ZytoVision

*Zyto*Dot 2C
SPEC ERBB2/CEN 17 Probe Kit

REF C-3022-10 Σ 10

REF C-3022-40 Σ 40

İnsan ERBB2 gen amplifikasyonlarının ve kromozom 17 alfa satellitlerinin kromojenik *in situ* hibridizasyon (CISH) ile kalitatif tespiti için

4250380N467W

CE 0483

IVD

İn vitro diagnostik tıbbi cihaz

IVDR (AB) 2017/746'ya göre

1. Hedeflenen amaç

*Zyto*Dot 2C SPEC ERBB2/CEN 17 Probe Kit, insan ERBB2 genini içeren amplifikasyonların kalitatif tespiti ve meme kanseri gibi formalinle sabitlenmiş, parafine gömülü örneklerde kromojenik in situ hibridizasyon (CISH) yoluyla kromozom 17 alfa uydularının 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.

Probun 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 probları olarak adlandırılan hapten-işaretli nükleotid fragmanları ve preparatlardaki tamamlayıcı hedef dizileri birlikte denatüre edilir ve daha sonra hibridizasyon sırasında tavlanmasına 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 çökeltilerin oluşmasına yol açar. Çekirdeğin bir nükleer boya ile karşı boyanmasından sonra, hibridize prob parçaları ışık mikroskobu ile görselleştirilir.

3. Sağlanan reaktifler

*Zyto*Dot 2C SPEC ERBB2/CEN 17 Probe Kit tek şekilde temin edilir ve şunları içerir:

Kod	Bileşen	Miktar		Ambalaj
		40	10	
PT2	Heat Pretreatment Solution EDTA	500 ml	150 ml	Vidalı kapaklı şişe, (büyük)
ES1	Pepsin Solution	4 ml	1 ml	Damlalıklı şişe, beyaz kapak
PD12	*Zyto*Dot 2C SPEC ERBB2/CEN 17 Probe	0.4 ml	0.1 ml	Reaksiyon kabı, kahverengi kapak
WB1	Wash Buffer SSC	560 ml	210 ml	Vidalı kapaklı şişe, (büyük)
WB5	20x Wash Buffer TBS	2x 50 ml	50 ml	Vidalı kapaklı şişe
AB14	Anti-DIG/DNP-Mix	4 ml	1 ml	Damlalıklı şişe, sarı kapaklı
AB13	HRP/AP-Polymer-Mix	4 ml	1 ml	Damlalıklı şişe, mavi kapaklı
SB6a	AP-Red Solution A	0.4 ml	0.1 ml	Damlalıklı şişe, kırmızı kapaklı (küçük)
SB6b	AP-Red Solution B	15 ml	4 ml	Damlalıklı şişe, kırmızı kapaklı
SB7a	HRP-Green Solution A	0.8 ml	0.2 ml	Damlalıklı şişe, yeşil kapaklı (küçük)
SB7b	HRP-Green Solution B	15 ml	4 ml	Damlalıklı şişe, yeşil kapaklı
CS2	Nuclear Blue Solution	20 ml	4 ml	Vidalı kapaklı şişe, siyah
MT4	Mounting Solution (alcoholic)	4 ml	1 ml	Cam şişe, kahverengi
	AP-Red reaksiyon kabı	2	1	Dereceli kap, kırmızı kapaklı
	HRP-Green reaksiyon kabı	2	1	Dereceli kap, yeşil kapaklı
	Kullanma kılavuzu	1	1	

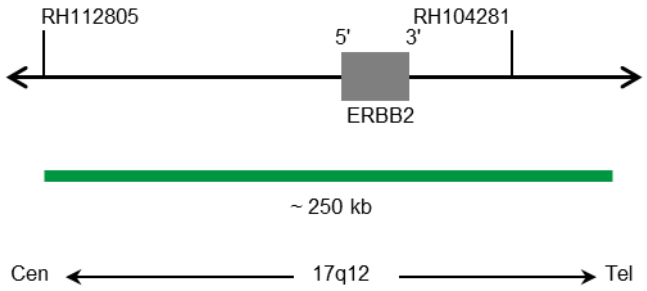
C-3022-10 (10 test): **PD12**, **ES1**, **AB14**, **AB13**, **SB6a-b**, **SB7a-b**, **CS2**, ve **MT4** bileşenleri 10 reaksiyon için yeterlidir. **PT2** bileşeni her biri 70 ml olan 2 boyama kabı için yeterlidir. **WB1** bileşeni her biri 70 ml olan 3 boyama kabı için yeterlidir. **WB5** bileşeni her biri 70 ml olan 14 boyama kabı için yeterlidir.

