



ZytoDot 2C  
SPEC ERBB2/CEN 17 Probe Kit

REF	C-3022-10	Σ 10
REF	C-3022-40	Σ 40

Kvalitatīvai cilvēka ERBB2 gēna amplifikāciju un hromosomas 17 alfa satelītu noteikšanai ar hromogēno in situ hibridizāciju (CISH)

4250380N467W



In vitro diagnostikas medicīnas ierīce  
saskaņā ar IVDR (ES) 2017/746

1. Paredzētais mērķis

ZytoDot 2C SPEC ERBB2/CEN 17 Probe Kit ir paredzēts kvalitatīvai cilvēka ERBB2 gēna amplifikāciju noteikšanai, kā arī hromosomas 17 alfa satelītu noteikšanai formalinā fiksētos, parafinā iestrādātos paraugos, piemēram, krūts vēža gadījumā, izmantojot hromogēno in situ hibridizāciju (CISH).

Produkts ir paredzēts tikai profesionālai lietošanai. Visi testi, kuros izmanto šo produktu, jāveic sertificētā, licencētā anatomiskās patoloģijas laboratorijā, patologa/cilvēka ģenētiķa uzraudzībā, ko veic kvalificēts personāls.

Zondi paredzēts izmantot kā palīg līdzekli krūts vēža diferenciāldiagnostikā, un, pamatojoties tikai uz testa rezultātu, nevajadzētu uzsākt terapeitiskus pasākumus.

2. Testa princips

Hromogēnās in situ hibridizācijas (CISH) metode ļauj noteikt un vizualizēt specifiskas nukleīnskābju sekvenču šūnu preparātos. Ar haptēniem marķēti nukleotīdu fragmenti, tā sauktās CISH zondes, un to komplementārās mērķa sekvenču preparātos tiek kopdenaturētas un pēc tam hibridizācijas laikā tiek atdalītas. Pēc tam nespecifiskos un nesaisītos zondes fragmentus noņem ar stingrām mazgāšanas darbībām. Marķētās zondes dubkļa veidošanās var vizualizēt, izmantojot primārās (nemarkētās) antivielas, ko nosaka ar sekundārajām polimerizētajām enzīmu konjugētajām antivielām. Enzīmu reakcija ar hromogēniem substrātiem izraisa krāsainu nogulšņu veidošanos. Pēc kodola iekrāsošanas ar kodola krāsvielu hibridizētos zondes fragmentus vizualizē gaismas mikroskopijā.

3. Sniegtie reaģenti

ZytoDot 2C SPEC ERBB2/CEN 17 Probe Kit ir pieejams divos izmēros, un to veido:

Kods	Sastāvdaļa	Daudzums		Konteiners
		40	10	
PT2	Heat Pretreatment Solution EDTA	500 ml	150 ml	Pudele ar skrūvējamu vāciņu (liela)
ES1	Pepsin Solution	4 ml	1 ml	Pudele ar pilienu, balts vāciņš
PD12	ZytoDot 2C SPEC ERBB2/CEN 17 Probe	0.4 ml	0.1 ml	Reakcijas trauks, brūns vāks
WB1	Wash Buffer SSC	560 ml	210 ml	Pudele ar skrūvējamu vāciņu (liela)
WB5	20x Wash Buffer TBS	2x 50 ml	50 ml	Pudele ar skrūvējamu vāciņu
AB14	Anti-DIG/DNP-Mix	4 ml	1 ml	Pudele ar pilienu, dzeltens vāciņš
AB13	HRP/AP-Polymer-Mix	4 ml	1 ml	Pudele ar pilienu, zils vāciņš
SB6a	AP-Red Solution A	0.4 ml	0.1 ml	Pudele ar pilienu, sarkans vāciņš (mazs)
SB6b	AP-Red Solution B	15 ml	4 ml	Pudele ar pilienu, sarkans vāciņš
SB7a	HRP-Green Solution A	0.8 ml	0.2 ml	Pudele ar pilienuzaļš vāciņš (mazs)
SB7b	HRP-Green Solution B	15 ml	4 ml	Pudele ar pilienu, zaļš vāciņš
CS2	Nuclear Blue Solution	20 ml	4 ml	Pudele ar skrūvējamu vāciņu, melna
MT4	Mounting Solution (alcoholic)	4 ml	1 ml	Stikla pudele, brūna
	AP-Red reaction vessel	2	1	Graduēta glāze ar sarkanu vāciņu
	HRP-Green reaction vessel	2	1	Graduēta glāze, zaļš vāciņš
	Lietošanas instrukcija	1	1	

