



ZytoLight

SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe Kit

REF Z-2020-5 Σ 5

REF Z-2020-20 Σ 20

Pour la détection qualitative des amplifications du gène ERBB2 et des alpha satellites du chromosome 17 par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)



Dispositif médical de diagnostic in vitro
En accord avec la directive européenne 98/79/CE

1. Utilisation prévue

ZytoLight SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe Kit est prévu pour être utilisé pour la détection qualitative des amplifications du gène ERBB2 chez l'homme ainsi que la détection des alpha satellites du chromosome 17 dans des échantillons fixés au formol et inclus en paraffine tels que des tissus de cancer du sein ou de cancer gastrique de l'homme par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH).

L'interprétation des résultats doit être effectuée dans le contexte de l'histoire clinique du patient par rapport à d'autres données cliniques et pathologiques du patient par un pathologiste qualifié.

2. Pertinence clinique

Le gène ErbB2 (aussi appelé HER2 et NEU) se situe dans la région chromosomique 17q12 et code pour une glycoprotéine transmembranaire de 185-190 kDa, p185, qui agit en tant que récepteur de facteur de croissance cellulaire. La protéine p185 appartient au sous-groupe EGFR (récepteurs de facteur de croissance épidermique) de la superfamille des RTK (récepteurs à activité tyrosine kinase) comprenant aussi les EGFR (ERBB1), ERBB3 (HER3) et ERBB4 (HER4). L'amplification du proto-oncogène ERBB2, observée dans approximativement 20 % de tous les échantillons de cancers du sein, a été mise en corrélation avec un pronostic défavorable de la maladie. Des résultats similaires ont été obtenus pour plusieurs autres néoplasmes malins, tels que le cancer des ovaires, le cancer de l'estomac et les carcinomes des glandes salivaires.

3. Principe du test

L'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) permet la détection et la visualisation de séquences d'acide nucléique spécifiques dans une préparation cellulaire. Les fragments d'ADN marqués par fluorescence, appelés sondes FISH, et leurs brins d'ADN complémentaires dans les échantillons sont dénaturés puis ré-appariés pendant l'hybridation. Par la suite, les fragments de sonde non spécifiques et non hybridés sont éliminés par des étapes de lavage stringent. Après une contre coloration de l'ADN avec du DAPI, les fragments de sondes hybridés sont visualisés au moyen d'un microscope à fluorescence équipé de filtres d'excitation et d'émission spécifiques aux fluorochromes avec lesquels les fragments de sondes FISH ont été marqués.

4. Réactifs fournis

ZytoLight SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe Kit est disponible en deux tailles et est composé de:

| Code | Composant | Quantité | | Contenant |
|------|----------------------------------------------|----------|-----------|--------------------------------------------|
| | | 5 | 20 | |
| PT1 | Heat Pretreatment Solution Citric | 150 ml | 500 ml | Flacon avec bouchon à visser (grand) |
| ES1 | Pepsin Solution | 1 ml | 4 ml | Flacon compte-gouttes, bouchon transparent |
| WB1 | Wash Buffer SSC | 210 ml | 560 ml | Flacon avec bouchon à visser (grand) |
| PL8 | ZytoLight SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe | 0,05 ml | 0,2 ml | Cuve à réaction, couvercle rouge |
| WB2 | 25x Wash Buffer A | 50 ml | 2 x 50 ml | Flacon avec bouchon à visser (moyen) |
| MT7 | DAPI/DuraTect-Solution | 0,2 ml | 0,8 ml | Cuve à réaction, couvercle bleu |
| | Mode d'emploi | 1 | 1 | |

Z-2020-5 (5 tests) : Les composants **ES1**, **PL8** et **MT7** suffisent pour 5 réactions. Le composant **WB2** suffit pour 5 x 3 cuves à coloration de 70 ml chacune. Le composant **PT1** suffit pour 2 cuves à coloration de 70 ml chacune. Le composant **WB1** suffit pour 3 cuves à coloration de 70 ml chacune.

Z-2020-20 (20 tests) : Les composants **ES1**, **PL8**, et **MT7** suffisent pour 20 réactions. Le composant **WB2** suffit pour 11 x 3 cuves à coloration de 70 ml chacune. Le composant **PT1** suffit pour 7 cuves à coloration de 70 ml chacune. Le composant **WB1** suffit pour 8 cuves à coloration de 70 ml chacune.

