


**ZytoLight**
**SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe Kit**

REF Z-2020-5

5

REF Z-2020-20

20

Για την ποιοτική ανίχνευση των ανθρώπινων ενισχύσεων του γονιδίου ERBB2 και των άλφα δορυφόρων του χρωμοσώματος 17 με υβριδισμό φθορισμού *in situ* (FISH)

4250380N447S


**In vitro** διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν

σύμφωνα με τον Κανονισμό IVDR (κανονισμό για τα *in vitro* διαγνωστικά ιατροτεχνολογικά προϊόντα) (ΕΕ) 2017/746

**1. Επιδιωκόμενος σκοπός**

Το **ZytoLight SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe Kit** προορίζεται να χρησιμοποιηθεί για την ποιοτική ανίχνευση των ενισχύσεων που αφορούν το ανθρώπινο γονίδιο ERBB2 καθώς και για την ανίχνευση των άλφα δορυφόρων του χρωμοσώματος 17 σε δείγματα που έχουν σταθεροποιηθεί με φορμόλη, ενσωματωμένα σε παραφίνη, όπως ο καρκίνος του μαστού και ο καρκίνος του γαστρικού/γαστροοισοφαγικού σωλήνα, με υβριδισμό φθορισμού *in situ* (FISH).

Το προϊόν προορίζεται μόνο για επαγγελματική χρήση. Όλες οι δοκιμές που χρησιμοποιούν το προϊόν πρέπει να εκτελούνται σε πιστοποιημένο, αδειοδοτημένο εργαστήριο παθολογικής ανατομικής από εξειδικευμένο προσωπικό, υπό την επίβλεψη παθολογοανατόμου/γενετιστή.

Ο ανιχνευτής προορίζεται να χρησιμοποιηθεί ως βοήθημα για τη διαφορική διάγνωση του καρκίνου του μαστού και του καρκίνου της γαστρικής/γαστροοισοφαγικής συμβολής και δεν πρέπει να λαμβάνονται θεραπευτικά μέτρα με βάση μόνο το αποτέλεσμα της εξέτασης.

**2. Αρχή της δοκιμής**

Η τεχνική *in situ* υβριδισμού φθορισμού (FISH) επιτρέπει την ανίχνευση και την οπτικοποίηση συγκεκριμένων αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων σε κυτταρικά παρασκευάσματα. Τα επισημασμένα με φθορισμό θραύσματα DNA, οι λεγόμενοι ανιχνευτές FISH (*in situ* υβριδισμού φθορισμού), και οι συμπληρωματικοί τους κλώνοι DNA στόχου στα παρασκευάσματα συν-μετουσιώνονται και στη συνέχεια αφήνονται να ανόπτουν κατά τη διάρκεια του υβριδισμού. Κατόπιν, τα μη ειδικά και μη δεσμευμένα θραύσματα ανιχνευτή αφαιρούνται με αυστηρά βήματα πλύσης. Μετά την αντιχρώση του DNA με φθορίζουσα χρωστική DAPI, τα υβριδισμένα θραύσματα ανιχνευτή οπτικοποιούνται, χρησιμοποιώντας μικροσκόπιο φθορισμού εξοπλισμένο με φίλτρα διέγερσης και εκπομπής ειδικά για τα φθοροχρωματικά, με τα οποία έχουν επισημανθεί απευθείας τα θραύσματα ανιχνευτή FISH.

**3. Παρεχόμενα αντιδραστήρια**

Το **ZytoLight SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe Kit** διατίθεται σε δύο μεγέθη και αποτελείται από τα εξής:

| Κωδικός | Συστατικό                                    | Ποσότητα |         | Δοχείο                              |
|---------|--|----------|---------|-------------------------------------|
|         |  | 5        | 20      |                                     |
| PT1     | Heat Pretreatment Solution Citric            | 150 ml   | 500 ml  | Μπουκάλι με βιδωτό καπάκι (μεγάλο)  |
| ES1     | Pepsin Solution                              | 1 ml     | 4 ml    | Σταγονομετρικό φιαλίδιο, λευκό πώμα |
| WB1     | Wash Buffer SSC                              | 210 ml   | 560 ml  | Μπουκάλι με βιδωτό καπάκι (μεγάλο)  |
| PL8     | ZytoLight SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe | 0.05 ml  | 0.2 ml  | Δοχείο αντίδρασης, κόκκινο καπάκι   |
| WB2     | 25x Wash Buffer A                            | 50 ml    | 2x50 ml | Μπουκάλι με βιδωτό καπάκι (μεσαίο)  |
| MT7     | DAPI/DuraTect-Solution                       | 0.2 ml   | 0.8 ml  | Δοχείο αντίδρασης, μπλε πώμα        |
|         | Οδηγίες χρήσης                               | 1        | 1       |                                     |

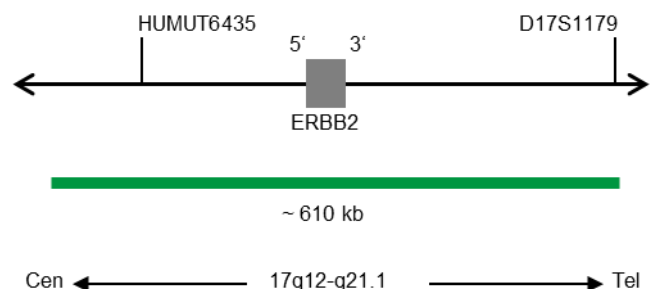
**Z-2020-5 (5 τεστ):** Τα συστατικά **ES1**, **PL8**, και **MT7** επαρκούν για 5 αντιδράσεις. Το συστατικό **WB2** επαρκεί για 5 x 3 δοχεία χρώσης των 70 ml το καθένα. Το συστατικό **PT1** επαρκεί για 2 δοχεία χρώσης των 70 ml το καθένα. Το συστατικό **WB1** επαρκεί για 3 δοχεία χρώσης των 70 ml το καθένα.

