



ZytoDot SPEC ERBB2 Probe Kit

REF C-3003-40

40

Per il rilevamento qualitativo delle amplificazioni del gene ERBB2 umano mediante ibridazione *in situ* cromogenica (CISH)

4250380N297W



Dispositivo medico – diagnostico in vitro
in conformità al Regolamento IVDR (EU) 2017/746

1. Scopo previsto

Il ZytoDot SPEC ERBB2 Probe Kit è destinata all'individuazione qualitativa di amplificazioni che coinvolgono il gene ERBB2 umano in campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina, come il cancro al seno, mediante ibridazione *in situ* cromogenica (CISH).

Il prodotto è destinato esclusivamente ad uso professionale. Tutti i test che utilizzano il prodotto devono essere eseguiti da personale qualificato in un laboratorio di anatomia patologica certificato e autorizzato, sotto la supervisione di un patologo/genetista umano.

La sonda deve essere utilizzata come ausilio per la diagnosi differenziale del tumore al seno e non devono essere avviate misure terapeutiche basate esclusivamente sul risultato del test.

2. Principio del metodo

La tecnica di ibridazione *in situ* cromogenica (CISH) consente la rivelazione e la visualizzazione di sequenze specifiche di acidi nucleici in preparazioni cellulari. I frammenti nucleotidici marcati con apteni, chiamati anche sonde CISH, e le loro sequenze target complementari nelle preparazioni vengono co-denaturati per consentire il successivo annealing durante l'ibridazione. Successivamente, frammenti di sonde aspecifici e non legati vengono rimossi mediante lavaggi stringenti. L'accoppiamento con la sonda marcata può essere visualizzato utilizzando anticorpi primari (non marcati) che sono rivelati mediante anticorpi secondari coniugati con enzimi polimerizzati. La reazione enzimatica con substrati cromogenici porta alla formazione di precipitati colorati. Dopo la controcolorazione dei nuclei con un colorante nucleare, i frammenti di sonda ibridata sono visibili al microscopio ottico.

3. Reagenti forniti

Il ZytoDot SPEC ERBB2 Probe Kit è disponibile in un unico formato ed è composto da:

Codice	Componenti	Importo	Contenitore
		40	
PT2	<u>Heat Pretreatment Solution EDTA</u>	500 ml	Flacone con tappo a vite (grande)
ES1	<u>Pepsin Solution</u>	4 ml	Flacone contagocce, tappo bianco
PD1	<u>ZytoDot SPEC ERBB2 Probe</u>	0.4 ml	Recipiente di reazione, coperchio marrone
WB1	<u>Wash Buffer SSC</u>	560 ml	Flacone con tappo a vite (grande)
WB4	<u>PBS/Tween</u>	2x	Confezione in alluminio
BS1	<u>Blocking Solution</u>	4 ml	Flacone contagocce, tappo arancione
AB1	<u>Mouse_Anti-Dig</u>	4 ml	Flacone contagocce, tappo rosa
AB2	<u>Anti-Mouse-HRP-Polymer</u>	4 ml	Flacone contagocce, tappo viola
SB1a	<u>DAB Solution A</u>	0.3 ml	Flacone contagocce, tappo verde
SB1b	<u>DAB Solution B</u>	10 ml	Flacone contagocce, tappo grigio
CS1	<u>Mayer's Hematoxylin Solution</u>	20 ml	Flacone con tappo a vite, nero
MT4	<u>Mounting Solution (alcoholic)</u>	4 ml	Bottiglia di vetro, marrone
	Istruzioni per l'uso	1	

C-3003-40 (40 tests): I componenti **PD1**, **ES1**, **BS1**, **AB1**, **AB2**, **SB1a-b**, **CS1** e **MT4** sono sufficienti per 40 reazioni. Il componente **PT2** è sufficiente per 7 vasi di colorazione da 70 ml ciascuno. Il componente **WB1** è sufficiente per 8 vasi di colorazione da 70 ml ciascuno. Il componente **WB4** è sufficiente per 28 vasi di colorazione da 70 ml ciascuno.