C-3022-40 (40 test): **PD12**, **ES1**, **AB14**, **AB13**, **SB6a-b**, **SB7a-b**, **CS2**, 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. **WB5** bileşeni her biri 70 ml olan 28 boyama kabı için yeterlidir.

*Zyto*Dot 2C SPEC ERBB2/CEN 17 Probe (**PD12**) oluşmaktadır:

- ERBB2 gen bölgesini barındıran 17q12*'de (chr17:37,725,661-37,973,541) eşlenen dizileri hedefleyen digoksigenin işaretli polinükleotidler (~1.1 ng/µl) (bkz. Şekil 1).
- Kromozom 17'nin alfa uydu sentromerik bölgesi D17Z1'e özgü 17p11.1-q11.1'de eşlenen dizileri hedefleyen dinitrofenil işaretli polinükleotitler (~1,1 ng/µl) (bkz. Şekil 1).
- Formamid bazlı hibridizasyon tamponu

*İnsan Genomu Düzenlemesine göre GRCh37/hg19



Şekil 1: SPEC ERBB2 sonda haritası (ölçekli değil)

4. Gerekli ancak sağlanmayan malzemeler

- Pozitif ve negatif kontrol numuneleri
- Mikroskop lamları, 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 (H_2O_2) %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)!
- Ürünle 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.
- Tekrar kullanıma açıkça izin verilmediği sürece reaktifleri tekrar 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.

SB6a için zararlılık ve önlem ifadeleri:

H412	Sucul ortamda uzun süre kalıcı, zararlı etki.
P273	Çevreye verilmesinden kaçının.

AB13, AB14, PT2, SB7b, WB1, ve WB5 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.

SB7a için zararlılık ve önlem ifadeleri:

Zararlılık belirleyici bileşenler metanol ve %30 hidrojen peroksit solüsyonudur.

Tehlike

H225	Kolay alevlenir sıvı ve buhar
H301+H311 +H331	Yutulduğunda, ciltle temas ettiğinde veya solunduğunda toksiktir.
H370	Organlarda hasara yol açar
P210	Isıdan/kıvılcımdan/alevden/sıcak yüzeylerden uzak tutun. – Sigara içilmez.
P233	Şiddetli tepkime ve alevlenme olasılığından dolayı, su ile herhangi olası temasından kaçının.
P260	Tozunu/dumanını/gazını/sisini/buharını/spreyini solumayın.
P280	Koruyucu eldiven/koruyucu kıyafet/göz koruyucu/yüz koruyucu kullanın.
P308+P311	Maruz kalınma halinde: ULUSAL ZEHİR DANIŞMA MERKEZİNİN 114 NOLU TELEFONUNU veya doktoru/hekimi arayın
P403+P235	İyi havalandırılmış bir alanda depolayan. Soğuk tutun.

CS2 için zararlılık ve önlem ifadeleri:

Zararlılık belirleyici bileşenler ethandiol ve ethylene glycol'dür.

Uyarı

H373	Uzun süreli veya tekrarlı maruz kalma sonucu organlarda hasara yol açabilir.
P260	Tozunu/dumanını/gazını/sisini/buharını/spreyini solumayın.
P314	Kendinizi iyi hissetmezseniz, tıbbi tavsiye/müdahale alınız.

PD12 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/yüz 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	methyl 2-methylprop-2-enoate; methyl 2-methylpropenoate; methyl methacrylate içerir. Alerjik reaksiyona yol açabilir.

