



ZytoDot SPEC ERBB2 Probe Kit

REF C-3003-40

Σ 40

Na kvalitatívnu detekciu amplifikácií ľudského génu
ERBB2 pomocou chromogénnej *in situ* hybridizácie
(CISH)

4250380N297W



Diagnostická zdravotnícka pomôcka in vitro
podľa IVDR (EÚ) 2017/746

1. Zamýšľaný účel

Sonda ZytoDot SPEC ERBB2 Probe Kit je určená na kvalitatívnu detekciu amplifikácií ľudského génu ERBB2 vo vzorkách fixovaných formalínom a vložených do parafrínu, ako je napríklad rakovina prsníka, pomocou chromogénnej *in situ* hybridizácie (CISH). Sonda je určená na použitie v kombinácii so súpravou ZytoDot CISH Implementation Kit (č. C-3018-40).

Výrobok je určený len na profesionálne použitie. Všetky testy s použitím výrobku by mal vykonávať kvalifikovaný personál v certifikovanom, licencovanom laboratóriu anatomickej patológie pod dohľadom patológa/ľudského genetika.

Sonda je určená ako pomôcka pri diferenciálnej diagnostike rakoviny prsníka a terapeutické opatrenia by sa nemali začínať len na základe výsledku testu.

2. Princíp testu

Technika chromogénnej *in situ* hybridizácie (CISH) umožňuje detekciu a vizualizáciu špecifických sekvencií nukleových kyselín v bunkových preparátoch. Hapténom označené nukleotidové fragmenty, tzv. sondy CISH, a ich komplementárne cieľové sekvencie v preparátoch sú počas hybridizácie spoločne denaturované a následne sa nechajú hybridizovať. Potom sa nešpecifické a nenaviazané fragmenty sond odstránia premytím. Tvorbu duplexu značenej sondy možno vizualizovať pomocou primárnych (neoznačených) protilátok, ktoré sa detekujú pomocou sekundárnych polymerizovaných protilátok konjugovaných s enzýmom. Enzymatická reakcia s chromogénnymi substrátmi vedie k tvorbe farebných precipitátov. Po kontrastnom farbení jadra jadrovým farbivom sa hybridizované fragmenty sondy vizualizujú svetelným mikroskopom.

3. Poskytnuté reagenty

ZytoDot SPEC ERBB2 Probe Kit je k dispozícii v jednej veľkosti a pozostáva z:

Kód	Komponent	Množstvo	Kontajner
		Σ 40	
PT2	Heat Pretreatment Solution EDTA	500 ml	S fľaša so skrutkovacím uzáverom (veľká)
ES1	Pepsin Solution	4 ml	Fľaštička s kvapkadlom, biela čiapka
PD1	ZytoDot SPEC ERBB2 Probe	0,4 ml	Reakčná nádoba, hnedé veko
WB1	Wash Buffer SSC	560 ml	Fľaša so skrutkovacím uzáverom (veľká)
WB4	PBS/Tween	2x	Hliníkové balenie
BS1	Blocking Solution	4 ml	Fľaštička s kvapkadlom, oranžová čiapka
AB1	Mouse Anti-Dig	4 ml	Fľaštička s kvapkadlom, ružová čiapka
AB2	Anti-Mouse-HRP-Polymer	4 ml	Fľaštička s kvapkadlom, fialová čiapka
SB1a	DAB Solution A	0.3 ml	Fľaštička s kvapkadlom, zelená čiapka
SB1b	DAB Solution B	10 ml	Fľaštička s kvapkadlom, šedá čiapka
CS1	Mayer's Hematoxylin Solution	20 ml	Fľaša so skrutkovacím uzáverom, čierna
MT4	Mounting Solution (alcoholic)	4 ml	Sklenená fľaša, hnedá
	Návod na použitie	1	

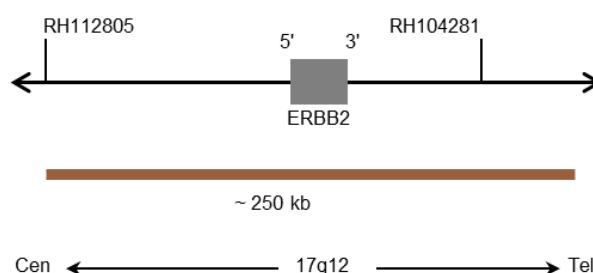
C-3003-40 (40 testov): Súčiastky **PD1**, **ES1**, **BS1**, **AB1**, **AB2**, **SB1a-b**, **CS1**, a **MT4** postačujú na 40 reakcií. Komponent **PT2** postačuje na 7 nádob na farbenie po 70 ml. Komponent **WB1** postačuje na 8 farbiacich nádobiek po 70 ml. Komponent **WB4** postačuje na 28 farbiacich nádobiek po 70 ml.