La ZytoDot SPEC ERBB2 Probe è composta da:

- Polinucleotidi marcati con digossigenina (~1,8 ng/μl), che hanno come bersaglio sequenze mappate in 17q12* (chr17:37,725,661-37,973,541) che ospitano la regione del gene ERBB2 (vedere Fig. 1).
- Tampone di ibridazione a base di formammide

*conformemente al Human Genome Assembly GRCh37/hg19

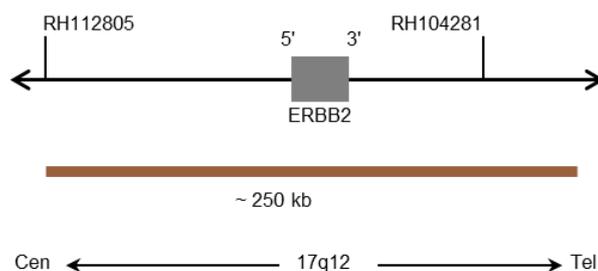


Fig. 1: ERBB2 Mappa della sonda (non in scala)

4. Materiali richiesti ma non forniti

- Campioni di controllo positivi e negativi
- Vetrini per microscopio, caricati positivamente
- Bagno ad acqua (80 °C, 98 °C)
- Ibridatore o piastra calda
- Ibridatore o camera di umidità nel forno di ibridazione
- Pipette regolabili (10 μl, 1000 μl)
- Macchiare vasi o vasche
- Timer
- Termometro calibrato
- Etanolo o alcool reagente
- Xilene
- Metanolo 100%
- Perossido d'idrogeno (H₂O₂) 30%

- Acqua deionizzata o distillata
- Vetrini (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Cemento di gomma, ad esempio, Fixogum Rubber Cement (n. di produzione E-4005-50/-125) o simile.
- Microscopio ottico adeguatamente mantenuto (400-630x)

5. Conservazione e stoccaggio

Conservare a 2-8°C in posizione verticale. Riportare alle condizioni di stoccaggio indicate subito dopo l'utilizzo. Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza indicata in etichetta. Il prodotto è stabile fino alla data di scadenza indicata in etichetta, se correttamente conservato.

6. Avvertenze e precauzioni

- Leggere le istruzioni prima dell'utilizzo.
- Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza!
- Questo prodotto contiene sostanze (in bassa concentrazione e volume) che sono nocive per la salute e potenzialmente infette. Evitare qualsiasi contatto diretto con i reagenti. Prendere le adeguate misure di precauzione (utilizzare i guanti, gli occhiali di protezione e il camice da laboratorio)!
- Segnalare qualsiasi incidente grave relativo al prodotto al produttore e all'autorità competente in conformità alle normative locali.
- Se il reagente dovesse entrare in contatto con la pelle, risciacquare subito abbondantemente!
- La scheda di sicurezza è disponibile su richiesta per usi professionali.
- Non riutilizzare i reagenti.
- Evitare la cross-contaminazione dei campioni, in quanto questo potrebbe portare a risultati sbagliati.
- I campioni non devono essere lasciati asciugare durante le fasi di ibridazione e lavaggio.

Etichettatura speciale di ES1:

- EUH208 Contiene pepsina A. Può provocare una reazione allergica.
EUH210 Scheda dati di sicurezza disponibile su richiesta.

Frasi di pericolo e prudenza per CS1 e WB4:

La miscela non è classificata come pericolosa ai sensi del regolamento (CE) n. 1272/2008.

Frasi di pericolo e prudenza per BS1, AB1, AB2, PT2, e WB1:

Il componente pericoloso è una miscela di: 5-cloro-2-metil-2H-isotiazol-3-one [EC no. 247-500-7]; 2-metil-2H-isotiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1).



Attenzione

- H317 Può provocare una reazione allergica cutanea.
P261 Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol.
P272 Gli indumenti da lavoro contaminati non devono essere portati fuori dal luogo di lavoro.
P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.
P302+P352 IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua.
P333+P313 In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.
P362+P364 Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

Frasi di pericolo e prudenza per SB1a:

Il componente che determina il pericolo è la bifenil-3,3',4,4'-tetrailtetraammina; diamminobenzidina.



Danger

- H350 Può provocare il cancro.
P201 Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso.
P202 Non manipolare prima di avere letto e compreso tutte le avvertenze.
P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/proteggere il viso/proteggere l'udito.
P308+P313 IN CASO di esposizione o di possibile esposizione, consultare un medico.
P405 Conservare sotto chiave.