**Z-2020-20 (20 τεστ):** Τα συστατικά **ES1**, **PL8**, και **MT7** επαρκούν για 20 αντιδράσεις. Το συστατικό **WB2** επαρκεί για 11 x 3 δοχεία χρώσης των 70 ml το καθένα. Το συστατικό **PT1** επαρκεί για 7 δοχεία χρώσης των 70 ml το καθένα. Το συστατικό **WB1** επαρκεί για 8 δοχεία χρώσης των 70 ml το καθένα.

Το **ZytoLight SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe (PL8)** αποτελείται από:

- Πολυνουκλεοτίδια σημασμένα με ZyGreen (διέγερση 503 nm/εκπομπή 528 nm) (~10,0 ng/μl), τα οποία στοχεύουν αλληλουχίες που χαρτογραφούνται στο 17q12-q21.1\* (chr17:37,572,531-38,181,308) και φιλοξενούν την περιοχή του γονιδίου ERBB2 (βλ. Εικ. 1).
- Πολυνουκλεοτίδια σημασμένα με ZyOrange (διέγερση 547 nm/εκπομπή 572 nm) (~1,5 ng/μl), τα οποία στοχεύουν σε αλληλουχίες που χαρτογραφούνται στο 17p11.1-q11.1 και είναι ειδικές για την άλφα δορυφορική κεντρομερική περιοχή D17Z1 του χρωμοσώματος 17 (βλ. Εικ. 1).
- Ρυθμιστικό υβριδισμού με βάση το φορμαμίδιο

\*σύμφωνα με την Εθνική Συνέλευση Ανθρώπινου Γονιδιώματος GRCh37/hg19



Εικ. 1: SPEC ERBB2 χάρτης ανιχνευτή (όχι σε κλίμακα)

**4. Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται**

- Δείγματα θετικών και αρνητικών μαρτύρων
- Πλακίδια μικροσκοπίου, θετικά φορτισμένα
- Υδατόλουτρο (37 °C, 98 °C)
- Υβριδιστής ή θερμαινόμενη πλάκα
- Υβριδιστής ή θάλαμος υγρασίας σε φούρνο υβριδισμού
- Ρυθμιζόμενες πιπέττες (10 μl, 25 μl)
- Δοχεία ή λουτρά χρώσης
- Χρονόμετρο
- Βαθμονομημένο θερμόμετρο
- Αιθανόλη ή αλκοόλη αντιδραστήριου
- Ξυλένιο
- Απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό

- Καλυπτρίδες (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Ελαστικό τσιμεντοειδές, π.χ., Fixogum Rubber Cement (Αρ. Προϊόντος E-4005-50/-125) ή παρόμοιο
- Επαρκώς συντηρημένο μικροσκόπιο φθορισμού (400-1000x)
- Έλαιο εμβάπτισης εγκεκριμένο για μικροσκοπία φθορισμού
- Κατάλληλα σεντ φίλτρων

## 5. Αποθήκευση και χειρισμός

Φυλάσσεται στους 2-8 °C σε όρθια θέση προστατευμένο από το φως. Χρησιμοποιήστε το προστατευμένο από το φως. Επαναφέρετε στις συνθήκες αποθήκευσης αμέσως μετά τη χρήση. Μη χρησιμοποιείτε αντιδραστήρια μετά την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα. Το προϊόν είναι σταθερό μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα, εφόσον γίνεται ανάλογος χειρισμός.

## 6. Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

- Διαβάστε τις οδηγίες χρήσης πριν από τη χρήση!
- Μη χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια μετά την ημερομηνία λήξης!
- Αυτό το προϊόν περιέχει ουσίες (σε χαμηλές συγκεντρώσεις και όγκους) που είναι επιβλαβείς για την υγεία και δυνητικά μολυσματικές. Αποφύγετε οποιαδήποτε άμεση επαφή με τα αντιδραστήρια. Λάβετε κατάλληλα προστατευτικά μέτρα (χρησιμοποιήστε γάντια μίας χρήσης, προστατευτικά γυαλιά και ρούχα εργαστηρίου)!
- Αναφέρετε κάθε σοβαρό περιστατικό που έχει συμβεί σχετικά με το προϊόν στον κατασκευαστή και την αρμόδια αρχή σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς!
- Εάν τα αντιδραστήρια έρθουν σε επαφή με το δέρμα, ξεπλύνετε αμέσως το δέρμα με άφθονη ποσότητα νερού!
- Κατόπιν αιτήματος διατίθεται για τον επαγγελματία χρήστη ένα δελτίο δεδομένων ασφαλείας υλικού.
- Μην επαναχρησιμοποιείτε αντιδραστήρια, εκτός εάν η επαναχρησιμοποίηση επιτρέπεται ρητά!
- Αποφύγετε τη διασταυρούμενη μόλυνση των δειγμάτων, καθώς αυτό μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα αποτελέσματα.
- Τα **PL8** και **MT7** δεν πρέπει να εκτίθενται στο φως, ιδίως στο έντονο φως, για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, δηλαδή όλα τα στάδια πρέπει να εκτελούνται, όπου είναι δυνατόν, στο σκοτάδι ή/και σε φωτισμένη δοχεία.

