



ZytoDot SPEC ERBB2 Probe Kit

REF C-3003-40

Σ 40

Kromojenik *in situ* hibridizasyon (CISH) ile insan ERBB2 gen amplifikasyonlarının kalitatif tespiti için

4250380N297W



İn vitro diagnostik tıbbi cihaz

IVDR (AB) 2017/746'ya göre

1. Hedeflenen amaç

ZytoDot SPEC ERBB2 Probe Kit, meme kanseri gibi formalinle sabitlenmiş, parafine gömülü örneklerde insan ERBB2 genini içeren amplifikasyonların kromojenik *in situ* hibridizasyon (CISH) ile kalitatif tespiti için kullanılmak üzere tasarlanmıştır.

Ürün sadece profesyonel kullanım için tasarlanmıştır. Ürünün kullanıldığı tüm testler sertifikalı, lisanslı bir anatomik patoloji laboratuvarında bir patolog/insan genetikçisinin gözetimi altında kalifiye personel tarafından gerçekleştirilmelidir.

Proben meme kanserinin ayırıcı tanısına yardımcı olarak kullanılması amaçlanmıştır ve terapötik önlemler yalnızca test sonucuna göre başlatılmamalıdır.

2. Test prensibi

Kromojenik *in situ* hibridizasyon (CISH) tekniği, hücre preparatlarında spesifik nükleik asit dizilerinin tespit edilmesini ve görüntülenmesini sağlar. CISH problemleri olarak adlandırılan hapten-işaretli nükleotid fragmanları ve preparatlardaki tamamlayıcı hedef dizileri birlikte denatüre edilir ve daha sonra hibridizasyon sırasında tavlamaına izin verilir. Daha sonra, spesifik olmayan ve bağlanmamış prob parçaları sıkı yıkama adımları ile uzaklaştırılır. İşaretli probun dubleks oluşumu, ikincil polimerize enzim-konjuge antikorlar tarafından tespit edilen birincil (işaretsiz) antikorlar kullanılarak görselleştirilebilir. Kromojenik substratlarla enzimatik reaksiyon, renkli çöktürlerin oluşmasına yol açar. Çekirdeğin bir nükleer boya ile karşı boyanmasından sonra, hibridize prob parçaları ışık mikroskobu ile görselleştirilir.

3. Sağlanan reaktifler

ZytoDot SPEC ERBB2 Probe Kit tek şekilde temin edilir ve şunları içerir:

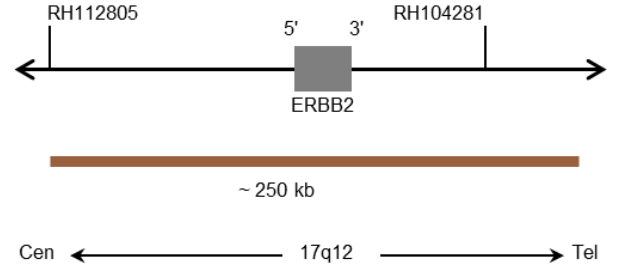
Kod	Bileşen	Miktar	Ambalaj
		Σ 40	
PT2	Heat Pretreatment Solution EDTA	500 ml	Vidalı kapaklı şişe, (büyük)
ES1	Pepsin Solution	4 ml	Damlalıklı şişe, beyaz kapak
PD1	ZytoDot SPEC ERBB2 Probe	0.4 ml	Reaksiyon kabı, kahverengi kapak
WB1	Wash Buffer SSC	560 ml	Vidalı kapaklı şişe, (büyük)
WB4	PBS/Tween	2x	Alüminyum paket
BS1	Blocking Solution	4 ml	Damlalıklı şişe, turuncu kapak
AB1	Mouse Anti-Dig	4 ml	Damlalıklı şişe, pembe kapak
AB2	Anti-Mouse-HRP-Polymer	4 ml	Damlalıklı şişe, menekşe kapak
SB1a	DAB Solution A	0.3 ml	Damlalıklı şişe, yeşil kapak
SB1b	DAB Solution B	10 ml	Damlalıklı şişe, gri kapak
CS1	Mayer's Hematoxylin Solution	20 ml	Vidalı kapaklı şişe, siyah
MT4	Mounting Solution (alcoholic)	4 ml	Cam şişe, kahverengi
	Kullanma kılavuzu	1	

C-3003-40 (40 test): PD1, ES1, BS1, AB1, AB2, SB1a-b, CS1, ve MT4 bileşenleri 40 reaksiyon için yeterlidir. PT2 bileşeni her biri 70 ml olan 7 boyama kabı için yeterlidir. WB1 bileşeni her biri 70 ml olan 8 boyama kabı için yeterlidir. WB4 bileşeni her biri 70 ml olan 28 boyama kabı için yeterlidir.

