ZytoDot 2C
SPEC ERBB2/CEN 17 Probe Kit

REF C-3022-100 Σ 10

REF C-3022-400 Σ 40

Für den qualitativen Nachweis von Amplifikationen des humanen ERBB2-Gens und Alpha-Satelliten von Chromosom 17 mittels chromogener *in-situ*-Hybridisierung (CISH)

4250380N467W

CE 0483

IVD

In-vitro-Diagnostikum

gemäß IVDR (EU) 2017/746

1. Verwendungszweck

Das ZytoDot 2C SPEC ERBB2/CEN 17 Probe Kit ist für den qualitativen Nachweis von Amplifikationen des humanen ERBB2-Gens sowie für den Nachweis von Alpha-Satelliten von Chromosom 17 in Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Geweben , wie z. B. Brustkrebs, durch chromogene *in-situ*-Hybridisierung (CISH) bestimmt.

Das Produkt ist nur für den professionellen Gebrauch bestimmt. Alle Tests, bei denen das Produkt verwendet wird, sollten in einem zertifizierten, zugelassenen anatomisch-pathologischen Labor unter der Aufsicht eines Pathologen/Humangenetikers von qualifiziertem Personal durchgeführt werden.

Die Sonde ist als Hilfsmittel für die Differentialdiagnose von Brustkrebs vorgesehen, und therapeutische Maßnahmen sollten nicht allein auf der Grundlage des Testergebnisses eingeleitet werden.

2. Prinzip der Methode

Die chromogene *in-situ*-Hybridisierung (CISH) erlaubt den Nachweis und die Visualisierung von spezifischen Nukleinsäuresequenzen in Zellpräparationen. Haptenmarkierte Nukleotid-Fragmente, sogenannte CISH-Sonden, und deren komplementäre Zielsequenzen in den Präparationen werden co-denaturiert und können anschließend während der Hybridisierung binden. Danach werden unspezifische und ungebundene Sondenfragmente durch Stringenzwaschschritte entfernt. Die Duplex-Bildung der markierten Sonde wird mittels primärer (nicht markierter) Antikörper sichtbar gemacht, welche von sekundären polymerisierten Enzym-konjugierten Antikörpern detektiert werden. Die enzymatische Reaktion mit den chromogenen Substraten führt zur Bildung von Farbpräzipitaten. Nach der Gegenfärbung des Zellkerns mit einer Zellkern-Färbung können die hybridisierten Sondenfragmente mit einem Lichtmikroskop visualisiert werden.

3. Enthaltene Reagenzien

Das ZytoDot 2C SPEC ERBB2/CEN 17 Probe Kit ist verfügbar in zwei Größen und besteht aus:

Code	Komponente	Menge 40 Σ 10		Gefäß
PT2	Heat Pretreatment Solution EDTA	500 ml	150 ml	Schraubverschlussflasche (groß)
ES1	Pepsin Solution	4 ml	1 ml	Tropfflasche, weißer Deckel
PD12	ZytoDot 2C SPEC ERBB2/CEN 17 Probe	0.4 ml	0.1 ml	Reaktionsgefäß, brauner Deckel
WB1	Wash Buffer SSC	560 ml	210 ml	Schraubverschlussflasche (groß)
WB5	20x Wash Buffer TBS	2x 50 ml	50 ml	Schraubverschlussflasche
AB14	Anti-DIG/DNP-Mix	4 ml	1 ml	Tropfflasche, gelber Deckel
AB13	HRP/AP-Polymer-Mix	4 ml	1 ml	Tropfflasche, blauer Deckel
SB6a	AP-Red Solution A	0,4 ml	0,1 ml	Tropfflasche, roter Deckel (klein)
SB6b	AP-Red Solution B	15 ml	4 ml	Tropfflasche, roter Deckel
SB7a	HRP-Green Solution A	0,8 ml	0,2 ml	Tropfflasche, grüner Deckel (kleinl)
SB7b	HRP-Green Solution B	15 ml	4 ml	Tropfflasche, grüner Deckel
CS2	Nuclear Blue Solution	20 ml	4 ml	Schraubverschlussflasche, schwarz
MT4	Mounting Solution (alcoholic)	4 ml	1 ml	Glasflasche, braun
	AP-Red Reaktionsgefäß	2	1	Graduiertes Reaktionsgefäß, roter Deckel
	HRP-Green Reaktionsgefäß	2	1	Graduiertes Reaktionsgefäß, grüner Deckel
	Gebrauchsanweisung	1	1	

C-3022-10 (10 Reaktionen): Komponenten **PD12**, **ES1**, **AB14**, **AB13**, **SB6a-b**, **SB7a-b**, **CS2** und **MT4** sind ausreichend für 10 Reaktionen. Komponente **PT2** ist ausreichend für 2 Küvetten à 70 ml. Komponente **WB1** ist ausreichend für 3 Küvetten à 70 ml. Komponente **WB5** ist ausreichend für 14 Küvetten à 70 ml.

