ZytoDot
SPEC ERBB2 Probe Kit

REF C-3003-40 Σ 40

Pour la détection qualitative des amplifications du gène ERBB2 humain par hybridation chromogénique *in situ* (CISH)

4250380N297W

CE 0124

IVD

Dispositif médical de diagnostic *in vitro*

conformément à l'IVDR (UE) 2017/746

1. Utilisation prévue

Le ZytoDot SPEC ERBB2 Probe Kit est destinée à la détection qualitative d'amplifications impliquant le gène humain ERBB2 dans des échantillons fixés au formol et inclus en paraffine, tels que le cancer du sein, par hybridation chromogénique in situ (CISH).

Le produit est destiné à un usage professionnel uniquement. Tous les tests utilisant le produit doivent être réalisés dans un laboratoire d'anatomie pathologique agréé et certifié, sous la supervision d'un médecin pathologiste/généticien et par du personnel qualifié.

La sonde est destinée à être utilisée comme une aide au diagnostic différentiel du cancer du sein et des mesures thérapeutiques ne doivent pas être prises sur la base du seul résultat du test.

2. Principe du test

La technique d'hybridation chromogénique in situ (CISH) permet la détection et la visualisation de séquences d'acides nucléiques spécifiques dans des préparations cellulaires. Les fragments de nucléotides marqués par des haptènes, appelés sondes CISH, et leurs séquences cibles complémentaires dans les préparations sont codénaturés et ensuite hybridés pendant l'hybridation. Les fragments de sondes non spécifiques et non liés sont éliminés par des étapes de lavage stringent. La formation de duplex de la sonde marquée peut être visualisée en utilisant des anticorps primaires (non marqués), qui sont détectés par des anticorps secondaires polymérisés conjugués à une enzyme. La réaction enzymatique avec les substrats chromogènes conduit à la formation de précipités colorés. Après avoir contre-coloré le noyau avec un colorant nucléaire, les fragments de sonde hybridés sont visualisés au microscope optique.

3. Réactifs fournis

ZytoDot SPEC ERBB2 Probe Kit est disponible en une taille et est composé de :

Code	Composant	Quantité Σ 40	Contenant
PT2	Heat Pretreatment Solution EDTA	500 ml	Flacon avec bouchon à visser (grand)
ES1	Pepsin Solution	4 ml	Flacon compte-gouttes, bouchon transparent
PD1	ZytoDot SPEC ERBB2 Probe	0.4 ml	Récipient à réaction, couvercle brun
WB1	Wash Buffer SSC	560 ml	Flacon avec bouchon à visser (grand)
WB4	PBS/Tween	2x	Emballage en aluminium
BS1	Blocking Solution	4 ml	Flacon compte-gouttes, bouchon orange
AB1	Mouse_Anti-Dig	4 ml	Flacon compte-gouttes, bouchon rose
AB2	Anti-Mouse-HRP-Polymer	4 ml	Flacon compte-gouttes, bouchon violet
SB1a	DAB Solution A	0.3 ml	Flacon compte-gouttes, bouchon vert
SB1b	DAB Solution B	10 ml	Flacon compte-gouttes, bouchon gris
CS1	Mayer's Hematoxylin Solution	20 ml	Flacon avec bouchon à visser, noir
MT4	Mounting Solution (alcoholic)	4 ml	Bouteille en verre, marron
	Mode d'emploi	1	

C-3003-40 (40 tests): Les composants **PD1**, **ES1**, **BS1**, **AB1**, **AB2**, **SB1a-b**, **CS1**, et **MT4** suffisent pour 40 réactions. Le composant **PT2** suffit pour 7 cuves à coloration de 70 ml chacune. Le composant **WB1** suffit pour 8 cuves à coloration de 70 ml chacune. Le composant **WB4** suffit pour 28 cuves à coloration de 70 ml chacune.