ZytoDot SPEC ERBB2 Probe oluşmaktadır:

- ERBB2 gen bölgesini barındıran 17q12'de (chr17:37,725,661-37,973,541) eşlenen dizileri hedefleyen diğoksijenin işaretili polinükleotidler (~1.8 ng/μl) (bkz. Şekil 1).
- Formamid bazlı hibridizasyon tamponu

*İnsan Genom Asamblesine göre GRCh37/hg19



Şekil 1: SPEC ERBB2 sonda haritası (ölçekli değil)

4. Gerekli ancak sağlanmayan malzemeler

- Pozitif ve negatif kontrol numuneleri
- Mikroskop lamaları, pozitif yüklü
- Su banyosu (80 °C, 98 °C)
- Hibridizatör veya sıcak plaka
- Hibridizasyon fırınında hibridizatör veya nem odası
- Ayarlanabilir pipetler (10 μl, 1000 μl)
- Boyama kavanozları veya banyoları
- Zamanlayıcı
- Kalibre edilmiş termometre
- Etanol veya reaktif alkol
- Ksilen
- Metanol %100
- Hidrojen peroksit (H₂O₂) %30

- Deiyonize veya damıtılmış su
- Kapaklı Klipsler (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Kauçuk çimento, örneğin Fixogum Rubber Cement (Ürün No. E-4005-50/-125) veya benzeri
- Yeterince bakımı yapılmış ışık mikroskobu (400-630x)

5. Depolama ve taşıma

2-8 °C'de dik konumda saklayın. Kullanımdan hemen sonra saklama koşullarına geri döndürün. Etiket üzerinde belirtilen son kullanma tarihinden sonra reaktifleri kullanmayın. Ürün, uygun şekilde kullanıldığında etikette belirtilen son kullanma tarihine kadar stabildir.

6. Uyarılar ve önlemler

- Kullanmadan önce kullanım talimatlarını okuyun!
- Reaktifleri son kullanma tarihi geçtikten sonra kullanmayın!
- Bu ürün sağlığa zararlı ve potansiyel olarak bulaşıcı maddeler (düşük konsantrasyonlarda ve hacimlerde) içerir. Reaktiflerle doğrudan temastan kaçının. Uygun koruyucu önlemleri alın (tek kullanımlık eldivenler, koruyucu gözlükler ve laboratuvar giysileri kullanın)!
- Ürüne ilgili olarak meydana gelen her türlü ciddi olayı yerel yönetmeliklere uygun olarak üreticiye ve yetkili makama bildirin!
- Reaktifler ciltle temas ederse, cildi derhal bol miktarda suyla yıkayın!
- Profesyonel kullanıcılar için talep üzerine bir malzeme güvenlik bilgi formu temin edilebilir.
- Yeniden kullanıma açıkça izin verilmediği sürece reaktifleri yeniden kullanmayın!
- Hatalı sonuçlara yol açabileceğinden numunelerin çapraz kontaminasyonundan kaçının.
- Hibridizasyon ve yıkama adımları sırasında numunelerin kurumasına izin verilmemelidir.

ES1 için özel etiket ifadeleri:

- EUH208 Pepsin A içerir. Alerjik reaksiyona yol açabilir.
EUH210 Talep halinde güvenlik bilgi formu sağlanabilir.

CS1 ve WB4 için zararlılık ve önlem ifadeleri:

Bu prob 1272/2008 no'lu AB Düzenlemesine göre zararlı olarak sınıflandırılmaz.

BS1, AB1, AB2, PT2, ve WB1 için zararlılık ve önlem ifadeleri:

Zararlılık belirleyici bileşen 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] ve 2-methyl-2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1) maddelerinin karışımıdır.