C-3022-40 (40 Reaktionen): Komponenten **PD12**, **ES1**, **AB14**, **AB13**, **SB6a-b**, **SB7a-b**, **CS2** und **MT4** sind ausreichend für 40 Reaktionen. Komponente **PT2** ist ausreichend für 7 Küvetten à 70 ml. Komponente **WB1** ist ausreichend für 8 Küvetten à 70 ml. Komponente **WB5** ist ausreichend für 28 Küvetten à 70 ml.

Die ZytoDot 2C SPEC ERBB2/CEN 17 Probe (**PD12**) besteht aus:

- Digoxigenin-markierten Polynukleotiden (~1.1 ng/µl), die gegen Sequenzen in 17q12* (chr17:37,725,661-37,973,541) gerichtet sind, welche die ERBB2-Genregion enthalten (siehe Abb. 1).
- Dinitrophenyl-markierten Polynukleotiden (~1.1 ng/µl), die gegen Sequenzen in 17p11.1-q11.1 gerichtet sind, die spezifisch für die zentromerische Alpha-Satelliten-Region D17Z1 von Chromosom 17 sind.
- Hybridisierungsbuffer auf Basis von Formamid

*nach Human Genome Assembly GRCh37/hg19

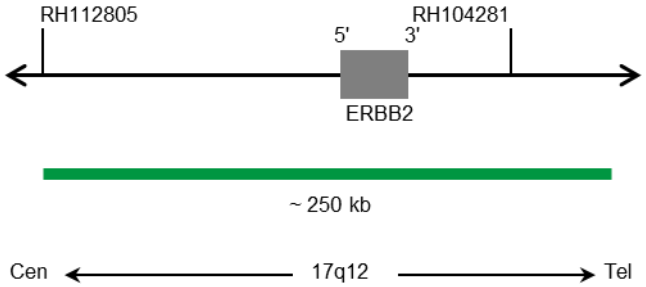


Abb. 1: SPEC ERBB2 Sondenlokalisation (nicht maßstabsgetreu)

4. Benötigte, aber nicht bereitgestellte Materialien

- Positive und negative Kontrollproben
- Objektträger, positiv geladen
- Wasserbad (80°C, 98°C)
- Hybridizer oder Wärmeplatte
- Hybridizer oder Feuchtekammer im Hybridisierungsofen
- Verstellbare Pipetten (10 µl, 1000 µl)
- Küvetten oder Färbetröge
- Stoppuhr
- Kalibriertes Thermometer
- Ethanol oder denaturierter Alkohol
- Xylol
- Methanol 100%
- Wasserstoffperoxid (H_2O_2) 30%
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser
- Deckgläser (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Naturkautschuk-Klebstoff, z.B. Fixogum Rubber Cement (Prod. Nr. E-4005-50/-125) oder Ähnliches
- Regelmäßig gewartetes Lichtmikroskop (400-630x)

5. Lagerung und Handhabung

Bei 2-8°C in aufrechter Position lagern. Unmittelbar nach Gebrauch wieder unter Lagerbedingungen aufbewahren. Keine Reagenzien nach Ablauf des auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatums verwenden. Das Produkt ist bei sachgemäßer Handhabung bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil.

6. Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Gebrauchsanweisung vor der Verwendung lesen!
- Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden!
- Dieses Produkt enthält Substanzen (in geringen Konzentrationen und Volumina), welche gesundheitsschädlich und potentiell infektiös sind. Jeder direkte Kontakt mit den Reagenzien muss vermieden werden. Entsprechende Schutzmaßnahmen (Verwendung von Einmalhandschuhen, Schutzbrille und Laborbekleidung) sind zu ergreifen!
- Schwerwiegende Vorfälle, die im Zusammenhang mit dem Produkt aufgetreten sind, in Übereinstimmung mit den örtlichen Vorschriften dem Hersteller sowie den zuständigen Behörden melden!
- Sollten Reagenzien mit der Haut in Kontakt kommen, die betroffenen Stellen sofort mit viel Wasser abspülen!
- Ein Sicherheitsdatenblatt ist auf Anfrage für den professionellen Anwender verfügbar.
- Reagenzien nicht wiederverwenden, außer die Wiederverwendung ist ausdrücklich erlaubt!
- Kreuzkontaminationen der Präparate vermeiden, da diese zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
- Die Präparate dürfen während der Hybridisierungs- und Waschschritte nicht austrocknen!