7. Sınırlamalar

- *İn 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 probları, 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 laboratuvarda yapılmalıdır.
- Numune boyaması, özellikle sinyal yoğunluğu ve arka plan boyaması, boyamadan önce numunenin kullanımına ve işlenmesine bağlıdır. Uygun olmayan fiksasyon, dondurma, çözdürme, 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 sadece bölüm 3'te açıklanan lokusları tespit etmek için kullanılmalıdır. "Sağlanan reaktifler".
- Performans, bu kullanım talimatlarında açıklanan prosedürler kullanılarak doğrulanmıştır. Bu prosedürlerde yapılacak değişiklikler performansı 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)
- Merkürik klorür
- Formaldehit/çinko fiksatifi
- Hollande'ın 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 ≤ 0.5 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 lamları kullanın.
- 50-60°C'de 2-16 saat fikse edin.

10. Cihazın hazırlık işlemi

20x Wash Buffer TBS (**WB5**) 11. "Tahlil prosedürü" bölümündeki talimatlara göre hazırlanmalıdır. Kitin tüm diğer bileşenleri kullanıma hazırdır. Yeniden sulandırmaya, karıştırmaya veya dilüsyon yapmaya gerek yoktur. Probu oda sıcaklığına (RT) getirin ve kullanmadan önce kısaca karıştırın.

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 2 CCISH Prob:* Kullanmadan önce oda sıcaklığına ulaştırın.

Ön işlemler (parafin giderme/proteoliz)

1. Lamları 70°C'de (örn: bir sıcak levha üzerinde) 10 dakika inkübe edin.
2. Lamları ksilen içinde 2x 5 dakika inkübe edin.
3. Lamları %100 etanol içinde 3x 3 dakika inkübe edin.
4. Lamları 3% H_2O_2 içinde 5 dakika inkübe edin.
5. Lamları 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. Lamları hemen deiyonize veya distile su içine aktarın ve 2x 2 dakika yıkayın.
8. Örneğin üzerinde Pepsin Solution'ı (**ES1**) damlatarak uygulayın ve bir nemli kutu içinde 37°C'de 5-15 dakika inkübe edin.

ES1, *kaliteyi etkilemeyen çökeltiler oluşturabilir.*

Genel kural olarak proteoliz için en uygun süreyi denemeler yaparak belirlemenizi öneriyoruz.

9. Lamları 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 lamları tamamen kuruttuğunuzdan emin olun.

Denatürasyon ve hibridizasyon

1. Ön işlemden geçirilmiş her numuneye 10 µl prob pipetleyin.
2. Örnekleri 22 mm x 22 mm lamel ile kaplayın (sıkışmış kabarcıklardan kaçının) ve lameli kapatın.

Sızdırmazlık için kauçuk çimento (örn. Fixogum) kullanmanızı öneririz.

3. Lamları sıcak bir plakaya veya hibridizatöre yerleştirin ve örnekleri 79 °C'de 5 dakika boyunca denatüre edin.
4. Lamları bir nem odasına aktarın ve gece boyunca 37 °C'de hibridize edin (örn. bir hibridizasyon fırınında).

Hibridizasyon adımı sırasında numunelerin kurumaması çok önemlidir.

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 çökeltiler oluşturabilir.
2. *1x Wash Buffer TBS hazırlanması::* 1 birim 20x Wash BUffer TBS'i **(WB5)** 19 birim deiyonize veya distile su ile seyreltin.

   Seyreltilmiş 1x Wash Buffer TBS 2-8°C'de saklandığında bir hafta boyunca stabildir.

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**): Kullanmadan önce oda sıcaklığına ulaştırın.