### Δηλώσεις επικινδυνότητας και προφύλαξης για το PL8:

Το συστατικό που καθορίζει τον κίνδυνο είναι το φορμαμίδιο.



#### Κίνδυνος

|           |   |
|-----------|---|
| H351      | Υποπτο για πρόκληση καρκίνου.   |
| H360FD    | Μπορεί να βλάψει τη γονιμότητα. Μπορεί να βλάψει το έμβρυο.                           |
| H373      | Μπορεί να προκαλέσει βλάβη στα όργανα λόγω παρατεταμένης ή επανειλημμένης έκθεσης.    |
| P201      | Εφοδιαστείτε με τις ειδικές οδηγίες πριν από τη χρήση.                                |
| P202      | Μην το χειρίζεστε, έως ότου διαβάσετε και κατανοήσετε όλες τις προφυλάξεις ασφαλείας. |
| P260      | Μην αναπνέετε σκόνη/αναθυμιάσεις/αέρια/αιθάλη/ατμούς/σπρέυ.                           |
| P280      | Φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μέσα προστασίας ματιών/προσώπου.   |
| P308+P313 | Σε περίπτωση έκθεσης ή ανησυχίας: Λάβετε ιατρική συμβουλή/προσοχή.                    |
| P405      | Φυλάσσεται κλειδωμένο.  |

### Ειδική επισήμανση του ES1:

|        |  |
|--------|--|
| EUH208 | Περιέχει πεψίνη Α. Μπορεί να προκαλέσει αλλεργική αντίδραση. |
| EUH210 | Δελτίο δεδομένων ασφαλείας παρέχεται εφόσον ζητηθεί.         |

### Δηλώσεις επικινδυνότητας και προφύλαξης για τα PT1, WB1 και WB2:

Το συστατικό που προσδιορίζει τον κίνδυνο είναι μια μάζα αντίδρασης των εξής: 5-χλωρο-2-μεθυλο-4-ισοθειαζολίνη-3-όνη [ΕΚ αρ. 247-500-7] και 2-μεθυλο-2Η-ισοθειαζόλ-3-όνη [ΕΚ αρ. 220-239-6] (3:1).



#### Προειδοποίηση

|           |  |
|-----------|--|
| H317      | Μπορεί να προκαλέσει αλλεργική δερματική αντίδραση.  |
| P261      | Αποφεύγετε να αναπνέετε σκόνη/αναθυμιάσεις/αέρια/σταγονίδια/ατμούς/εκνεφώματα.                 |
| P272      | Τα μολυσμένα ενδύματα εργασίας δεν πρέπει να βγαίνουν από τον χώρο εργασίας.                   |
| P280      | Φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μέσα προστασίας ματιών/προσώπου.            |
| P302+P352 | ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΟ ΔΕΡΜΑ: Πλύνετε με άφθονο νερό.                                       |
| P333+P313 | Εάν παρατηρηθεί ερεθισμός του δέρματος ή εμφανιστεί εξάνθημα: Λάβετε ιατρική συμβουλή/προσοχή. |
| P362+P364 | Βγάλτε τα μολυσμένα ρούχα και πλύνετε τα πριν τα επαναχρησιμοποιήσετε.                         |

### Δηλώσεις επικινδυνότητας και προφύλαξης για το MT7:

Αυτό το προϊόν δεν ταξινομείται ως επικίνδυνο σύμφωνα με τον Κανονισμό (ΕΚ) Αρ. 1272/2008.