Besondere Kennzeichnung von ES1:

EUH208	Enthält Pepsin A. Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
EUH210	Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.

Gefahren- und Sicherheitshinweise für SB6a:

H412	Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
P273	Freisetzung in die Umwelt vermeiden.

Gefahren- und Sicherheitshinweise für AB13, AB14, PT2, SB7b, WB1 und WB5:

Die gefahrbestimmende Komponente ist eine Reaktionsmasse aus: 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on [EG-Nr. 247-500-7] und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on [EG-Nr. 220-239-6] (3:1).

Achtung

H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
P261	Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden.
P272	Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen.
P280	Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.
P302+P352	BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Wasser waschen.
P333+P313	Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P362+P364	Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.

Gefahren- und Sicherheitshinweise für SB7a:

Die gefahrbestimmende Komponenten sind Methanol und 30 % Wasserstoffperoxid in Lösung.

Gefahr

H225	Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
H301+H311 +H331	Giftig bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen.
H370	Schädigt die Organe.
P210	Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen und anderen Zündquellen fernhalten. Nicht rauchen.
P233	Behälter dicht verschlossen halten.
P260	Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen.
P280	Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.
P308+P311	BEI Exposition oder falls betroffen: GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt anrufen.
P403+P235	An einem gut belüfteten Ort aufbewahren. Behälter dicht verschlossen halten.

Gefahren- und Sicherheitshinweise für PD12:

Die gefahrbestimmende Komponente ist Formamid.

Gefahr

H351	Kann vermutlich Krebs erzeugen.
H360FD	Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
H373	Kann die Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition.
P201	Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
P202	Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.
P260	Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen.
P280	Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.
P308+P313	BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P405	Unter Verschluss aufbewahren.

Gefahren- und Sicherheitshinweise für CS2:

Die gefahrbestimmende Komponenten sind Ethandiol (vgl. Glykol).

Achtung

H373	Kann die Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition.
P260	Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen.
P314	Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

Gefahren- und Sicherheitshinweise für MT4:

Die gefahrbestimmende Komponente ist Xylol.

Achtung

H226	Flüssigkeit und Dampf entzündbar.
H312+H332	Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt oder Einatmen.
H315	Verursacht Hautreizungen.
H319	Verursacht schwere Augenreizung.
H335	Kann die Atemwege reizen.
H373	Kann die Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition.
P210	Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen und anderen Zündquellen fernhalten. Nicht rauchen.
P260	Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen.
P280	Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.
P305+P351+ P338	BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.
P337+P313	Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P403+P235	An einem gut belüfteten Ort aufbewahren. Kühl halten.
EUH208	Enthält Methyl-methacrylat; Methyl 2-methylprop-2-enoat; MMA. Kann allergische Reaktionen hervorrufen.

7. Einschränkungen

- Für die Verwendung als In-vitro-Diagnostikum.
- Nur für die professionelle Anwendung.
- Nur für den nicht-automatischen Gebrauch.
- Die klinische Interpretation jeglicher positiven Färbung bzw. deren Abwesenheit muss im Kontext mit der klinischen Anamnese, Morphologie, anderer histopathologischer Kriterien sowie weiterer diagnostischer Tests erfolgen. Es obliegt der Verantwortung eines qualifizierten Pathologen, mit CISH Sonden, Reagenzien, Diagnose-Panels und den zur Erstellung von gefärbten Präparaten verwendeten Methoden vertraut zu sein. Die Färbung ist in einem zertifizierten, lizenzierten Labor unter Aufsicht eines Pathologen durchzuführen, der für die Auswertung der Färbepräparate und für die Sicherstellung der Eignung von positiven und negativen Kontrollen verantwortlich ist.
- Die Färbung der Präparate, insbesondere die Signalintensität und die Hintergrundfärbung, ist abhängig von der Behandlung und Prozessierung der Präparate vor der Färbung. Unsachgemäßes Fixieren, Einfrieren, Auftauen, Waschen, Trocknen, Erhitzen, Schneiden oder Kontamination mit anderen Präparaten oder Flüssigkeiten können Artefakte oder falsche Ergebnisse verursachen. Inkonsistente Ergebnisse können von Variationen bei Fixierungs- und Einbettungsverfahren sowie von inhärenten Unregelmäßigkeiten innerhalb des Präparates resultieren.
- Die Sonde ist nur für den Nachweis der Loci, die in Kapitel 3 „Enthaltene Reagenzien“ beschrieben werden, zu verwenden.
- Die Leistung wurde unter Verwendung der in dieser Gebrauchsanweisung beschriebenen Verfahren validiert. Abweichungen von diesen Verfahren können die Leistung beeinflussen und müssen vom Anwender validiert werden. Dieses IVD ist nur dann CE-zertifiziert, wenn es wie in dieser Gebrauchsanweisung beschrieben im Rahmen der bestimmungsgemäßen Verwendung eingesetzt wird.