SB7a *ve* ***SB7B*** *bileşenleri, boyama kalitesini etkilemeyen çökeltiler oluşturabilir.*

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 1x Wash Buffer TBS içine yerleştirin.
6. Anti-DIG/DNP-Mix (**AB14**) (lam başına 1-2 damla) lamlara uygulayın ve nem odasında 37°C'de 15 dakika inkübe edin.
7. Lamları 1x Wash Buffer TBS içinde 3x 1 dakika yıkayın.
8. HRP/AP-Polymer-Mix (**AB13**) (lam başına 1-2 damla) lamlara uygulayın ve nem odasında 37°C'de 15 dakika inkübe edin.
9. Lamları 1x Wash Buffer TBS içinde 3x 1 dakika yıkayın.
10. AP-Red Solution (çalışma solüsyonu) hazırlayın: Ölçekli bir tüpe 1 ml AP-Red Solution B (**SB6b**) koyun ve bir damla (30 µl) AP-Red Solution A (**SB6a**) ekleyin. İyice karıştırın
11. Lamlara damlatarak AP-Red Solution uygulayın (her lama 1-2 damla) ve oda sıcaklığında 10 dakika karanlıkta inkübe edin.
12. İnkübasyon sırasında HRP-Green Solution (çalışma çözeltisi) hazırlayın: 1 ml HRP-Green Solution B'yi (**SB7b**) dereceli bir kaba doldurun ve iki damla (2x 20 µl) HRP-Green Solution A (**SB7a**) ekleyin. İyice karıştırın.
13. Lamları oda sıcaklığında deiyonize veya distile su ile 2 dakika yıkayın.
14. HRP-Green Solution slaytlara damla damla (slayt başına 1-2 damla) uygulayın ve oda sıcaklığında 10 dakika karanlıkta inkübe edin.
15. Lamları oda sıcaklığında deiyonize veya distile su ile 2 dakika yıkayın.
16. Örnekleri 2 dakika boyunca Nuclear Blue Solution (**CS2**) ile karşıt boyayın.
17. Lamları bir boyama kavanozuna aktarın ve akan soğuk musluk suyu altında 2 dakika yıkayın.
18. 100 etanol içinde 3x 30 sn kurutun (çok saf etanol kullanın).
19. Lamları ksilen içinde 2x 30 sn inkübe edin (çok saf ksilen kullanın).

Sinyal kaybına neden olabileceğinden inkübasyon süresini uzatmayın veya kısaltmayın!

20. 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.
21. Boyanan örnekleri ışık mikroskobunda değerlendirin.

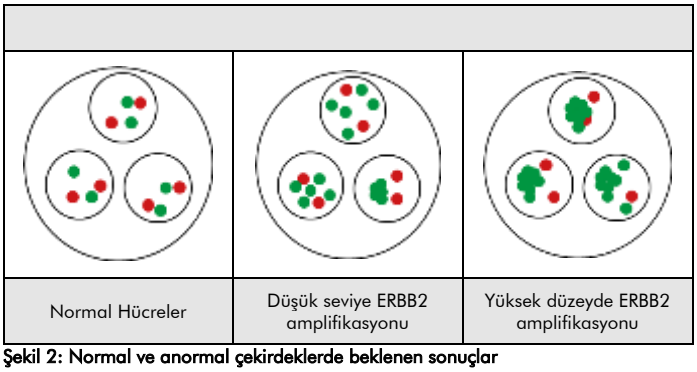
12. Sonuçların yorumlanması

ZytoDot 2C CISH Implementation Kit kullanıldığında, Digoxigenin ile işaretlenmiş polinükleotidlerin hibridizasyon sinyalleri koyu yeşil renkli belirgin noktalar (ERBB2 gen bölgesi) ve Dinitrofenil ile işaretlenmiş polinükleotidler parlak kırmızı renkli belirgin noktalar (CEN 17) olarak görünür.

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

Anormal bir durum: ERBB2 gen bölgesinde amplifikasyon olan hücrelerde, artan sayıda yeşil sinyal veya yeşil sinyal kümeleri gözlenecektir (bkz. Şekil 2).

Çakışan sinyaller kahverengi sinyaller olarak görünebilir.