ZytoDot SPEC ERBB2 Probe Kit sa skladá z:

- Polynukleotidy značené digoxigenínom (~1,8 ng/μl), ktoré sú zamerané na sekvencie mapujúce oblasť 17q12* (chr17:37,725,661-37,973,541), v ktorej sa nachádza oblasť génu ERBB2 (pozri obr. 1).

- Hybridizačný pufer na báze formamidu

*podľa zhromaždenia ľudského genómu GRCh37/hg19



Obr. 1: SPEC ERBB2 Mapa sondy (bez mierky)

4. Požadované, ale neposkytované materiály

- ZytoDot CISH Implementation Kit (. C-3018-40)
- Pozitívne a negatívne kontrolné vzorky
- Mikroskopické sklíčka, kladne nabité
- Vodný kúpeľ (80 °C, 98 °C)
- Hybridizér alebo horúca platňa
- Hybridizátor alebo komora na udržiavanie vlhkosti v hybridizačnej peci
- Nastaviteľné pipety (10 μl, 1000 μl)
- Farbiace nádoby alebo kúpele
- Časovač
- Kalibrovaný teplomer
- Etanol alebo reagenčný alkohol

- Xylén
- Metanol 100%
- Peroxid vodíka (H₂O₂) 30%
- Deionizovaná alebo destilovaná voda
- Krycie sklíčka (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Gumové lepidlo, napr. Fixogum Rubber Cement (č. E-4005-50/-125) alebo podobné
- Primerane udržiavaný svetelný mikroskop (400-630x)

5. Skladovanie a manipulácia

Uchovávať pri teplote 2-8 °C vo zvislej polohe. Okamžite po použití vráťte do skladovacích podmienok. Nepoužívajte činidlá po dátume expirácie uvedenom na etikete. Produkt je stabilný do dátumu expirácie uvedeného na etikete, ak sa s ním zaobchádza primeraným spôsobom.

6. Upozornenia a bezpečnostné opatrenia

- Pred použitím si prečítajte návod na použitie!
- Nepoužívajte činidlá po uplynutí dátumu expirácie!
- Tento výrobok obsahuje látky (v nízkych koncentráciách a objemoch), ktoré sú zdraviu škodlivé a potenciálne infekčné. Vyhnite sa akémukoľvek priamemu kontaktu s činidlami. Vykonajte vhodné ochranné opatrenia (používajte jednorazové rukavice, ochranné okuliare a laboratórny odev)!
- Každý závažný incident, ku ktorému došlo v súvislosti s výrobkom, nahláste výrobcovi a príslušnému orgánu podľa miestnych predpisov!
- Ak sa činidlá dostanú do kontaktu s pokožkou, okamžite ju opláchnite veľkým množstvom vody!
- Pre profesionálnych používateľov je na požiadanie k dispozícii karta bezpečnostných údajov.
- Reagencie nepoužívajte opakovane, pokiaľ nie je opakované použitie výslovne povolené!
- Vyhnite sa krížovej kontaminácii vzoriek, pretože to môže viesť k chybným výsledkom.
- Počas hybridizácie a premývania sa vzorky nesmú nechať vyschnúť.

Špeciálne označenie ES1:

- EUH208 Obsahuje pepsin A. Môže vyvolať alergickú reakciu.
- EUH210 Na požiadanie možno poskytnúť kartu bezpečnostných údajov.

Výstražné a bezpečnostné upozornenia pre CS1 a WB4:

Zmes nie je klasifikovaná ako nebezpečná podľa nariadenia (ES) č. 1272/2008.