8. Störsubstanzen

Folgende Fixierungen sind nicht kompatibel mit ISH:

- Bouin Fixierung
- B5 Fixierung
- Saure Fixiermittel (z.B. Pikrinsäure)
- Zenker Fixierung
- Alkohole (bei alleiniger Verwendung)
- Quecksilberchlorid
- Formaldehyd/Zink Fixiermittel
- Hollande Fixierung
- Ungepuffertes Formalin

9. Vorbereitung der Präparate

Empfehlungen:

- Kreuzkontaminationen der Präparate vermeiden, da diese zu fehlerhaften Ergebnissen führen können.
- Fixierung in 10% neutral gepuffertem Formalin für 24h bei Raumtemperatur (18-25°C).
- Probengröße ≤ 0,5 cm^3.
- Qualitativ hochwertiges Paraffin verwenden.
- Das Einbetten sollte bei Temperaturen unter 65°C erfolgen.
- 3-5 μm dicke Mikrotomschnitte anfertigen.
- Positiv geladene Objektträger verwenden.
- Für 2-16h bei 50-60°C fixieren.

10. Vorbereitung der Reagenzien

20x Wash Buffer TBS (**WB5**) ist wie in der Gebrauchsanweisung unter 11. „Durchführung“ beschrieben vorzubereiten. Alle anderen Reagenzien des Produkts sind gebrauchsfertig. Kein Rekonstituieren, Mischen oder Verdünnen ist notwendig. Die Sonde vor der Anwendung auf Raumtemperatur (RT) bringen und kurz mischen.

11. Testverfahren

11.1 Tag 1

Vorbehandlung der Präparate

1. *Eine Ethanolreihe (70%, 90% und 100% Ethanol) vorbereiten:* 100% Ethanol mit deionisiertem oder destilliertem Wasser verdünnen. Diese Lösungen können in geeigneten Gefäßen aufbewahrt und wiederverwendet werden.
2. *Heat Pretreatment Solution EDTA (***PT2***):* In einer abgedeckten Küvette auf 98°C erwärmen.
3. *Vorbereitung von 3% H_2O_2:* 1 Teil 30% H_2O_2 mit 9 Teilen 100% Methanol verdünnen.
4. *ZytoDot 2C CISH Probe*: Vor der Verwendung auf Raumtemperatur bringen.

Vorbehandlung (Entparaffinierung/Proteolyse)

1. Die Objektträger für 10 min bei 70°C inkubieren (z.B. auf einer Wärmeplatte).
2. Die Objektträger für 2x 5 min in Xylol inkubieren.
3. Die Objektträger für 3x 3 min in 100% Ethanol inkubieren.
4. Die Objektträger für 5 min in 3% H_2O_2 inkubieren.
5. 2x 1 min in deionisiertem oder destilliertem Wasser waschen.
6. Für 15 min in vorgewärmter Heat Pretreatment Solution EDTA (**PT2**) bei 98°C inkubieren.

Wir empfehlen, acht Objektträger pro Färbetrog zu verwenden (falls notwendig, Dummy-Objektträger hinzufügen).

7. Die Objektträger sofort in destilliertes oder deionisiertes Wasser überführen und für 2x 2 min waschen.
8. Pepsin Solution (**ES1**) (tropfenweise) auf die Präparate auftragen und für 5-15 min bei 37°C in einer Feuchtekammer inkubieren.

ES1 *kann Präzipitate bilden, welche nicht die Qualität beeinflussen. Generell wird eine Bestimmung der optimalen Dauer der Proteolyse in Vortests empfohlen.*

9. Die Objektträger in deionisiertes oder destilliertes Wasser eintauchen.
10. Dehydrierung für jeweils 1 min in 70%, 90% und 100% Ethanol.
11. Schnitte an der Luft trocknen.

Bitte beachten: Die Schnitte vollständig trocknen lassen, bevor die Sonde aufgetragen wird.

Denaturierung und Hybridisierung

1. 10 µl der Sonde auf jedes der vorbehandelten Präparate pipettieren.
2. Die Präparate mit 22 mm x 22 mm Deckgläsern abdecken (Einschluss von Luftbläschen vermeiden) und das Deckglas versiegeln.