## 7. Περιορισμοί

- Για *in vitro* διαγνωστική χρήση.
- Μόνο για επαγγελματική χρήση.
- Μόνο για μη αυτοματοποιημένη χρήση.
- Η κλινική ερμηνεία οποιασδήποτε θετικής χρώσης ή απουσίας της πρέπει να γίνεται στο πλαίσιο του κλινικού ιστορικού, της μορφολογίας, άλλων ιστοπαθολογικών κριτηρίων καθώς και άλλων διαγνωστικών εξετάσεων. Είναι ευθύνη ενός ειδικευμένου παθολογοανατόμου/γενετιστή να είναι εξοικειωμένος με τους ανιχνευτές FISH (*in situ* υβριδισμού φθορισμού), τα αντιδραστήρια, τα διαγνωστικά πάνελ και τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή του χρωματισμένου παρασκευάσματος. Η χρώση πρέπει να πραγματοποιείται σε πιστοποιημένο, αδειοδοτημένο εργαστήριο υπό την επίβλεψη παθολογοανατόμου/γενετιστή που είναι υπεύθυνος για την επισκόπηση των χρωματισμένων πλακιδίων και τη διασφάλιση της επάρκειας των θετικών και αρνητικών μαρτύρων.
- Η χρώση του δείγματος, ειδικότερα η ένταση του σήματος και η χρώση του υποβάθρου, εξαρτώνται από τον χειρισμό και την επεξεργασία του δείγματος πριν από τη χρώση. Η ακατάλληλη στερέωση, ψύξη, απόψυξη, το πλύσιμο, στέγνωμα, η θέρμανση, τμήση ή μόλυνση με άλλα δείγματα ή υγρά μπορεί να προκαλέσουν τεχνουργήματα ή ψευδή αποτελέσματα. Ασυνεπή αποτελέσματα μπορεί να προκύψουν από διακυμάνσεις στις μεθόδους στερέωσης και ενσωμάτωσης, καθώς και από εγγενείς ανωμαλίες εντός του δείγματος.
- Ο ανιχνευτής θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνον για την ανίχνευση τόπων που περιγράφονται στο κεφάλαιο 3. «Παρεχόμενα αντιδραστήρια».
- Η απόδοση επικυρώθηκε, χρησιμοποιώντας τις διαδικασίες που περιγράφονται σε αυτές τις οδηγίες χρήσης. Τροποποιήσεις σε αυτές τις διαδικασίες ενδέχεται να αλλάξουν την απόδοση και πρέπει να επικυρωθούν από τον χρήστη. Αυτό το IVD (*in vitro* διαγνωστικό) προϊόν είναι πιστοποιημένο ως CE, μόνον όταν χρησιμοποιείται όπως περιγράφεται σε αυτές τις οδηγίες χρήσης εντός του πεδίου της προβλεπόμενης χρήσης.



## 8. Παρεμβάλλουσες ουσίες

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια που υπάρχουν στο δείγμα ενδέχεται να εμφανίζουν αυτοφθορισμό που εμποδίζει την αναγνώριση σήματος.

Τα ακόλουθα σταθεροποιητικά δεν είναι συμβατά με το FISH (*in situ* φθορισμό υβριδισμού):

- Σταθεροποιητικό Bouin
- B5 σταθεροποιητικό
- Όξινα σταθεροποιητικά (π.χ. πικρικό οξύ)
- Σταθεροποιητικό Zenker
- Αλκοόλες (όταν χρησιμοποιούνται μόνες τους)
- Χλωριούχος υδράργυρος
- Σταθεροποιητικό φορμαλδεΐδης/ψευδαργύρου
- Σταθεροποιητικό Hollande
- Μη ρυθμισμένη φορμαλίνη

## 9. Προετοιμασία δειγμάτων

Συστάσεις:

- Σταθεροποίηση σε 10% ουδέτερα ρυθμισμένη φορμαλίνη για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C).
- Μέγεθος δείγματος  $\leq 0,5 \text{ cm}^3$ .
- Χρησιμοποιήστε παραφίνη εξαιρετικής ποιότητας.
- Η ενσωμάτωση πρέπει να πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες χαμηλότερες από 65°C.
- Προετοιμάστε τομές μικροτόμου 2-4  $\mu\text{m}$ .
- Χρησιμοποιήστε θετικά φορτισμένα πλακίδια μικροσκοπίου.
- Σταθεροποιήστε για 2-16 ώρες στους 50-60°C.

## 10. Προπαρασκευαστική επεξεργασία της συσκευής

Το 25x Wash Buffer A (WB2) πρέπει να υποβάλλεται σε προεπεξεργασία σύμφωνα με τις οδηγίες στο κεφάλαιο 11.2 "Διαδικασία ανάλυσης - Ημέρα 2". Όλα τα άλλα αντιδραστήρια του kit είναι έτοιμα για χρήση. Δεν απαιτείται ανασύσταση, ανάμειξη ή αραιώση. Φέρτε τον ανιχνευτή σε θερμοκρασία δωματίου (18-25 °C) πριν από τη χρήση, προστατέψτε τον από το φως. Πριν ανοίξετε το φιαλίδιο, αναμείξτε το με στροβιλισμό και περιστρέψτε το για λίγο προς τα κάτω.

## 11. Διαδικασία ανάλυσης

### 11.1 Ημέρα 1

#### Προπαρασκευαστικά βήματα

1. Προετοιμάστε μια σειρά με αιθανόλη (διαλύματα αιθανόλης 70%, 90% και 100%). Αραιώστε 100% αιθανόλη με απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό. Τα διαλύματα αυτά μπορούν να αποθηκευτούν στους κατάλληλους περιέκτες και να επαναχρησιμοποιηθούν.
2. *Heat Pretreatment Solution Citric (PT1)*: Θερμάνετε στους 98°C.
3. *Wash Buffer SSC (WB1)*: Φέρτε το σε θερμοκρασία δωματίου. Το WB1 ενδέχεται να σχηματίζει ιζήματα στους 2-8°C, τα οποία, ωστόσο, δεν επηρεάζουν την ποιότητα και διαλύονται όταν θερμανθούν.
4. *Ανιχνευτής ZytoLight FISH*: Πριν από τη χρήση, φέρτε το σε θερμοκρασία δωματίου, προστατέψτε το από το φως.

