



ZytoDot
SPEC ERBB2 Probe Kit

REF C-3003-40



Az emberi ERBB2 gén amplifikációinak minőségi kimutatására kromogén *in situ* hibridizációval (CISH)

4250380N297W



In vitro diagnosztikai orvostechnikai eszköz
az IVDR (EU) 2017/746 szerint

1. Rendeltetészerű cél

A ZytoDot SPEC ERBB2 Probe Kit a humán ERBB2 gént érintő amplifikációk minőségi kimutatására szolgál formalinban rögzített, paraffinba ágyazott mintákban, például emlőrákban, kromogén *in situ* hibridizációval (CISH).

A termék kizárólag professzionális használatra készült. A termékkel végzett valamennyi vizsgálatot minősített, engedéllyel rendelkező anatómiai patológiai laboratóriumban, patológus/humángenetikus felügyelete mellett, szakképzett személyzetnek kell elvégeznie.

A próba az emlőrák differenciáldiagnózisának segédeszközeként szolgál, és terápiás intézkedéseket nem szabad kizárólag a teszteredmény alapján kezdeményezni.

2. A vizsgálat elve

A kromogén *in situ* hibridizációs (CISH) technika lehetővé teszi specifikus nukleinsav-szekvenciák kimutatását és vizualizálását sejtkészítményekben. Hapten-jelölt nukleotidfragmentumok, úgynevezett CISH-szondák és a preparátumokban lévő komplementer célszekvenciák együttesen denaturálódnak, majd a hibridizáció során hagyják, hogy egymáshoz kapcsolódjanak. Ezt követően a nem specifikus és nem kötött szondafragmentumokat szigorú mosási lépésekkel távolítják el. A jelölt szonda duplexképződése elsődleges (nem jelölt) antitestekkel láthatóvá tehető, amelyeket másodlagos polimerizált enzimkonjugált antitestekkel detektálunk. Az enzimatis reakció kromogén szubsztátokkal színes csapadékok képződéséhez vezet. A sejtmag nukleáris festékekkel történő ellenfestése után a hibridizált szondafragmentumok fénymikroszkópiával láthatóvá válnak.

3. Rendelkezésre bocsátott reagensek

A ZytoDot SPEC ERBB2 Probe Kit egy méretben kapható, és a következőkből áll:

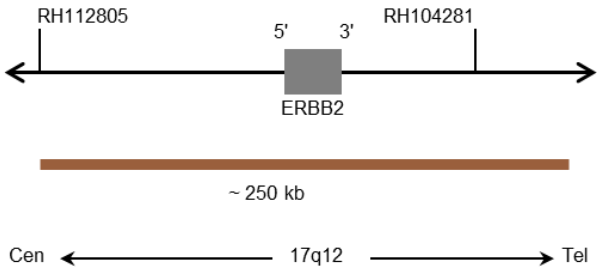
Kód:	Komponens	Mennyiség	Konténer
		Σ 40	
PT2	Heat Pretreatment Solution EDTA	500 ml	Csavaros kupakos üveg (nagy)
ES1	Pepsin Solution	4 ml	Cseppentős üveg, fehér kupakkal
PD1	ZytoDot SPEC ERBB2 Probe	0.4 ml	Reakcióedény, barna fedéllel
WB1	Wash Buffer SSC	560 ml	Csavaros kupakos üveg (nagy)
WB4	PBS/Tween	2x	Alumínium csomag
BS1	Blocking Solution	4 ml	Cseppentős üveg, narancssárga kupakkal
AB1	Mouse Anti-Dig	4 ml	Cseppentős üveg, rózsaszín kupakkal
AB2	Anti-Mouse-HRP-Polymer	4 ml	Cseppentős üveg, lila kupakkal
SB1a	DAB Solution A	0.3 ml	Cseppentős üveg, zöld kupakkal
SB1b	DAB Solution B	10 ml	Cseppentős üveg, szürke kupakkal
CS1	Mayer's Hematoxylin Solution	20 ml	Csavaros kupakos üveg, fekete
MT4	Mounting Solution (alcoholic)	4 ml	Üvegpalack, barna
	Használati utasítás	1	

C-3003-40 (40 vizsgálat): PD1, ES1, BS1, AB1, AB2, SB1a-b, CS1, és MT4 összetevők 40 reakcióhoz elegendők. A **PT2** komponens 7 darab, egyenként 70 ml-es festőedényhez elegendő. A **WB1** komponens 8 darab, egyenként 70 ml-es festőedényhez elegendő. A **WB4** komponens 28 darab, egyenként 70 ml-es festőedényhez elegendő.