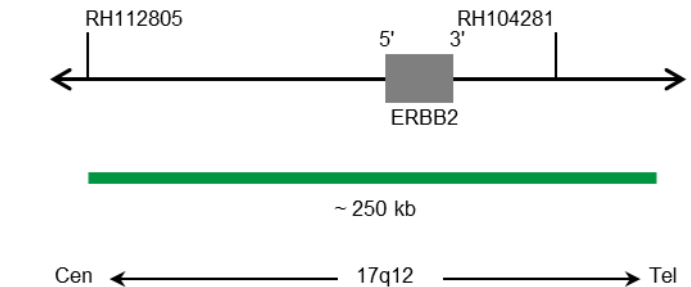
**C-3022-10 (10 testi):** Sastāvdaļas **ES1, AB14, AB13, SB6a-b, SB7a-b, CS2** un **MT4** ir pietiekamas 10 reakcijām. Komponenti **PT2** ir pietiekams 2 krāsošanas burkāms pa 70 ml katrā. Komponenta **WB1** pietiek 3 krāsošanas burciņām pa 70 ml katrā. **WB5** komponents ir pietiekams 14 krāsošanas burciņām pa 70 ml katrā.

**C-3022-40 (40 testi):** Sastāvdaļas **PD12, ES1, AB14, AB13, SB6a-b, SB7a-b, CS2** un **MT4** ir pietiekamas 40 reakcijām. Komponenti **PT2** ir pietiekams 7 krāsošanas burkāms pa 70 ml katrā. Komponenta **WB1** pietiek 8 krāsošanas burciņām pa 70 ml katrā. **WB5** komponents ir pietiekams 28 krāsošanas burciņām pa 70 ml katrā.

ZytoDot 2C SPEC ERBB2/CEN 17 Probe (**PD12**) sastāv no:

- Ar digoksigenīnu iezīmēti polinukleotīdi (~1,1 ng/μl), kas ir vērsti pret sekvenčām, kas atrodas 17q12\* (chr17:37,725,661-37,973,541), kurā atrodas ERBB2 gēna reģions (skatīt 1. attēlu).
- Dinitrofenil-marķēti polinukleotīdi (~1,1 ng/μl), kas ir vērsti uz sekvenčām, kas kartētas 17p11.1-q11.1, kas raksturīgas 17. hromosomas alfa satelīta centromeriskajam reģionam D17Z1 (skatīt 1. attēlu).
- Hibridizācijas buferis uz formamīda bāzes

\*askaņā ar Cilvēka genoma asambleju GRCh37/hg19



1. attēls: SPEC ERBB2 Zondes karte (bez mēroga)

#### 4. Nepieciešamie, bet nepiegādātie materiāli

- Pozitīvās un negatīvās kontroles paraugi
- Mikroskopa priekšmetstikliņi, pozitīvi lādēti
- Ūdens vanna (80 °C, 98 °C)
- Hibridizers vai karstā plate
- Hibridizators vai mitruma kamera hibridizācijas krāsnī
- Regulējamas pipetes (10 µl, 1000 µl)
- Burku vai vannu krāsošana
- Taimeris
- Kalibrēts termometrs
- Etanols vai reagentu spirts
- Ksilols
- Metanols 100%
- Ūdeņraža peroksīds (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30%.
- Dejonizēts vai destilēts ūdens
- Pārklājumi (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Gumijas cements, piemēram, Fixogum Rubber Cement (Produkta Nr. E-4005-50/-125) vai līdzīgs.
- Atbilstoši uzturēts gaismas mikroskops (400-630x).

#### 5. Uzglabāšana un pārvietošana

Uzglabāt 2-8 °C temperatūrā vertikālā stāvoklī. Uzreiz pēc lietošanas atgriezt glabāšanas apstākļos. Nelietot reagentus pēc derīguma termiņa beigām, kas norādīts uz etiķetes. Produkts ir stabils līdz marķējumā norādītajam derīguma termiņam, ja ar to rīkojas atbilstoši.

#### 6. Brīdinājumi un piesardzības pasākumi

- Pirms lietošanas izlasiet lietošanas instrukciju!
- Neizmantojiet reagentus pēc derīguma termiņa beigām!
- Šis produkts satur veselībai kaitīgas un potenciāli infekciozas vielas (nelielā koncentrācijā un daudzumā). Izvairieties no tiešas saskares ar reagentiem. Veikt atbilstošus aizsardzības pasākumus (lietot vienreizlietojamus cimdus, aizsargbrilles un laboratorijas apģērbu)!
- Par jebkuru nopietnu negadījumu, kas noticis saistībā ar izstrādājumu, ziņojiet ražotājam un kompetentajai iestādei saskaņā ar vietējiem noteikumiem!
- Ja reagenti nonāk saskarē ar ādu, nekavējoties noskalojiet ādu ar lielu daudzumu ūdens!
- Profesionālam lietotājam pēc pieprasījuma ir pieejama materiālu drošības datu lapa.
- Neizmantojiet reagentus atkārtoti, ja vien atkārtota izmantošana nav skaidri atļauta!
- Izvairieties no paraugu savstarpējas piesārņošanas, jo tas var izraisīt kļūdainus rezultātus.
- Hibridizācijas un mazgāšanas laikā paraugiem nedrīkst ļaut nožūt.