**Προαιρετικό, όταν εκτελείται το βήμα μεταγενέστερης σταθεροποίησης:** (συνιστάται έντονα εάν η σταθεροποίηση των ιστών δεν είναι η βέλτιστη) Προετοιμάστε ένα διάλυμα φορμαλδεΐδης 1% χρησιμοποιώντας το *Formaldehyde Dilution Buffer Set (PT-0006-100)*

#### Προεπεξεργασία (αποκλήρωση/πρωτεόλυση)

1. Επώστε τα πλακίδια για 10 λεπτά στους 70°C (π.χ. επάνω σε μια καυτή πλάκα).
2. Επώστε τα πλακίδια 2 φορές από 10 λεπτά μέσα σε ξυλénio.
3. Επώστε σε αιθανόλη 100%, 100%, 90% και 70%, έκαστο για 5 λεπτά.
4. Πλύνετε 2 φορές από 2 λεπτά σε απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό.
5. Επώστε για 15 λεπτά σε προθερμασμένο *Heat Pretreatment Solution Citric (PT1)* στους 98°C.

Συνιστούμε να μη χρησιμοποιείτε περισσότερα από 8 πλακίδια ανά δοχείο χρώσης.

6. Μεταφέρετε αμέσως τα πλακίδια σε απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό, πλύνετε από 2 φορές για 2 λεπτά και στραγγίξτε ή τινάξτε το νερό για να φύγει.

7. Εφαρμόστε (στάγδην) *Pepsin Solution (ES1)* στα δείγματα και επώστε για 15 λεπτά στους 37°C σε θάλαμο υγρασίας.

Το **ES1** ενδέχεται να σχηματίζει ιζήματα, τα οποία, ωστόσο, δεν επηρεάζουν την ποιότητα.

Ανάλογα με πολλούς και διάφορους παράγοντες όπως π.χ. η φύση και η διάρκεια της σταθεροποίησης, το πάχος των τομών, και η φύση των ιστών/κυττάρων, ενδέχεται να απαιτούνται διαφορετικοί χρόνοι επώσης. Ως κατευθυντήρια οδηγία για την επώση, συνιστούμε έναν χρόνο επώσης των 2-30 λεπτών για δείγματα ιστών και 2 έως 15 λεπτών για δείγματα κυττάρων. Ως γενικό κανόνα, συνιστούμε να εξακριβώνεται ο βέλτιστος χρόνος για πρωτεόλυση σε προδοκιμές.

8. Πλύνετε για 5 λεπτά σε *Wash Buffer SSC (WB1)*.

**Προαιρετικό, όταν εκτελείται το βήμα μεταγενέστερης σταθεροποίησης:** Επώστε τα πλακίδια για 15 λεπτά σε 1% διάλυμα φορμαλδεΐδης και κατόπιν πλύνετε τα για 5 λεπτά μέσα σε *Wash Buffer SSC (WB1)*

9. Πλύνετε για 1 λεπτό σε απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό.
10. Αφυδάτωση: σε αιθανόλη 70%, 90% και 100%, έκαστο για 1 λεπτό.
11. Στεγνώστε τα μέρη με στεγνό αέρα.

**Σημείωση:** Βεβαιωθείτε ότι στεγνώσατε πλήρως τα μέρη προτού χρησιμοποιήσετε τον ανιχνευτή, καθώς η υπολειπόμενη υγρασία ενδέχεται να μειώσει την ένταση των σημάτων ή/και να επηρεάσει τη μορφολογία των ιστών.

#### Μετουσίωση και υβριδισμός

1. Μεταφέρετε με πιπέττα 10  $\mu\text{l}$  περιεχομένου του *ZytoLight FISH Probe* σε κάθε προεπεξεργασμένο δείγμα.

Αποφύγετε την παρατεταμένη έκθεση του ανιχνευτή στο φως.

2. Καλύψτε τα δείγματα με καλυπτρίδα 22 mm x 22 mm (αποφύγετε τις παγιδευμένες φυσαλίδες) και σφραγίστε την καλυπτρίδα.

Συνιστούμε τη χρήση ελαστικού τσιμεντοειδούς (π.χ. *Fixogum Rubber Cement*) για τη σφράγιση.

3. Τοποθετήστε τα πλακίδια σε θερμή πλάκα ή υβριδιστή και μετουσιώστε τα δείγματα για 10 λεπτά στους 75°C.
4. Μεταφέρετε τα πλακίδια σε θάλαμο υγρασίας και υβριδοποιήστε όλη τη νύχτα στους 37°C (π.χ. σε φούρνο υβριδισμού).

Είναι σημαντικό τα δείγματα ιστών/κυττάρων να μη στεγνώνουν κατά τη διάρκεια του υβριδισμού.

### 11.2 Ημέρα 2

#### Προπαρασκευαστικά βήματα

1. Προετοιμασία 1x Wash Buffer A: Αραιώστε 1 μέρος 25x Wash Buffer A (WB2) σε 24 μέρη απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό. Γεμίστε τρία δοχεία χρώσης με 1x Wash Buffer A και προθερμάνετε στους 37°C.

Το αραιωμένο 1x Wash Buffer A είναι σταθερό για μία εβδομάδα όταν αποθηκεύεται στους 2-8°C.

2. *DAPI/DuraTect-Solution (MT7)*: Πριν από τη χρήση, φέρτε το σε θερμοκρασία δωματίου και προστατέψτε το από το φως.

