




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

**REF** C-3003-40  40

Για την ποιοτική ανίχνευση των ενισχύσεων του ανθρώπινου γονιδίου ERBB2 με χρωμογόνο υβριδισμό *in situ* (CISH)

4250380N297W



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 ZytoDot SPEC ERBB2 Probe Kit προορίζεται να χρησιμοποιηθεί για την ποιοτική ανίχνευση των ενισχύσεων που αφορούν το ανθρώπινο γονίδιο ERBB2 σε δείγματα που έχουν σταθεροποιηθεί με φορμόλη και έχουν ενσωματωθεί σε παραφίνη, όπως ο καρκίνος του μαστού, με χρωμογόνο υβριδισμό *in situ* (CISH).

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 δεν πρέπει να λαμβάνονται θεραπευτικά μέτρα με βάση μόνο το αποτέλεσμα της εξέτασης.

**2. Αρχή της δοκιμής**

Η τεχνική χρωμογόνου *in situ* υβριδισμού (CISH) επιτρέπει την ανίχνευση και την οπτικοποίηση συγκεκριμένων αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων σε κυτταρικά παρασκευάσματα. Θραύσματα νουκλεοτιδίων επισημασμένα με απτένιο, οι λεγόμενοι ανιχνευτές CISH (χρωμογόνου *in situ* υβριδισμού), και οι συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στόχου στα παρασκευάσματα συν-μετουσιώνονται και στη συνέχεια αφήνονται να ανόπτονται κατά τη διάρκεια του υβριδισμού. Κατόπιν, τα μη ειδικά και μη δεσμευμένα θραύσματα ανιχνευτή αφαιρούνται με αυστηρά βήματα πλύσης. Ο σχηματισμός διπλής όψης του επισημασμένου ανιχνευτή μπορεί να οπτικοποιηθεί, χρησιμοποιώντας πρωτεύοντα (μη μαρκαρισμένα) αντισώματα, τα οποία ανιχνεύονται από δευτερογενή πολυμερισμένα συζευγμένα με ένζυμα αντισώματα. Η ενζυματική αντίδραση με χρωμογόνα υποστρώματα οδηγεί στον σχηματισμό έγχρωμων ιζημάτων. Μετά την αντιχρώση του πυρήνα με μια πυρηνική χρωστική, τα υβριδισμένα θραύσματα ανιχνευτή οπτικοποιούνται με μικροσκοπία φωτός.

**3. Παρεχόμενα αντιδραστήρια**

Το ZytoDot SPEC ERBB2 Probe Kit διатиθέται σε ένα μέγεθος και αποτελείται από τα εξής:

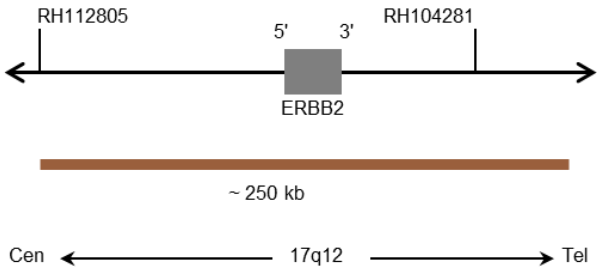
Κωδικός	Συστατικό	Ποσότητα	Δοχείο
		 40	
PT2	Heat Pretreatment Solution EDTA	500 ml	Μπουκάλι με βιδωτό καπάκι (μεγάλο)
ES1	Pepsin Solution	4 ml	Σταγονομετρικό φιαλίδιο, λευκό πώμα
PD1	ZytoDot SPEC ERBB2 Probe	0.4 ml	Δοχείο αντίδρασης, καφέ καπάκι
WB1	Wash Buffer SSC	560 ml	Μπουκάλι με βιδωτό καπάκι (μεγάλο)
WB4	PBS/Tween	2x	Συσκευασία από αλουμίνιο
BS1	Blocking Solution	4 ml	Σταγονομετρικό φιαλίδιο, πορτοκαλί πώμα
AB1	Mouse Anti-Dig	4 ml	Σταγονομετρικό φιαλίδιο, ροζ πώμα
AB2	Anti-Mouse-HRP-Polymer	4 ml	Σταγονομετρικό φιαλίδιο, βιολετί πώμα
SB1a	DAB Solution A	0.3 ml	Σταγονομετρικό φιαλίδιο, πράσινο πώμα
SB1b	DAB Solution B	10 ml	Σταγονομετρικό φιαλίδιο, γκριζό πώμα
CS1	Mayer's Hematoxylin Solution	20 ml	Μπουκάλι με βιδωτό καπάκι, μαύρο
MT4	Mounting Solution (alcoholic)	4 ml	Γυάλινο μπουκάλι, καφέ
	Οδηγίες χρήσης	1	