Výstražné a bezpečnostné upozornenia BS1, AB1, AB2, PT2, a WB1:

Zložka určujúca nebezpečenstvo je zmesou: 5-chlór-2-metyl-4-izotiazolín-3-ón [ES č. 247-500-7] a 2-metyl-2H-izotiazol-3-ón [ES č. 220-239-6] (3:1).



Pozor

- H317 Môže vyvolať alergickú kožnú reakciu.
- P261 Zabráňte vdychovaniu prachu/dymu/plynu/hmly/pár/aerosólov.
- P272 Je zakázané vynieť kontaminovaný pracovný odev z pracoviska.
- P280 Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre.
- P302+P352 PRI KONTAKTE S POKOŽKOU: umyte veľkým množstvom vody.
- P333+P313 Ak sa prejaví podráždenie pokožky alebo sa vytvoria vyrážky: vyhľadajte lekársku pomoc/starostlivosť.
- P362+P364 Kontaminovaný odev vyzlečte a pred ďalším použitím vyperte.

Výstražné a bezpečnostné upozornenia pre SB1a:

Zložkou určujúcou nebezpečenstvo je bifenyl 3,3',4,4'-tetrayltetraamín; diaminobenzidín.



Nebezpečenstvo

- H350 Môže spôsobiť rakovinu.
- P201 Pred použitím sa oboznámte s osobitnými pokynmi.
- P202 Nepoužívajte, kým si neprečítate a nepochopíte všetky bezpečnostné opatrenia.
- P280 Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre/prostriedky na ochranu sluchu.
- P308+P313 Po expozícii alebo podozrení z nej: Vyhľadajte lekársku pomoc/starostlivosť.
- P405 Uchovávať uzamknuté.

Výstražné a bezpečnostné upozornenia pre SB1b:

Zložkou určujúcou nebezpečenstvo je imidazol;

reakčná hmotnosť: (3:1): 5-chlór-2-metyl-4-izotiazolín-3-ón [ES č. 247-500-7] a 2-metyl-2H-izotiazol-3-ón [ES č. 220-239-6].



Nebezpečenstvo

- H317 Môže vyvolať alergickú kožnú reakciu.
- H360D Môže poškodiť nenarodené dieťa.
- P201 Pred použitím sa oboznámte s osobitnými pokynmi.
- P261 Zabráňte vdychovaniu prachu/dymu/plynu/hmly/pár/aerosólov.
- P280 Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre/prostriedky na ochranu sluchu.
- P302+P352 PRI KONTAKTE S POKOŽKOU: umyte veľkým množstvom vody.
- P308+P313 Po expozícii alebo podozrení z nej: Vyhľadajte lekársku pomoc/starostlivosť.
- P362+P364 Kontaminovaný odev vyzlečte a pred ďalším použitím vyperte.

Výstražné a bezpečnostné upozornenia pre MT4:

Nebezpečnou zložkou je xylén.

**Pozor**

H226	Horľavá kvapalina a pary.
H312+H332	Zdraviu škodlivý pri styku s kožou alebo pri vdýchnutí.
H315	Dráždi kožu.
H319	Spôsobuje vážne podráždenie očí.
H335	Môže spôsobiť podráždenie dýchacích ciest.
H373	Môže spôsobiť poškodenie orgánov pri dlhšej alebo opakovanej expozícii.
P210	Uchovávať mimo dosahu tepla, horúcich povrchov, iskier, otvoreného ohňa a iných zdrojov zapálenia. Nefajčiťe.
P260	Nevdychujte prach/dym/plyn/hmlu/pary/aerosóly.
P280	Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre.
P305+P351+P338	PO ZASIAHNUTÍ OČÍ: Niekoľko minút ich opatrne vyplachujte vodou. Ak používate kontaktné šošovky a je to možné, odstráňte ich. Pokračujte vo vyplachovaní.
P337+P313	Ak podráždenie očí pretrváva: vyhľadajte lekársku pomoc/starostlivosť.
P403+P235	Uchovávať na dobre vetranom mieste. Uchovávať v chlade.
EUH208	Obsahuje methyl 2-methylprop-2-enoate; methyl 2-methylpropenoate; methyl methacrylate, n-butyl methacrylate. Môže vyvolať alergickú reakciu.