A ZytoDot SPEC ERBB2 Probe a következőkből áll:

- Digoxigeninnel jelölt polinukleotidok (~1,8 ng/ μ l), amelyek a 17q12* (chr17:37,725,661-37,973,541), az ERBB2 gén régióját rejtő szekvenciákat célozzák (lásd az 1. ábrát).
- Formamid alapú hibridizációs puffer

*a Human Genome Assembly szerint GRCh37/hg19



1. ábra: SPEC ERBB2 (nem méretarányos)

4. Szükséges, de nem biztosított anyagok

- Pozitív és negatív kontrollminták
- Mikroszkópos tárgylemez, pozitív töltésű
- Vízfürdő (80 °C, 98 °C)
- Hibridizáló vagy főzőlap
- Hibridizáló vagy pára kamra a hibridizációs kemencében
- Állítható pipetták (10 μ l, 1000 μ l)
- Festőedények vagy fürdők
- Időzítő
- Kalibrált hőmérő
- Etanol vagy reagens alkohol
- Xilol
- Metanol 100%
- Hidrogén-peroxid (H₂O₂) 30%
- Deionizált vagy desztillált víz
- fedőlemezek (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)

- Gumicement, pl. Fixogum Rubber Cement (Prod. No. E-4005-50/-125) vagy hasonló.
- Megfelelően karbantartott fénymikroszkóp (400-630x)

5. Tárolás és kezelés

2-8 °C-on, függőleges helyzetben tárolja. Használat után azonnal állítsa vissza a tárolási körülmények közé. Ne használja fel a reagenseket a címkén feltüntetett lejárati időn túl. A termék a címkén feltüntetett lejárati dátumig stabil, ha megfelelően kezelik.

6. Figyelmeztetések és óvintézkedések

- Használat előtt olvassa el a használati utasítást!
- Ne használja fel a reagenseket a lejárati idő lejárta után!
- Ez a termék (kis koncentrációban és mennyiségben) egészségre káros és potenciálisan fertőző anyagokat tartalmaz. Kerülje a reagensekkel való közvetlen érintkezést. Tegyén megfelelő védőintézkedéseket (használon eldobható kesztyűt, védőszemüveget és laboratóriumi ruházatot)!
- A termékkel kapcsolatban bekövetkezett minden súlyos eseményt jelentsen a gyártónak és a helyi előírásoknak megfelelően az illetékes hatóságoknak!
- Ha a reagensek bőrrel érintkeznek, azonnal öblítse le a bőrt bőseges mennyiségű vízzel!
- A professzionális felhasználók számára kérésre biztonsági adatlap áll rendelkezésre.
- Ne használja újra a reagenseket, kivéve, ha az újrafelhasználás kifejezetten engedélyezett!
- Kerülje a minták keresztszennyeződését, mivel ez hibás eredményekhez vezethet.
- A minták nem száradhatnak meg a hibridizációs és mosási lépések alatt.

Az ES1 speciális címkézése:

- EUH208 pepsin A-t tartalmaz. Allergiás reakciót válthat ki.
EUH210 Kérésre biztonsági adatlap kapható..

Veszély- és óvintézkedési nyilatkozatok az CS1 és WB4 esetében:

Ez a próba az 1272/2008/EK rendelet szerint nem minősül veszélyesnek.

Veszély- és óvintézkedési nyilatkozatok az BS1, AB1, AB2, PT2, és WB1 esetében:

A veszélyt meghatározó komponens a reakciótermék: EK-szám: 247-500-7] és 2-metil-2H-izotiazol-3-on [EK-szám: 220-239-6] (3:1).