**C-3003-40 (40 τεστ):** Τα συστατικά **PD1**, **ES1**, **BS1**, **AB1**, **AB2**, **SB1a-b**, **CS1**, και **MT4** επαρκούν για 40 αντιδράσεις. Το συστατικό **PT2** επαρκεί για 7 δοχεία χρώσης των 70 ml το καθένα. Το συστατικό **WB1** επαρκεί για 8 δοχεία χρώσης των 70 ml το καθένα. Το συστατικό **WB4** επαρκεί για 28 δοχεία χρώσης των 70 ml το καθένα.

Το ZytoDot SPEC ERBB2 Probe αποτελείται από:

- Πολυνουκλεοτίδια επισημασμένα με διγοξιγενίνη (~1,8 ng/μl), τα οποία στοχεύουν αλληλουχίες που χαρτογραφούνται στο 17q12\* (chr17:37,725,661-37,973,541) που φιλοξενεί την περιοχή του γονιδίου ERBB2 (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 (80 °C, 98 °C)
- Υβριδιστής ή θερμαινόμενη πλάκα
- Υβριδιστής ή θάλαμος υγρασίας σε φούρνο υβριδισμού
- Ρυθμιζόμενες πιπέτες (10 μl, 1000 μl)
- Δοχεία ή λουτρά χρώσης
- Χρονόμετρο
- Βαθμονομημένο θερμόμετρο
- Αιθανόλη ή αλκοόλη αντιδραστήριου
- Ξυλένιο
- Μεθανόλη 100%

- Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30%
- Απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό
- Καλυπτρίδες (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Ελαστικό τσιμεντοειδές, π.χ., Fixogum Rubber Cement (Αρ. Προϊόντος E-4005-50/-125) ή παρόμοιο
- Επαρκώς συντηρημένο μικροσκόπιο φωτός (400-630x)

## 5. Αποθήκευση και χειρισμός

Φυλάσσεται στους 2-8 °C σε όρθια θέση. 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 άφθονο 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 διασταυρωμένη μόλυνση των δειγμάτων, καθώς αυτό μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα αποτελέσματα.
- Τα δείγματα δεν πρέπει να αφήνονται να στεγνώσουν κατά τη διάρκεια των βημάτων υβριδισμού και πλύσης.

### 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 CS1 και WB4:

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

### Δηλώσεις επικινδυνότητας και προφύλαξης για τα BS1, AB1, AB2, PT2, και WB1:

Το συστατικό που προσδιορίζει τον κίνδυνο είναι μείγμα 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 SB1a:

Το συστατικό που καθορίζει τον κίνδυνο είναι η διφαινυλο-3,3'-4,4'-τετραϋλοτετραμίνη διαμινοβενζίνη.



#### Κίνδυνος

- H350 Μπορεί να προκαλέσει καρκίνο.
- P201 Εφοδιαστείτε με τις ειδικές οδηγίες πριν από τη χρήση.
- P202 Μην το χειρίζεστε, έως ότου διαβάσετε και κατανοήσετε όλες τις προφυλάξεις ασφαλείας.
- P280 Φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μέσα προστασίας ματιών/προσώπου.
- P308+P313 Σε περίπτωση έκθεσης ή ανησυχίας: Λάβετε ιατρική συμβουλή/προσοχή.
- P405 Φυλάσσεται κλειδωμένο.

### Δηλώσεις επικινδυνότητας και προφύλαξης για το MT4:

Το συστατικό που προσδιορίζει τον κίνδυνο είναι το ξυλένιο.