#### Μετα-υβριδισμός και ανίχνευση

1. Αφαιρέστε προσεκτικά το ελαστικό τσιμεντοειδές ή την κόλλα.
2. Αφαιρέστε την καλυπτρίδα βυθίζοντας τα πλακίδια σε 1x Wash Buffer A στους 37 βαθμούς Κελσίου για 1 έως 3 λεπτά.
3. Πλύνετε τα πλακίδια για 2 φορές από 5 λεπτά σε 1x Wash Buffer A στους 37°C.

Το 1x Wash Buffer A θα πρέπει να προθερμαίνεται. Εάν είναι απαραίτητο, ελέγξτε με τη χρήση θερμόμετρου.

4. Επώστε τα πλακίδια σε αιθανόλη 70%, 90% και 100%, έκαστο για 1 λεπτό.
5. Στεγνώστε τα δείγματα προστατευμένα από το φως.
6. Μεταφέρετε με πιπέττα 25  $\mu\text{l}$  *DAPI/DuraTect-Solution (MT7)* στα πλακίδια. Αποφεύγοντας τις παγιδευμένες φυσαλίδες, καλύψτε τα δείγματα με καλυπτρίδα (24 mm x 60 mm). Επώστε στο σκοτάδι για 15 λεπτά.



Με τη χρήση ενός στόμιου πλέττας που έχει κοπεί για να αυξηθεί το μέγεθος του ανοίγματος μπορεί να διευκολυνθεί η διαδικασία της πλέττας. Αποφύγετε την παρατεταμένη έκθεση στο φως.

7. Αποθηκεύστε το πλακίδιο στο σκοτάδι. Για μεγαλύτερες περιόδους αποθήκευσης, αυτό πρέπει να γίνεται στους 2-8°C.
8. Η αξιολόγηση του υλικού του δείγματος πραγματοποιείται με μικροσκόπιο φθορισμού. Ενδέχεται να είναι απαραίτητα τα εξής φίλτρα για το εξής εύρος μήκους κύματος:

| Φθορίζουσα χρωστική | Διέγερση | Εκπομπή |
|---------------------|----------|---------|
| ZyGreen             | 503 nm   | 528 nm  |
| ZyOrange            | 547 nm   | 572 nm  |

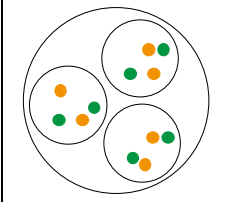
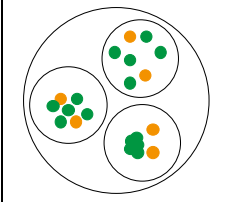
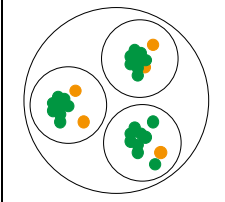
12. Ερμηνεία αποτελεσμάτων

Με τη χρήση κατάλληλων σετ φίλτρων, τα σήματα υβριδισμού του ανιχνευτή εμφανίζονται πράσινα (περιοχή του γονιδίου ERBB2) και πορτοκαλί (CEN 17).

**Κανονική κατάσταση:** Στις ενδιάμεσες φάσεις φυσιολογικών κυττάρων ή κυττάρων χωρίς ενίσχυση που περιλαμβάνει την περιοχή του γονιδίου ERBB2, εμφανίζονται δύο πράσινα και δύο πορτοκαλί σήματα (βλ. Εικ. 2).

**Μη κανονική κατάσταση:** Σε κύτταρα με ενίσχυση της περιοχής του γονιδίου ERBB2 θα παρατηρηθεί αυξημένος αριθμός πράσινων σημάτων ή συστάδων πράσινων σημάτων (βλ. Εικ. 2).

Τα επικαλυπτόμενα σήματα μπορεί να εμφανίζονται ως κίτρινα σήματα.

| Πράσινο/πορτοκαλί διπλό σετ ζωνοπερατών φίλτρων                                   |  |  |
|---|--|--|
|  |  |  |
| Φυσιολογικά κύτταρα   | Ενίσχυση του ERBB2 σε χαμηλό επίπεδο   | Ενίσχυση του ERBB2 σε χαμηλό επίπεδο   |

Εικ. 2: Αναμενόμενα αποτελέσματα σε κανονικούς και αποκλίνοντες πυρήνες

Άλλα μοτίβα σήματος από αυτά που περιγράφονται παραπάνω μπορεί να παρατηρηθούν σε ορισμένα μη φυσιολογικά δείγματα. Αυτά τα απροσδόκητα μοτίβα σήματος θα πρέπει να διερευνηθούν περαιτέρω.