Wir empfehlen die Verwendung von Naturkautschuk-Klebstoff (z.B. Fixogum) zum Versiegeln.

3. Die Objektträger auf einer Wärmeplatte oder in einem Hybridizer platzieren und die Proben für 5 min bei 79°C denaturieren.
4. Die Objektträger in eine Feuchtekammer überführen und über Nacht bei 37°C hybridisieren (z.B. in einem Hybridisierungsofen).

Es ist essentiell, dass die Präparate während des Hybridisierungsschritts nicht austrocknen.

11.2 Tag 2

Vorbereitende Schritte

1. *Wash Buffer SSC* (**WB1**): Für die Stringenzwaschung in einer abgedeckten Küvette auf 80°C erwärmen. **WB1** kann bei 2-8°C Präzipitate bilden, welche nicht die Qualität beeinflussen und sich durchs Erwärmen lösen sollten.
2. *Vorbereitung von 1x Wash Buffer TBS:* 1 Teil 20x Wash Buffer TBS (**WB5**) mit 19 Teilen deionisiertem oder destilliertem Wasser verdünnen.

Der verdünnte 1x Wash Buffer TBS ist bei 2-8°C eine Woche lang haltbar.

3. Anti-DIG/DNP-Mix (**AB14**), HRP/AP-Polymer-Mix (**AB13**), AP-Red Solution A (**SB6a**), AP-Red Solution B (**SB6b**), HRP-Green Solution A (**SB7a**), HRP-Green Solution B (**SB7b**) Nuclear Blue Solution (**CS2**), Mounting Solution (alcoholic) (**MT4**): Vor der Verwendung auf Raumtemperatur bringen.

Die Komponenten ***SB7a*** *und* ***SB7b*** *können Präzipitate bilden, welche nicht die Qualität der Färbung beeinflussen.*

Post-Hybridisierung und Detektion

1. Vorsichtig den Naturkautschuk-Klebstoff oder Kleber entfernen.
2. Durch das Eintauchen der Objektträger in Wash Buffer SSC (**WB1**) für 5 min bei Raumtemperatur das Deckglas entfernen.

WB1 *kann einmal wiederverwendet werden. Maximal für eine Woche bei 2-8°C aufbewahren.*

3. Die Objektträger mit Wash Buffer SSC (**WB1**) für 5 min bei 80°C waschen.

Wir empfehlen, acht Objektträger pro Färbetrog zu verwenden (falls notwendig, Dummy-Objektträger hinzufügen).

4. Die Objektträger 2x 1 min in deionisiertem oder destilliertem Wasser waschen.
5. Die Objektträger in 1x Wash Buffer TBS eintauchen.
6. Anti-DIG/DNP-Mix (**AB14**) (1-2 Tropfen pro Objektträger) auf die Objektträger geben und für 15 min bei 37°C in einer Feuchtekammer inkubieren.
7. Die Objektträger 3x 1 min in 1x Wash Buffer TBS waschen.
8. HRP/AP-Polymer-Mix (**AB13**) (1-2 Tropfen pro Objektträger) auf die Objektträger geben und für 15 min bei 37°C in einer Feuchtekammer inkubieren.
9. Die Objektträger 3x 1 min in 1x Wash Buffer TBS waschen.
10. AP-Red Solution (working solution) vorbereiten: 1 ml AP-Red Solution B (**SB6b**) in ein graduiertes Reaktionsgefäß geben und einen Tropfen (30 µl) AP-Red Solution A (**SB6a**) hinzufügen. Gut mischen.
11. AP-Red Solution (1-2 Tropfen pro Objektträger) auf die Objektträger geben und für 10 min bei Raumtemperatur (RT) lichtgeschützt inkubieren.
12. Während der Inkubation HRP-Green Solution (working solution) vorbereiten: 1 ml HRP-Green Solution B (**SB7b**) in ein graduiertes Reaktionsgefäß geben und zwei Tropfen (2x 20 µl) HRP-Green Solution A (**SB7a**) hinzufügen. Gut mischen.
13. Die Objektträger für 2 min in deionisiertem oder destilliertem Wasser waschen.
14. HRP-Green Solution tropfenweise (1-2 Tropfen pro Objektträger) auf die Objektträger geben und für 10 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubieren.
15. Die Objektträger für 2 min in deionisiertem oder destilliertem Wasser waschen.
16. Die Präparate für 2 min mit Nuclear Blue Solution (**CS2**) gegenfärben.
17. Die Objektträger in eine Küvette überführen und 2 min unter kaltem fließenden Leitungswasser waschen.
18. 3x 30 s in 100% Ethanol dehydrieren (sehr reines Ethanol verwenden).
19. Die Objektträger für 2x 30 s in Xylol inkubieren (sehr reines Xylol verwenden).