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 kat büyütme ile yapılmalı ve kolayca görülebilen sinyaller elde edilmelidir. Kromozomal kırılmaları tespit eden problar için 630 kat büyütme önerilir. Sinyal rengini bozabileceğinden kontrast arttırıcı filtre lensleri kullanmayın. Parlak renklerde sinyaller elde etmek için diyafram açıklığını açın. Bir çekirdeği değerlendirirken yukarı ve aşağı odaklandığınızdan emin olun, çünkü kırmızı ve yeşil sinyaller birbirinin üzerinde bulunabilir.
- 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

Probun performansı, 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)

Günden Güne Tekrar Üretilebilirlik, bir denetçinin 10 farklı günde elde ettiği sonuçları karşılaştırarak ve uyumu değerlendirerek test edilmiştir.

	Yüzde Anlaşma
nnegatif numune	100%
pozitif numune	100%

Tekrarlanabilirlik, bir denetçiden 10 farklı günde elde edilen tekrarlanan sonuçlar karşılaştırılarak ve uyum değerlendirilerek test edilmiştir.

	Yüzde Anlaşma
nnegatif numune	100%
pozitif numune	100%

14.2 Klinik performans

Tanısal duyarlılık	91% (95% CI 86.0 – 95.0) iki değişkenli bir modele dayalı
Teşhis özgüllüğü:	97% (95% CI 93.0 – 99.0) iki değişkenli bir modele dayalı

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
Buharlaşma probu	Bir hibridizatör kullanırken, ıslak şeritlerin/su dolu tankların kullanılması zorunludur. Bir hibridizasyon fırını kullanıldığında, bir nem odasının kullanılması gereklidir. Ayrıca, hibridizasyon sırasında numunenin kurumasını önlemek için lamel, örneğin Fixogum ile tamamen kapatılmalıdır
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
AP-Kırmızı Çözelti inkübasyon süresi doğru değil	Gerekirse inkübasyon süresi 5 dakikaya kadar kısaltılabilir. Substrat çözeltisini 25 °C'nin üzerinde ısıtmayın; sadece oda sıcaklığında inkübe edin
HRP-Green çözeltisi inkübasyon süresi doğru değil	Gerekirse inkübasyon süresi 7 dakikaya kadar kısaltılabilir. Substrat çözeltisini 25 °C'nin üzerinde ısıtmayın; sadece oda sıcaklığında inkübe edin

Kırmızı sinyaller çok zayıf

Olası neden	Eylem
AP-Kırmızı Çözelti güçlü doğrudan ışığa maruz bırakıldı	AP-Red Solüsyonunu güçlü doğrudan ışıktan koruyarak hazırlayın ve kullanın
AP-Kırmızı Çözelti çok erken hazırlandı	Hemen kullanmadan önce hazırlayın
AP-Kırmızı Çözelti inkübasyon süresi doğru değil	Gerekirse, inkübasyon süresi 15 dakikaya kadar uzatılabilir
Kromojenik substratın yetersiz hazırlanması	Çözelti A'nın hacmini artırmayın

Yeşil sinyaller çok zayıf

Olası neden	Eylem
HRP-Green ile boyamadan sonra herhangi bir yıkama adımının inkübasyon süresi çok uzun	Verilen inkübasyon sürelerini aşmayın
HRP-Green çözeltisi inkübasyon süresi doğru değil	Gerekirse, inkübasyon süresi 15 dakikaya kadar uzatılabilir
Kromojenik substratın yetersiz hazırlanması	Çözelti A'nın hacmini artırmayın

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
Kesitler uygun şekilde dehidrate edilmemiş	Taze etanol ve ksilen çözeltileri kullanın; yalnızca "saf" kalitede ksilen kullanın

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 fiksatifi 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

- 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 Technolog Med Sci 33*: 379-84.
- Pfarr N, et al. (2017) *Genes chromosomes cancer 56*: 255-264.
- Saito Y, et al. (2016) *Sci Rep 6*: 1-8.
- Schiavon BN, et al. (2012) *Am J Surg Pathol.*
- 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. Revizyon

Revizyon	Onaylanmış kuruluş değişikliği
5.1.1	Onaylanmış kuruluş değişikliği 14. Performans özellikleri doğruluk ekleme
5.2.1	11.Tahlil prosedürü sıcaklığında 10 dakika karanlıkta inkübe edin

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 Zyto*Dot*® , ZytoVision GmbH'nin ticari markalarıdır.