършено правилно	Използвайте студена течаща вода от чешмата за посиняване; не използвайте топла или гореща вода, нито реактиви за посиняване.

Твърде силни сигнали

Възможна причина	Действие
Протеолитична предварителна обработка, провеждана твърде дълго	Оптимизирайте времето за инкубиране на пепсин, ако е необходимо, увеличете или намалете
Реакцията на субстрата е твърде интензивна	Съкратете времето за инкубиране на субстрата; не загрявайте разтвора на субстрата над 25 °C; инкубирайте само при стайна температура

Сигналите избледняват или се сливат

Възможна причина	Действие
Използвано е неподходящо решение за монтаж	Използвайте само монтажния разтвор, предоставен в комплекта, или монтажни разтвори на основата на ксилол, които не съдържат никакви примеси; не използвайте тиксо за покрития.

Неравномерни или само на някои места много леки петна

Възможна причина	Действие
Непълно обезпаразитяване	Използвайте пресни разтвори; проверете продължителността на обезпаразитяването
Твърде малък обем на реагента	Уверете се, че обемът на реактива е достатъчно голям, за да покрие тъканната област

Непоследователни резултати

Възможна причина	Действие
Недостатъчно изсушаване преди нанасяне на сондата	Удължаване на сушенето на въздух
Твърде много вода/буфер за промиване върху тъканта преди нанасянето на пепсин, антителя и/или цветни субстрати	Уверете се, че излишната течност е отстранена от тъканния участък, като я забършете или изтръскате от предметно стъкло. Малки количества остатъчна вода/буфер за промиване не пречат на теста.
Вариации в методите за фиксиране и вграждане на тъкани	Оптимизиране на методите за фиксиране и вграждане
Вариации в дебелината на тъканния участък	Оптимизиране на разделянето

Разрушена морфология

Възможна причина	Действие
Клетъчната или тъканната проба не е била правилно фиксирана	Оптимизиране на времето за фиксиране и фиксатора
Протеолитична предварителна обработка, която не се извършва твърде дълго	Намаляване на времето за инкубиране на пепсин

Сигнали за кръстосана хибридизация; зашумен фон

Възможна причина	Действие
Изсъхване на секциите по всяко време по време на или след хибридизацията	Избягвайте изсушаването на секциите; използвайте камера за влажност; запечатайте правилно покривното стъкло
Удължено време за инкубиране на субстрата	Съкращаване на времето за инкубиране на субстрата
Непълно обезпаразитяване	Използвайте пресни разтвори; проверете продължителността на депарафинирането
Твърде силна протеолитична предварителна обработка	Оптимизиране на времето за инкубиране на пепсин
Слайдове, охладени до стайна температура преди хибридизация	Прехвърлете бързо предметите за хибридизация на температурата.



**Припокриващи се сигнали**

Възможна причина	Действие
Неподходяща дебелина на тъканните разрези	Подготвяне на 3-5 $\mu$ m микротомни разрези

**Образците се издигат извън предметно стъкло**

Възможна причина	Действие
Твърде силна протеолитична предварителна обработка	Съкращаване на времето за инкубиране на пепсин

**17. Литература**

- Nie X, et al. (2013) *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*.
- Wilkinson DG: In Situ Hybridization, A Practical Approach, *Oxford University Press* (1992) ISBN 0 19 963327 4.

**18. Ревизия**



[www.zytovision.com](http://www.zytovision.com)

Моля, вижте [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com) за най-новите инструкции за употреба, както и за инструкции за употреба на различни езици.

Нашите експерти са на разположение, за да отговорят на въпросите ви.

Моля, свържете се с [helptech@zytovision.com](mailto:helptech@zytovision.com)

За обобщение на безопасността и ефективността, моля, вижте [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com).



ZytoVision GmbH  
Fischkai 1  
27572 Bremerhaven/ Германия  
Телефон: +49 471 4832-300  
Факс: +49 471 4832-509  
[www.zytovision.com](http://www.zytovision.com)  
Имейл: [info@zytovision.com](mailto:info@zytovision.com)

**Търговски марки:**  
ZytoVision® и ZytoDot® са търговски марки на ZytoVision GmbH.