#### Προειδοποίηση

- H226 Υγρό και ατμοί πολύ εύφλεκτα.
- H312+H332 Επιβλαβές σε επαφή με το δέρμα ή σε περίπτωση εισπνοής.
- H315 Προκαλεί ερεθισμό του δέρματος.
- H319 Προκαλεί σοβαρό οφθαλμικό ερεθισμό.
- H335 Μπορεί να προκαλέσει ερεθισμό της αναπνευστικής οδού.
- H373 Μπορεί να προκαλέσει βλάβη στα όργανα λόγω παρατεταμένης ή επανειλημμένης έκθεσης.
- P210 Μακριά από θερμότητα, θερμές επιφάνειες, σπινθήρες, γυμνές φλόγες και άλλες πηγές ανάφλεξης. Μην καπνίζετε.
- P260 Μην αναπνέετε σκόνη/αναθυμιάσεις/αέρια/αιθάλη/ατμούς/σπρέυ.
- P280 Φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μέσα προστασίας ματιών/προσώπου.
- P305+P351+P338 ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΑ ΜΑΤΙΑ: Ξεπλύνετε προσεκτικά με νερό για αρκετά λεπτά. Αφαιρέστε τους φακούς επαφής, εάν υπάρχουν και είναι εύκολο να το κάνετε. Συνεχίστε το ξέπλυμα.
- P337+P313 Εάν ο ερεθισμός των ματιών επιμένει: Λάβετε ιατρική συμβουλή/προσοχή.
- P403+P235 Αποθηκεύεται σε καλά αεριζόμενο χώρο. Διατηρείται δροσερό.
- EUH208 Περιέχει 2-μεθυλοπροπ-2-ενοϊκό μεθυλεστέρα, 2-μεθυλοπροπ-2-ενοϊκό μεθυλεστέρα, μεθακρυλικό μεθυλεστέρα. Μπορεί να προκαλέσει αλλεργική αντίδραση.

**Δηλώσεις επικινδυνότητας και προφύλαξης για το SB1b:**

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

**Κίνδυνος**

H317	Μπορεί να προκαλέσει αλλεργική δερματική αντίδραση.
H360D	Μπορεί να βλάψει το έμβρυο.
P201	Εφοδιαστείτε με τις ειδικές οδηγίες πριν από τη χρήση.
P261	Αποφεύγετε να αναπνέετε σκόνη/αναθυμιάσεις/αέρια/σταγονίδια/ατμούς/εκνεφώματα.
P280	Φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μέσα προστασίας ματιών/προσώπου.
P302+P352	ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΟ ΔΕΡΜΑ: Πλύνετε με άφθονο νερό.
P308+P313	Σε περίπτωση έκθεσης ή ανησυχίας: Λάβετε ιατρική συμβουλή/προσοχή.
P362+P364	Βγάλτε τα μολυσμένα ρούχα και πλύνετε τα πριν τα επαναχρησιμοποιήσετε.

**Δηλώσεις επικινδυνότητας και προφύλαξης για το PD1:**

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.

**7. Περιορισμοί**

- Για *in vitro* διαγνωστική χρήση.
- Μόνο για επαγγελματική χρήση.
- Μόνο για μη αυτοματοποιημένη χρήση.
- Η αναλυτική κανονική αποκοπή για το μη κανονικό μοτίβο σήματος ενδιαφέροντος θα πρέπει να καθορίζεται από έναν ειδικευμένο παθολογοανατόμο/γενετιστή.
- 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 CISH (χρωμογόνου *in situ* υβριδισμού), 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 ακόλουθα σταθεροποιητικά δεν είναι συμβατά με το ISH (*in situ* υβριδισμό):

- Σταθεροποιητικό Bouin
- B5 σταθεροποιητικό
- Ώξινα 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:

- Σε κάθε βήμα της προετοιμασίας να αποφεύγετε τη διασταυρούμενη μόλυνση των δειγμάτων, καθώς αυτή μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα αποτελέσματα.
- Σταθεροποίηση σε 10% ουδέτερα ρυθμισμένη φορμαλίνη για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C).
- Μέγεθος δείγματος ≤ 0,5 cm<sup>3</sup>.
- Χρησιμοποιήστε παραφίνη εξαιρετικής ποιότητας.
- Η ενσωμάτωση πρέπει να πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες χαμηλότερες από 65°C.
- Προετοιμάστε τομές μικροτόμου 3-5 μm.
- Χρησιμοποιήστε θετικά φορτισμένα πλακίδια μικροσκοπίου.
- Σταθεροποιήστε τα αποκόμματα ιστών για 2-16 ώρες στους 50-60°C.