Figyelem

- H317 Allergiás bőrreakciót válthat ki.
P261 Kerülje a por/füst/gáz/köd/gőzök/permet belélegzését.
P272 Szennyezett munkaruhát tilos kivinni a munkahely területéről.
P280 Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő/hallásvédelem/... használata kötelező.
P302+P352 HA BŐRRE KERÜL: Lemosás bő vízzel
P333+P313 Bőrirritáció vagy kiütések megjelenése esetén: orvosi ellátást kell kérni.
P362+P364 A szennyezett ruhadarabot le kell vetni és újbóli használat előtt ki kell mosni.

Veszély- és óvintézkedési nyilatkozatok az SB1a-re vonatkozóan:

A veszélyt meghatározó komponens a bifenil3-,3',4,4,4'-tetraaitetraamin; diaminobenzidín.



Veszély

- H350 Rákot okozhat.
P201 Használat előtt ismerje meg az anyagra vonatkozó különleges utasításokat.
P202 Ne használja addig, amíg az összes biztonsági óvintézkedést el nem olvasta és meg nem értette.
P280 Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő/hallásvédelem/... használata kötelező.
P308+P313 Expozíció vagy annak gyanúja esetén: orvosi ellátást kell kérni.
P405 Elzárva tárolandó.

Veszély- és óvintézkedési nyilatkozatok az SB1b-re vonatkozóan:

A veszélyt meghatározó összetevő az imidazol;
a reakciótermék: 247-500-7] és 2-metil-2H-izotiazol-3-on [EK-szám: 220-239-6] (3:1):



Veszély

- H317 Allergiás bőrreakciót válthat ki.
H360D Károsíthatja a születendő gyermeket.
P201 Használat előtt ismerje meg az anyagra vonatkozó különleges utasításokat.
P261 Kerülje a por/füst/gáz/köd/gőzök/permet belélegzését.
P280 Viseljen védőkesztyűt/védő ruházatot/szemvédőt/arcvédőt.
P302+P352 HA BŐRRE KERÜL: Lemosás bő vízzel/.....
P308+P313 Expozíció vagy annak gyanúja esetén: orvosi ellátást kell kérni.
P362+P364 A szennyezett ruhadarabot le kell vetni és újbóli használat előtt ki kell mosni.

Veszély- és óvintézkedési nyilatkozatok az MT4-re vonatkozóan:

A veszélyt meghatározó összetevő a xilol.



Figyelem

- H226 Tűzveszélyes folyadék és gőz.
H312+H332 Bőrrel érintkezve vagy belélegezve ártalmas
H315 Bőrirritáló hatású.
H319 Súlyos szemirritációt okoz.
H335 Légúti irritációt okozhat.
H373 Ismétlődő vagy hosszabb expozíció esetén károsíthatja a szerveket.
P210 Hőtől, forró felületektől, szikrától, nyílt lángtól és más gyújtóforrástól távol tartandó. Tilos a dohányzás.
P260 A por/füst/gáz/köd/gőzök/permet belélegzése tilos.
P280 Védőkesztyű/védőruha és szemvédő/arcvédő használata kötelező.
P305+P351+P338 SZEMBE KERÜLÉS ESETÉN: Több percig tartó óvatos öblítés vízzel. Adott esetben a kontaktlencsék eltávolítása, ha könnyen megoldható. Az öblítés folytatása.
P337+P313 Ha a szemirritáció nem múlik el: orvosi ellátást kell kérni.
P403+P235 Jól szellőző helyen tárolandó. Hűvös helyen tartandó.
EUH208 Metil-metakrilát; Metil 2-metilprop-2-enoát; Metil 2-metilpropenoát, Butil-metakrilát-t tartalmaz. Allergiás reakciót válthat ki.

Veszély- és óvintézkedési nyilatkozatok az PD1-re vonatkozóan:

A veszélyt meghatározó komponens a formamid.