Le ZytoLight SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe (PL8) est composé de :

- Polynucléotides marqués au ZyGreen (excitation 503 nm/émission 528 nm) (~10,0 ng/ μ l), qui ciblent des séquences en 17q12-q21.1* (chr17:37,572,531-38,181,308) hébergeant la région du gène ERBB2 (voir figure 1).
- Polynucléotides marqués au ZyOrange (excitation 547 nm/émission 572 nm) (~1,5 ng/ μ l), qui ciblent des séquences en 17p11.1-q11.1 particulière pour la région centromérique alpha satellite D17Z1 du chromosome 17.
- Tampon d'hybridation à base de formol

* selon Human Genome Assembly GRCh37/hg19

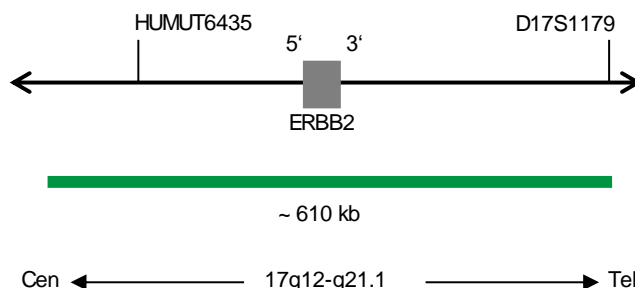


Fig. 1 : Carte de la sonde SPEC ERBB2 (pas à l'échelle)

5. Matériel requis mais non fourni

- Echantillons pour les contrôles positifs et négatifs
- Lames pour microscope, chargées positivement
- Bain-marie (37 °C, 98 °C)
- Système d'hybridation ou plaque chauffante
- Système d'hybridation ou chambre humide dans un four à hybridation
- Pipettes ajustables (10 µl, 25 µl)
- Pots ou bacs de coloration
- Chronomètre
- Thermomètre calibré
- Ethanol ou réactif à l'alcool
- Xylène
- Eau distillée ou déminéralisée
- Lamelles (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Ciment caoutchouc, par exemple : Fixogum Rubber Cement (Prod. N° E-4005-50/-125) ou similaire
- Microscope à fluorescence adéquatement entretenu (400-1000x)
- Huile à immersion compatible avec la microscopie à fluorescence
- Sets de filtres appropriés

6. Stockage et manipulation

Les composants du kit doivent être conservés entre 2 et 8° C. En outre, DuraTect/DAPI-Solution (MT7) et la solution de la sonde (**PL8**) doivent être conservés à l'abri de la lumière. Remettre dans les conditions de stockage immédiatement après utilisation. Si ces conditions de stockage sont suivies, le kit fonctionnera, sans perte d'efficacité, au moins jusqu'à date de péremption imprimée sur l'étiquette. Ne pas utiliser les réactifs après leur date de péremption indiquée sur l'étiquette.

7. Avertissements et précautions

- Lire les instructions avant utilisation !
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
- Ce produit contient des substances (en faibles concentrations et volumes) nocifs pour la santé et potentiellement infectieux. Eviter le contact direct avec ces réactifs. Prenez les mesures de protection appropriées (utilisez des gants jetables, des lunettes de protection et des vêtements de laboratoire).
- Si les réactifs entrent en contact avec la peau, rincer immédiatement avec beaucoup d'eau.
- Une fiche signalétique de sécurité à l'usage de l'utilisateur professionnel est disponible sur demande.
- Ne pas réutiliser les réactifs.
- Éviter la contamination croisée des échantillons car cela peut entraîner des résultats erronés.
- Il ne faut pas laisser sécher les échantillons pendant l'hybridation et les étapes de lavage !
- La sonde (**PL8**) et la DAPI/DuraTect-Solution (MT7) ne doivent pas être exposées à la lumière, en particulier à une lumière intense, pendant longtemps ; c'est-à-dire que chaque étape doit être effectuée, si possible, dans l'obscurité et/ou en utilisant des récipients opaques!

Mentions de danger et conseils de prudence pour PL8 :

Le composant dangereux déterminant est le formol.



Danger

| | |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| H351 | Susceptible de provoquer le cancer. |
| H360FD | Peut nuire à la fertilité. Peut nuire au fœtus. |
| H373 | Risque présumé d'effets graves pour les organes à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée. |
| P201 | Se procurer les instructions spéciales avant utilisation. |
| P202 | Ne pas manipuler avant d'avoir lu et compris toutes les précautions de sécurité. |
| P260 | Ne pas respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols. |
| P280 | Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. |
| P308+P313 | EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée : consulter un médecin. |
| P405 | Garder sous clef. |

Risques et conseils de prudence pour PT1, WB1 et WB2 :

Le composant dangereux déterminant est un mélange de 5-chloro-2-méthyl-4-isothiazoline-3-one [CE n°247-500-7] et 2-méthyl-2h-isothiazol-3-one [CE n° 220-239-6] (3:1).