**10. Προπαρασκευαστική επεξεργασία της συσκευής**

Το PBS/Tween (WB4) πρέπει να υποβάλλεται σε προεπεξεργασία σύμφωνα με τις οδηγίες στο κεφάλαιο 11. "Διαδικασία ανάλυσης". Όλα τα άλλα αντιδραστήρια του kit είναι έτοιμα για χρήση. Δεν απαιτείται ανασύσταση, ανάμειξη ή αραίωση. Φέρτε τον ανιχνευτή σε θερμοκρασία δωματίου (18-25 °C) πριν από τη χρήση, προστατέψτε τον από το φως. Πριν ανοίξετε το φιαλίδιο, αναμειξτε 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 EDTA (PT2)*: Θερμάνετε σε θερμοκρασία έως και 98°C σε καλυμμένο δοχείο χρώσης.
- (3) Προετοιμασία του 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Αραιώστε 1 μέρος 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε 9 μέρη μεθανόλης 100%.
- (4) Ανιχνευτής χρωμογόνου *in situ* υβριδισμού (CISH) *ZytoDot*: Πριν από τη χρήση, φέρτε το σε θερμοκρασία δωματίου.

**Προεπεξεργασία (αποκλήρωση/πρωτεόλυση)**

- (1) Επλώστε τα πλακίδια για 10 λεπτά στους 70°C (π.χ. επάνω σε μια καυτή πλάκα).
- (2) Επλώστε τα πλακίδια 2 φορές από 5 λεπτά μέσα σε ξυλένιο.
- (3) Επλώστε τα πλακίδια 3 φορές από 3 λεπτά σε αιθανόλη 100%.
- (4) Επλώστε τα πλακίδια για 5 λεπτά σε 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- (5) Πλύνετε τα πλακίδια 2 φορές από 1 λεπτό σε απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό.
- (6) Επλώστε για 15 λεπτά σε προθερμασμένο Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2) στους 98°C.

Χρησιμοποιείτε οκτώ πλακίδια ανά δοχείο χρώσης (προσθέστε ομοίωμα πλακιδίων εάν χρειαστεί).

- (7) Μεταφέρετε τα πλακίδια αμέσως σε απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό και πλύνετε τα 2 φορές από 2 λεπτά.
- (8) Εφαρμόστε (στάγδην) Pepsin Solution (ES1) στο δείγμα και επλώστε για 5 έως 15 λεπτά στους 37°C σε θάλαμο υγρασίας.

Το **ES1** ενδέχεται να σχηματίζει ιζήματα, τα οποία, ωστόσο, δεν επηρεάζουν την ποιότητα. Ως γενικό κανόνα, συνιστούμε να εξακριβώνεται ο βέλτιστος χρόνος για πρωτεόλυση σε προδοκιμές.

- (9) Βυθίστε τα πλακίδια 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.

#### Μετουσίωση και υβριδισμός

- (1) Μεταφέρετε με πιπέττα 10 μl περιεχομένου του ανιχνευτή ZytoDot CISH σε κάθε προεπεξεργασμένο δείγμα.
- (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) για τη σφράγιση.

- (3) Τοποθετήστε τα πλακίδια σε μια καυτή πλάκα ή έναν υβριδιστή και μετουσίωστε τα δείγματα για 5 λεπτά στους 94-95°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 να μη στεγνώνουν κατά τη διάρκεια του υβριδισμού.

#### 11.2 Ημέρα 2

##### Προπαρασκευαστικά βήματα

- (1) Wash Buffer SSC (WB1): Για αυστηρή έκπλυση θερμάνετε σε θερμοκρασία έως και 80°C σε καλυμμένο δοχείο χρώσης. Το **WB1** ενδέχεται να σχηματίζει ιζήματα, τα οποία, ωστόσο, δεν επηρεάζουν την ποιότητα και διαλύονται όταν θερμαίνονται.
- (2) Προετοιμασία του ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης PBS/Tween: Προσθέστε 1 ταμπλέτα με PBS/Tween (WB4) σε 1000 ml απιονισμένου ή αποσταγμένου νερού και αναδεύστε για να διαλυθεί.
- (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): Πριν από τη χρήση, φέρτε το σε θερμοκρασία δωματίου.

#### Μετα-υβριδισμός και ανίχνευση

- (1) Αφαιρέστε προσεκτικά το ελαστικό τσιμεντοειδές ή την κόλλα.
- (2) Αφαιρέστε την καλυπτρίδα βυθίζοντας τα πλακίδια σε Wash Buffer SSC (WB1) σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.