**Veszély**

H351	Feltehetően rákot okoz.
H360FD	Károsíthatja a termékenységet. Károsíthatja a magzatot.
H373	Hosszan tartó vagy ismételt expozíció esetén szervi károsodást okozhat.
P201	Használat előtt kérje be a speciális utasításokat.
P202	Ne kezelje, amíg az összes biztonsági óvintézkedést el nem olvasta és meg nem értette.
P260	Ne lélegezze be a port/füstöt/gázt/ködöt/gőzt/permetet.
P280	Viseljen védőkesztyűt/védő ruházatot/szemvédőt/arcvédőt.
P308+P313	HA ki van téve vagy érintett: Kérjen orvosi tanácsot/megfigyelést.
P405	Elzárva tárolandó.

7. Korlátozások

- *In vitro* diagnosztikai felhasználásra.
- Kizárólag professzionális használatra.
- Kizárólag nem automatizált használatra.
- A pozitív festődés klinikai értelmezését vagy annak hiányát a klinikai anamnézis, a morfológia, az egyéb szövettani kritériumok, valamint az egyéb diagnosztikai vizsgálatok összefüggésében kell elvégezni. A szakképzett patológus/humángenetikus felelőssége, hogy ismerje a CISH-szondákat, a reagenseket, a diagnosztikai paneleket és a festett preparátum előállításához használt módszereket. A festést minősített, engedélyezett laboratóriumban kell elvégezni, patológus/humángenetikus felügyelete mellett, aki felelős a festett tárgylemezek felülvizsgálatáért és a pozitív és negatív kontrollok megfelelőségének biztosításáért.
- A minták festése, különösen a jelintenzitás és a háttérfestés, függ a minta festést megelőző kezelésétől és feldolgozásától. A nem megfelelő fixálás, fagyasztás, felolvasztás, mosás, szárítás, melegítés, szeletelés vagy más mintákkal vagy folyadékokkal való szennyeződés artefaktumokat vagy hamis eredményeket eredményezhet. Az inkonzisztens eredmények a fixálási és beágyazási módszerek eltéréseiből, valamint a mintában rejlő szabálytalanságokból adódhatnak.
- A szonda csak a 3. fejezetben leírt lókuszkok kimutatására használható. "Reagensek".
- A teljesítményt a jelen használati utasításban leírt eljárásokkal validálták. Ezen eljárások módosítása megváltoztathatja a teljesítményt, és azt a felhasználónak kell hitelesítenie. Ez az IVD csak akkor rendelkezik CE tanúsítvánnyal, ha az ebben a használati utasításban leírtak szerint, a rendeltetésszerű használat körében használják.

8. Interferenciát kiváltó anyagok

A következő fixálószer nem kompatibilisek az ISH-val:

- Bouin-fixálás
- B5 fixáló
- savas fixálószer (pl. pikrinsav)
- Zenker-fixáló
- Alkoholak (önmagukban használva)
- Higany-klorid
- Formaldehid/cink fixáló
- Hollande fixáló
- Nem pufferelt formalin

9. A minták előkészítése

Ajánlások:

- Kerülje a minták keresztszennyeződését, mivel ez hibás eredményekhez vezethet.
- Fixálás 10% semlegesen pufferelt formalinban 24 órán keresztül szobahőmérsékleten (RT, 18°C-25°C).
- Mintaméret $\leq 0,5 \text{ cm}^3$.
- Használjon prémium minőségű paraffint.
- A beágyazást 65 °C-nál alacsonyabb hőmérsékleten kell végezni.
- Készítsen 3-5 μm -es mikrotomos metszeteket.
- Használjon pozitív töltésű tárgylemezeket.
- Fixáljuk a szövetszelvényeket 2-16 órán át 50-60 °C-on.

10. A készülék előkészítő kezelése

A PBS/Tween (WB4) előkezelést a 11. pontban leírtak szerint kell elvégezni. „Assay procedure” (Vizsgálati eljárás). Az összes többi reagens készlet felhasználásra kész. Nincs szükség rekonstitúcióra, keverésre vagy hígításra.

Használat előtt a szondát szobahőmérsékletre (18-25 °C) kell hozni, fénytől óvni kell. Az injekciós üveg felnyitása előtt vortexeléssel keverje össze, és rövid ideig forgassa le.