Výstražné a bezpečnostné upozornenia pre PD1:

Komponent určujúcou nebezpečenstvo je formamid.

**Nebezpečenstvo**

H351	Podozrenie, že spôsobuje rakovinu.
H360FD	Môže poškodiť plodnosť. Môže poškodiť nenarodené dieťa.
H373	Môže spôsobiť poškodenie orgánov pri dlhodobej alebo opakovanej expozícii.
P201	Pred použitím si vyžiadať špeciálne pokyny.
P202	Nemanipulujte s ním, kým si neprečítate a nepochopíte všetky bezpečnostné opatrenia.
P260	Nevdychujte prach/dym/plyn/hmlu/výpary/sprej.
P280	Používajte ochranné rukavice/ochranný odev/ochranu očí/ochranu tváre.
P308+P313	Po expozícii alebo podozrení z nej: Vyhľadajte lekársku pomoc/starostlivosť.
P405	Skladujte uzamknuté.

7. Obmedzenia

- Na diagnostické použitie *in vitro*.
- Len na profesionálne použitie.
- Len na neautomatizované použitie.
- Klinická interpretácia akéhokoľvek pozitívneho farbenia alebo jeho neprítomnosti sa musí vykonať v kontexte klinickej anamnézy, morfológie, iných histopatologických kritérií, ako aj iných diagnostických testov. Kvalifikovaný patológ/humánny genetik je povinný poznať sondy CISH, reagenty, diagnostické panely a metódy používané na výrobu farbeného preparátu. Farbenie sa musí vykonávať v certifikovanom, licencovanom laboratóriu pod dohľadom patológa/humánneho genetika, ktorý je zodpovedný za preskúmanie farbených preparátov a zabezpečenie primeranosti pozitívnych a negatívnych kontrol.
- Zafarbenie vzorky, najmä intenzita signálu a zafarbenie pozadia, závisí od manipulácie so vzorkou a jej spracovania pred zafarbením. Nesprávna fixácia, zmrazenie, rozmrazenie, premývanie, sušenie, zahrievanie, rezanie alebo kontaminácia inými vzorkami alebo tekutinami môže spôsobiť artefakty alebo falošné výsledky. Nekonzistentné výsledky môžu byť dôsledkom rozdielov v metódach fixácie a vkladania, ako aj vnútorných nepravidielností vo vzorke.
- Sonda by sa mala používať len na detekciu lokusov opísaných v kapitole 3. "Dodávané činidlá".
- Výkon bol overený pomocou postupov opísaných v tomto návode na použitie. Úpravy týchto postupov môžu zmeniť výkon a musí ich overiť používateľ. Tento IVD je certifikovaný ako CE len vtedy, keď sa používa tak, ako je opísané v tomto návode na použitie v rozsahu určeného použitia.

8. Rušivé látky

Nasledujúce fixatíva sú nekompatibilné s ISH:

- Bouinovo fixačné činidlo
- Fixačné činidlo B5
- Kyslé fixačné prostriedky (napr. kyselina pikrová)
- Zenkerov fixatív
- Alkoholy (ak sa používajú samostatne)
- Chlorid ortuťnatý
- Formaldehydové/zinkové fixačné činidlo
- Hollandova fixácia
- Formálín bez pufru

9. Príprava vzoriek

Odporúčania:

- Vyhnite sa krížovej kontaminácii vzoriek v ktoromkoľvek kroku prípravy, pretože to môže viesť k chybným výsledkom.
- Fixácia v 10 % neutrálne pufovanom formalíne počas 24 hodín pri izbovej teplote (18 - 25 °C).
- Veľkosť vzorky ≤ 0.5 cm³.
- Používajte parafín prvotriednej kvality.
- Vkladanie by sa malo vykonávať pri teplotách nižších ako 65 °C.
- Pripravte rezy s veľkosťou 3 - 5 μm z mikrotomu.
- Použite pozitívne nabitú mikroskopickú sklička.
- Fixujte tkanivové rezy 2 - 16 hodín pri 50-60°C.

10. Prípravné ošetrenie zariadenia

PBS/Tween (WB4) sa má vopred upraviť podľa pokynov v časti 11. "Postup analýzy". Všetky ostatné činidlá súpravy sú pripravené na použitie. Nie je potrebná žiadna rekonštitúcia, miešanie ani riedenie.