Παρακαλώ σημειώστε:

- Λόγω της αποσυμπυκνωμένης χρωματίνης, τα μεμονωμένα σήματα FISH (*in situ* υβριδισμού φθορισμού) μπορούν να εμφανιστούν ως μικρές ομάδες σημάτων. Έτσι, δύο ή τρία σήματα ίδιου μεγέθους, που χωρίζονται με απόσταση  $\leq 1$  διαμέτρου σήματος, θα πρέπει να υπολογίζονται ως ένα σήμα.
- Μην αξιολογείτε αλληλοεπικαλυπτόμενους πυρήνες.
- Μη μετράτε πυρήνες που έχουν υποστεί υπερβολική πέψη (αναγνωρίζονται από σκοτεινές περιοχές που είναι ορατές στο εσωτερικό των πυρήνων).
- Μη μετράτε πυρήνες με ισχυρό αυτο-φθορισμό, που εμποδίζει την αναγνώριση σήματος.
- Ένα αρνητικό ή μη συγκεκριμένο αποτέλεσμα μπορεί να προκληθεί από πολλούς παράγοντες (βλ. κεφάλαιο 16 «Αντιμετώπιση προβλημάτων»).
- Για τη σωστή ερμηνεία των αποτελεσμάτων, ο χρήστης πρέπει να επικυρώσει το προϊόν αυτό πριν από τη χρήση με διαγνωστικές διαδικασίες σύμφωνα με τις εθνικές ή/και διεθνείς οδηγίες.

13. Συνιστώμενες διαδικασίες ποιοτικού ελέγχου

Προκειμένου να παρακολουθείται η σωστή απόδοση των επεξεργασμένων δειγμάτων και των αντιδραστηρίων δοκιμής, κάθε ανάλυση θα πρέπει να συνοδεύεται από εσωτερικούς και εξωτερικούς μάρτυρες. Εάν οι εσωτερικοί ή/και εξωτερικοί μάρτυρες δεν καταφέρουν να επιδείξουν την κατάλληλη χρώση, τα αποτελέσματα με τα δείγματα ασθενών πρέπει να θεωρούνται άκυρα.

**Εσωτερικοί μάρτυρες:** Μη νεοπλασματικά κύτταρα εντός του δείγματος που εμφανίζουν φυσιολογικό μοτίβο σήματος, π.χ. ινοβλάστες.

**Εξωτερικοί μάρτυρες:** Επικυρωμένα δείγματα θετικών και αρνητικών μαρτύρων.

14. Χαρακτηριστικά απόδοσης

14.1 Αναλυτικές επιδόσεις

Η απόδοση αξιολογήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης του kit εφαρμογής *ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit*.

|                        |                            |
|------------------------|----------------------------|
| Αναλυτική ευαισθησία:  | 100% (95% CI 98.5 – 100.0) |
| Αναλυτική εξειδίκευση: | 100% (95% CI 97.0 – 100.0) |

14.2 Κλινική απόδοση

|                          |  |
|--------------------------|--|
| Διαγνωστική ευαισθησία:  | <b>Καρκίνος του μαστού:</b><br>93% (95% CI 91.0 – 95.0) με βάση ένα διμεταβλητό μοντέλο<br><b>Καρκίνος του στομάχου και καρκίνος της γαστροοισοφαγικής συμβολής:</b><br>88% (95% CI 74.0 – 95.0) με βάση ένα διμεταβλητό μοντέλο |
| Διαγνωστική εξειδίκευση: | <b>Καρκίνος του μαστού:</b><br>98% (95% CI 97.0 – 99.0) με βάση ένα διμεταβλητό μοντέλο<br><b>Καρκίνος του στομάχου και καρκίνος της γαστροοισοφαγικής συμβολής:</b><br>95% (95% CI 92.0 – 97.0) με βάση ένα διμεταβλητό μοντέλο |

15. Απόρριψη

Η απόρριψη των αντιδραστηρίων πρέπει να πραγματοποιείται σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς.

16. Αντιμετώπιση προβλημάτων

Οποιαδήποτε απόκλιση από τις οδηγίες λειτουργίας μπορεί να οδηγήσει σε κατώτερα αποτελέσματα χρώσης ή σε καθόλου χρώση. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στη διεύθυνση [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com).

Αδύναμα σήματα ή καθόλου σήματα

| Πιθανή αιτία   | Ενέργεια  |
|--|---|
| Το δείγμα κυττάρου ή ιστού δεν έχει στερεωθεί σωστά      | Βελτιστοποιήστε τον χρόνο στερέωσης και το σταθεροποιητικό ή εφαρμόστε ένα βήμα μετά τη στερέωση, όπως περιγράφεται στη «διαδικασία ανάλυσης» του εγχειριδίου του <i>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</i>   |
| Η πρωτεολυτική προεπεξεργασία δεν πραγματοποιήθηκε σωστά | Βελτιστοποιήστε τον χρόνο επώασης της πεψίνης, αυξήστε ή μειώστε εάν είναι απαραίτητο   |
| Εξάτμιση ανιχνευτή                                       | Όταν χρησιμοποιείτε υβριδιστή, είναι υποχρεωτική η χρήση των υγρών λωρίδων/γεμάτων με νερό δεξαμενών. Όταν χρησιμοποιείτε φούρνο υβριδισμού, απαιτείται η χρήση ενός θαλάμου υγρασίας. Επιπλέον, η καλυπτρίδα θα πρέπει να σφραγίζεται πλήρως, π.χ. με Fixogum, για να αποφευχθεί η ξήρανση του δείγματος κατά τον υβριδισμό. |
| Χρησιμοποιούνται ακατάλληλα σετ φίλτρων                  | Χρησιμοποιήστε σετ φίλτρων κατάλληλα για τα φθοροχρωματικά του ανιχνευτή.<br>Τα σετ φίλτρων τριπλής ζώνης παρέχουν λιγότερο φως σε σύγκριση με τα σετ φίλτρων μονής ή διπλής ζώνης. Κατά συνέπεια, τα σήματα μπορεί να φαίνονται πιο αμυδρά, εάν χρησιμοποιείτε αυτά τα σετ φίλτρων τριπλής ζώνης.                            |