Die Inkubationszeit nicht verlängern oder verkürzen, da dies zum Verlust der Signale führen könnte!

20. Die Präparate mit einem Deckglas (22 mm x 22 mm; 24 mm x 32 mm) mit Hilfe von Mounting Solution (alcoholic) (**MT4**) abdecken, dabei den Einschluss von Luftbläschen vermeiden. 20-30 min warten, bis das Deckgläschen nicht mehr beweglich ist.

Die Verwendung einer abgeschnittenen Pipettenspitze zur Vergrößerung der Öffnung kann das Pipettieren erleichtern.

21. Die gefärbten Präparate mit einem Lichtmikroskop auswerten.

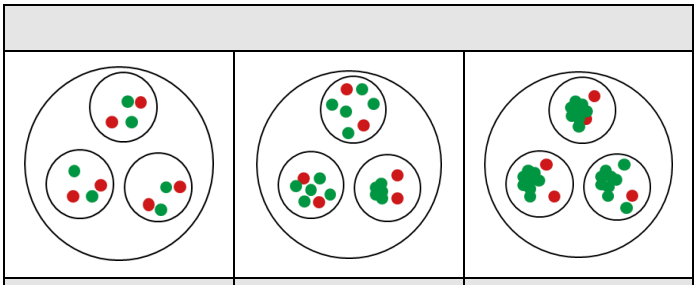
12. Interpretation der Ergebnisse

Die Hybridisierungssignale der Digoxigenin-markierten Polynukleotide erscheinen als dunkelgrün gefärbte eindeutige Punkte (ERBB2-Genregion) und Dinitrophenyl-markierte Polynukleotide erscheinen als hellrot gefärbte eindeutige Punkte (CEN 17).

Normale Situation: In Interphasen von normalen Zellen oder Zellen ohne eine Amplifikation der ERBB2-Genregion erscheinen zwei grüne und zwei rote eindeutig punktförmige Signale (siehe Abb. 2).

Aberrante Situation: In Zellen mit einer Amplifikation der ERBB2-Genregion können eine erhöhte Anzahl grüner Signale oder grüne Signalcluster beobachtet werden (siehe Abb. 2).

Sich überlagernde Signale können als braune Signale erscheinen.



Normale Zellen	Low-Level ERBB2 Amplifikation	High-Level ERBB2 Amplifikation

Abb. 2: Zu erwartende Ergebnisse in normalen und aberranten Zellkernen

Bei einigen aberranten Präparaten können andere Signalmuster als die oben beschriebenen beobachtet werden. Diese unerwarteten Signalmuster sollten weiter untersucht werden.

Bitte beachten:

- Aufgrund von dekondensiertem Chromatin können einzelne CISH-Signale als kleine Signal-Cluster erscheinen. Daher sollten zwei oder drei Signale der gleichen Größe mit einer Distanz von ≤ 1 Signaldurchmesser als ein Signal gewertet werden.
- Vor Auszählung der Signale sollte das Präparat auf jegliche mögliche intratumorale Heterogenität bei einer 100-200fachen Vergrößerung untersucht werden.
- Die Signale sollten mindestens mit einer 400fachen Vergrößerung visualisiert werden, sodass die Signale gut zu erkennen sind. Für Sonden zum Nachweis von Chromosomenbrüchen wird eine 630fache Vergrößerung empfohlen. Verwenden Sie keine kontrastverstärkenden Filterlinsen, da dies die Signalfarbe verzerren könnte. Um Signale in hellen Farben zu erhalten, öffnen Sie die Aperturblende. Stellen Sie sicher, dass Sie bei der Auswertung eines Zellkerns nach oben und unten fokussieren, da sich rote und grüne Signale übereinander befinden können.
- Keine nekrotischen Bereiche, sich überlagernde Zellkerne, überverdaute Zellkerne oder Zellkerne mit schwacher Signalintensität auswerten.
- Zusätzliche Signale können aufgrund von Mitose auch in einem kleinen Prozentsatz von nicht-neoplastischen Zellen auftreten. Aufgrund von Schnitt-Artefakten können bei Paraffin-eingebetteten Geweben gelegentlich Zellkerne mit fehlenden Signalen beobachtet werden.
- Ein negatives oder unspezifisches Ergebnis kann durch verschiedene Faktoren verursacht werden (siehe Kapitel 16 "Fehlerbehebung").
- Um die Ergebnisse korrekt zu interpretieren, muss der Anwender das Produkt vor der Anwendung in diagnostischen Verfahren unter Berücksichtigung nationaler und/oder internationaler Richtlinien validieren.