ZytoDot SPEC ERBB2 Probe est compose de :

- Polynucléotides marqués à la digoxigénine (~1,8 ng/µl), qui ciblent des séquences cartographiées en 17q12* (chr17:37,725,661-37,973,541) hébergeant la région du gène ERBB2 (voir Fig. 1).
- Tampon d'hybridation à base de formamide

* selon Human Genome Assembly GRCh37/hg19

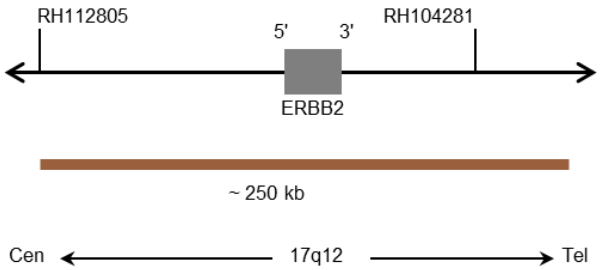

Fig. 1 : Carte de la sonde SPEC ERBB2 (pas à l'échelle)

4. Matériel requis mais non fourni

- Échantillons de contrôle positifs et négatifs
- Lames pour microspcope, chargées positiviement
- Bain-marie (80°C, 98°C)
- Appareil à hybridation ou plaque chauffante
- Appareil à hybridation ou chamber humide
- Pipettes adjustable (10 µl, 1000 µl)
- Bocaux ou bains de coloration
- Minuteur
- Thermomètre calibré
- Ethanol ou alcool
- Xylène
- Méthanol 100%
- Péroxide d'hydrogène (H_2O_2) 30%

- Eau dionisée ou distillée
- Lamelles (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Ciment caoutchouc, par exemple, Fixogum Rubber Cement (Prod. No. E-4005-50/-125) ou similaire
- Microscope lumineux correctement entretenu (400-630x)

5. Stockage et manipulation

Conserver entre 2 et 8 °C dans une position verticale. Remettre dans les conditions de stockage immédiatement après utilisation. Ne pas utiliser les réactifs après leur date de péremption indiquée sur l'étiquette. Le produit est stable jusqu'à sa date de péremption indiquée sur l'étiquette lorsqu'il est utilisé dans les bonnes conditions.

6. Avertissements et précautions

- Lire les instructions avant utilisation !
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
- Ce produit contient des substances (en faibles concentrations et volumes) nocifs pour la santé et potentiellement infectieux. Eviter le contact direct avec ces réactifs. Prenez les mesures de protection appropriées (utilisez des gants jetables, des lunettes de protection et des vêtements de laboratoire) !
- Signaler tout incident grave survenu en rapport avec le produit au fabricant et à l'autorité compétente, conformément à la réglementation locale!
- Si les réactifs entrent en contact avec la peau, rincer immédiatement avec beaucoup d'eau.
- Une fiche signalétique de sécurité à l'usage de l'utilisateur professionnel est disponible sur demande.
- Ne pas réutiliser les réactifs, sauf si la réutilisation est explicitement autorisée!
- Éviter la contamination croisée des échantillons car cela peut entraîner des résultats erronés.
- Les spécimens ne doivent pas être laissés sécher pendant les étapes d'hybridation et de lavage.

Étiquetage particulier de ES1 :

EUH208	Contient de la pepsine A. Peut produire une réaction allergique.
EUH210	Fiche de données de sécurité disponible sur demande.

Mentions de danger et conseils de prudence pour CS1 et WB4 :

Le mélange n'est pas classé comme dangereux au sens du règlement (CE) n° 1272/2008.

Mentions de danger et conseils de prudence pour BS1, AB1, AB2, PT2, et WB1 :

Le composant dangereux déterminant est un mélange de 5-chloro-2-méthyl-4-isothiazoline-3-one [EC n° 247-500-7] et 2-méthyl-2H-isothiazol-3-one [EC n° 220-239-6] (3:1).

Avertissement

H317	Peut provoquer une allergie cutanée.
P261	Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols.
P272	Les vêtements de travail contaminés ne devraient pas sortir du lieu de travail.
P280	Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
P302+P352	EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: Laver abondamment à l'eau.
P333+P313	En cas d'irritation ou d'éruption cutanée: Demander un avis médical/Consulter un médecin.
P362+P364	Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation.

Mentions de danger et conseils de prudence pour SB1a:
Le composant dangereux déterminant est biphényl-3,3',4,4'-tétrayltétraamine; diaminobenzidine.

Danger

H350	Peut provoquer le cancer.
P201	Se procurer les instructions avant utilisation.
P202	Ne pas manipuler avant d'avoir lu et compris toutes les précautions de sécurité.
P280	Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
P308+P313	EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée: consulter un médecin.
P405	Garder sous clef.