11. Vizsgálati eljárás**11.1 1. nap****Előkészítő lépések**

- (1) *Készítsünk etanol-sorozatot (70%-os, 90%-os és 100%-os etanolos oldatok): Hígítsuk fel a 100%-os etanolt ionmentesített vagy desztillált vízzel. Ezek az oldatok megfelelő tartályokban tárolhatók és újra felhasználhatók.*
- (2) Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2): Melegítse 98 °C-ra egy lefedett festőedénybe.
- (3) *3%-os H₂O₂ előkészítése: Hígítson fel 1 rész 30% H₂O₂-t 9 rész 100%-os metanolban..*
- (4) *ZytoDot CISH szonda: Használat előtt hozza szobahőmérsékletre..*

Pretreatment (dewax/proteolysis)

- (1) Inkubáljuk a tárgylemezeket 10 percig 70°C-on (pl. forró lemezen).
- (2) Inkubáljuk a tárgylemezeket 2x 5 percig xilolban.
- (3) Inkubáljuk a tárgylemezeket 3x 3 percig 100%-os etanolban.
- (4) Inkubáljuk a tárgylemezeket 5 percig 3%-os H₂O₂-ben..
- (5) Mossuk a tárgylemezeket 2x 1 percig deionizált vagy desztillált vízben.
- (6) Inkubáljuk 15 percig 98°C-on előmelegített Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2) -ban.

Használjon nyolc tárgylemezt festőedényenként (szükség esetén adjon hozzá műlemezeket).

- (7) Azonnal helyezze át a tárgylemezeket deionizált vagy desztillált vízbe, és mossa 2x 2 percig.
- (8) Vigyen fel (cseppenként) Pepsin Solution (ES1) a mintára, és inkubálja 5-15 percig 37°C-on, pára kamrában.

*Az **ES1** csapadékot képezhet, amely nem befolyásolja a minőséget. Általános szabályként javasoljuk, hogy a proteolízis optimális idejét elővizsgálatokban állapítsa meg.*

- (9) Merítse a tárgylemezeket deionizált vagy desztillált vízbe.
- (10) Dehidratálás in: 70%-os, 90%-os és 100%-os etanolban, egyenként 1 percig.
- (11) Légszárítás a metszeteken.

Megjegyzés: Ügyeljen arra, hogy a szondák felhelyezése előtt a metszetek teljesen megszáradjanak.

Denaturáció és hibridizáció

- (1) Pipetázzon 10 μl ZytoDot CISH Probe-t minden előkezelt mintára.
- (2) Fedje le a mintákat egy 22 mm x 22 mm-es fedőlappal (kerülje a beszorult buborékokat), és zárja le a fedőlapot.

A lezáráshoz gumicement (pl. Fixogum) használatát javasoljuk.

- (3) Helyezze a tárgylemezeket forró lemezre vagy hibridizátorra, és denaturálja a mintákat 5 percig 94-95 °C-on.
- (4) Vigye át a tárgylemezeket egy pára kamrába, és hibridizáljon egy éjszakán át 37°C-on (pl. hibridizációs kemencében)).

Lényeges, hogy a minták ne száradjanak ki a hibridizációs lépés során.

11.2 2. nap

Előkészítő lépések

- (1) Wash Buffer SSC (WB1): A szigorított mosáshoz melegítse 80 °C-ra egy lefedett festőedényben. A **WB1** 2-8°C-on csapadékat képezhet, amely nem befolyásolja a minőséget, és melegítéskor fel kell oldódnia.
- (2) A Wash Buffer PBS/Tween mosópuffer elkészítése: Adjon 1 tablettát PBS/Tween (WB4) 1000 ml deionizált vagy desztillált vízhez, és oldja fel.

A Wash Buffer PBS/Tween 2-8°C-on tárolva egy hétig stabil.

- (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): Használat előtt hozza szobahőmérsékletre.

Hibridizálás és detektálás

- (1) Óvatosan távolítsa el a gumicementet vagy a ragasztót.
- (2) Távolítsa el a fedőlemezt úgy, hogy a tárgylemezeket 5 percre szobahőmérsékleten Wash Buffer SSC (WB1) mosópufferbe meríti.

A **WB1** egyszer újra felhasználható. Tárolja 2-8 °C-on legfeljebb egy hétig.