Uyarı

- H317 Alerjik cilt reaksiyonlarına yol açar.
P261 Tozunu/dumanını/gazını/sisini/buharını/spreyini solumaktan kaçının.
P272 Kirlenmiş kıyafetleri işyeri dışına çıkarmayın.
P280 Koruyucu eldiven/koruyucu kıyafet/göz koruyucu/yüz koruyucu kullanın.
P302+P352 DERİ İLE TEMAS HALİNDE İSE: Bol sabun ve su ile yıkayın.
P333+P313 Ciltte tahriş veya kaşıntı söz konusu ise: Tıbbi yardım/müdahale alın.
P362+P364 Kirlenmiş giysilerinizi çıkarın ve yeniden kullanmadan önce yıkayın.

SB1a için zararlılık ve önlem ifadeleri:

Zararlılık belirleyici bileşen biphenyl-3,3',4,4'-tetrayltetraamine; diaminobenzidine'dir.



Tehlike

- H350 Kansere yol açabilir.
P201 Kullanmadan önce özel talimatları okuyun.
P202 Bütün önlem ifadeleri okunup anlaşılmadan elleçlemeyin.
P280 Koruyucu eldiven/koruyucu kıyafet/göz koruyucu/yüz koruyucu kullanın.
P308+P313 Maruz kalınma veya etkileşme halinde İSE: Tıbbi yardım/bakım alın.
P405 Kilit altında saklayın.

SB1b için zararlılık ve önlem ifadeleri:

Tehlikeyi belirleyen bileşen imidazoldür; Zararlılık belirleyici bileşen 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] ve 2-methyl-2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1) maddelerinin karışımıdır.



Tehlike

- H317 Alerjik cilt reaksiyonlarına yol açar.
H360D Doğmamış çocukta hasara yol açabilir.
P201 Kullanmadan önce özel talimatları okuyun.
P261 Tozunu/dumanını/gazını/sisini/buharını/spreyini solumaktan kaçının.
P280 Koruyucu eldiven/koruyucu kıyafet/göz koruyucu/yüz koruyucu kullanın.
P302+P352 DERİ İLE TEMAS HALİNDE İSE: Bol sabun ve su ile yıkayın.
P308+P313 Maruz kalınma veya etkileşme halinde İSE: Tıbbi yardım/bakım alın.
P362+P364 Kirlenmiş giysilerinizi çıkarın ve yeniden kullanmadan önce yıkayın.

PD1 için zararlılık ve önlem ifadeleri:

Tehlikeyi belirleyen bileşen formamiddir.



Tehlike

- H351 Kansere neden olduğundan şüpheleniliyor.
H360FD Doğurganlığa zarar verebilir. Doğmamış çocuğa zarar verebilir.
H373 Uzun süreli veya tekrarlı maruz kalma sonucu organlarda hasara neden olabilir.
P201 Kullanmadan önce özel talimatları alın.
P202 Tüm güvenlik önlemleri okunup anlaşılmadan elleçlemeyin.
P260 Toz/duman/gaz/sis/buhar/sprey solumayın.
P280 Koruyucu eldiven/koruyucu giysi/göz koruması kullanın.
P308+P313 Maruz kaldıysanız veya endişeliyseniz: Tıbbi tavsiye/müdahale alın.
P405 Depo kilitli.

MT4 için zararlılık ve önlem ifadeleri:

Zararlılık belirleyici bileşen Ksilendir.

**Uyarı**

H226	Alevlenir sıvı ve buhar.
H312+H332	Ciltle temas ettiğinde veya solunduğunda zararlıdır.
H315	Cilt tahrişine yol açar.
H319	Ciddi göz tahrişine yol açar.
H335	Solunum yolu tahrişine yol açabilir.
H373	Uzun süreli veya tekrarlı maruz kalma sonucu organlarda hasara yol açabilir.
P210	Isıdan/kıvılcımdan/alevden/sıcak yüzeylerden uzak tutun. – Sigara içilmez.
P260	Tozunu/dumanını/gazını/sisini/buharını/spreyini solumayın.
P280	Koruyucu eldiven/koruyucu kıyafet/göz koruyucu/yüz koruyucu kullanın.
P305+P351+P338	GÖZ İLE TEMASI HALİNDE: Su ile birkaç dakika dikkatlice durulayın. Takılı ve yapması kolaysa, kontak lensleri çıkartın. Durulamaya devam edin.
P337+P313	Göz tahrişi kalıcı ise: Tıbbi yardım/bakım alın.
P403+P235	İyi havalandırılmış bir alanda depolayan. Soğuk tutun.
EUH208	methıl 2-methylprop-2-enoate; methıl 2-methylpropenoate; methıl methacrylate içerir. Alerjik reaksiyona yol açabilir.