Pred použitím uveďte sondu na izbovú teplotu (18 - 25 °C) a chráňte ju pred svetlom. Pred otvorením injekčnej liekovky premiešajte vortexovaním a krátko roztočte.

11. Postup analýzy

11.1 Deň 1

Prípravné kroky

- (1) *Prípravte sériu etanolu (70 %, 90 % a 100 % roztok etanolu):* Zriedte 100% etanol deionizovanou alebo destilovanou vodou. Tieto roztoky sa môžu uchovávať vo vhodných nádobách a môžu sa použiť opakovane.
 - (2) *Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2):* Zahrejte na 98 °C v zakrytej nádobe na farbenie.
 - (3) *Príprava 3% H₂O₂:* Zriedte 1 diel 30% H₂O₂ v 9 dieloch 100% metanolu.
 - (4) *ZytoDot CISH Probe:* Pred použitím ju uveďte do izbovej teploty (RT).
- Predúprava (odvskovanie/proteolýza)**
- (1) Sklíčka inkubujte 10 minút pri teplote 70 °C (napr. na horúcej platni).
 - (2) Sklíčka inkubujte 2x 5 minút v xyléne.
 - (3) Sklíčka inkubujte 3x 3 minút v 100 % etanole.
 - (4) Sklíčka inkubujte 5 min v 3% H₂O₂.
 - (5) Premyte sklíčka 2x 1 min v deionizovanej alebo destilovanej vode.
 - (6) Inkubujte 15 minút vo vopred zohriatom Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2) pri 98°C.

Použite osem sklíčok na jednu nádobu na farbenie (v prípade potreby pridajte fiktívne sklíčka)

- (7) inkubujte 15 min vo vopred zohriatom Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2) pri 98 °C, ihneď prelejte do deionizovanej alebo destilovanej vody a premyte 2x 2 min.
- (8) Naneste (po kvapkách) Pepsin Solution (ES1) na vzorku a inkubujte 5-15 min pri 37 °C vo vlhkej komore.

ES1 môže tvoriť zrazeniny, ktoré neovplyvňujú kvalitu Vo všeobecnosti odporúčame zistiť optimálny čas proteolýzy v predbežných testoch.

- (9) Sklíčka ponorte do deionizovanej alebo destilovanej vody.
- (10) Dehydratácia v: 70 %, 90 % a 100 % etanole, vždy po dobu 1 min.
- (11) Vysušenie rezov na vzduchu.

Poznámka: Pred aplikáciou sondy sa uistite, že rezy sú úplne suché.

Denaturácia a hybridizácia

- (1) Na každú vopred upravenú vzorku napipetujte 10 µl sondy ZytoDot CISH Probe.
- (2) Vzorky zakryte krycím sklíčkom s rozmermi 22 x 22 mm (zabráňte zachytávaniu bublín) a krycie sklíčko utesnite.

Na utesnenie odporúčame použiť gumový cement (napr. Fixogum).

- (3) Umiestnite sklíčka na horúcu platňu alebo hybridizátor a vzorky denaturujte 5 minút pri teplote 94 - 95 °C.
- (4) Sklíčka preneste do komory s vlhkosťou a hybridizujte cez noc pri 37 °C (napr. v hybridizačnej peci).

Je dôležité, aby vzorky počas hybridizačného kroku nevyschli.

11.2 Deň 2

Prípravné kroky

- (1) Wash Buffer SSC (WB1) Na premytie s príslym účinkom zahrejte na 80 °C v zakrytej nádobe na farbenie. **WB1** môže pri teplote 2 - 8 °C tvoriť zrazeniny, ktoré nemajú vplyv na kvalitu a mali by sa pri zahrievaní rozpustiť
- (2) *Príprava premývacieho pufra PBS/Tween:* Pridajte 1 tabletu PBS/Tween (WB4) do 1000 ml deionizovanej alebo destilovanej vody a rozpustite.

Premývaci tlmivý roztok PBS/Tween je pri skladovaní pri teplote 2 - 8 °C stabilný jeden týždeň.

- (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): Pred použitím sa upraví na izbovú teplotu.