Mentions de danger et conseils de prudence pour SB1b:
Le composant dangereux déterminant est un mélange de 5-chloro-2-méthyl-4-isothiazoline-3-one [EC n° 247-500-7] et 2-méthyl-2H-isothiazol-3-one [EC n° 220-239-6] (3:1).

Danger

H317	Peut provoquer une allergie cutanée.
H360D	Peut nuire au foetus.
P201	Se procurer les instructions avant utilisation.
P261	Éviter de respirer les poussières/ fumées/ gaz/ brouillards/ vapeurs/ aérosols.
P280	Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
P302+P352	EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: laver abondamment à l'eau.
P308+P313	EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée: consulter un médecin.
P362+P364	Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation.

Mentions de danger et conseils de prudence pour MT4:
Le composant dangereux déterminant est xylène.

Avertissement

H226	Liquide et vapeurs inflammables.
H312+H332	Nocif en cas de contact cutané ou d'inhalation.
H315	Provoque une irritation cutanée.
H319	Provoque une sévère irritation des yeux.
H335	Peut irriter les voies respiratoires.
H373	Risque présumé d'effets graves pour les organes à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée.
P210	Tenir à l'écart de la chaleur, des surfaces chaudes, des étincelles, des flammes nues et de toute autre source d'inflammation. Ne pas fumer.
P260	Ne pas respirer les poussières/fumées/gaz/ brouillards/vapeurs/aérosols.
P280	Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
P305+P351+P338	EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.
P337+P313	Si l'irritation oculaire persiste: Consulter un médecin.
P403+P235	Stocker dans un endroit bien ventilé. Tenir au frais.
EUH208	Contient méthacrylate de méthyle. Peut produire une réaction allergique.

Mentions de danger et conseils de prudence pour PD1 :

Le composant dangereux déterminant est le formol.

Danger

H351	Susceptible de provoquer le cancer.
H360FD	Peut nuire à la fertilité. Peut nuire au fœtus.
H373	Risque présumé d'effets graves pour les organes à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée.
P201	Se procurer les instructions spéciales avant utilisation.
P202	Ne pas manipuler avant d'avoir lu et compris toutes les précautions de sécurité.
P260	Ne pas respirer les poussières/ fumées/gaz/ brouillards/ vapeurs/ aérosols.
P280	Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
P308+P313	EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée : consulter un médecin.
P405	Garder sous clef.

7. Restrictions

- Destiné à une utilisation en diagnostic *in vitro*.
- Destiné à un usage professionnel uniquement.
- Pour une utilisation non automatisée uniquement.
- L'interprétation clinique de toute coloration positive, ou de son absence, doit être faite en tenant compte de l'historique clinique du patient, de la morphologie, des autres critères histopathologiques ainsi que des autres tests diagnostiques. Il est de la responsabilité d'un médecin pathologiste/généticien qualifié de se familiariser avec les sondes CISH, les réactifs, les panels de diagnostic et les méthodes utilisées pour produire la préparation colorée. La coloration doit être effectuée dans un laboratoire certifié et autorisé sous la supervision d'un médecin pathologiste/généticien qui est responsable de l'interprétation des lames colorées et de la vérification de l'adéquation des contrôles positifs et négatifs.
- La coloration de l'échantillon, en particulier l'intensité du signal et le bruit de fond, dépend de la manipulation et de la préparation de l'échantillon avant marquage. Une mauvaise fixation, congélation, décongélation, un mauvais lavage, séchage, chauffage, de mauvaises coupes, ou une contamination avec d'autres échantillons ou fluides peut produire des artéfacts et de faux résultats. Des résultats incohérents peuvent résulter des variations des méthodes de fixation et d'inclusion, ainsi que des irrégularités inhérentes à l'échantillon.
- La sonde doit être utilisée uniquement pour la détection du locus décrit au paragraphe 3. « Réactifs fournis ».
- Les performances ont été validées en utilisant les procédures décrites dans ce mode d'emploi. Des modifications de ces procédures peuvent altérer les performances et doivent être validées par l'utilisateur. Ce produit IVD est uniquement certifié CE lorsqu'il est utilisé comme décrit dans ce mode d'emploi dans le cadre de l'utilisation prévue.