7. Sınırlamalar

- *In vitro* diagnostik kullanım için.
- Sadece profesyonel kullanım içindir.
- Yalnızca otomatik olmayan kullanım içindir.
- Herhangi bir pozitif boyamanın klinik yorumu veya yokluğu, klinik öykü, morfoloji, diğer histopatolojik kriterler ve diğer tanısal testler bağlamında yapılmalıdır. CISH problemleri, reaktifleri, tanı panelleri ve boyalı preparatı üretmek için kullanılan yöntemler hakkında bilgi sahibi olmak kalifiye bir patolog/insan genetikçisinin sorumluluğundadır. Boyama, boyanmış slaytları gözden geçirmekten ve pozitif ve negatif kontrollerin yeterliliğini sağlamaktan sorumlu olan bir patolog/insan genetikçisinin gözetimi altında sertifikalı, lisanslı bir laboratuvarında yapılmalıdır.
- Numune boyaması, özellikle sinyal yoğunluğu ve arka plan boyaması, boyamadan önce numunenin kullanımına ve işlenmesine bağlıdır. Uygun olmayan fiksasyon, dondurma, çözündürme, yıkama, kurutma, ısıtma, kesit alma veya diğer numuneler veya sıvılarla kontaminasyon artefaktlara veya yanlış sonuçlara neden olabilir. Tutarsız sonuçlar, fiksasyon ve gömme yöntemlerindeki farklılıkların yanı sıra numune içindeki doğal düzensizliklerden de kaynaklanabilir.
- Prob yalnızca bölüm 3'te açıklanan lokusları tespit etmek için kullanılmalıdır. "Sağlanan reaktifler".
- Performans, bu kullanım talimatlarında açıklanan prosedürler kullanılarak doğrulanmıştır. Bu prosedürlerde yapılacak değişiklikler performansını değiştirebilir ve kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır. Bu IVD, yalnızca bu kullanım talimatında açıklandığı şekilde amaçlanan kullanım kapsamında kullanıldığında CE sertifikasına sahiptir.

8. Müdahale eden maddeler

Aşağıdaki fiksatifler ISH ile uyumlu değildir:

- Bouin'in fiksatifi
- B5 fiksatif
- Asidik fiksatifler (örn. pikrik asit)
- Zenker fiksatifi
- Alkoller (tek başına kullanıldığında)
- Merkürük klorür
- Formaldehit/çinko fiksatifi
- Hollande'in sabitleyicisi
- Tamponlanmamış formalin

9. Numunelerin hazırlanması

Öneriler:

- Herhangi bir hazırlık adımında örnekler arasında çapraz kontaminasyon olmasından sakının çünkü bu durum hatalı sonuçlara yol açabilir.
- Oda sıcaklığında (18-25°C) 24 saat %10 nötral tamponlu formalin ile fiksasyon.
- Örnek büyüklüğü $\leq 0.5 \text{ cm}^3$.
- En üst kalitede parafin kullanın.
- Gömme işlemi 65°C'den daha düşük sıcaklıklarda yapılmalıdır.
- Mikrotom ile 3-5 μm kalınlığında kesitler alın.
- Pozitif yüklü mikroskop lamaları kullanın.
- 50-60°C'de 2-16 saat fiks edin.

10. Cihazın hazırlık işlemi

PBS/Tween (WB4) 11. "Tahlil prosedürü" bölümündeki talimatlara göre hazırlanmalıdır. Kiti tüm diğer bileşenleri kullanıma hazırdır. Yeniden sulandırmaya, karıştırmaya veya dilüsyon yapmaya gerek yoktur. Kullanmadan önce probu oda sıcaklığına (18-25 °C) getirin, ışıktan koruyun. Flakonu açmadan önce vorteksleyerek karıştırın ve kısa bir süre döndürün.