Frasi di pericolo e prudenza per SB1b:

Il componente pericoloso è una miscela di: 5-cloro-2-metil-2H-isotiazol-3-one [EC no. 247-500-7]; 2-metil-2H-isotiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1).



Pericolo

- H317 Può provocare una reazione allergica cutanea.
H360D Può nuocere al feto.
P201 Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso.
P261 Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol.
P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.
P302+P352 IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua.
P308+P313 IN CASO di esposizione o di possibile esposizione, consultare un medico.
P362+P364 Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

Frasi di pericolo e prudenza per MT4:

Il componente che determina il pericolo è lo xilene.



Attenzione

- H226 Liquido e vapori infiammabili.
H312+H332 Nocivo a contatto con la pelle o se inalato.
H315 Provoca irritazione cutanea.
H319 Provoca grave irritazione oculare.
H335 Può irritare le vie respiratorie.
H373 Può provocare danni agli organi in caso di esposizione prolungata o ripetuta.
P210 Tenere lontano da fonti di calore, superfici calde, scintille, fiamme libere o altre fonti di accensione. Non fumare.
P260 Non respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol.
P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.
P305+P351+P338 IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.
P337+P313 Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico.
P403+P235 Conservare in luogo fresco e ben ventilato.
EUH208 Contiene metacrilato di metile; metil 2-metilprop-2-enoato; metil-metacrilato, n-butilmecrilato. Può provocare una reazione allergica.

Fraasi di pericolo e prudenza per PD1:

Il componente pericoloso è la formammide.



Pericolo

H351	Sospettato di provocare il cancro.
H360FD	Può nuocere alla fertilità. Può nuocere al feto.
H373	Può provocare danni agli organi in caso di esposizione prolungata o ripetuta.
P201	Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso.
P202	Non manipolare prima di avere letto e compreso tutte le avvertenze.
P260	Non respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol.
P280	Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.
P308+P313	IN CASO di esposizione o di possibile esposizione, consultare un medico.
P405	Conservare sotto chiave.

7. Limitazioni

- Per uso diagnostico *in vitro*.
- Solo per uso professionale.
- Solo per uso non-automatico.
- L'interpretazione clinica di qualsiasi colorazione positiva o meno deve essere condotta considerando il contesto della storia clinica, della morfologia, di altri criteri istopatologici e di altri test diagnostici. È responsabilità di un patologo/genetista umano qualificato avere familiarità con le sonde ISH, i reagenti, i pannelli diagnostici e i metodi utilizzati per la colorazione del preparato. La colorazione deve essere eseguita in un laboratorio certificato e autorizzato sotto la supervisione di un patologo/genetista umano che è responsabile della revisione dei vetrini colorati e della garanzia dell'adeguatezza dei controlli positivi e negativi.
- La colorazione, in particolar modo l'intensità del segnale e il rumore di fondo, dipende da come il campione è stato gestito e processato prima della colorazione stessa. Una fissazione impropria, il congelamento, lo scongelamento, il lavaggio, l'asciugatura, il riscaldamento, il sezionamento o la contaminazione con un altro campione o fluido può produrre artefatti o falsi risultati. Risultati incoerenti possono derivare da variazioni nei metodi di fissazione e inclusione.
- La sonda dovrebbe essere usata solo per identificare i loci descritti nella sezione 3 "Reagenti forniti".
- Le prestazioni sono state convalidate utilizzando le procedure descritte nelle istruzioni per l'uso della rispettiva sonda o del kit di implementazione ZytoVision. Le modifiche a queste procedure potrebbero alterare le prestazioni e devono essere convalidate dall'utente. Questo prodotto IVD è certificato come CE solo se utilizzato come descritto in queste istruzioni nell'ambito dell'uso previsto.