Το **WB1** μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί για μία ακόμη μόνο φορά (σύνολο 2 φορές). Αποθηκεύστε στους 2-8°C το πολύ για μία εβδομάδα.

- (3) Πλύνετε τα πλακίδια για 5 λεπτά σε Wash Buffer SSC (WB1) σε θερμοκρασία 80°C.

Χρησιμοποιείτε οκτώ πλακίδια ανά δοχείο χρώσης (προσθέστε ομοίωμα πλακιδίων εάν χρειαστεί).

- (4) Πλύνετε τα πλακίδια 2 φορές από 1 λεπτό σε απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό.
- (5) Βυθίστε τα πλακίδια σε ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης PBS/Tween.
- (6) Εφαρμόστε Blocking Solution (BS1) (1-2 σταγόνες ανά πλακίδιο) στα πλακίδια και επλώστε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- (7) Σκουπίστε ό, τι περισσεύει από το Blocking Solution (BS1), αλλά μην το ξεπλύνετε!
- (8) Εφαρμόστε Mouse-Anti-DIG (AB1) (1-2 σταγόνες ανά πλακίδιο) στα πλακίδια και επλώστε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- (9) Πλύνετε τα πλακίδια 3 φορές από 1 λεπτό σε PBS/Tween.
- (10) Εφαρμόστε Anti-Mouse-HRP-Polymer (AB2) (1-2 σταγόνες ανά πλακίδιο) στα πλακίδια και επλώστε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

- (11) Πλύνετε τα πλακίδια 3 φορές από 1 λεπτό σε PBS/Tween.
- (12) Προετοιμάστε το διάλυμα διαμινοβενζιδίνης (**DAB**) (διάλυμα εργασίας): συμπληρώστε με 1 ml DAB Solution B (SB1b) σε μία βαθμονομημένη κούπα και προσθέστε μία σταγόνα (30 μl) DAB Solution A (SB1a). Ανακατέψτε καλά.
- (13) Εφαρμόστε διάλυμα διαμινοβενζιδίνης (**DAB**) (1-2 σταγόνες ανά πλακίδιο) στα πλακίδια και επλώστε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- (14) Μεταφέρετε τα πλακίδια σε ένα δοχείο χρώσης και ξεπλύνετε τα για 2 λεπτά κάτω από τρεχούμενο κρύο νερό βρύσης.
- (15) Εφαρμόστε αντίχρωση στα δείγματα για 5 έως 10 δευτερόλεπτα με το Mayer's Hematoxylin Solution (CS1).
- (16) Μεταφέρετε τα πλακίδια σε ένα δοχείο χρώσης και ξεπλύνετε τα για 2 λεπτά κάτω από τρεχούμενο κρύο νερό βρύσης.
- (17) Αφυδάτωση σε: αιθανόλη 70%, 90% και 100%, έκαστο για 1 λεπτό.
- (18) Επλώστε τα πλακίδια 2 φορές από 2 λεπτά μέσα σε ξυλένιο (χρησιμοποιήστε εξαιρετικά καθαρό ξυλένιο).
- (19) Αποφύγετε τυχόν παγιδευμένες φυσαλίδες, καλύψτε τα δείγματα με μία καλυπτρίδα (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm) χρησιμοποιώντας το Mounting Solution (alcoholic) (MT4). Περιμένετε περίπου 20 με 30 λεπτά ώπου να ακινητοποιηθεί η καλυπτρίδα.

Με τη χρήση ενός στόμιου πιπέττας που έχει κοπεί για να αυξηθεί το μέγεθος του ανοίγματος μπορεί να διευκολυνθεί η διαδικασία της πιπέτας.

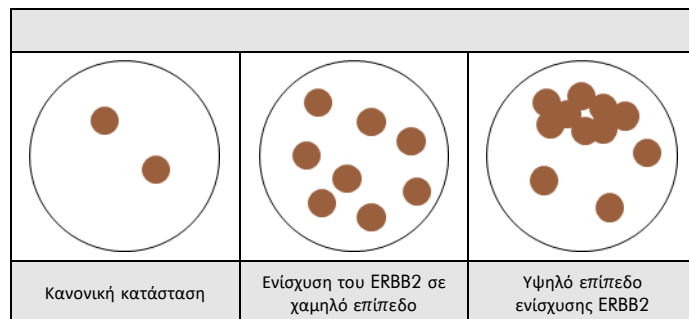
- (20) Αξιολογήστε τη χρώση των δειγμάτων χρησιμοποιώντας μικροσκόπιο φωτός.