11. Tahlil prosedürü**11.1 Birinci Gün****Hazırlık adımları**

- (1) *Bir etanol serisi hazırlayın (%70, %90 ve %100 etanol solüsyonları):* %100 etanolü deiyonize veya distile su ile seyreltin. Bu solüsyonlar uygun kaplarda saklanabilir ve yeniden kullanılabilir.
- (2) *Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2):* Üstü kapalı bir boyama kabında 98°C'ye ısıtın.
- (3) *3% H₂O₂ hazırlanması:* 1 birim %30 H₂O₂'i 9 birim %100 metanol ile karıştırın.
- (4) *ZytoDot CISH Prob:* Kullanmadan önce oda sıcaklığına ulaştırın.

Ön işlemler (parafin giderme/proteoliz)

- (1) Lamaları 70°C'de (örn: bir sıcak levha üzerinde) 10 dakika inkübe edin.
- (2) Lamaları ksilen içinde 2x 5 dakika inkübe edin.
- (3) Lamaları %100 etanol içinde 3x 3 dakika inkübe edin.
- (4) Lamaları 3% H₂O₂ içinde 5 dakika inkübe edin.
- (5) Lamaları oda sıcaklığında deiyonize veya distile su ile 2x 1 dakika yıkayın.
- (6) Önceden 98°C'ye ısıtılmış *Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2)* içinde 15 dakika inkübe edin.

Bir boyama kabında 8 lam kullanın (gerekirse boş lam ekleyin).

- (7) Lamaları hemen deiyonize veya distile su içine aktarın ve 2x 2 dakika yıkayın.
 - (8) Örneğin üzerinde *Pepsin Solution'ı (ES1)* damlatarak uygulayın ve bir nemli kütü içinde 37°C'de 5-15 dakika inkübe edin.
- ES1, kaliteyi etkilemeyen çokeltiller oluşturabilir. Genel kural olarak proteoliz için en uygun süreyi denemeler yaparak belirlemenizi öneriyoruz.*
- (9) Lamaları deiyonize veya distile su içine yerleştirin.
 - (10) Dehidrasyon yapın: %70, %90 ve %100 etanol ile her birinde 1 dakika.
 - (11) Kesitleri havada kurutun.

Not: Prob uygulamasından önce lamaları tamamen kuruttuğunuzdan emin olun.

Denatürasyon ve hibridizasyon

- (1) Ön işlemi yapılmış örneğin üzerine 10 μl *ZytoDot CISH Probe* pipetleyin.

- (2) Örnekleri 22 mm x 22 mm lamel ile kapatın (hava kabarcığı bırakmayın) ve lamelin yalıtımını sağlayın.
- Yalıtım için lastik solüsyonu (örn: Fixogum) kullanılmasını öneririz.*
- (3) Lamları bir sıcak levha üzerine ya da bir hibridizasyon cihazına yerleştirin ve örnekleri 94-95°C'de 5 dakika denatüre edin.
- (4) Lamları bir nemli kutuya aktarın ve 37°C'de gece boyu inkübe edin (örn. Bir hibridizasyon etüvünde).
- Hibridizasyon aşamasında örneklerin kurumaması gerekir.*

11.2 İkinci Gün

Hazırlık adımları

- (1) **Wash Buffer SSC (WB1)**: Güçlü yıkama işlemi için üstü kapalı bir boyama kabında 80°C'ye ısıtın. **WB1** 2-8°C'de kaliteyi etkilemeyen ve ısıtıldığında çözünmesi gereken çöktürücüler oluşturabilir.
- (2) **Wash Buffer PBS/Tween hazırlanması**: 1 **PBS/Tween (WB4)** tabletini 1000 ml deiyonize veya distile su içine atın ve çözün.
- Wash Buffer PBS/Tween 2-8°C'de saklandığında bir hafta boyunca stabildir.*
- (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)**: Kullanmadan önce oda sıcaklığına ulaştırın.