#### Īpašs ES1 marķējums:

EUH208	Satur pepsin A. Var izraisīt alerģisku reakciju.
EUH210	Drošības datu lapa ir pieejama pēc pieprasījuma.

#### Bīstamības un piesardzības brīdinājumi attiecībā uz SB6a:

H412	Kaitīgs ūdens organismiem ar ilgstošām sekām.
P273	Izvairīties no izplatīšanas apkārtējā vidē

#### Bīstamības un piesardzības brīdinājumi AB13, AB14, PT2, SB7b, WB1 un WB5:

Bīstamību noteicošais komponents ir maisījums no: 5-hlor-2-metil-4-izotiazolīn-3-ons [EK Nr. 247-500-7] un 2-metil-2H-izotiazol-3-ons [EK Nr. 220-239-6] (3:1).



#### Uzmanību

H317	Var izraisīt alerģisku ādas reakciju.
P261	Izvairīties ieelpot putekļus/tvaikus/gāzi/dūmus/izgarojumus/smīdināju mu.
P272	Piesārņoto darba apģērbu neiznest ārpus darba telpām.
P280	Izmantot aizsargcimdus/aizsargapģērbu un acu aizsargus/sejas aizsargus.
P302+P352	SASKARĒ AR ĀDU: Nomazgāt ar lielu ūdens daudzumu.
P333+P313	Ja rodas ādas iekaisums vai izsitumi: lūdziet mediķu palīdzību.
P362+P364	Novilkt piesārņoto apģērbu un pirms atkārtotas lietošanas izmazgāt.

#### Bīstamības un piesardzības brīdinājumi attiecībā uz SB7a

Bīstamību noteicošās sastāvdaļas ir metanols un ūdeņraža peroksīda šķīdums 30 %.



#### Bīstami

H225	Viegli uzliesmojošs šķīdums un tvaiki.
H301+H311+H331	Toksisks, ja norīts, saskaras ar ādu vai iekļūst elpceļos.
H370	Rada orgānu bojājumus.
P210	Turēt pietiekamā attālumā no karstuma avotiem, karstām virsmām, dzirkstelēm, atklātas liesmas un citiem aizdegšanās avotiem. Nesmēķēt.
P233	Tvertni stingri noslēgt.
P260	Neieelpot putekļus/tvaikus/gāzi/dūmus/izgarojumus/smīdināju mu.
P280	Izmantot aizsargcimdus/aizsargapģērbu/acu aizsargus/sejas aizsargus/dzirdes Aizsarglīdzekļus.
P308+P311	JA saskaras vai saistīts ar: sazinieties ar SAINĒŠANĀS INFORMĀCIJAS CENTRU/ārstu.
P403+P235	Glabāt labi vēdināmās telpās. Turēt vēsumā.

#### Bīstamības un piesardzības brīdinājumi attiecībā uz PD12:

Bīstamību noteicošais komponents ir formamīds.



#### Bīstamība

H351	Aizdomas par vēža izraisīšanu.
H360FD	Var kaitēt auglībai. Var kaitēt nedzimušajam bērnam.
H373	Ilgstoša vai atkārtota iedarbība var izraisīt orgānu bojājumus.
P201	Pirms lietošanas saņemiet īpašus norādījumus.

P202	Nestrādājiet ar to, kamēr nav izlasīti un izprasti visi drošības pasākumi.
P260	Neelpot putekļus/dūmus/gāzi/smidzeni/tvaikus/smidzeni.
P280	Valkājiet aizsargcimdus/aizsargapģērbu/acu/ sejas aizsardzību.
P308+P313	Ja ir apdraudēta vai ir bažas: Saņemiet medicīnisku padomu/pievērsiet uzmanību.
P405	Veikals ir aizslēgts.

## CS2 bīstamības un piesardzības norādījumi:

Bīstamību noteicošās sastāvdaļas ir etandiols un etilēnglikols.



### Uzmanību

H373	Norīšanas gadījumā, ja negatīvā ietekme ir ilgstoša vai atkārtota, var izraisīt nieru bojājumus.
P260	Neieelpot putekļus/tvaikus/gāzi/dūmus/izgarojumus/smīdinājumu.
P314	Lūdziet palīdzību mediķiem, ja jums ir slikta pašsajūta.

## Bīstamības un piesardzības paziņojumi attiecībā uz MT4:

Bīstamību noteicošais komponents ir ksilols.