8. Substances interférentes

Les fixateurs suivants sont incompatibles avec la ISH :

- Fixateur de Bouin
- Fixateur B5
- Fixateurs acides (par exemple l'acide picrique)
- Fixateur de Zenker
- Alcools (lorsqu'ils sont utilisés seuls)
- Chlorure de mercure
- Fixateur formaldéhyde/zinc
- Fixateur de Hollande
- Formol non tamponné

9. Préparation des échantillons

Recommandations:

- Évitez la contamination croisée des échantillons à toutes les étapes de la préparation, car elle peut entraîner des résultats erronés.
- Fixation dans du formol à 10% tamponné de manière neutre pendant 24 h à température ambiante (18-25°C).
- Taille de l'échantillon ≤ 0.5 cm^3.
- Utiliser de la paraffine de qualité supérieure.
- L'enrobage doit être effectué à des températures inférieures à 65°C.
- Préparer des sections au microtome de 3 à 5 µm.
- Utilisez des lames de microscope à charge positive.
- Fixer les coupes de tissu pendant 2 à 16 h à 50-60°C.

10. Traitement préparatoire du produit

PBS/Tween **(WB4)** doit être préparé selon les instructions de la section 11. "Procédure d'essai". Tous les autres réactifs du kit sont prêts à l'emploi. Mettre la sonde à température ambiante (18 à 25 °C) avant utilisation, à l'abri de la lumière. Avant d'ouvrir le tube, mélanger à l'aide d'un vortexeur et centrifuger brièvement.

11. Protocole

1.1 Jour 1

Étapes préparatoires

(1) *Préparer une série d'éthanol (solutions d'éthanol à 70 %, 90 % et 100 %) :* Diluer l'éthanol à 100 % avec de l'eau déionisée ou distillée. Ces solutions peuvent être stockées dans des récipients appropriés et peuvent être réutilisées.

(2) *Heat Pretreatment Solution EDTA* (**PT2**) *: chauffer à 98°C dans un bocal à coloration couvert.*

(3) *Préparation de 3 % de H_2O_2 :* Diluer 1 partie de 30 % de H_2O_2 dans 9 parties de méthanol à 100 %.

(4) *Sonde ZytoDot CISH :* Amener à température ambiante (RT) avant utilisation.

Prétraitement (déparaffinage / protéolyse)

(1) Incuber les lames pendant 10 minutes à 70°C (par exemple, sur une plaque chauffante).

(2) Incuber les lames pendant 2x 5 min dans du xylène.

(3) Incuber les lames pendant 3x 3 min dans de l'éthanol à 100 %.

(4) Incuber les lames pendant 5 min dans du H_2O_2 à 3 %.

(5) Laver les lames pendant 2x 1 min dans de l'eau déionisée ou distillée.

(6) Incuber pendant 15 minutes dans une solution de Heat Pretreatment Solution EDTA (**PT2**) à 98°C.

Utiliser huit lames par bocal de coloration (ajouter des lames factices si nécessaire).

(7) Transférer immédiatement les lames dans de l'eau déionisée ou distillée et les laver pendant 2x 2 min.

(8) Appliquer (goutte à goutte) la Pepsin Solution (**ES1**) à l'échantillon et incuber pendant 5-15 min à 37°C dans une chambre humide.

***ES1** peut former des précipités qui n'affectent pas la qualité du produit. En règle générale, nous recommandons de déterminer le moment optimal pour la protéolyse lors des tests préliminaires.*

(9) Immerger les lames dans de l'eau déionisée ou distillée.

(10) Déshydratation dans : 70 %, 90 % et 100 % d'éthanol, chacun pendant 1 min.

(11) Séchage à l'air des sections.

Note : Veillez à sécher complètement les sections avant l'application de la sonde.

Dénaturation et hybridation

(1) Pipeter 10 µl de la sonde sur chaque spécimen prétraité

(2) Recouvrir les spécimens d'une lamelle de 22 mm x 22 mm (éviter de piéger des bulles) et sceller la lamelle.

Nous recommandons d'utiliser du ciment caoutchouc (par exemple, Fixogum) pour l'étanchéité.

(3) Placer les lames sur une plaque chauffante ou un hybrideur et dénaturer les spécimens pendant 5 min à 94-95°C.