Hibridizasyon sonrası ve tespit

- (1) Lastik solüsyonunu veya yapıştırıcıyı dikkatlice sökün.
- (2) Lamları oda sıcaklığındaki **Wash Buffer SSC (WB1)** içinde 5 dakika tutup lameli çıkarın.
- WB1 bir kez daha kullanılabilir. 2-8°C'de en fazla bir hafta muhafaza edin.*
- (3) Lamları 80°C'deki **Wash Buffer SSC (WB1)** içinde 5 dakika yıkayın. *Bir boyama kabında sekiz lam kullanın (gerekirse boş lam ekleyin).*
- (4) Lamları deiyonize veya distile su içinde 2x 1 dakika yıkayın.
- (5) Lamları Wash Buffer PBS/Tween içine yerleştirin.
- (6) Lamlara **Blocking Solution (BS1)** (her lama 1-2 damla) uygulayın ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edin.
- (7) **Blocking Solution (BS1)**'i lamin üzerinden akıtın, **sakin yıkamayın!**
- (8) Lamlara damlatarak **Mouse-Anti-DIG (AB1)** uygulayın (her lama 1-2 damla) ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edin.
- (9) Lamları PBS/Tween içinde 3x 1 dakika yıkayın.
- (10) Lamlara damlatarak **Anti-Mouse-HRP-Polymer (AB2)** uygulayın (her lama 1-2 damla) ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edin.
- (11) Lamları PBS/Tween içinde 3x 1 dakika yıkayın.
- (12) **DAB Solution (çalışma solüsyonu)** hazırlayın: Ölçekli bir tüpe 1 ml **DAB Solution B (SB1b)** koyun ve bir damla (30 µl) **DAB Solution A (SB1a)** ekleyin. İyice karıştırın.
- (13) Lamlara damlatarak **DAB Solution** uygulayın (her lama 1-2 damla) ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edin.
- (14) Lamları bir boyama kabına aktarın ve akan soğuk çeşme suyunda 2 dakika yıkayın.
- (15) **Mayer's Hematoxylin Solution (CS1)** ile 5-10 saniye örneklerin zıt boyamasını yapın.
- (16) Lamları bir boyama kabına aktarın ve akan soğuk çeşme suyunda 2 dakika yıkayın.
- (17) %70, %90 ve %100 etanol ile her birinde 1 dakika dehidrasyon yapın.
- (18) Lamları ksilen içinde 2x 2 dakika inkübe edin (çok saf ksilen kullanın).
- (19) **Mounting Solution (alcoholic) (MT4)** kullanarak hava kabarcığı bırakmadan örnekleri bir lamel (22 mm x 22 mm; 24 mm x 32 mm) ile kapatın. Lamelin tamamen sabitlenmesi için 20-30 dakika bekleyin.

Açıklığın boyutunu artırmak için kesilmiş bir pipet ucu kullanmak pipetleme işlemini kolaylaştırabilir.

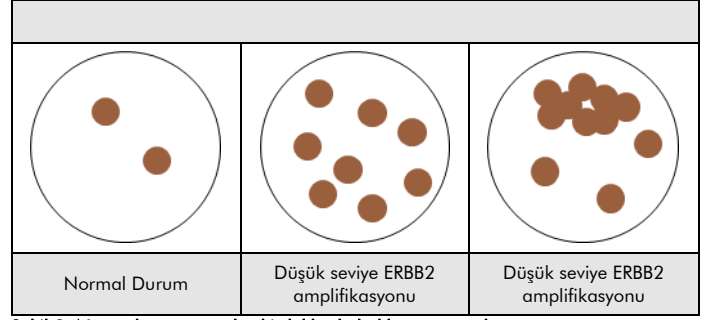
- (20) Boyanan örnekleri ışık mikroskopunda değerlendirin.

12. Sonuçların yorumlanması

ZytoDot CISH Implementation Kit kullanıldığında digoksijeninle işaretlenmiş polinükleotidlerin hibridizasyon sinyalleri kahverengi ile koyu kahverengi (ERBB2 gen bölgesi) görünür.

Normal durum: Normal hücrelerin veya ERBB2 gen bölgesini içeren bir amplifikasyon içermeyen hücrelerin interfazlarında, iki farklı nokta şeklinde kahverengi sinyal görülür (bkz. Şekil 2).