### Uzmanību

H226	Uzliesmojošs šķidrums un tvaiki.
H312+H332	Kaitīgs saskarē ar ādu vai ja iekļūst elpceļos.
H315	Kairina ādu.
H319	Izraisa nopietnu acu kairinājumu.
H335	Var izraisīt elpceļu kairinājumu.
H373	Var izraisīt orgānu bojājumus ilgstošas vai atkārtotas iedarbības rezultātā..
P210	Turēt pietiekamā attālumā no karstuma avotiem, karstām virsmām, dzirkstelēm, atklātas liesmas un citiem aizdegšanās avotiem. Nesmēķēt..
P260	Neieelpot putekļus/tvaikus/gāzi/dūmus/izgarojumus/smīdinājumu.
P280	Izmantot aizsargcimdus/aizsargapģērbu un acu aizsargus/sejas aizsargus.
P305+P351+P338	SASKARĒ AR ACĪM: Uzmanīgi izskalot ar ūdeni vairākas minūtes. Izņemt kontaktlēcas, ja tās ir ievietotas un ja to var vienkārši izdarīt. Turpināt skalot.
P337+P313	Ja acu iekaisums nepāriet: lūdziet mediķu palīdzību.
P403+P235	Glabāt labi vēdināmās telpās. Turēt vēsumā.
EUH208	Satur metilmetakrilāts; metil 2-metilpropenoāts-2; metil 2-metilpropenoāts, n-butilmetakrilāts. Var izraisīt alerģisku reakciju.

## 7. Ierobežojumi

- Lietošanai *in vitro* diagnostikā.
- Tikai profesionālai lietošanai.
- Tikai neautomatizētai lietošanai.
- Pozitīva krāsojuma vai tā neesamības klīniskā interpretācija jāveic, ņemot vērā klīnisko anamnēzi, morfoloģiju, citus histopatoloģiskos kritērijus, kā arī citus diagnostiskos testus. Kvalificēta patologa/cilvēka ģenētiķa pienākums ir pārzināt CISH zondes, reaģentus, diagnostikas paneļus un metodes, ko izmanto, lai iegūtu krāsoto preparātu. Krāsošana jāveic sertificētā, licencētā laboratorijā patologa/cilvēka ģenētiķa uzraudzībā, kurš ir atbildīgs par iekrāsoto priekšmetstikliņu pārskatīšanu un pozitīvās un negatīvās kontroles atbilstības nodrošināšanu.

- Parauga krāsošana, jo īpaši signāla intensitāte un fona krāsojums, ir atkarīga no parauga apstrādes un apstrādes pirms krāsošanas. Nepareiza fiksācija, sasaldēšana, atkausēšana, mazgāšana, žāvēšana, sildīšana, griezumus veidošana vai piesārņojums ar citiem paraugiem vai šķidrumiem var radīt artefaktus vai kļūdainus rezultātus. Neatbilstošus rezultātus var izraisīt fiksācijas un iestrādes metožu atšķirības, kā arī paraugam raksturīgi nelidzenumi.
- Zondi drīkst izmantot tikai 3. nodaļā aprakstīto lokusu noteikšanai. "Piegādātie reaģenti".
- Darbība tika validēta, izmantojot šajā lietošanas instrukcijā aprakstītās procedūras. Šo procedūru modifikācijas var mainīt veikspēju, un tās ir jāapstiprina lietotājam. Šis IVD ir sertificēts kā CE tikai tad, ja to lieto, kā aprakstīts šajā lietošanas instrukcijā, atbilstoši paredzētajam lietojumam.

## 8. Vietas, kas rada traucējumus

Ar ISH nav saderīgi šādi fiksatori:

- Buēna fiksatīvs
- B5 fiksators
- Skābie fiksatori (piemēram, pikronskābe).
- Zenkera fiksatīvs
- Alkoholi (ja tos lieto atsevišķi)
- Dzīvsudraba hlorīds
- Formaldehīda/cinka fiksators
- Olanda fiksatīvs līdzeklis
- Nebuferēts formalīns

## 9. Paraugu sagatavošana

Ieteikumi:

- Ieteikumi: Izvairieties no paraugu savstarpējas piesārņošanas jebkurā sagatavošanas posmā, jo tas var novest pie kļūdainiem rezultātiem.
- Fiksēšana 10 % neitrāli buferētā formalinā 24 h istabas temperatūrā (18-25 °C).
- Parauga izmērs ≤ 0,5 cm<sup>3</sup>.
- Izmantot augstākās kvalitātes parafinu.
- Ievietošana jāveic temperatūrā, kas zemāka par 65 °C.
- Sagatavot 3-5 μm mikrotoma griezumus.
- Izmantojiet pozitīvi uzlādētus mikroskopa priekšmetstiklīņus.
- Fiksējiet audu sekcijas 2-16 h 50-60 °C temperatūrā.

## 10. Ierīces sagatavošanas apstrāde

20x Wash Buffer TBS (WB5) jāgatavo saskaņā ar 11. punktā sniegtajiem norādījumiem. " Analīzes procedūra". Visi pārējie komplekta reaģenti ir gatavi lietošanai. Reaģenti nav jāatjauno, jāsaļauc vai jāatšķaida. Pirms lietošanas zondi jāuzsilda istabas temperatūrā (RT) un īsi jāsaļauc.