(4) Transférer les lames dans une chambre humide et les hybrider pendant la nuit à 37°C (par exemple, dans un four d'hybridation).

Il est essentiel que les spécimens ne se dessèchent pas pendant l'étape d'hybridation.

1.2 Jour 2

Étapes préparatoires

(1) *Wash Buffer SSC* (**WB1**) :Pour un lavage rigoureux, chauffer à 80°C dans un bocal à coloration couvert. Le **WB1** peut former des précipités à 2-8°C, qui n'affectent pas la qualité et devraient se dissoudre lorsqu'ils sont chauffés.

(2) *Préparation du Wash Buffer PBS/Tween :* Ajouter 1 comprimé de PBS/Tween (**WB4**) à 1000 ml d'eau déionisée ou distillée et dissoudre.

(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**) : Amener à température ambiante avant utilisation.

Post-hybridation et détection

(1) Enlevez avec précaution le ciment ou la colle à base de caoutchouc.

(2) Retirez la lamelle de protection en immergeant les lames dans le Wash Buffer SSC (**WB1**) à température ambiante pendant 5 minutes.

Le WB1 peut être réutilisé une fois. Conserver à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant une semaine au maximum.

(3) Laver les lames pendant 5 minutes dans le Wash Buffer SSC (**WB1**) à 80°C.

Utiliser huit lames par bocal de coloration (ajouter des lames factices si nécessaire).

(4) Laver les lames pendant 2x 1 min dans de l'eau déionisée ou distillée.

(5) Immerger les lames dans du PBS/Tween.

(6) Appliquer la Blocking Solution (**BS1**) (1-2 gouttes par lame) sur les lames et incuber pendant 10 min à la température ambiante.

(7) Tamponner la Blocking Solution (**BS1**), mais ne pas rincer !

(8) Appliquez la Mouse-Anti-DIG (**AB1**) (1-2 gouttes par lame) sur les lames et incubez pendant 30 minutes à température ambiante.

(9) Laver les lames 3x 1 min dans la PBS/Tween.

(10) Appliquer un Anti-Mouse-HRP-Polymer (**AB2**) (1-2 gouttes par lame) sur les lames et incuber pendant 30 minutes à température ambiante.

(11) Laver les lames 3x 1 min dans du PBS/Tween.

(12) Préparer la solution DAB (solution de travail) : remplir 1 ml de DAB Solution B (**SB1b**) dans une tasse graduée et ajouter une goutte (30 µl) de DAB Solution A (**SB1a**). Bien mélanger.

(13) Appliquer la solution DAB (1 à 2 gouttes par lame) sur les lames et incuber pendant 30 minutes à température ambiante.

(14) Transférer les lames dans un bocal à coloration et les laver 2 min sous l'eau froide du robinet.

(15) Contre-colorer les échantillons pendant 5 à 10 secondes avec la Mayer's Hematoxylin Solution (**CS1**).

(16) Transférer les lames dans un bocal à coloration et laver 2 minutes sous l'eau courante froide.

(17) Déshydratation dans : 70 %, 90 % et 100 % d'éthanol, chacun pendant 1 min.

(18) Incuber les lames pendant 2x 2 min dans du xylène (utiliser du xylène très pur).

(19) En évitant d'emprisonner des bulles, couvrir les échantillons avec une lamelle (22 mm x 22 mm ; 24 mm x 32 mm) en utilisant la Mounting Solution (alcoholic) (**MT4**). Attendez 20 à 30 minutes pour que la lamelle soit immobilisée.

L'utilisation d'une pointe de pipette coupée pour augmenter la taille de l'ouverture peut faciliter le processus de pipetage.

(20) Évaluer les échantillons colorés en utilisant la microscopie optique.

12. Interprétation des résultats

Avec le *Zyto*Dot CISH Implementation Kit, les signaux d'hybridation des polynucléotides marqués à la digoxigénine apparaissent de couleur marron à marron foncé (région du gène ERBB2).

Situation normale : Dans les interphases de cellules normales ou de cellules sans amplification impliquant la région du gène ERBB2, deux signaux bruns distincts en forme de points apparaissent (Voir figure 2).

Situation aberrante : Dans les cellules présentant une amplification de la région du gène ERBB2 ou une polysomie du chromosome 17, on observe un nombre accru de signaux bruns ou de grappes de signaux bruns (Voir figure 2).