#### 12. Ερμηνεία αποτελεσμάτων

Χρησιμοποιώντας το ZytoDot CISH Implementation Kit, τα σήματα υβριδισμού των πολυνουκλεοτιδίων που έχουν επισημανθεί με διγοξιγενίνη εμφανίζονται καφέ έως σκούρο καφέ (περιοχή γονιδίου ERBB2).

**Κανονική κατάσταση:** Στις ενδιάμεσες φάσεις φυσιολογικών κυττάρων ή κυττάρων χωρίς ενίσχυση που περιλαμβάνει την περιοχή του γονιδίου ERBB2, εμφανίζονται δύο διακριτά καφέ σήματα σε σχήμα κουκκίδας (βλ. Εικ. 2).

**Μη κανονική κατάσταση:** Σε κύτταρα με ενίσχυση της περιοχής του γονιδίου ERBB2 ή πολυσωμία του χρωμοσώματος 17, θα παρατηρηθεί αυξημένος αριθμός του καφέ σήματος ή συστάδες καφέ σήματος (βλ. Εικ. 2).



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 CISH (χρωμογόνου *in situ* υβριδισμού) 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.
- Πριν από την απαρίθμηση του σήματος, το δείγμα θα πρέπει να σαρωθεί για οποιαδήποτε πιθανή ενδογενή ετερογένεια σε μεγέθυνση 100 έως 200 φορές.
- Η οπτικοποίηση των σημάτων θα πρέπει να εκτελείται σε μεγέθυνση τουλάχιστον 400 έως 630 φορές με αποτέλεσμα τα εύκολα ορατά σήματα.
- Μην αξιολογείτε περιοχές νέκρωσης, αλληλοεπικαλυπτόμενους πυρήνες, πυρήνες που έχουν υποστεί υπερβολική πέψη και πυρήνες με ασθενή ένταση σήματος.
- Λόγω της μίτωσης, μπορεί να είναι ορατά επιπλέον σήματα ακόμη και σε ένα μικρό ποσοστό μη νεοπλασματικών κυττάρων. Περιστασιακά,





- πυρήνες με ελλείποντα σήματα μπορεί να παρατηρηθούν σε δείγματα ενσωματωμένα σε παραφίνη, λόγω τεχνουργημάτων κοπής.
- 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 του ανιχνευτή καθορίστηκε με σύγκριση με τον αντίστοιχο ανιχνευτή FISH εγκριμένο από το IVD.

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

14.2 Κλινική απόδοση

Διαγνωστική ευαισθησία:	100% (95% CI 83.2 – 100.0) έναντι FISH, CISH
Διαγνωστική εξειδίκευση:	100% (95% CI 83.2 – 100.0) έναντι FISH, CISH

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
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.
Ανεπαρκής προετοιμασία χρωμογόνου υποστρώματος	Αντί να χρησιμοποιήσετε μία σταγόνα διαλύματος A DAB χρησιμοποιήστε 30 µl
Ο χρόνος αντίχρωσης είναι πολύ μεγάλος	Αποφύγετε τη σκούρα αντίχρωση, γιατί μπορεί να κρύψει τα θετικά σήματα χρώσης

Η κυάνωση της αντίχρωσης δεν έγινε σωστά	Χρησιμοποιήστε κρύο τρεχούμενο νερό βρύσης για κυάνωση· μη χρησιμοποιείτε ζεστό ή καυτό νερό ή αντιδραστήρια κυάνωσης
--	---

Τα σήματα είναι πολύ δυνατά

Πιθανή αιτία	Ενέργεια
Η πρωτεολυτική προεπεξεργασία διεξήχθη για πολύ καιρό	Βελτιστοποιήστε τον χρόνο επώασης της πεψίνης, αυξήστε ή μειώστε εάν είναι απαραίτητο
Η αντίδραση του υποστρώματος είναι πολύ έντονη	Συντομεύστε τον χρόνο επώασης του υποστρώματος· μη θερμαίνετε το διάλυμα υποστρώματος σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 25 °C· επώαστε μόνον σε θερμοκρασία δωματίου