- (3) Mossuk a tárgylemezeket 5 percig 80°C-on Wash Buffer SSC (WB1) mosópufferben.

Használjon nyolc tárgylemezt festőedényenként (szükség esetén adjon hozzá műtárgylemezeket).

- (4) Mossuk a tárgylemezeket 2x 1 percig deionizált vagy desztillált vízben.
- (5) Merítse a tárgylemezeket Wash Buffer PBS/Tween pufferbe.
- (6) Vigyen fel Blocking Solution (BS1) (1-2 cseppet tárgylemezenként) a tárgylemezekre, és inkubálja 10 percig szobahőmérsékleten.
- (7) Blotolja le a Blocking Solution (BS1), **de ne öblítse le!**
- (8) Vigyen fel Mouse-Anti-DIG (AB1) (1-2 cseppet tárgylemezenként) a tárgylemezekre, és inkubálja 30 percig szobahőmérsékleten.
- (9) Mossuk a tárgylemezeket 3x 1 percig PBS/Tween.
- (10) Vigyen fel Anti-Mouse-HRP-Polymer (AB2) (1-2 cseppet tárgylemezenként) a tárgylemezekre, és inkubálja 30 percig szobahőmérsékleten.
- (11) Mossuk a tárgylemezeket 3x 1 percig PBS/Tween.
- (12) Készítsünk DAB Solution (munkaoldat): töltsünk 1 ml DAB Solution B (SB1b) oldatot egy mérőpohárba, és adjunk hozzá egy csepp (30 µl) DAB Solution A (SB1a) oldatot. Jól keverjük össze.
- (13) Vigyen fel DAB Solution (1-2 cseppet tárgylemezenként) a tárgylemezekre, és inkubálja 30 percig szobahőmérsékleten.
- (14) Helyezze át a tárgylemezeket festőedénybe, és mossa le 2 percig hideg folyó csapvíz alatt.
- (15) Ellenfestjük a mintákat 5-10 másodpercig Mayer's Hematoxylin Solution (CS1) oldattal.
- (16) Helyezze át a tárgylemezeket festőedénybe, és mosson 2 percig hideg folyó csapvíz alatt.
- (17) Dehidratálás a következőben: 70%-os, 90%-os és 100%-os etanolban, egyenként 1 percig.
- (18) Inkubáljuk a tárgylemezeket 2x 2 percig xilolban (használjunk nagyon tiszta xilolt).
- (19) A beszorult buborékok elkerülése mellett fedőlemezrel (22 mm x 22 mm; 24 mm x 32 mm) fedjük le a mintákat a Mounting Solution (alcoholic) (MT4) használatával. Hagyjon 20-30 percet, amíg a fedőlap immobilizálódik.

A pipettázás megkönnyíthető egy olyan pipettahegy használatával, amelyet a nyílás méretének növelése érdekében levágtak.

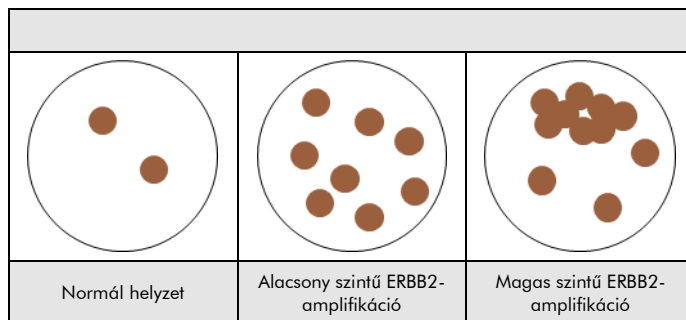
- (20) Értékelje a festett mintákat fénymikroszkópiával.

12. Az eredmények értelmezése

A ZytoDot CISH Implementation Kit használatával a digoxigeninnel jelölt polinukleotidok hibridizációs jelei barnától sötétbarnaig terjedő színben jelennek meg (ERBB2 gén régió).

Normál jelrendszer: A normális sejtek vagy az ERBB2 gén régióját érintő amplifikáció nélküli sejtek interfázisaiban két különálló, pont alakú barna jel jelenik meg (lásd a 2. ábrát).