## 11. Analīzes procedūra

### 11.1 1 diena

#### Sagatavošanās pasākumi

- Sagatavojiet etanola sēriju (70 %, 90 % un 100 % etanola šķīdumus): Atšķaidīt 100% etanolu ar dejonizētu vai destilētu ūdeni. Šos šķīdumus var uzglabāt piemērotos traukos, un tos var izmantot atkārtoti.
- Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2): Uzkarsē līdz 98 °C nosegtā trauciņā.
- 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sagatavošana: Atšķaidīt 1 daļu 30% 9 daļās 100% metanola.
- ZytoDot 2C CISH Probe: Pirms lietošanas nogatavināt istabas temperatūrā.

#### Priekšapstrāde (devaskāšana/proteolīze)

- Inkubējiet priekšmetstiklīņus 10 minūtes 70 °C temperatūrā (piemēram, uz karstās plātes).
- 2 x 5 min inkubējiet priekšmetstiklīņus ksilolā.
- Inkubējiet priekšmetstiklīņus 3x 3 min 100% etanolā.
- Slaidus 5 min inkubē 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Slaidus mazgā 2x 1 min dejonizētā vai destilētā ūdenī.
- 15 min inkubēt iepriekš uzsildītā Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2) 98 °C temperatūrā.

*Katrā krāsošanas burcīnā izmantojiet astoņus priekšmetstiklīņus (vajadzības gadījumā pievienojiet mākslīgos priekšmetstiklīņus).*

7. Tūlīt pārnēs priekšmetstiklīņus uz dejonizētu vai destilētu ūdeni un mazgā 2x 2 min.
8. Uz paraugiem uzklāj (pilienu veidā) Pepsin Solution (ES1) un inkubē 5-15 min 37 °C temperatūrā mitruma kamerā.

**ES1 var veidot nogulsnes, kas neietekmē kvalitāti.**

Parasti mēs iesakām noskaidrot optimālo proteolīzes laiku iepriekšējos testos.

9. Immerse slides in deionized or distilled water.
10. Dehydration in: 70%, 90%, and 100% ethanol, each for 1 min.
11. Air dry sections.

**Piezīme:** Pirms zondes uzklāšanas pārliecinieties, ka sekcijas ir pilnībā izžāvētas.

### Denaturēšana un hibridizācija

1. Uz katra iepriekš apstrādātā parauga ar pipeti uzpildiniet 10 µl zondes.
2. Pārklājiet paraugus ar 22 mm x 22 mm pārklājplāksnīti (izvairieties no iesprūdušiem burbuļiem) un aiztaisiet pārklājplāksnīti.

**Aizlīmēšanai ieteicams izmantot gumijas cementu (piemēram, Fixogum).**

3. Novietojiet priekšmetstiklīņus uz karstās plates vai hibridizatora un denaturējiet paraugus 5 minūtes 79 °C temperatūrā.
4. Pārvietojiet priekšmetstiklīņus mitruma kamerā un hibridizējiet uz nakti 37°C temperatūrā (piemēram, hibridizācijas krāsni).

**Ir svarīgi, lai hibridizācijas laikā paraugi neizžūtu.**

### 11.2 2. diena

#### Sagatavošanās pasākumi

1. Wash Buffer SSC (WB1): Uzkaršē līdz 80 °C pārklātā trauciņā. **WB1** var veidot nogulsnes 2-8 °C temperatūrā, kas neietekmē kvalitāti un karsējot izšķīst.
2. 1x Wash Buffer TBS pagatavošana: Atšķaidiet 1 daļu 20x Wash Buffer TBS (WB5) 19 daļās dejonizēta vai destilēta ūdens.

**Atšķaidītais 1x Wash Buffer TBS ir stabils vienu nedēļu, ja to uzglabā 2-8°C temperatūrā.**

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): Pirms lietošanas nogatavināt istabas temperatūrā.

**Sastāvdaļas SB7a un SB7b var veidot nogulsnes, kas neietekmē krāsošanas kvalitāti.**

#### Post-hybridization and detection

##### Pēchibridizācija un noteikšana

1. Rūpīgi noņem gumijas cementu vai līmi.
2. Noņemiet vāku, iegremdējot priekšmetstiklīņus Wash Buffer SSC (WB1) istabas temperatūrā uz 5 min.

**WB1 var izmantot atkārtoti vienu reizi. Uzglabāt 2-8 °C temperatūrā ne ilgāk kā vienu nedēļu.**

3. 5 min mazgājiet priekšmetstiklīņus Wash Buffer SSC (WB1) 80 °C temperatūrā.