Posthybridizácia a detekcia

- (1) Opatrne odstráňte gumový cement alebo lepidlo.
- (2) Odstráňte krycie sklíčko ponorením do Wash Buffer SSC (WB1) pri izbovej teplote na 5 min.

WB1 sa môže použiť jedenkrát. Uchovávať pri teplote 2 - 8 °C maximálne jeden týždeň.

- (3) Premývajte sklíčka 5 min v Wash Buffer SSC (WB1) pri teplote 80 °C. Na jednu nádobu na farbenie použite osem sklíčok (v prípade potreby pridajte fiktívne sklíčka).
- (4) Premyte sklíčka 2x 1 min v deionizovanej alebo destilovanej vode.
- (5) Ponorte sklíčka do Wash Buffer PBS/Tween.

- (6) Na sklíčka naneste Blocking Solution (BS1) (1-2 kvapky na sklíčko) a inkubujte 10 min pri RT.
- (7) Blocking Solution (BS1) odstráňte, **ale neoplachujte!**
- (8) Na sklíčka naneste Mouse-Anti-DIG (AB1) (1-2 kvapky na sklíčko) a inkubujte 30 min pri RT.
- (9) Premyte sklíčka 3x 1 min v PBS/Tween.
- (10) Na sklíčka naneste Anti-Mouse-HRP-Polymer (AB2) (1-2 kvapky na sklíčko) a inkubujte 30 min pri RT.
- (11) Premyte sklíčka 3x 1 min v PBS/Tween.
- (12) Pripravte roztok DAB (pracovný roztok): do odmerného pohára naplňte 1 ml DAB Solution B (SB1b) a pridajte jednu kvapku (30 µl) DAB Solution A (SB1a). Dobré premiešajte.
- (13) Roztok DAB (1 - 2 kvapky na sklíčko) naneste na sklíčka a inkubujte 30 min pri RT.
- (14) Preneste sklíčka do nádoby na farbenie a 2 min. ich premývajte pod studenou tečúcou vodou z vodovodu.
- (15) Vzorky na 5-10 sekúnd zafarbíte Mayer's Hematoxylin Solution (CS1).
- (16) Preložte preparáty do nádoby na farbenie a 2 minúty ich premývajte pod studenou tečúcou vodou z vodovodu.
- (17) Dehydratujte v: 70 %, 90 % a 100 % etanole, vždy po dobu 1 min.
- (18) Inkubujte sklíčka 2x 2 min v xyléne (použite veľmi čistý xylén).
- (19) Vyhňte sa zachyteným bublinkám, vzorky zakryte krycím sklíčkom (22 mm x 22 mm; 24 mm x 32 mm) pomocou Mounting Solution (alcoholic) (MT4). Nechajte 20 - 30 min, aby sa krycie sklíčko znehybnilo.

Použitie špičky pipety, ktorá bola odrezaná, aby sa zväčšil otvor, môže uľahčiť proces pipetovania.

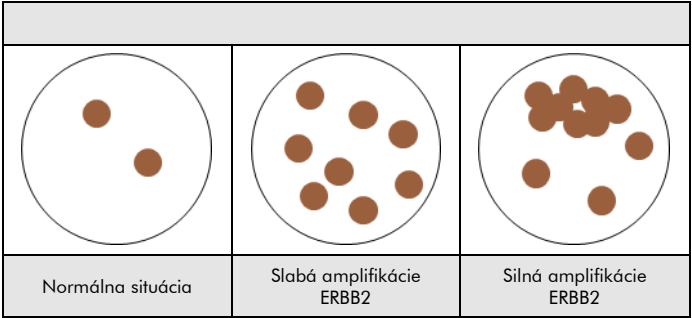
- (20) Vyhodnoťte zafarbené vzorky pomocou svetelnej mikroskopie.

12. Interpretácia výsledkov

Pri použití súpravy ZytoDot CISH Implementation Kit sa hybridizačné signály polynukleotidov značených digoxigenínom zobrazujú hnedo až tmavohnedo (oblast gény ERBB2).

Normálna situácia: V interfázach normálnych buniek alebo buniek bez amplifikácie zahŕňajúcej oblasť gény ERBB2 sa objavujú dva odlišné hnedé signály v tvare bodky (pozri obr. 2).