Rendellenes jelrendszer: Az ERBB2 gén régiójának amplifikációjával vagy a 17-es kromoszóma poliszómiájával rendelkező sejtekben a barna jel vagy barna jel klaszterek számának növekedése figyelhető meg (lásd a 2. ábrát).



2. ábra: Várható eredmények normális és rendellenes sejtmagok esetén

Egyes rendellenes mintákban a fent leírtaktól eltérő jelminták is megfigyelhetők. Ezeket a váratlan jelmintákat tovább kell vizsgálni.

Kérjük, vegye figyelembe:

- A dekonzenzált kromatin miatt az egyes CISH-jelek kis jelhalmozokként jelenhetnek meg. Ezért két vagy három azonos méretű, ≤ 1 jelátmérővel elválasztott jelet egy jelnek kell tekinteni.
- A jelek megszámlálása előtt a mintát 100-200-szoros nagyítással meg kell vizsgálni az esetleges tumoron belüli heterogenitás szempontjából.
- A jelek vizualizálását legalább 400-630-szoros nagyítással kell elvégezni, ami könnyen látható jeleket eredményez.
- Ne értékelje a nekrotizált területeket, az átfedő magokat, a túlságosan megemésztett magokat és a gyenge jelintenzitású magokat.
- A mitózis miatt további jelek lehetnek láthatóak még a nem neoplasztikus sejtek kis százalékában is. Esetenként a paraffinba ágyazott mintákban a vágási műtermékek miatt hiányzó jelekkel rendelkező sejtmagok figyelhetők meg.
- A negatív vagy nem specifikus eredményt több tényező is okozhatja (lásd a 16. fejezet "Hibaelhárítás" című részét).
- Az eredmények helyes értelmezése érdekében a felhasználónak a nemzeti és/vagy nemzetközi irányelveknek megfelelően validálnia kell a terméket a diagnosztikai eljárásokban való felhasználás előtt.

13. Ajánlott minőségellenőrzési eljárások

A feldolgozott minták és a vizsgálati reagensek megfelelő teljesítményének ellenőrzése érdekében minden egyes vizsgálathoz belső és külső kontrollokat kell rendelni. Ha a belső és/vagy külső kontrollok nem mutatnak megfelelő festődést, a betegmintákkal kapott eredményeket érvénytelennek kell tekinteni.

Belső ellenőrzés: Nem neoplasztikus sejtek a mintán belül, amelyek normális jelmintázatot mutatnak, pl. fibroblasztok.

Külső vezérlés: Validált pozitív és negatív kontrollminták.

14. Teljesítményjellemzők

14.1 Analitikai teljesítmény

A próba teljesítményét a megfelelő IVD által jóváhagyott FISH-szondával való összehasonlítással határozták meg.

Analitikai érzékenység:	100% (95% CI 98.5 – 100.0)
Analitikai specifikusság:	100% (95% CI 97.0 – 100.0)

14.2 Klinikai teljesítmény

Diagnosztikai érzékenység:	100% (95% CI 83.2 – 100.0) vs. FISH, CISH
Diagnosztikai specifitás:	100% (95% CI 83.2 – 100.0) vs. FISH, CISH

15. Eltávolítás

A reagensek ártalmatlanítását a helyi előírásoknak megfelelően kell elvégezni.

16. Hibaelhárítás

A kezelési utasításoktól való bármilyen eltérés rosszabb festési eredményhez vagy egyáltalán nem festéshez vezethet. További információkért kérjük, olvassa el a www.zytovision.com/honlapot.

Gyenge jelek vagy egyáltalán nincs jel

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Nem megfelelően végzett proteolitikus előkezelés	Optimalizálja a pepszin inkubációs idejét, szükség esetén növelje vagy csökkentse azt.
Szonda párolgás	A hibridizáló használata esetén a nedves csíkok/vízzel töltött tartályok használata kötelező. Hibridizáló kemence használata esetén a párákamra használata kötelező. Ezenkívül a fedőlemezt teljesen le kell zárni, pl. Fixogummal, hogy megakadályozzuk a minta kiszáradását a hibridizáció során.
A kromogén szubsztrát nem megfelelő előkészítése	Egy csepp DAB A oldat helyett használjunk 30 µl-t.
Túl hosszú az ellenfestési idő	Kerülje a sötét ellenfestést, mert az elfedheti a pozitív festési jeleket.
Az ellenfesték kékítése nem megfelelően történik	A kékítéshez hideg folyó csapvizet használjon; ne használjon meleg vagy forró vizet vagy kékítő reagenseket.