8. Sostanze interferenti

I seguenti fissativi sono incompatibili con ISH:

- Fissativo di Bouin
- Fissativo B5
- Fissativi acidi (es. acido picrico)
- Fissativo di Zenker
- Alcoli (se usati da soli)
- Cloruro mercurico
- Fissativo a base di formaldeide e zinco
- Il fissativo di Hollande
- Formalina non tamponata

9. Preparazione dei campioni

Raccomandazioni:

- Evitare la contaminazione incrociata dei campioni per evitare risultati errati.
- Fissazione in formalina tamponata neutra al 10% per 24 ore a temperatura ambiente (RT, 18°C-25°C).
- Dimensione del campione $\leq 0,5 \text{ cm}^3$.
- Utilizzare paraffina di qualità superiore.
- L'inclusione deve essere effettuata a temperature inferiori a 65°C.
- Preparare sezioni al microtomo da 3-5 μm .
- Utilizzare vetrini da microscopio con carica positiva.
- Fissare le sezioni di tessuto per 2-16 ore a 50-60°C.

10. Trattamento preparatorio del prodotto

PBS/Tween (WB4) deve essere preparato secondo le istruzioni riportate al punto 11. "Procedura di lavoro". Tutti gli altri reagenti del kit sono pronti all'uso. Non è richiesta alcuna ricostituzione, miscelazione o diluizione. Portare la sonda a temperatura ambiente (18-25°C) prima dell'uso, proteggere dalla luce. Prima di aprire la vial, vortexare e centrifugare brevemente.

11. Procedura di lavoro

11.1 Giorno 1

Fasi preparatorie

- (1) *Preparare una serie di soluzioni di etanolo (70%, 90% e 100%):* Diluire l'etanolo al 100% con acqua deionizzata o distillata. Queste soluzioni possono essere conservate in contenitori adeguati e possono essere riutilizzate.
- (2) *Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2):* Riscaldare a 98°C in un barattolo di colorazione coperto.
- (3) *Preparazione di H₂O₂ al 3%:* Diluire 1 parte di H₂O₂ al 30% in 9 parti di metanolo al 100%.
- (4) *ZytoDot CISH Probe:* Portare a temperatura ambiente (RT) prima dell'uso.

Pretrattamento (decerazione/proteolisi)

- (1) Incubare i vetrini per 10 minuti a 70°C (ad esempio, su una piastra).
- (2) Incubare i vetrini per 2x 5 min in xilene.
- (3) Incubare i vetrini per 3x 3 min in etanolo al 100%.
- (4) Incubare i vetrini per 5 min in H₂O₂ al 3%.
- (5) Lavare i vetrini 2x 1 min in acqua deionizzata o distillata a temperatura ambiente.
- (6) Incubare per 15 min in Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2) preriscaldata a 98°C.

Utilizzare otto vetrini per ogni barattolo di colorazione (aggiungere vetrini finti se necessario).

- (7) Trasferire immediatamente i vetrini in acqua deionizzata o distillata e lavare per 2x 2 min.
- (8) Applicare (a gocce) la Pepsin Solution (ES1) sul campione e incubare per 5-15 min a 37°C in una camera umida.

ES1 può formare precipitati, che non influiscono sulla qualità.

Come regola generale, si consiglia di accertare il tempo ottimale per la proteolisi nei test preliminari.

- (9) Immergere i vetrini in acqua deionizzata o distillata a temperatura ambiente.
- (10) Disidratazione in: 70%, 90% e 100% etanolo, ciascuno per 1 min.
- (11) Asciugare all'aria le sezioni.

Nota: assicurarsi che le sezioni siano completamente asciutte prima dell'applicazione della sonda.

Denaturazione e ibridazione

- (1) Pipettare 10 μl di ZytoDot CISH Probe su ciascun campione pretrattato.
- (2) Coprire i campioni con un vetrino coprioggetto di 22 mm x 22 mm (per evitare la formazione di bolle) e sigillare il vetrino.

Per la sigillatura si consiglia di utilizzare del cemento per gomma (ad es. Fixogum).

- (3) Posizionare i vetrini su una piastra calda o su un ibridatore e denaturare i campioni per 5 min a 94-95°C.
- (4) Trasferire i vetrini in una camera di umidità e ibridare per una notte a 37°C (ad esempio, in un forno di ibridazione).

È essenziale che i campioni non si seccino durante la fase di ibridazione.