Anormal bir durum: ERBB2 gen bölgesinin amplifikasyonu veya 17. kromozomun polisomisi olan hücrelerde, kahverengi sinyal veya kahverengi sinyal kümelerinin sayısında artış gözlenecektir (bkz. Şekil 2).



Şekil 2: Normal ve anormal çekirdeklerde beklenen sonuçlar

Bazı anormal numunelerde yukarıda açıklananlardan farklı sinyal modelleri gözlemlenebilir. Bu beklenmedik sinyal modelleri daha fazla araştırılmalıdır.

Lütfen unutmayın:

- Dekondense kromatin nedeniyle, tek CISH sinyalleri küçük sinyal kümeleri olarak görünebilir. Bu nedenle, ≤ 1 sinyal çapı mesafeyle ayrılmış aynı boyuttaki iki veya üç sinyal tek bir sinyal olarak sayılmalıdır.
- Sinyal sayımından önce, numune 100 ila 200 kat büyütme ile olası intratümöral heterojenite açısından taranmalıdır.
- Sinyallerin görselleştirilmesi en az 400 ila 630 kat büyütme ile yapılmalı ve kolayca görülebilen sinyaller elde edilmelidir.
- Nekroz alanlarını, üst üste binen çekirdekleri, aşırı sindirilmiş çekirdekleri ve zayıf sinyal yoğunluğuna sahip çekirdekleri değerlendirmeyin.
- Mitoz nedeniyle, neoplastik olmayan hücrelerin küçük bir yüzdesinde bile ek sinyaller görülebilir. Bazen, parafine gömülü örneklerde kesme artefaktları nedeniyle eksik sinyalli çekirdekler gözlenebilir.
- Negatif veya spesifik olmayan bir sonuç birden fazla faktörden kaynaklanabilir (bkz. Bölüm 16 "Sorun Giderme").
- Sonuçların doğru bir şekilde yorumlanabilmesi için, kullanıcı bu ürünü tanı prosedürlerinde kullanmadan önce ulusal ve/veya uluslararası kılavuzlara göre doğrulamalıdır.

13. Önerilen kalite kontrol prosedürleri

İşlenmiş numunelerin ve test reaktiflerinin doğru performansını izlemek için, her tahlile dahili ve harici kontroller eşlik etmelidir. Dahili ve/veya harici kontroller uygun boyamayı gösteremezse, hasta numuneleriyle elde edilen sonuçlar geçersiz kabul edilmelidir.

Dahili kontrol: Örnek içinde normal sinyal paterni sergileyen neoplastik olmayan hücreler, örneğin fibroblastlar.

Harici kontrol: Onaylanmış pozitif ve negatif kontrol numuneleri.

14. Performans özellikleri

14.1 Analitik performans

Proben performansını, ilgili IVD onaylı FISH probu ile karşılaştırılarak belirlenmiştir.

Analitik hassasiyet:	100% (95% CI 98.5 – 100.0)
Analitik özgüllük:	100% (95% CI 97.0 – 100.0)

14.2 Klinik performans

Tanısal duyarlılık	100% (95% CI 83.2 – 100.0) vs. FISH, CISH
Tehiş özgüllüğü:	100% (95% CI 83.2 – 100.0) vs. FISH, CISH

15. Bertaraf

Reaktiflerin imhası yerel yönetmeliklere uygun olarak gerçekleştirilmelidir.

16. Sorun Giderme

Kullanım talimatlarından herhangi bir sapma, düşük boyama sonuçlarına veya hiç boyama olmamasına neden olabilir. Daha fazla bilgi için lütfen www.zytovision.com adresine bakın.

Zayıf sinyaller veya hiç sinyal yok

Olası neden	Eylem
Proteolitik ön işlem düzgün yapılmamış	Pepsin inkübasyon süresini optimize edin, gerekirse artırın veya azaltın
Buharlaştırma probu	Bir hibridizatör kullanırken, ıslak şeritlerin/su dolu tankların kullanılması zorunludur. Bir hibridizasyon fırını kullanıldığında, bir nem odasının kullanılması gereklidir. Ek olarak, hibridizasyon sırasında örneğin kurumasını önlemek için lamel Fixogum ile tamamen kapatılmalıdır
Kromojenik substratın yetersiz hazırlanması	Bir damla DAB Çözeltisi A kullanmak yerine 30 µl kullanın
Karşı boyama süresi çok uzun	Koyu karşı boyamadan kaçının, çünkü pozitif boyama sinyallerini gizleyebilir
Karşı lekenin mavileştirilmesi düzgün yapılmamış	Mavileştirme için soğuk akan musluk suyu kullanın; ılık veya sıcak su veya mavileştirme reaktifleri kullanmayın