13. Empfohlene Qualitätskontrollverfahren

Um die korrekte Funktionsweise der verwendeten Präparate und Testreagenzien zu überwachen, sollte jeder Test von internen und externen Kontrollen begleitet werden. Falls interne und/oder externe Kontrollen keine adäquate Färbung zeigen, müssen die Ergebnisse der Patientenproben als ungültig angesehen werden.

Interne Kontrolle: Nicht-neoplastische Zellen innerhalb des Präparates, die ein normales Signalmuster aufweisen, z.B. Fibroblasten.

Externe Kontrolle: Validierte positive und negative Kontrollproben.

14. Leistungsmerkmale

14.1 Analytische Leistung

Die Leistung der Sonde wurde durch den Vergleich mit der entsprechenden IVD-zugelassenen FISH-Sonde bestimmt.

Analytische Sensitivität:	100% (95% CI 98.5 – 100.0)
Analytische Spezifität:	100% (95% CI 97.0 – 100.0)

Die Tag-zu-Tag-Reproduzierbarkeit wurde getestet, indem die von einem Prüfer an 10 verschiedenen Tagen erzielten Ergebnisse verglichen und die Übereinstimmung bewertet wurde.

	Prozentuale Übereinstimmung
Negative Präparate	100%
Positive Präparate	100%

Die Wiederholbarkeit wurde getestet, indem die von einem Prüfer an 10 verschiedenen Tagen erzielten Ergebnisse verglichen und die Übereinstimmung bewertet wurde.

	Prozentuale Übereinstimmung
Negative Präparate	100%
Positive Präparate	100%

14.2 Klinische Leistung

Diagnostische Sensitivität	91% (95% CI 86.0 – 95.0) auf der Grundlage eines bivariaten Modells
Diagnostische Spezifität	97% (95% CI 93.0 – 99.0) auf der Grundlage eines bivariaten Modells

15. Entsorgung

Die Entsorgung der Reagenzien muss in Übereinstimmung mit den örtlichen Vorschriften erfolgen.

16. Fehlerbehebung

Jede Abweichung von der Gebrauchsanweisung kann zu schwachen bis gar keinen Färbungen führen. Weitere Informationen erhalten Sie unter www.zytovision.com.

Schwache oder keine Signale

Mögliche Ursache	Lösung
Proteolytische Vorbehandlung nicht optimal	Die Inkubationszeit mit Pepsin optimieren, falls notwendig erhöhen oder reduzieren
Verdunstung der Sonde	Bei der Nutzung eines Hybridizers ist die Verwendung von feuchten Vliesstreifen/Wassertanks erforderlich. Bei der Nutzung eines Hybridisierungsofens muss eine Feuchtekammer verwendet werden. Zusätzlich sollte das Deckglas, z.B. mit Fixogum, vollständig versiegelt werden, um ein Austrocknen der Präparat während der Hybridisierung zu verhindern.
Dauer der Gegenfärbung zu lang	Dunkle Gegenfärbungen vermeiden, da diese positive Signale verdecken könnten
Bläuen der Gegenfärbung nicht ausreichend durchgeführt	Für das Bläuen kaltes Leitungswasser verwenden; kein warmes bzw. heißes Wasser oder Bläuungsreagenzien verwenden

Signale sind zu stark

Mögliche Ursache	Lösung
Dauer der proteolytischen Vorbehandlung zu lang	Die Inkubationszeit mit Pepsin optimieren, falls notwendig erhöhen oder reduzieren
Inkubationszeit mit AP-Red Solution nicht korrekt	Falls erforderlich kann die Inkubationszeit bis auf 5 min verkürzt werden; die Substratlösung nicht über 25°C erhitzen; nur bei Raumtemperatur inkubieren

Inkubationszeit mit HRP-Green Solution nicht korrekt	Falls erforderlich, kann die Inkubationszeit bis auf 7 min verkürzt werden; die Substratlösung nicht über 25°C erhitzen; nur bei Raumtemperatur inkubieren

Rote Signale zu schwach

Mögliche Ursache	Lösung
AP-Red Solution wurde starkem direktem Licht ausgesetzt	AP-Red Solution vor starkem direktem Licht geschützt vorbereiten und verwenden
AP-Red Solution wurde zu früh vorbereitet	Vor der sofortigen Verwendung vorbereiten
Inkubationszeit mit AP-Red Solution nicht korrekt	Falls erforderlich kann die Inkubationszeit bis zu 15 min verlängert werden
Unzureichende Vorbereitung des chromogenen Substrates	Das Volumen von Solution A nicht erhöhen