**Διασταυρούμενα σήματα υβριδισμού· θορυβώδεις υπόβαθρο**

| Πιθανή αιτία  | Ενέργεια   |
|---|--|
| Ατελής αποκλήρωση   | Χρησιμοποιήστε φρέσκα διαλύματα· ελέγξτε τη διάρκεια της αποκλήρωσης |
| Η πρωτεολυτική προεπεξεργασία είναι πολύ ισχυρή                     | Μειώστε τον χρόνο επώασης της πεψίνης                                |
| Τα πλακίδια ψύχονται σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τον υβριδισμό | Μεταφέρετε τα πλακίδια γρήγορα στους 37 °C                           |

**Υποβαθμισμένη μορφολογία**

| Πιθανή αιτία   | Ενέργεια  |
|--|---|
| Το δείγμα κυττάρου ή ιστού δεν έχει στερεωθεί σωστά      | Βελτιστοποιήστε τον χρόνο στερέωσης και το σταθεροποιητικό ή εφαρμόστε ένα βήμα μετά τη στερέωση, όπως περιγράφεται στη «διαδικασία ανάλυσης» του εγχειριδίου του <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</u> |
| Η πρωτεολυτική προεπεξεργασία δεν πραγματοποιήθηκε σωστά | Βελτιστοποιήστε τον χρόνο επώασης της πεψίνης, μειώστε εάν είναι απαραίτητο   |
| Ανεπαρκές στέγνωμα πριν από την εφαρμογή του ανιχνευτή   | Επεκτείνετε το στέγνωμα στον αέρα   |

**Αλληλεπικαλυπτόμενοι πυρήνες**

| Πιθανή αιτία                 | Ενέργεια                             |
|------------------------------|--------------------------------------|
| Ακατάλληλο πάχος τομών ιστού | Προετοιμάστε τομές μικροτόμου 2-4 μm |

**Το δείγμα επιπλέει στο πλακίδιο**

| Πιθανή αιτία                                    | Ενέργεια                              |
|---|---------------------------------------|
| Η πρωτεολυτική προεπεξεργασία είναι πολύ ισχυρή | Μειώστε τον χρόνο επώασης της πεψίνης |

**Αδύναμη αντίχρωση**

| Πιθανή αιτία  | Ενέργεια   |
|---|--|
| Χαμηλής συγκέντρωσης διάλυμα φθορίζουσας χρωστικής DAPI           | Αντί αυτού, χρησιμοποιήστε <u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (Αρ. Προϊόντος MT-0008-0.8) |
| Ο χρόνος επώασης της φθορίζουσας χρωστικής DAPI είναι πολύ μικρός | Προσαρμόστε τον χρόνο επώασης της φθορίζουσας χρωστικής DAPI                                 |

**17. Βιβλιογραφία**

- Brockhoff G, et al. (2016) *Histopathology* 69: 635-646.
- Gajaria PK, et al. (2020) *Indian J Pathol Microbiol* 63: 1
- Hwang CC, et al. (2011) *Histopathology* 59: 984-992.
- Holten-Rossing H, et al. (2015) *Breast Cancer Res Treat* 152: 367-375.
- Jensen SG, et al. (2020) *Apmis* 128: 573-582.
- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Köseoglu RD, et al. (2019) *Eur J Breast Health* 15: 43.
- Nielsen SL, et al. (2017) *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 25: 320-328.
- Page R, et al. (2022) *PLoS one* 17(6): e0270139
- Pfarr N, et al. (2017) *Genes Chromosomes Cancer* 56: 255-265.
- Schindlbeck C, et al. (2010) *J Cancer Res Clin Oncol* 136: 1029-1037.
- Staněk L, et al. (2014) *Mol Med Rep* 10: 2669-2674.
- Tabarestani S, et al. (2015) *Asian Pac J Cancer Prev* 16: 7997-8002.
- Wilkinson DG: *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.

**18. Αναθεώρηση**
[www.zytovision.com](http://www.zytovision.com)

Ανατρέξτε στη διεύθυνση [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com) για τις πιο πρόσφατες οδηγίες χρήσης καθώς και για οδηγίες χρήσης σε διάφορες γλώσσες.

Οι ειδικοί μας είναι πρόθυμοι να απαντήσουν στις ερωτήσεις σας. Επικοινωνήστε στη διεύθυνση [help@zytovision.com](mailto:help@zytovision.com) Για τη σύνοψη της ασφάλειας και της απόδοσης, ανατρέξτε στη διεύθυνση [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com).



ZytoVision GmbH  
Fischkai 1  
27572 Bremerhaven / Γερμανία  
Τηλέφωνο: +49 471 4832-300  
Φαξ: +49 471 4832-509  
[www.zytovision.com](http://www.zytovision.com)  
E-Mail: [info@zytovision.com](mailto:info@zytovision.com)

**Εμπορικά σήματα:**

Τα ZytoVision® και ZytoLight® είναι εμπορικά σήματα της ZytoVision GmbH.