Τα σήματα εξασθενούν ή συγχωνεύονται

Πιθανή αιτία	Ενέργεια
Έχει χρησιμοποιηθεί ακατάλληλο διάλυμα στερέωσης	Χρησιμοποιείτε μόνον το διάλυμα στερέωσης που παρέχεται με το κιτ ή διαλύματα στερέωσης με βάση το ξυλένιο και χωρίς ακαθαρσίες· μη χρησιμοποιείτε ταινία καλυπτρίδας

Ανώμαλη ή σε ορισμένα σημεία πολύ ελαφριά χρώση

Πιθανή αιτία	Ενέργεια
Ατελής αποκλήρωση	Χρησιμοποιήστε φρέσκα διαλύματα· ελέγξτε τη διάρκεια των χρόνων αποκλήρωσης
Ο όγκος του αντιδραστηρίου είναι πολύ μικρός	Βεβαιωθείτε ότι ο όγκος του αντιδραστηρίου είναι αρκετά μεγάλος, ώστε να καλύπτει την περιοχή του ιστού

Ασυνεπή αποτελέσματα

Πιθανή αιτία	Ενέργεια
Ανεπαρκές στέγνωμα πριν από την εφαρμογή του ανιχνευτή	Επεκτείνετε το στέγνωμα στον αέρα
Πάρα πολύ νερό/ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης στον ιστό πριν από την εφαρμογή πεψίνης, αντισωμάτων ή/και χρωματικών υποστρωμάτων	Βεβαιωθείτε ότι η περίσσεια του υγρού έχει αφαιρεθεί από το τμήμα του ιστού με στύπωμα ή τίναγμα από το πλακίδιο. Μικρές ποσότητες υπολειπόμενου νερού/ρυθμιστικού διαλύματος δεν παρεμβαίνουν στη δοκιμή
Παραλλαγές στις μεθόδους στερέωσης και ενσωμάτωσης ιστών	Βελτιστοποιήστε τις μεθόδους στερέωσης και ενσωμάτωσης
Διακυμάνσεις στο πάχος τομής ιστού	Βελτιστοποίηση τομής

Υποβαθμισμένη μορφολογία

Πιθανή αιτία	Ενέργεια
Το δείγμα κυττάρου ή ιστού δεν έχει στερεωθεί σωστά	Βελτιστοποιήστε τον χρόνο στερέωσης και το σταθεροποιητικό
Η πρωτεολυτική προεπεξεργασία δεν διεξήχθη για μεγάλο χρονικό διάστημα	Μειώστε τον χρόνο επώασης της πεψίνης



Διασταυρούμενα σήματα υβριδισμού· θορυβώδες υπόβαθρο

Πιθανή αιτία	Ενέργεια
Τα τμήματα στέγνωσαν οποιαδήποτε στιγμή κατά τη διάρκεια ή μετά τον υβριδισμό	Αποφύγετε το στέγνωμα των τμημάτων· χρησιμοποιήστε θάλαμο υγρασίας· σφραγίστε σωστά την καλυπτρίδα
Παρατεταμένος χρόνος επώασης του υποστρώματος	Μειώστε τον χρόνο επώασης του υποστρώματος
Ατελής αποκήρωση	Χρησιμοποιήστε φρέσκα διαλύματα· ελέγξτε τη διάρκεια της αποκήρωσης
Η πρωτεολυτική προεπεξεργασία είναι πολύ ισχυρή	Βελτιστοποιήστε τον χρόνο επώασης της πεψίνης
Τα πλακίδια ψύχονται σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τον υβριδισμό	Μεταφέρετε τα πλακίδια γρήγορα σε θερμοκρασία υβριδισμού

Αλληλοεπικαλυπτόμενα σήματα

Πιθανή αιτία	Ενέργεια
Ακατάλληλο πάχος τομών ιστού	Προετοιμάστε τομές μικροτόμου 3-5 μm

Το δείγμα επιπλέει στο πλακίδιο

Πιθανή αιτία	Ενέργεια
Η πρωτεολυτική προεπεξεργασία είναι πολύ ισχυρή	Συντομεύστε τον χρόνο επώασης πεψίνης

17. Βιβλιογραφία

- 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. 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 ZytoDot® είναι εμπορικά σήματα της ZytoVision GmbH.