Neštandardná situácia: V bunkách s amplifikáciou oblasti gény ERBB2 alebo polyzómiou chromozómu 17 sa pozoruje zvýšený počet hnedých signálov alebo zhlukov hnedých signálov (pozri obr. 2).



Obr. 2: Očakávané výsledky v normálnych a aberantných jadrách

V niektorých abnormálnych vzorkách možno pozorovať iné vzory signálov, ako sú opísané vyššie. Tieto neočakávané vzory signálov by mali byť ďalej preskúmané.

Upozornenie:

- Vzhľadom na dekonenzovaný chromátín sa jednotlivé signály CISH môžu javiť ako malé zhluky signálov. Preto by sa dva alebo tri signály rovnakej veľkosti, oddelené vzdialenosťou ≤ 1 priemer signálu, mali považovať za jeden signál.
- Pred vyčíslením signálu by sa mala vzorka naskenovať kvôli prípadnej intratumorálnej heterogenite pri 100- až 200-násobnom zväčšení.
- Vizualizácia signálov by sa mala vykonávať aspoň pri 400- až 630-násobnom zväčšení, čo vedie k ľahko viditeľným signálom.
- Nehodnoťte oblasti nekrózy, prekrývajúcich sa jadier, nadmerne natrávených jadier a jadier so slabou intenzitou signálu.
- V dôsledku mitózy môžu byť ďalšie signály viditeľné aj v malom percente nenádorových buniek. Príležitostne sa môžu v parafínových



- vzorkách pozorovať jadrá s chýbajúcimi signálmi v dôsledku artefaktov pri rezaní.
- Negatívny alebo nešpecifický výsledok môže byť spôsobený viacerými faktormi (pozri kapitolu 16 "Riešenie problémov").
 - V záujme správnej interpretácie výsledkov musí používateľ tento výrobok pred použitím v diagnostických postupoch validovať podľa národných a/alebo medzinárodných smerníc.

13. Odporúčané postupy kontroly kvality

Na monitorovanie správneho fungovania spracovaných vzoriek a testovacích činidiel by mali byť ku každému testu pripojené interné a externé kontroly. Ak interné a/alebo externé kontroly nepreukážu vhodné zafarbenie, výsledky so vzorkami pacientov sa musia považovať za neplatné.

Interná kontrola: Nenádorové bunky vo vzorke, ktoré vykazujú normálny vzor signálu, napr. fibroblasty.

Externé ovládanie: Validované pozitívne a negatívne kontrolné vzorky.

14. Výkonnostné charakteristiky

14.1 Analytický výkon

Výkonnosť sondy sa určila porovnaním s príslušnou sondou FISH schválenou IVD.

Analytická citlivosť:	100% (95% CI 98.5 – 100.0)
Analytická špecifickosť:	100% (95% CI 97.0 – 100.0)

14.2 Klinický výkon

Diagnostická senzitivita:	100% (95% CI 83.2 – 100.0) vs. FISH, CISH
Diagnostická špecifita:	100% (95% CI 83.2 – 100.0) vs. FISH, CISH

15. Likvidácia

Likvidácia činidiel sa musí vykonávať v súlade s miestnymi predpismi.

16. Riešenie problémov

Akákkoľvek odchýlka od návodu na obsluhu môže viesť k horším výsledkom farbenia alebo k tomu, že sa farbenie vôbec nevyskytne. Viac informácií nájdete na stránke www.zytovision.com.

Slabý signál alebo žiadny signál

Možná příčina	Akcia
Predbežná proteolytická úprava nebola vykonaná správne	Optimalizujte čas inkubácie pepsínu, v prípade potreby ho predĺžte alebo skráťte
Odparovanie sondy	Pri používaní hybridizéra je používanie vlhkých pásov/ nádrží naplnených vodou povinné. Pri používaní hybridizačnej pece je potrebné používať vlhkú komoru. Okrem toho by malo byť krycie sklo úplne utesnené, napr. pomocou Fixogumu, aby sa zabránilo vysychaniu vzorky počas hybridizácie
Nedostatočná príprava chromogénneho substrátu	Namiesto jednej kvapky roztoku DAB A použite 30 µl
Príliš dlhý čas kontrastného farbenia	Vyhňte sa tmavému kontrastnému farbeniu, pretože môže zakryť pozitívne signály farbenia
Nesprávne vykonané modrenie kontrastného farbiva	Na modrenie používajte studenú tečúcu vodu z vodovodu; nepoužívajte teplú alebo horúcu vodu ani modriace činidlá.