**Vienā krāsošanas burciņā izmantot astoņus priekšmetstiklīņus (vajadzības gadījumā pievienot mākslīgos priekšmetstiklīņus).**

4. 2 reizes 1 min. mazgājiet priekšmetstiklīņus dejonizētā vai destilētā ūdenī.
5. Iegremdējiet priekšmetstiklīņus 1x Wash Buffer TBS.
6. Uzklājiet uz priekšmetstiklīņiem Anti-DIG/DNP-Mix (AB14) (1-2 pilieni uz priekšmetstiklīņa) un 15 min inkubējiet 37 °C temperatūrā mitruma kamerā.
7. Mazgājiet priekšmetstiklīņus 3x 1 min 1x Wash Buffer TBS.
8. Uzklājiet HRP/AP-Polymer-Mix (AB13) (1-2 pilieni uz priekšmetstiklīņa) un inkubēt 15 min 37 °C temperatūrā mitruma kamerā.
9. Mazgājiet priekšmetstiklīņus 3x 1 min 1x Wash Buffer TBS.
10. Sagatavojiet AP-Red Solution (darba šķīdumu): iepildiet 1 ml AP-Red Solution B (**SB6b**) graduētā glāzītē un pievienojiet vienu pilienu (30 µl) AP-Red Solution A (**SB6a**). Labi samaisa.
11. Uzklājiet uz priekšmetstiklīņiem AP-Red Solution (1-2 pilieni uz priekšmetstiklīņa) un 10 minūtes inkubējiet tumsā istabas temperatūrā.
12. Inkubācijas laikā pagatavojiet HRP-Green Solution (darba šķīdumu): iepildiet 1 ml HRP-Green Solution B (SB7b) graduētā glāzē un

pievienojiet divus pilienus (2x 20 µl) HRP-Green Solution A (SB7a). Labi samaisa.

13. 2 minūtes mazgājiet priekšmetstiklīņus dejonizētā vai destilētā ūdenī.
14. Uzklājiet HRP-Green Solution pilienu pa pilienam (1-2 pilieni uz priekšmetstiklīņa) uz priekšmetstiklīņiem un 10 min inkubējiet tumsā istabas temperatūrā.
15. 2 min. mazgājiet priekšmetstiklīņus dejonizētā vai destilētā ūdenī.
16. Paraugus 2 min kontrastkrāso ar Nuclear Blue Solution (CS2).
17. Transfer slides into a staining jar and wash 2 min under cold running tap water.
18. Dehydrate 3x 30 s in 100% ethanol (use very pure ethanol).
19. Inkubēt priekšmetstiklīņus 2x 30 s ksilolā (izmantojot ļoti tīru ksilolu).

**Nepagarināt vai nesāsināt inkubācijas laiku, jo tas var izraisīt signālu zudumu!**

20. Avoiding trapped bubbles, cover the samples with a coverslip (22 mm x 22 mm; 24 mm x 32 mm) by using Mounting Solution (alcoholic) (MT4). Allow 20-30 min for the coverslip to become immobilized.

**Pipetēšanas procesu var atvieglot, izmantojot pipetes uzgalīti, kas ir nogrieztas, lai palielinātu atveres izmēru.**

21. Novērtējiet iekrāsotos paraugus, izmantojot gaismas mikroskopu.

### 12. Rezultātu interpretācija

Ar digoksigenīnu iezīmētu polinukleotīdu hibridizācijas signāli parādās kā tumši zaļas krāsas atšķirīgi punkti (ERBB2 gēna reģions), bet ar dinitrofenilu iezīmēti polinukleotīdi parādās kā spilgti sarkanas krāsas atšķirīgi punkti (CEN 17).

**Normāla situācija:** Normālu šūnu vai šūnu, kurās nav amplifikācijas, kas skar ERBB2 gēna reģionu, starpfāzēs parādās divi skaidri punktveida zaļi un divi skaidri punktveida sarkani signāli (skatīt 2. attēlu).

**Neparasta situācija:** Šūnās ar ERBB2 gēna reģiona amplifikāciju novērots palielināts zaļo signālu vai zaļo signālu kopu skaits (sk. 2. attēlu).

**Pārklājošies signāli var parādīties kā brūni signāli.**

Normālas šūnas	ERBB2 amplifikācija zemā līmenī	Augsta līmeņa ERBB2 amplifikācija

2. attēls: Paredzamie rezultāti normālos un aberantos kodolos

Dažos patoloģiskos paraugos var novērot citus signālu modeļus, kas nav iepriekš aprakstīti. Šie negaidītie signālu modeļi ir jāizpēta sīkāk.

#### Lūdzu, ņemiet vērā:

- Dekondensētā hromatīna dēļ atsevišķi CISH signāli var parādīties kā nelieli signālu klasteri. Tādējādi divi vai trīs vienāda lieluma signāli, kurus šķir attālums ≤ 1 signāla diametrs, jāuzskata par vienu signālu.
- Pirms signālu uzskaitīšanas paraugs jāskenē, lai noteiktu iespējamo intratumorālo heterogenitāti 100 līdz 200 reizes palielinājumā.
- Signālu vizualizācija jāveic vismaz ar 400kārtīgu palielinājumu, lai iegūtu labi redzamus signālus. Hromosomu pārrāvumus konstatējot, zondēm ieteicams izmantot 630kārtīgu palielinājumu. Neizmantojiet kontrastu uzlabojošas filtru lēcas, jo tas var izkropļot signāla krāsu. Lai iegūtu spilgtu krāsu signālus, atveriet diafragmu. Novērtējot kodolu, noteikti fokusējiet uz augšu un uz leju, jo sarkanie un zaļie signāli var atrasties viens virs otra.
- Neizvērtējiet nekrozes zonas, pārklājošos kodolus, pārāk sagremotus kodolus un kodolus ar vāju signāla intensitāti.
- Mitozes dēļ papildu signāli var būt redzami pat nelielā nelielā nelielā šūnu daļā. Reizēm parafinā iestrādātos paraugos griešanas artefaktu dēļ var būt novērojami kodoli ar iztrūkstošiem signāliem.