Grüne Signale zu schwach

Mögliche Ursache	Lösung
Inkubationszeit der Waschschritte nach der Färbung mit HRP-Green zu lang	Die angegebenen Inkubationszeiten nicht überschreiten
Inkubationszeit mit HRP-Green Solution nicht korrekt	Falls erforderlich kann die Inkubationszeit bis zu 15 min verlängert werden
Unzureichende Vorbereitung des chromogenen Substrates	Das Volumen von Solution A nicht erhöhen

Signale verblassen oder verschmelzen

Mögliche Ursache	Lösung
Verwendung eines ungeeigneten Eindeckmediums	Nur das Eindeckmedium, welches mit dem Kit zur Verfügung gestellt wird, oder Xylol-basierte Eindeckmedien frei von Unreinheiten verwenden; keine Eindeckfolie verwenden
Schnitte wurden nicht ausreichend dehydriert	Frische Ethanol- und Xylol-Lösungen verwenden, nur Xylol mit „reiner" Qualität verwenden

Ungleichmäßige oder teils nur sehr leichte Färbung

Mögliche Ursache	Lösung
Unvollständiges Entparaffinieren	Frische Lösungen verwenden, Dauer des Entparaffinierens überprüfen
Volumen der Reagenzien zu gering	Sicherstellen, dass das Volumen der Reagenzien groß genug ist, um den Bereich des Gewebes zu bedecken

Inkonsistente Ergebnisse

Mögliche Ursache	Lösung
Unzureichende Trocknung vor Applikation der Sonde	Lufttrocknung verlängern
Zu viel Wasser/Waschpuffer auf dem Gewebe vor Applikation von Pepsin, Antikörpern und/oder Farbsubstraten	Überschüssige Flüssigkeit durch Abklopfen oder Abschütteln des Objektträgers von dem Gewebeschnitt entfernen. Kleinere Mengen an restlichem Wasser/Waschpuffer beeinträchtigen nicht den Test
Variierende Methoden der Gewebefixierung oder Einbettung	Methoden der Fixierung und Einbettung optimieren
Variierende Gewebedicke	Schneiden optimieren

Degradierte Morphologie

Mögliche Ursache	Lösung
Zell- oder Gewebeproben sind nicht optimal fixiert	Die Fixierzeit und das Fixiermittel optimieren
Proteolytische Vorbehandlung zu stark	Die Inkubationszeit mit Pepsin reduzieren

Kreuzhybridisierungssignale, Hintergrundsignale

Mögliche Ursache	Lösung
Schnitte sind irgendwann während oder nach der Hybridisierung ausgetrocknet	Das Austrocknen der Schnitte vermeiden; Feuchtekammern verwenden; Deckglas sorgfältig abdichten
Verlängerte Inkubationszeit des Substrates	Inkubationszeit des Substrates verkürzen
Unvollständiges Entparaffinieren	Frische Lösungen verwenden, Dauer des Entparaffinierens überprüfen
Proteolytische Vorbehandlung zu stark	Inkubationszeit von Pepsin optimieren
Objektträger sind vor der Hybridisierung auf Raumtemperatur abgekühlt	Die Objektträger zügig auf Hybridisierungstemperatur überführen

Überlagernde Zellkerne

Mögliche Ursache	Lösung
Ungeeignete Dicke der Gewebeschnitte	3-5 µm dicke Mikrotomschnitte anfertigen

Präparat löst sich vom Objektträger

Mögliche Ursache	Lösung
Proteolytische Vorbehandlung ist zu stark	Inkubationszeit mit Pepsin reduzieren

17. Literatur

- 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 Technolog 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.*
- 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. Revision

Revision	Beschreibung der Änderung
5.1.1	Änderung der Benanntenstelle 14. Leistungsmerkmale Genauigkeit hinzugefügt

www.zytovision.com

Die aktuellste Gebrauchsanweisung sowie Gebrauchsanweisungen in verschiedenen Sprachen finden Sie unter www.zytovision.com.

Unsere Experten stehen Ihnen für Ihre Fragen zur Verfügung.
Bitte kontaktieren Sie helptech@zytovision.com
Einen Kurzbericht über Sicherheit und Leistung finden Sie unter www.zytovision.com.

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

Warenzeichen:
ZytoVision® und ZytoDot® sind Warenzeichen der ZytoVision GmbH.