



ZytoDot 2C
SPEC ERBB2/CEN 17 Probe Kit

REF	C-3022-10	Σ	10
REF	C-3022-40	Σ	40

Az emberi ERBB2 génamplifikációk és a 17. kromoszóma alfa-szatellit kromogén *in situ* hibridizációval (CISH) történő minőségi kimutatására

4250380N467W



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

1. Rendeltetésszerű cél

A ZytoDot 2C SPEC ERBB2/CEN 17 Probe Kit a humán ERBB2 gént érintő amplifikációk minőségi kimutatására, valamint a 17-es kromoszóma alfa-szatellit kimutatására szolgál formalin-fixált, 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 sejt-készítményekben. 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 festékkel történő ellenfestése után a hibridizált szondafragmentumok fénymikroszkópiával láthatóvá válnak.

3. Rendelkezésre bocsátott reagensek

A ZytoDot 2C SPEC ERBB2/CEN 17 Probe Kit két méretben kapható, és a következőkből áll:

Kód:	Komponens	Mennyiség		Konténer
		40	10	
PT2	Heat Pretreatment Solution EDTA	500 ml	150 ml	Csavaros kupakos üveg (nagy)
ES1	Pepsin Solution	4 ml	1 ml	Cseppentős üveg, fehér kupakkal
PD12	ZytoDot 2C SPEC ERBB2/CEN 17 Probe	0.4 ml	0.1 ml	Reakcióedény, barna fedéllel
WB1	Wash Buffer SSC	560 ml	210 ml	Csavaros kupakos üveg
WB5	20x Wash Buffer TBS	2x 50 ml	50 ml	Cseppentős üveg, sárga kupakkal
AB14	Anti-DIG/DNP-Mix	4 ml	1 ml	Cseppentős üveg, kék kupak
AB13	HRP/AP-Polymer-Mix	4 ml	1 ml	Cseppentős üveg, piros kupakkal (kicsi)
SB6a	AP-Red Solution A	0.4 ml	0.1 ml	Cseppentős üveg, piros kupakkal
SB6b	AP-Red Solution B	15 ml	4 ml	Cseppentős üveg, zöld kupakkal (kicsi)
SB7a	HRP-Green Solution A	0.8 ml	0.2 ml	Cseppentős üveg, zöld kupakkal
SB7b	HRP-Green Solution B	15 ml	4 ml	Csavaros kupakos üveg, fekete
CS2	Nuclear Blue Solution	20 ml	4 ml	Üvegpalack, barna
MT4	Mounting Solution (alcoholic)	4 ml	1 ml	Méretezett csésze, piros fedéllel
	AP-Red reaction vessel	2	1	Méretezett csésze, zöld fedéllel
	HRP-Green reaction vessel	2	1	Csavaros kupakos üveg
	Használati utasítás	1	1	

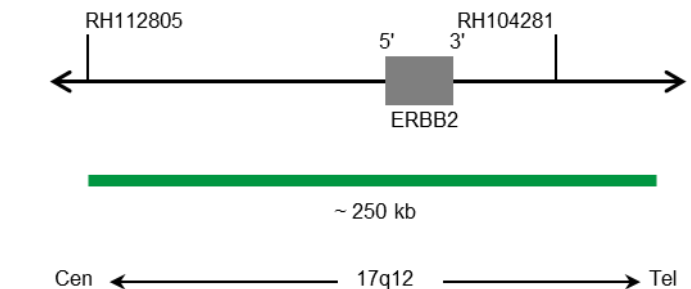
C-3022-10 (10 vizsgálat): Az PD12, ES1, AB14, AB13, SB6a-b, SB7a-b, CS2, és MT4 komponensek 10 reakcióhoz elegendőek. A PT2 komponens 2 db, egyenként 70 ml-es festőedényhez elegendő. A WB1 komponens 3 darab, egyenként 70 ml-es festőedényhez elegendő. A WB5 komponens 14 darab, egyenként 70 ml-es festőedényhez elegendő.

C-3022-40 (40 vizsgálat): Az PD12, ES1, AB14, AB13, SB6a-b, SB7a-b, CS2, és MT4 komponensek 40 reakcióhoz elegendőek. A PT2 komponens 7 db, egyenként 70 ml-es festőedényhez elegendő. A WB1 komponens 8 darab, egyenként 70 ml-es festőedényhez elegendő. A WB5 komponens 28 darab, egyenként 70 ml-es festőedényhez elegendő.