11.2 Giorno 2

Fasi preparatorie

(1) **Wash Buffer SSC (WB1)**: Per il lavaggio di rigore, riscaldare a 80°C in un barattolo di colorazione coperto. **WB1** può formare precipitati a 2-8°C, che non influiscono sulla qualità e si dissolvono quando vengono riscaldati.

(2) **Preparazione di Wash Buffer PBS/Tween**: Aggiungere 1 compressa di PBS/Tween (**WB4**) a 1000 ml di acqua deionizzata o distillata e sciogliere.

Il Wash Buffer PBS/Tween è stabile per una settimana se conservato a 2-8°C.

(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)**: Portare a temperatura ambiente prima dell'uso.

Post-ibridazione e rilevamento

(1) Rimuovere con cautela il cemento o la colla di gomma.

(2) Rimuovere il coprioggetto immergendolo in **Wash Buffer SSC (WB1)** a temperatura ambiente per 5 min.

WB1 può essere riutilizzato una volta. Conservare a 2-8°C per un massimo di una settimana..

(3) Lavare i vetrini per 5 min in **Wash Buffer SSC (WB1)** a 80°C.

Utilizzare otto vetrini per ogni barattolo di colorazione (aggiungere vetrini finti se necessario).

(4) Lavare i vetrini 2x 1 min in acqua deionizzata o distillata a temperatura ambiente.

(5) Immergere i vetrini in Wash Buffer PBS/Tween.

(6) Applicare **Blocking Solution (BS1)** (1-2 gocce per vetrino) sui vetrini e incubare per 10 minuti a temperatura ambiente.

(7) Togliere la **Blocking Solution (BS1)**, **ma non risciacquare!**

(8) Applicare **Mouse-Anti-DIG (AB1)** (1-2 gocce per vetrino) sui vetrini e incubare per 30 min a RT.

(9) Lavare i vetrini 3x 1 min in PBS/Tween.

(10) Applicare **Anti-Mouse-HRP-Polymer (AB2)** (1-2 gocce per vetrino) sui vetrini e incubare per 30 min a RT.

(11) Lavare i vetrini 3x 1 min in PBS/Tween.

(12) Preparare la soluzione DAB (soluzione di lavoro): riempire 1 ml di **DAB Solution B (SB1b)** in un bicchiere graduato e aggiungere una goccia (30 µl) di **DAB Solution A (SB1a)**. Mescolare bene.

(13) Applicare **DAB Solution** (1-2 gocce per vetrino) sui vetrini e incubare per 30 min a temperatura ambiente.

(14) Trasferire i vetrini in un barattolo di colorazione e lavare per 2 minuti con acqua corrente fredda.

(15) Controcolorare i campioni per 5-10 secondi con la **Mayer's Hematoxylin Solution (CS1)**.

(16) Trasferire i vetrini in un barattolo di colorazione e lavare per 2 minuti con acqua corrente fredda.

(17) Disidratazione in: 70%, 90% e 100% di etanolo, ciascuno per 1 minuto.

(18) Incubare i vetrini per 2 volte 2 minuti in xilene (utilizzare xilene molto puro).

(19) Per evitare la formazione di bolle, coprire i campioni con un coprioggetto (22 mm x 22 mm; 24 mm x 32 mm) utilizzando la **Mounting Solution (alcoholic) (MT4)**. Lasciare 20-30 min per immobilizzare il coprioggetto.

L'uso di un puntale tagliato per aumentare le dimensioni dell'apertura può facilitare il processo di pipettaggio.

(20) Valutare i campioni colorati utilizzando la microscopia ottica.

12. Interpretazione dei risultati

Utilizzando il **ZytoDot CISH Implementation Kit**, i segnali di ibridazione dei polinucleotidi marcati con digossigenina appaiono da marrone a marrone scuro (regione del gene ERBB2).

Situazione normale: Nelle interfasi di cellule normali o di cellule senza un'amplificazione che coinvolge la regione del gene ERBB2, compaiono due distinti segnali marroni a forma di puntino (vedere Fig. 2).

Situazione aberrante: Nelle cellule con un'amplificazione della regione del gene ERBB2 o con una poliosomia del cromosoma 17, si osserva un numero maggiore di segnali marroni o di cluster di segnali marroni. (vedere Fig. 2).