- Negatīvu vai nespecifisku rezultātu var izraisīt vairāki faktori (skatīt 16. nodaļu "Problēmu novēršana").
- Lai pareizi interpretētu rezultātus, lietotājam šis produkts pirms lietošanas diagnostikas procedūrās ir jāapstiprina saskaņā ar valsts un/vai starptautiskajām vadlīnijām.

13. Ieteicamās kvalitātes kontroles procedūras

Lai uzraudzītu apstrādāto paraugu un testa reaģentu pareizu darbību, katrai analīzei ir jābūt pievienotai iekšējai un ārējai kontrolei. Ja iekšējās un/vai ārējās kontroles neuzrāda atbilstošu krāsojumu, rezultāti ar pacienta paraugiem jāuzskata par nederīgiem.

**Iekšējā kontrole:** Ne-neoplastiskas šūnas paraugā, kurām ir normāls signāla modelis, piemēram, fibroblasti.

**Ārējā vadība:** Apstiprināti pozitīvie un negatīvie kontroles paraugi.

14. Veiktspējas raksturlielumi

14.1 Analītiskā veiktspēja

Analītiskā jutība:	100% (95% CI 98.5 – 100.0)
Analītiskā specifika:	100% (95% CI 97.0 – 100.0)

14.2 Klīniskā veiktspēja

Diagnostikas jutīgums:	91% (95% CI 86.0 – 95.0) pamatojoties uz divdimensiju modeli
Diagnostikas specifiskums:	97% (95% CI 93.0 – 99.0) pamatojoties uz divdimensiju modeli

15. Izmešana

Reaģentu iznīcināšana jāveic saskaņā ar vietējiem noteikumiem.

16. Problēmu novēršana

Jebkura novirze no lietošanas instrukcijām var novest pie sliktākiem krāsošanas rezultātiem vai arī pie tā, ka krāsošana vispār nenotiek. Sīkāku informāciju skatiet [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com).

vāji signāli vai to nav vispār

Iespējamais iemesls	Rīcība
Nepareizi veikta proteolītiskā pirmapstrāde	Optimizēt pepsīna inkubācijas laiku, vajadzības gadījumā to palielināt vai samazināt.
Zondes iztvaikošana	Ja izmantojat hibrīdizeru, obligāti jāizmanto slapjās svītras/ ar ūdeni piepildītas tvertnes. Izmantojot hibrīdizācijas krāsnī, obligāti jāizmanto mitruma kamera. Turklāt, lai novērstu parauga izžušanu hibrīdizācijas laikā, pārklājlapas pilnībā jāaizlīmē, piemēram, ar fiksogumu.
Pārāk ilgs pretkrāsošanas laiks	Izvairieties no tumša pretkrāsojuma, jo tas var aizēnot pozitīvos krāsošanas signālus.
Nepareizi veikta pretkrāsojuma zilināšana	Zilināšanai izmantojiet aukstu tekošu krāna ūdeni; nelietojiet siltu vai karstu ūdeni vai zilināšanas reaģentus.

Pārāk spēcīgi signāli

Iespējamais iemesls	Rīcība
Pārāk ilga proteolītiskā pirmapstrāde	Optimizēt pepsīna inkubācijas laiku, vajadzības gadījumā to palielināt vai samazināt.
AP-Red šķīduma inkubācijas laiks nav pareizs	Ja nepieciešams, inkubācijas laiku var saīsināt līdz 5 min. Substrāta šķīdumu nekarsēt augstāk par 25 °C; inkubēt tikai istabas temperatūrā.
HRP-zaļā šķīduma inkubācijas laiks nav pareizs	Ja nepieciešams, inkubācijas laiku var saīsināt līdz 7 min. Substrāta šķīdumu nekarsēt augstāk par 25 °C; inkubēt tikai istabas temperatūrā.