Príliš silné signály

Možná příčina	Akcia
Proteolytická predúprava vykonávaná príliš dlho	Optimalizujte čas inkubácie pepsínu, v prípade potreby ho predĺžte alebo skráťte
Reakcia substrátu je príliš intenzívna	Skrátiť čas inkubácie substrátu; roztok substrátu nezahrievať nad 25 °C; inkubovať len pri izbovej teplote

Signály zanikajú alebo sa spájajú

Možná příčina	Akcia
Bolo použité nevhodné montovacie médium	Používajte len montážny roztok dodaný so súpravou alebo montážne roztoky na báze xylénu bez akýchkoľvek nečistôt; nepoužívajte kryciu pásku

Nerovnomerné alebo v niektorých častiach len veľmi ľahké zafarbenie

Možná příčina	Akcia
Neúplné odparafinovanie	Používajte čerstvé roztoky; skontrolujte dĺžku trvania odparafinovania
Príliš malý objem činidla	Uistite sa, že objem činidla je dostatočne veľký na pokrytie plochy tkaniva

Nekonzistentné výsledky

Možná příčina	Akcia
Nedostatočné vysušenie pred aplikáciou sondy	Predĺženie sušenia na vzduchu
Príliš veľa vody/preplachovacieho pufru na tkanive pred aplikáciou pepsínu, profilátok a/alebo farebných substrátov	Uistite sa, že prebytočná tekutina je z tkanivového rezu odstránená odsávaním alebo vytriasaním zo sklíčka. Malé množstvá zvyškovej vody/preplachovacieho pufru neinterferujú s testom
Rozdiely v metódach fixácie a vkladania tkaniva	Optimalizácia metód fixácie a vkladania
Zmeny v hrúbke tkanivového rezu	Optimalizácia rezania vzorky

Zhoršená morfológia

Možná příčina	Akcia
Vzorka buniek alebo tkaniva nebola správne fixovaná	Optimalizácia času fixácie a fixačného prostriedku
Proteolytická predúprava sa nevykonáva vhodný časový interval	Skrátenie času inkubácie pepsínu

Křížové hybridizačné signály; silné pozadie

Možná příčina	Akcia
Sekcie vysušené kedykoľvek počas hybridizácie alebo po nej	Zabráňte vysušeniu rezov; použite vlhkú komoru; riadne utesnite krycie sklíčko
Predĺžený čas inkubácie substrátu	Skrátenie času inkubácie substrátu
Neúplné odparafinovanie	Používajte čerstvé roztoky; skontrolujte trvanie odparafinovania
Príliš silná proteolytická predúprava	Optimalizujte čas inkubácie pepsínu

Sklíčka sú pred hybridizáciou ochladené na izbovú teplotu	Rýchlo presuňte sklíčka na hybridizačnú teplotu
---	---

Prekrývajúce sa signály

Možná příčina	Akcia
Nevhodná hrúbka tkanivových rezov	Pripravte 3-5 μ m rezy mikrotomom

Vzorka vypláva zo sklíčka

Možná příčina	Akcia
Príliš silná proteolytická predúprava	Skrátenie inkubačného času pepsínu

17. Literatúra

- 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. Revízia
www.zytovision.com

Najnovší návod na použitie, ako aj návod na použitie v rôznych jazykoch nájdete na stránke www.zytovision.com.

Naši odborníci sú pripravení odpovedať na vaše otázky.

Obráťte sa na help@zytovision.com

Prehľad o bezpečnosti a výkonnosti nájdete na www.zytovision.com.



ZytoVision GmbH

Fischkai 1

27572 Bremerhaven/ Nemecko

Telefón: +49 471 4832-300

Fax: +49 471 4832-509

www.zytovision.com

E-mail: info@zytovision.com

Ochranné známky:

ZytoVision® a ZytoDot® sú ochranné známky spoločnosti ZytoVision GmbH.