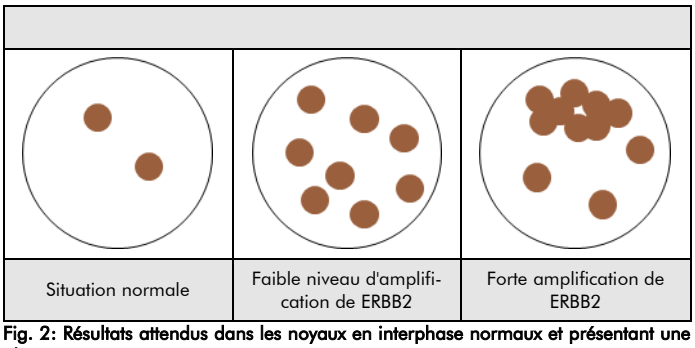

Fig. 2: Résultats attendus dans les noyaux en interphase normaux et présentant une aberration

D'autres modèles de signaux que ceux décrits ci-dessus peuvent être observés dans certains échantillons anormaux. Ces signaux inattendus doivent être examinés de manière plus approfondie.

Veuillez noter :

- En raison de la chromatine décondensée, les signaux CISH individuels peuvent apparaître sous forme de petits groupes de signaux. Ainsi, deux ou trois signaux de même taille, séparés par une distance ≤ 1 diamètre de signal, doivent être comptés comme un seul signal.
- Avant le dénombrement des signaux, l'échantillon doit être scanné pour détecter toute hétérogénéité intratumorale éventuelle à un grossissement de 100 à 200 fois.
- La visualisation des signaux doit être effectuée avec un grossissement d'au moins 400 à 630 fois, ce qui permet d'obtenir des signaux facilement visibles.
- Ne pas évaluer les zones de nécrose, les noyaux chevauchants, les noyaux surdigérés et les noyaux à faible intensité de signal.
- En raison de la mitose, des signaux supplémentaires peuvent être visibles même dans un faible pourcentage de cellules non néoplasiques. Parfois, des noyaux avec des signaux manquants peuvent être observés dans des spécimens enrobés de paraffine en raison d'artefacts de coupe.
- Un résultat négatif ou non spécifique peut être causé par de multiples facteurs (voir chapitre 16 "Assistance").
- Afin d'interpréter correctement les résultats, l'utilisateur doit valider ce produit avant de l'utiliser dans des procédures de diagnostic conformément aux directives nationales et/ou internationales.

13. Procédures de contrôle qualité recommandées

Afin de surveiller les performances correctes des spécimens traités et des réactifs d'essai, chaque dosage doit être accompagné de contrôles internes et externes. Si les contrôles internes et / ou externes n'indiquent pas une coloration appropriée, les résultats avec les échantillons de patients doivent être considérés comme invalides.

Contrôle interne : Cellules non néoplasiques dans l'échantillon qui présentent un motif de signal normal, par exemple des fibroblastes.

Contrôle externe : Echantillons contrôles négatifs et positifs validés.

14. Caractéristiques de performances

14.1 Performance analytique

La performance de la sonde a été déterminée par comparaison avec la sonde FISH correspondante approuvée par le DIV.

Sensibilité analytique:	100% (95% CI 98.5 – 100.0)
Spécificité analytique:	100% (95% CI 97.0 – 100.0)

14.2 Performance clinique

Sensibilité diagnostique:	100% (95% CI 83.2 – 100.0) vs. FISH, CISH
Spécificité diagnostique:	100% (95% CI 83.2 – 100.0) vs. FISH, CISH

15. Elimination

L'élimination des réactifs doit être effectuée conformément à la réglementation locale.

16. Assistance

Tout écart par rapport au mode d'emploi peut conduire à des résultats de coloration inférieurs ou à aucune coloration du tout. Veuillez consulter le site www.zytovision.com pour plus d'informations.