Pārāk vāji sarkanie signāli

Iespējamais iemesls	Rīcība
AP-Red šķīdums tika pakļauts spēcīgai tiešas gaismas iedarbībai	Sagatavojiet un izmantojiet AP-Red šķīdumu, pasargājot no spēcīgas tiešas gaismas.
AP-Red šķīdums tika sagatavots pārāk agri	Sagatavot pirms tūlītējas lietošanas
AP-Red šķīduma inkubācijas laiks nav pareizs	Ja nepieciešams, inkubācijas laiku var pagarināt līdz 15 min.
Nepietiekama hromogēnā substrāta sagatavošana	Nepalīdiniet A šķīduma tilpumu

Pārāk vāji zaļie signāli

Iespējamais iemesls	Rīcība
Pārāk ilgs mazgāšanas posmu inkubācijas laiks pēc krāsošanas ar HRP-Green.	Nepārsniedziet norādīto inkubācijas laiku
HRP-zaļā šķīduma inkubācijas laiks nav pareizs	Ja nepieciešams, inkubācijas laiku var pagarināt līdz 15 min.
Nepietiekama hromogēnā substrāta sagatavošana	Nepalīdiniet A šķīduma tilpumu

Signālu izžušana vai apvienošana

Iespējamais iemesls	Rīcība
Ir izmantots nepiemērots montāžas risinājums	Izmantojiet tikai komplektā iekļauto montāžas šķīdumu vai uz ksilēna bāzes gatavotus montāžas šķīdumus, kas nesatur nekādus piemaisījumus; neizmantojiet pārklājlapas lenti.
Sekcijas nebija pienācīgi dehidrētas	Izmantojiet svaigus etanola un ksilēna šķīdumus; izmantojiet tikai "tīras" kvalitātes ksilēnu.



**Nevienmērīgi vai dažviet tikai ļoti viegli traipi**

Iespējamais iemesls	Rīcība
Nepilnīga deparafinēšana	Izmantojiet svaigus šķīdumus; pārbaudiet deparafinēšanas ilgumu.
Pārāk mazs reaģenta tilpums	Pārliecinieties, ka reaģenta tilpums ir pietiekami liels, lai pārklātu audu laukumu.

**Neviendabīgi rezultāti**

Iespējamais iemesls	Rīcība
Nepietiekama žāvēšana pirms zondes uzklāšanas	Pagarināt žāvēšanu gaisā
Pārāk daudz ūdens/mazgāšanas bufera uz audiem pirms pepsīna, antivielu un/vai krāsu substrātu lietošanas.	Pārliecinieties, ka no audu griezumā ir noņemts liekais šķidrums, to noslaucot vai sakratot no priekšmetstikliņa. Nelieli ūdens/mazgāšanas bufera atlikumi netraucē testam.
Audu fiksācijas un iestrādāšanas metožu variācijas	Optimizēt fiksācijas un iestrādes metodes
Audu griezumā biezuma izmaiņas	Optimizēt griezumā sadalīšanu

**Morfoloģijas degradācija**

Iespējamais iemesls	Rīcība
Šūnu vai audu paraugs nav pareizi fiksēts	Optimizēt fiksācijas laiku un fiksatoru
Proteolītiskā pirmāpstrāde nav veikta pārāk ilgi	Pepsīna inkubācijas laika samazināšana

**Krustveida hibridizācijas signāli; trokšņains fons**

Iespējamais iemesls	Rīcība
Sekcijas izžuvušas jebkurā laikā hibridizācijas laikā vai pēc tās.	Izvairieties no sekciju izžūšanas; izmantojiet mitruma kameru; pienācīgi noslēdziet vāku.
Ilgāks substrāta inkubācijas laiks	Substrāta inkubācijas laika saīsināšana
Nepilnīga deparafinēšana	Izmantojiet svaigus šķīdumus; pārbaudiet deparafinēšanas ilgumu.
Pārāk spēcīga proteolītiskā pirmāpstrāde	Pepsīna inkubācijas laika optimizēšana
Slaidi pirms hibridizācijas atdzesēti līdz istabas temperatūrai	Ātri pārvietojiet priekšmetstikliņus hibridizācijas temperatūrā

**Signālu pārklāšanās**

Iespējamais iemesls	Rīcība
Neatbilstošs audu griezumā biezums	Sagatavojiet 3-5 μm mikrotoma griezumus

**Paraugs peld no priekšmetstikliņa**

Iespējamais iemesls	Rīcība
Pārāk spēcīga proteolītiskā pirmāpstrāde	Pepsīna inkubācijas laika saīsināšana

**17. Literatūra**

- 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.
- 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. Pārskatīšana**
[www.zytovision.com](http://www.zytovision.com)

Jaunākās lietošanas instrukcijas, kā arī lietošanas instrukcijas dažādās valodās skatīt [vietnē www.zytovision.com](http://www.zytovision.com).

Mūsu eksperti ir gatavi atbildēt uz jūsu jautājumiem.

Lūdzu, sazinieties ar [help@zytovision.com](mailto:help@zytovision.com)

Drošības un veikspējas kopsavilkumu skatiet šādā dokumentā [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com).



ZytoVision GmbH  
Fischkai 1  
27572 Bremerhäfena/ Vācija  
Tālrunis: +49 471 4832-300  
Fakss: +49 471 4832-509  
[www.zytovision.com](http://www.zytovision.com)  
E-pasts: [info@zytovision.com](mailto:info@zytovision.com)

**Preču zīmes:**

ZytoVision® un ZytoDot® ir ZytoVision GmbH preču zīmes.