A ZytoDot 2C SPEC ERBB2/CEN 17 Probe (PD12) a következőkből áll:

- Digoxigeninnel jelölt polinukleotidok (~1,1 ng/μl), amelyek a 17q12* (chr17:37,725,661-37,973,541), az ERBB2 gén régióját rejtő szekvenciákat célozzák (lásd az 1. ábrát).
- Dinitrofenil-jelölt polinukleotidok (~1,1 ng/μl), amelyek a 17p11.1-q11.1 kromoszóma D17Z1 alfa-szatellit centromerikus régiójára specifikus, a 17p11.1-q11.1 kromoszómában leképezett 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 tárgylemezek, pozitív töltésű
- Vízfürdő (80 °C, 98 °C)
- Hibridizátor vagy főzőlap
- Hibridizáló vagy páraakmlra a hibridizációs kemencében
- Állítható pipetták (10 µl, 1000 µl)
- 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 lejártá után!
- Ez a termék (kis koncentrációban és mennyiségben) egészségre káros és potenciálisan fertőző anyagokat tartalmaz. Kerülje a reagenssel való közvetlen érintkezést. Tegyen megfelelő védőintézkedéseket (használjon 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 reagens bőrrel érintkezik, 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 SB6a -re vonatkozóan:

- H412 Ártalmas a vízi élővilágra, hosszan tartó károsodást okoz.
P273 Kerülni kell az anyagnak a környezetbe való kijutását.

Veszély- és óvintézkedési nyilatkozatok az AB13, AB14, PT2, SB7b, WB1 és WB5 esetében:

A veszélyt meghatározó komponens a reakciótömeg: 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 SB7a -re vonatkozóan:

A veszélyt meghatározó komponensek a metanol és a 30 %-os hidrogén-peroxid-oldat.



Veszély

- H225 Fokozottan tűzveszélyes folyadék és gőz.
H301+H311 Lenyelve, bőrrel érintkezve vagy belélegezve mérgező
+H331
H370 Károsítja a szerveket.
P210 Hőtől, forró felületektől, szikrától, nyílt lángtól és más gyújtóforrástól távol tartandó. Tilos a dohányzás
P233 Az edény szorosan lezárva tartandó.
P260 A por/füst/gáz/köd/gőzök/permet belélegzése tilos.
P280 Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő/hallásvédelem használata kötelező.
P308+P311 Expozíció vagy annak gyanúja esetén: Forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ/orvoshoz.
P403+P235 Jól szellőző helyen tárolandó. Hűvös helyen tartandó.

Veszély- és óvintézkedési nyilatkozatok az PD12-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 kitett vagy érintett: Kérjen orvosi tanácsot/megfigyelést.
P405	Elzárva tárolandó.

Veszély- és óvintézkedési nyilatkozatok az CS2 -re vonatkozóan:

A veszélyt meghatározó összetevő az etándiol, etilénlikol.



Figyelem

H373	Hosszabb vagy ismételt expozíció esetén lenyelése károsíthatja a vesét.
P260	A por/füst/gáz/köd/gőzök/permet belélegzése tilos
P314	Rosszullét esetén orvosi ellátást kell kérni.

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	Védokesztyű/védoruha 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.

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, más szövettani kritériumok és más 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 lókuszok 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 okozó anyagok

A következő fixálószerke nem kompatibilisek az ISH-val:

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

9. A minták előkészítése

Ajánlások:

- Kerülje a minták keresztszennyeződését, mivel ez hibás eredményekhez vezethet.
- Fixálás 10% semlegesen puffertelt formalinban 24 órán keresztül szobahőmérsékleten (RT, 18°C-25°C).
- Mintaméret ≤ 0,5 cm³.
- 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 20x Wash Buffer TBS (WB5) puffert a 11. pontban leírtak szerint kell elkészíteni. „Assay procedure” (Vizsgálati eljárás). Az összes többi kit-reagens használatra kész. Nincs szükség rekonstitúcióra, keverésre vagy hígításra. Használat előtt a szondát hozza szobahőmérsékletre (RT), és rövid ideig keverje meg.

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 2C CISH szonda: Használat előtt hozza szobahőmérsékletre.*

Előkezelés (viaszmentesítés/proteolízis)

- (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, páraaknában.

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) Pipettázzunk 10 µl szondát 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 79°C-on.
- (4) Vigye át a tárgylemezeket egy páraaknába, 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 csapadékot képezhet, amely nem befolyásolja a minőséget, és melegítéskor fel kell oldódnia.*
- (2) *Az 1x Wash Buffer TBS elkészítése: Hígítsunk 1 részt 20x Wash Buffer TBS (WB5) 19 rész deionizált vagy desztillált vízben.*

A hígított 1x Wash Buffer TBS mosópuffer 2-8°C-on tárolva egy hétig stabil.