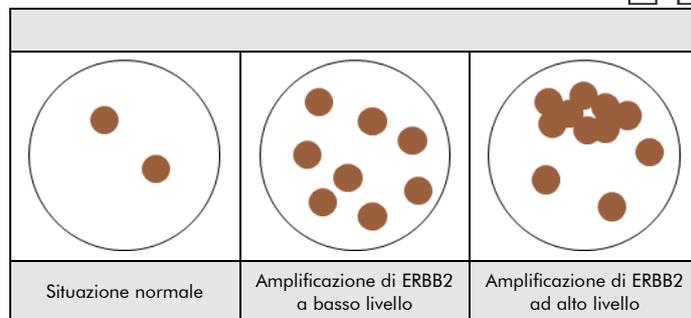


Fig. 2: Risultati attesi in situazione normale e aberrante

Altri pattern di segnali oltre a quelli descritti sopra si potrebbero osservare in alcuni campioni anormali. Questi pattern di segnali inconsueti dovrebbero essere ulteriormente indagati.

Note:

- A causa della cromatina decondensata, i singoli segnali CISH possono apparire come piccoli cluster singoli. Inoltre, due o tre segnali della stessa dimensione, separate da una distanza inferiore o uguale a un singolo diametro, dovrebbero essere considerati come singolo segnale.
- Prima della conta dei segnali, il campione dovrebbe essere scansionato a ingrandimenti 100x o 200x per valutare eventuale eterogeneità intratumorale.
- La visualizzazione dei segnali dovrebbe essere condotta almeno a un ingrandimento tra 400x e 630x perché i segnali siano facilmente visibili.
- Non valutare le aree di necrosi, i nuclei sovrapposti, i nuclei over-digeriti e i nuclei con intensità di segnale scarsa.
- Per via della mitosi, ulteriori segnali aggiuntivi potrebbero essere visibili anche in una piccola percentuale di cellule non neoplastiche. Saltuariamente inoltre, in campioni inclusi in paraffina, si potrebbero vedere nuclei con segnali assenti a causa di artefatti del taglio.
- Un risultato negativo o non specifico potrebbe essere causato da multipli fattori (vedere capitolo 16 "Risoluzione dei problemi").
- Al fine di una corretta interpretazione dei risultati, l'utente deve validare questo prodotto prima del suo utilizzo in procedure diagnostiche secondo le linee guida nazionali e internazionali.

13. Procedure di Controllo qualità raccomandate

Al fine di monitorare la corretta performance del campione processato e testare i reagenti, ogni test dovrebbe essere associato a controlli interni e esterni. Se i controlli interni e/o esterni non forniscono colorazioni appropriate, i risultati con i campioni dei pazienti devono essere considerati non validi.

Controllo interno: Cellule non neoplastiche all'interno di un campione che mostra un pattern normale di segnali, ad esempio, i fibroblasti.

Controllo esterno: Campioni di controlli positivi e negativi validati.

14. Caratteristiche di performance

14.1 Prestazioni analitiche

Le prestazioni della sonda sono state determinate mediante confronto con la corrispondente sonda FISH approvata da IVD.

Sensibilità analitica:	100% (95% CI 98.5 – 100.0)
Specificità analitica:	100% (95% CI 97.0 – 100.0)

14.2 Prestazioni cliniche

Sensibilità diagnostica:	100% (95% CI 83.2 – 100.0) vs. FISH, CISH
Specificità diagnostica:	100% (95% CI 83.2 – 100.0) vs. FISH, CISH

15. Smaltimento

Lo smaltimento dei reagenti deve avvenire in accordo alle regolamentazioni locali.

16. Risoluzione dei problemi

Qualsiasi modifica dalle istruzioni operative può comportare risultati di colorazione inferiori o a nessuna colorazione. Fare riferimento a www.Zytovision.com per altre informazioni.