Túl erős jelek

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Túl hosszú ideig végzett proteolitikus előkezelés	Optimalizálja a pepszin inkubációs idejét, szükség esetén növelje vagy csökkentse azt.
A szubsztrát reakció túl intenzív	Rövidítse le a szubsztrát inkubációs idejét; ne melegítse a szubsztrátoldatot 25 °C fölé; csak szobahőmérsékleten inkubálja.

A jelek elhalványulnak vagy összeolvadnak

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Nem megfelelő szerelési megoldást használtak	Kizárólag a készlethez mellékelt rögzítő oldatot vagy minden szennyeződéstől mentes xilén alapú rögzítő oldatot használjon; ne használjon fedőszalagot.

Egyenetlen vagy egyes részekben csak nagyon enyhe foltosodás

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Nem teljes viaszmentesítés	Használjon friss oldatokat; ellenőrizze a viaszmentesítési időtartamát.
Túl kicsi a reagens térfogata	Győződjön meg arról, hogy a reagens térfogata elég nagy ahhoz, hogy a szöveti területet lefedje.

Ellentmondásos eredmények

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Elégtelen szárítás a szonda felhelyezése előtt	Légszárítás meghosszabbítása
Túl sok víz/mosópuffer a szöveten a pepszin, az antitestek és/vagy a színezékszubsztrátumok felvitele előtt.	Győződjön meg arról, hogy a felesleges folyadékot a szövetszelvényről a tárgylemezről való leitatással vagy lerázással eltávolítja. A kis mennyiségű maradék víz/mosópuffer nem zavarja a vizsgálatot.
A szövetek rögzítési és beágyazási módszereinek változatai	A rögzítési és beágyazási módszerek optimalizálása
A szövetszelvény vastagságának változása	Optimalizálja a szekcionálást

Morfológia romlott

Lehetséges ok	Javasolt teendő
A sejt- vagy szövetmintát nem rögzítették megfelelően	A rögzítési idő és a fixálószer optimalizálása
Nem túl hosszú ideig végzett proteolitikus előkezelés	Csökkentse a pepszin inkubációs idejét

Kereszt hibridizációs jelek; zajos háttér

Lehetséges ok	Javasolt teendő
A szelvények a hibridizáció során vagy után bármikor kiszáradhattak.	Kerülje a szelvények kiszáradását; használjon párákamrát; zárja le megfelelően a fedőlapot.
Meghosszabbított szubsztrát inkubációs idő	A szubsztrát inkubációs idejének lerövidítése
Nem teljes viaszmentesítés	Használjon friss oldatokat; ellenőrizze a viaszmentesítés időtartamát.
Túl erős proteolitikus előkezelés	A pepszin inkubációs idejének optimalizálása
A tárgylemezeket hibridizáció előtt szobahőmérsékletre kell hűteni.	A tárgylemezeket gyorsan helyezze át hibridizációs hőmérsékletre

Átfedő jelek

Lehetséges ok	Javasolt teendő
A szöveti metszetek nem megfelelő vastagsága	Készítsünk 3-5 µm-es mikrotomos metszeteket

A minta lebeg a tárgylemezről

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Túl erős proteolitikus előkezelés	A pepszin inkubációs idő lerövidítése

17. Irodalom

- 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. Felülvizsgálat



www.zytovision.com

A legfrissebb használati utasításokat, valamint a különböző nyelvű használati utasításokat a www.zytovision.com oldalon találja.

Szakértőink készséggel válaszolnak kérdéseire.
Vegye fel velünk a kapcsolatot a helptech@zytovision.com címen.
A biztonságról és a teljesítményről szóló összefoglalót lásd a következő oldalon www.zytovision.com.



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

Védjegyek:

A ZytoVision® és a ZytoDot® a ZytoVision GmbH védjegyei.