- (3) Anti-DIG/DNP-Mix (AB14), HRP/AP-Polymer-Mix (AB13), AP-Red Solution A (SB6a), AP-Red Solution B (SB6b), HRP-Green Solution A (SB7a), HRP-Green Solution B (SB7b) Nuclear Blue Solution (CS2), Mounting Solution (alcoholic) (MT4): Használat előtt hozza szobahőmérsékletre.

Az SB7a és SB7b komponensek csapadékot képezhetnek, ami nem befolyásolja a festés minőségét.

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 1x Wash Buffer TBS pufferbe.
 - (6) Vigyen fel Anti-DIG/DNP-Mix (AB14) (1-2 cseppet tárgylemezenként) a tárgylemezekre, és inkubálja 15 percig 37°C-on, páraaknában.
 - (7) Mossuk a tárgylemezeket 3x 1 percig 1x Wash Buffer TBS mosópufferben.
 - (8) Vigyen fel HRP/AP-Polymer-Mix (AB13) (1-2 cseppet tárgylemezenként) a tárgylemezekre, és inkubálja 15 percig 37°C-on, páraaknában.
 - (9) Mossuk a tárgylemezeket 3x 1 percig 1x Wash Buffer TBS mosópufferben.
 - (10) Készítsünk AP-Red Solution (munkaoldat): töltsünk 1 ml AP-Red Solution B (SB6b) egy mérőpohárba, és adjunk hozzá egy csepp (30 µl) AP-Red Solution A (SB6a). Jól keverjük össze.
 - (11) Vigye fel az AP-Red Solution oldatot (1-2 cseppet tárgylemezenként) a tárgylemezekre, és inkubálja sötétben 10 percig RT-nél.
 - (12) Az inkubáció alatt készítse el a HRP-Green Solution (munkaoldat): töltsön 1 ml HRP-Green Solution B (SB7b) egy mérőlapos pohárba, és adjon hozzá két csepp (2x 20 µl) „HRP-Green Solution A (SB7a)”. Jól keverjük össze.
 - (13) Mossuk a tárgylemezeket 2 percig deionizált vagy desztillált vízben.
 - (14) Vigye fel a HRP-Green Solution cseppenként (1-2 cseppet tárgylemezenként) a tárgylemezekre, és inkubálja sötétben 10 percig szobahőmérsékleten.
 - (15) Mossuk a tárgylemezeket 2 percig ionmentesített vagy desztillált vízben.
 - (16) Ellenfestjük a mintákat 2 percig Nuclear Blue Solution (CS2).
 - (17) Tegyük át a tárgylemezeket festőedénybe, és mossuk át 2 percig hideg folyó csapvíz alatt.
 - (18) Dehidratáljuk 3x 30 másodpercig 100%-os etanolban (használjunk nagyon tiszta etanolt).
 - (19) Inkubáljuk a tárgylemezeket 2x 30 másodpercig xilolban (használjunk nagyon tiszta xilolt).
- A pipettázás megkönnyíthető egy olyan pipettahegy használatával, amelyet a nyílás méretének növelése érdekében levágtak.*
- (20) Értékelje a festett mintákat fénymikroszkópiával.

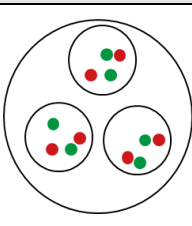
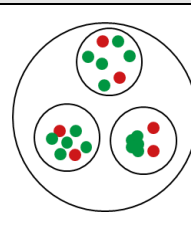
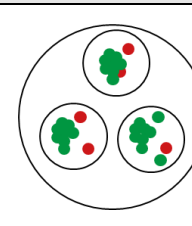
12. Az eredmények értelmezése

A ZytoDot 2C CISH Implementation Kit használatával a Digoxigeninnel jelölt polinukleotidok hibridizációs jelei sötétzöld színű, elkülönülő pontokként jelennek meg (ERBB2 génterület), a Dinitrofenil-lel jelölt polinukleotidok pedig élénkpiros színű, elkülönülő pontokként jelennek meg (CEN 17).

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

Rendellenes jelrendszer: Az ERBB2 gén régiójának amplifikációjával rendelkező sejtekben a zöld jelek vagy zöld jelcsoportok megnövekedett száma figyelhető meg (lásd a 2. ábrát).

Az egymást átfedő jelek barna jelekként jelenhetnek meg.