Segnali deboli o mancanti

Possibile causa	Azione
Trattamento proteolitico non condotto in modo adeguato	Ottimizzare il tempo di incubazione in pepsina, aumentandolo o diminuendolo, se necessario
Evaporazione della sonda	Se si utilizza l'ibridatore, è obbligatorio l'utilizzo di strisce umide o di tuniche preimpilate d'acqua. Se si utilizza una stufa d'ibridazione, usare una camera umida. Inoltre il coprioggetto deve essere completamente sigillato, per esempio con Fixogum, per prevenire che il campione si asciughi durante l'ibridazione
Insufficiente preparazione del substrato cromogenico	Invece di utilizzare una goccia di DAB Solution A, utilizzare 30 µl
Il tempo di controcolorazione è troppo lungo	Evitare una controcolorazione scura perché potrebbe oscurare segnali positivi della colorazione
Il lavaggio della controcolorazione non avviene correttamente	Utilizzare acqua di fonte fredda per lavare: non utilizzare acqua tiepida o calda o reagenti di lavaggio.

Segnali troppo forti

Possibile causa	Azione
Trattamento proteolitico non condotto in modo adeguato	Ottimizzare il tempo di incubazione in pepsina, aumentandolo o diminuendolo, se necessario
La reazione del substrato è troppo intensa	Ridurre il tempo di incubazione del substrato; non scaldare la soluzione del substrato oltre i 25 °C; incubare solo a temperatura ambiente

Segnali sbiaditi o fusi

Possibile causa	Azione
È stato utilizzato un mezzo di montaggio non idoneo	Utilizzare solo mezzi di montaggio forniti con il kit o mezzi di montaggio a base di xilene privi di impurezze. Non utilizzare il nastro coprioggetto.

Colorazione debole non uniforme o solo in alcune porzioni

Possibile causa	Azione
Sparaffinatura incompleta	Utilizzare soluzioni fresche; controllare la durata della sparaffinatura
Il volume del reagente è troppo piccolo	Assicurarsi che il volume del reagente sia sufficiente a ricoprire l'area del tessuto

Risultati inconsistenti

Possibile causa	Azione
Asciugatura insufficiente prima dell'applicazione della sonda	Aumentare i tempi di asciugatura

Troppa acqua / tampone di lavaggio sul tessuto prima dell'applicazione della pepsina, degli anticorpi o dei substrati	Assicurarsi che l'eccesso di liquido sia rimosso dalla sezione di tessuto tamponando o sgocciolando il vetrino. Piccoli quantitativi di acqua residua o di tampone di lavaggio non interferiscono con il test
Variazioni nella fissazione del tessuto o nel metodo di inclusione	Ottimizzare i metodi di fissazione e inclusione
Variazione dello spessore delle sezioni tissutali	Ottimizzare il taglio

Morfologia degradata

Possibile causa	Azione
Il campione cellulare o tissutale non è stato fissato correttamente	Ottimizzare il tempo di fissazione e il fissativo
Pretrattamento proteolitico non condotto per un tempo adeguato	Diminuire il tempo di incubazione in pepsina

Segnali di cross ibridazione; rumori di fondo

Possibile causa	Azione
Sezioni asciutte durante o post ibridazione	Evitare che le sezioni si asciughino; utilizzare una camera umida e sigillare adeguatamente i vetrini
Tempo di incubazione del substrato prolungato	Diminuire il tempo di incubazione del substrato
Sparaffinatura incomplete	Utilizzare soluzioni fresche; controllare la durata della sparaffinatura
Pretrattamento proteolitico troppo forte	Ottimizzare il tempo di incubazione in pepsina
Vetrini raffreddati a temperature ambiente prima dell'ibridazione	Trasferire rapidamente i vetrini alla temperatura di ibridazione

Nuclei sovrapposti

Possibile causa	Azione
Inadeguato spessore della sezione di tessuto	Preparare sezioni al microto dello spessore di 3-5 µm

Campione galleggiante sul vetrino

Possibile causa	Azione
Pretrattamento proteolitico troppo forte	Ridurre il tempo di incubazione in pepsina

17. Letteratura

- 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. Revisione



www.Zytovision.com

Fare riferimento al sito www.Zytovision.com per le istruzioni d'uso più recenti e per le istruzioni d'uso nelle diverse lingue.

I nostri esperti sono disponibili per rispondere alle vostre domande.
Contattare per cortesia helptech@zytovision.com



ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/ Germania
Tel.: +49 471 4832-300
Fax: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
Email: info@zytovision.com

Marchi registrati:

ZytoVision® e ZytoDot® sono marchi registrati da ZytoVision GmbH.