Faible signal ou aucun signal

Cause possible	Action
Le prétraitement protéolytique n'est pas effectué correctement	Optimiser le temps d'incubation de la pepsine, l'augmenter ou le diminuer si nécessaire
Evaporation de la sonde	Lors de l'utilisation d'un système d'hybridation, l'utilisation des bandes humides/réservoirs remplis d'eau est obligatoire. Lors de l'utilisation d'un four à hybridation, il faut utiliser une chambre humide. En outre, la lamelle doit être complètement scellée, par exemple avec du Fixogum, afin d'empêcher le séchage de l'échantillon lors de l'hybridation
Préparation insuffisante des substrats chromogènes	Au lieu d'utiliser une goutte de DAB Solution A, utilisez 30 µl
Temps de contre coloration trop long	Évitez la contre-coloration sombre, car elle peut masquer les signaux de coloration positive
Le bleuissement de la contre-coloration n'a pas été effectué correctement	Utilisez l'eau courante froide du robinet ; n'utilisez pas d'eau chaude ou tiède, ni de réactifs

Des signaux trop forts

Cause possible	Action
Prétraitement protéolytique effectué trop longtemps	Optimiser le temps d'incubation de la pepsine, l'augmenter ou le diminuer si nécessaire
La réaction du substrat est trop intense	Réduire le temps d'incubation du substrat ; ne pas chauffer la solution de substrat à plus de 25°C ; incuber à température ambiante uniquement

Les signaux s'estompent ou fusionnent

Cause possible	Action
Une solution de montage inadaptée a été utilisée	Utilisez uniquement la solution de montage fournie avec le kit ou des solutions de montage à base de xylène exemptes de toute impureté ; n'utilisez pas de ruban adhésif pour couvre-objet

Coloration inégale ou, dans certaines parties, très légère

Cause possible	Action
Déparaffinage incomplet	Utiliser des solutions fraîches ; vérifier la durée des temps de déparaffinage
Volume de réactifs trop faible	Veiller à ce que le volume du réactif soit suffisamment important pour couvrir la zone du tissu

Des résultats incohérents

Cause possible	Action
Séchage insuffisant avant l'application de la sonde	Prolonger le séchage à l'air libre
Trop d'eau/tampon de lavage sur les tissus avant l'application de pepsine, d'anticorps et/ou de substrats colorés	Veillez à ce que l'excès de liquide soit retiré de la section de tissu en l'essuyant ou en le secouant sur la lame. De petites quantités d'eau résiduelle/tampon de lavage n'interfèrent pas avec l'essai
Variations des méthodes de fixation et d'incrustation des tissus	Optimiser les méthodes de fixation et d'encastrement
Variations de l'épaisseur de la coupe de tissu	Optimiser le découpage en sections

Morphologie détériorée

Cause possible	Action
L'échantillon de cellule ou de tissu n'a pas été correctement fixé	Optimiser le temps de fixation et le fixateur
Prétraitement protéolytique effectué trop longtemps	Réduire le temps d'incubation de la pepsine

Signaux d'hybridation croisée ; bruit de fond

Cause possible	Action
Sections desséchées à tout moment pendant ou après l'hybridation	Éviter que les sections ne s'assèchent ; utiliser une chambre d'humidité ; sceller correctement les couvercles
Temps d'incubation prolongé du substrat	Réduire la durée d'incubation du substrat
Déparaffinage incomplet	Utiliser des solutions fraîches ; vérifier la durée du déparaffinage
Prétraitement protéolytique trop fort	Optimiser le temps d'incubation de la pepsine
Lames refroidies à température ambiante avant l'hybridation	Transférer rapidement les lames à la température d'hybridation

Noyaux chevauchants

Cause possible	Action
Épaisseur inappropriée des coupes de tissus	Préparer des sections de microtome de 3 à 5 µm

Echantillon glissant sur la lame

Cause possible	Action
Prétraitement protéolytique trop fort	Réduire le temps d'incubation de la pepsine

17. Bibliographie

- 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. Revision

www.zytovision.com

Veuillez consulter le site www.zytovision.com pour obtenir le mode d'emploi le plus récent ainsi que des instructions d'utilisation dans différentes langues.

Nos experts sont disponibles pour répondre à vos questions.
Merci de nous contacter à helptech@zytovision.com
Pour le résumé de la sécurité et des performances, veuillez vous référer www.zytovision.com.

ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/Allemagne
Téléphone : +49 471 4832-300
Fax : +49 471 4832-509
www.zytovision.com
Courriel : info@zytovision.com

Marques déposées :
ZytoVision® et Zyto*Dot* ® sont des marques déposées de ZytoVision GmbH.