		
Normál sejtek	Alacsony szintű ERBB2-amplifikáció	Magas szintű ERBB2-amplifikáció

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 jelhalmazokként 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-szoros nagyítással kell elvégezni, ami könnyen látható jeleket eredményez. A kromoszómatoréseket detektáló szondák esetében 630-szoros nagyítás ajánlott. Ne használjon kontrasztfokozó szűrőlelencsét, mivel ez torzíthatja a jelek színét. A világos színű jelek eléréséhez nyissa ki a rekesznyílást. Ügyeljen arra, hogy a sejtmag kiértékelésekor felfelé és lefelé fókuszáljon, mivel a piros és zöld jelek egymáson helyezkedhetnek el.
- Ne értékelje a nekrotikus 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 artefaktumok 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 reagensok 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:	91% (95% CI 86.0 – 95.0) kétváltozós modell alapján
Diagnosztikai specifitás:	97% (95% CI 93.0 – 99.0) kétváltozós modell alapján

15. Eltávolítás

A reagensok 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 fedőlemez teljesen le kell zárni, pl. Fixogummal, hogy megakadályozzuk a minta kiszáradását a hibridizáció során.
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.
Az AP-Red Solution inkubációs ideje nem megfelelő	Szükség esetén az inkubációs idő 5 percre lerövidíthető. A szubsztrátoldatot ne melegítse 25 °C fölé; csak szobahőmérsékleten inkubálja.
HRP-zöld oldat inkubációs ideje nem megfelelő	Szükség esetén az inkubációs idő 7 percre rövidíthető. A szubsztrátoldatot ne melegítse 25 °C fölé; csak szobahőmérsékleten inkubáljon.

A piros jelek túl gyengék

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Az AP-Red oldatot erős közvetlen fénynek tették ki.	Készítse el és használja az AP-Red oldatot erős közvetlen fénytől védve.
Az AP-Red oldatot túl korán készítették el	Azonnali használat előtt készítse elő
Az AP-Red Solution inkubációs ideje nem megfelelő	Szükség esetén az inkubációs idő 15 percig meghosszabbítható.
A kromogén szubsztrát nem megfelelő előkészítése	Ne növelje az A oldat térfogatát

A zöld jelek túl gyengék

Lehetséges ok	Javasolt teendő
A HRP-zölddel történő festést követő mosási lépések inkubációs ideje túl hosszú	Ne lépje túl a megadott inkubációs időt
HRP-zöld oldat inkubációs ideje nem megfelelő	Szükség esetén az inkubációs idő 15 percig meghosszabbítható.

A kromogén szubsztrát nem megfelelő előkészítése	Ne növelje az A oldat térfogatát
--	----------------------------------

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.
A metszeteket nem dehidratálták megfelelően.	Friss etanol- és xiloldatokat használjon; csak "tisztá" minőségű xilolt használjon.

Egyenetlen vagy egyes részen csak nagyon enyhe foltosodás

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Nem teljes viaszmentesítés	Használjon friss oldatokat; ellenőrizze a viaszmentesítési idő tartamát.
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	Lég szárítás 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 metszetek a hibridizáció során vagy után bármikor kiszáradhattak.	Kerülje a szelvények kiszáradását; használjon pára kamrát; zárja le megfelelően a fedőlapot.
Meghosszabbított szubsztrát inkubációs idő	A szubsztrát inkubációs idejének lerövidítése
Nem teljes viaszmentesítés	Használjon friss oldatokat; ellenőrizze a viaszmentesítési 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

- Ali AHM, et al. (2019) *Open Access Maced J Med Sci* 7: 1917.
- Bhargava R, et al. (2005) *Am J Clin Pathol* 123: 237-43.
- Hwang CC, et al. (2011) *Histopathology* 59: 984-92.
- Kurihara N, et al. (2019) *J Clin Pathol* 72: 603-608.
- Mayr D, et al. (2009) *Histopathology* 55: 716-23.
- Miligy IM, et al. (2019) *Br J Cancer* 120: 1075-1082.
- Nie X, et al. (2013) *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci* 33: 379-84.
- Pfarr N, et al. (2017) *Genes chromosomes cancer* 56: 255-264.
- Saito Y, et al. (2016) *Sci Rep* 6: 1-8.
- Schiavon BN, et al. (2012) *Am J Surg Pathol.*: 1489-1496
- Tabarestani S, et al. (2015) *Asian Pac J Cancer Prev* 16: 7997-8002.
- Wilkinson DG: *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.
- Wolf FF, et al. (2015) *J Bras Patol Med Lab* 51: 407-414.

18. 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 help@zytovision.com címen.

A biztonságról és a teljesítményről szóló összefoglalóért kérjük, olvassa el a következőt 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.