Sinyaller çok güçlü

Olası neden	Eylem
Proteolitik ön işlemin çok uzun sürmesi	Pepsin inkübasyon süresini optimize edin, gerekirse artırın veya azaltın
Substrat reaksiyonu çok yoğun	Substrat inkübasyon süresini kısaltın; substrat çözeltisini 25 °C'nin üzerinde ısıtmayın; sadece oda sıcaklığında inkübe edin

Sinyaller kaybolur veya birleşir

Olası neden	Eylem
Uygun olmayan bir montaj çözümü kullanılmıştır	Yalnızca kitle birlikte verilen montaj solüsyonunu veya herhangi bir yabancı madde içermeyen ksilen bazlı montaj solüsyonlarını kullanın; lamel bandı kullanmayın

Düzensiz veya bazı kısımlarda sadece çok hafif lekelenme

Olası neden	Eylem
Eksik mum alma	Taze solüsyonlar kullanın; mum alma sürelerini kontrol edin
Reaktif hacmi çok küçük	Reaktif hacminin doku alanını kaplayacak kadar büyük olduğundan emin olun

Tutarsız sonuçlar

Olası neden	Eylem
Prob uygulamasından önce yetersiz kurutma	Hava ile kurutmayı uzatın
Pepsin, antikorlar ve/veya renk substratlarının uygulanmasından önce doku üzerinde çok fazla su/yıkama tamponu	Fazla sıvının doku kesitinden lekeleyerek veya lamdan sallayarak uzaklaştırıldığından emin olun. Az miktarda kalan su/yıkama tamponu testi etkilemez

Doku fiksasyonu ve gömme yöntemlerindeki varyasyonlar	Sabitleme ve gömme yöntemlerini optimize edin
Doku kesit kalınlığındaki değişimler	Kesit almayı optimize edin

Morfoloji bozulmuş

Olası neden	Eylem
Hücre veya doku örneği uygun şekilde sabitlenmemiş	Sabitleme süresini ve fiksatif optimize edin
Proteolitik ön işlemin çok uzun süre yapılmaması	Pepsin inkübasyon süresini azaltın

Çapraz hibridizasyon sinyalleri; gürültülü arka plan

Olası neden	Eylem
Hibridizasyon sırasında veya sonrasında herhangi bir zamanda kurumuş kesitler	Kesitlerin kurumasını önleyin; nem odası kullanın; lamelleri uygun şekilde kapatın
Uzatılmış substrat inkübasyon süresi	Substrat inkübasyon süresini kısaltın
Eksik mum alma	Taze solüsyonlar kullanın; mum alma süresini kontrol edin
Proteolitik ön işlem çok güçlü	Pepsin inkübasyon süresini optimize edin
Hibridizasyondan önce oda sıcaklığına soğutulmuş slaytlar	Lamları hızlı bir şekilde hibridizasyon sıcaklığına aktarın

Çakışan sinyaller

Olası neden	Eylem
Doku kesitlerinin uygun olmayan kalınlığı	3-5 µm mikrotom kesitleri hazırlayın

Numune lam üzerinde yüzer

Olası neden	Eylem
Proteolitik ön işlem çok güçlü	Pepsin inkübasyon süresini kısaltın

17. Edebiyat

- 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. Revizyon
www.zytovision.com

En güncel kullanım talimatları ve farklı dillerdeki kullanım talimatları için lütfen www.zytovision.com adresine bakın.

Uzmanlarımız sorularınızı yanıtlamak için hazırdır.
Lütfen helptech@zytovision.com ile iletişime geçin
Güvenlik ve performans özeti için lütfen bkz. www.zytovision.com.



ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/ Almanya
Telefon numarası: +49 471 4832-300
Faks: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
E-posta: info@zytovision.com

Ticari markalar:

ZytoVision® ve ZytoDot®, ZytoVision GmbH'nin ticari markalarıdır.