Avertissement

| | |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| H317 | Peut provoquer une allergie cutanée. |
| P261 | Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols. |
| P272 | Les vêtements de travail contaminés ne devraient pas sortir du lieu de travail. |
| P280 | Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. |
| P302+P352 | EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : Laver abondamment à l'eau et au savon. |
| P333+P313 | En cas d'irritation ou d'éruption cutanée : Consulter un médecin. |
| P362+P364 | Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation. |

8. Restrictions

- Destiné à une utilisation en diagnostic *in vitro*.
- Destiné à un usage professionnel uniquement.
- L'interprétation clinique de la présence ou de l'absence de marquage doit être faite en tenant compte du contexte Clinique, de la morphologie, et d'autres critères histo-pathologiques ainsi que d'autres tests diagnostiques. Il incombe à un pathologiste qualifié de connaître les sondes FISH, les réactifs, les tableaux de diagnostic et les méthodes utilisées pour produire la préparation colorée. La coloration doit être effectuée dans un laboratoire certifié et sous licence sous la supervision d'un pathologiste ayant la responsabilité d'examiner les lames colorées et d'assurer l'adéquation des contrôles positifs et négatifs.
 - La coloration de l'échantillon, en particulier l'intensité du signal et le bruit de fond, dépend de la manipulation et de la préparation de l'échantillon avant marquage. Une mauvaise fixation, congélation, décongélation, un mauvais lavage, séchage, chauffage, de mauvaises coupes, ou une contamination avec d'autres échantillons ou fluides peut produire des artefacts et de faux résultats. Des résultats incohérents peuvent résulter des variations des méthodes de fixation et d'inclusion, ainsi que des irrégularités inhérentes à l'échantillon.
 - La sonde doit être utilisée uniquement pour la détection du locus décrit au paragraphe 4. « Réactifs fournis ».

- Les performances ont été validées en utilisant les instructions décrites dans cette notice. Les modifications de ces procédures peuvent altérer les performances et doivent être validées par l'utilisateur.

9. Substances interférentes

Les globules rouges présents dans l'échantillon peuvent présenter une auto fluorescence qui entrave la reconnaissance du signal.

Les fixateurs suivants sont incompatibles avec la FISH :

- Fixateur de Bouin
- Fixateur B5
- Fixateurs acides comme l'acide picrique
- Fixateur de Zenker
- Alcools (lorsqu'ils sont utilisés seuls)
- Chlorure de mercure
- Fixateur formaldéhyde/zinc
- Fixateur de Hollande
- Formol non tamponné

10. Préparation des échantillons

Recommandations :

- Fixation dans 10 % de formol tamponné pendant 24 h à température ambiante (18 à 25 °C)
- Taille de l'échantillon $\leq 0,5 \text{ cm}^3$.
- Utiliser de la paraffine de bonne qualité
- L'inclusion doit être faite à une température inférieure à 65 °C.
- Préparer des sections de 2-4 μm .
- Utiliser des lames pour microscope chargées positivement
- Fixer pendant 2 à 16 h à 50-60 %.

11. Traitement préparatoire du produit

25x Wash Buffer (WB2) doivent être prétraités conformément aux instructions dans 12, « Protocole ». Tous les autres réactifs du kit sont prêts à l'emploi. Il n'est pas nécessaire de le reconstituer, le mélanger ou le diluer. Mettre la sonde à température ambiante (18 à 25 °C) avant utilisation, à l'abri de la lumière. Avant d'ouvrir le tube, mélanger à l'aide d'un vortexeur et centrifuger brièvement.

12. Protocole

12.1 1er jour

Étapes préparatoires

- (1) *Préparation de deux séries d'éthanol (solutions d'éthanol à 70 %, 90 % et 100 %) :* Diluer de l'éthanol à 100 % avec de l'eau distillée ou désionisée. Ces solutions peuvent être stockées dans des récipients appropriés et peuvent être réutilisées.
- (2) *Heat Pretreatment Solution Citric (PT1) :* Chauffer à 98 °C.
- (3) *Wash Buffer SSC (WB1) :* Amener à température ambiante (TA).
- (4) *ZytoLight FISH Probe :* Amener à TA avant utilisation, à l'abri de la lumière.

Facultatif, lors de l'étape de post-fixation :

*(vivement recommandé si la fixation des tissus n'est pas optimale)
Préparer une solution de Formaldéhyde 1 % à l'aide du Formaldéhyde Dilution Buffer Set (PT-0006-100)*

Prétraitement (déparaffinage/protéolyse)

- (1) Effectuer l'incubation des lames pendant 10 min à 70 °C (par ex., sur une assiette chaude).
- (2) Effectuer l'incubation des lames pendant 2 x 10 min dans du xylène.
- (3) Effectuer l'incubation dans de l'éthanol à 100 %, 100 %, 90 %, et 70 % éthanol, pendant 5 min pour chaque.
- (4) Laver 2 x 2 min dans de l'eau distillée ou désionisée.
- (5) Effectuer l'incubation pendant 15 min dans la Heat Pretreatment Solution Citric (PT1) préchauffée à 98 °C.

Il n'est pas recommandé d'utiliser plus de huit lames par cuve à coloration.

- (6) Transférer les lames immédiatement dans distillée ou désionisée, laver pendant 2 x 2 min et drainer ou éponger l'eau.
- (7) Appliquer (en gouttelettes) la Pepsin Solution (ES1) aux échantillons et effectuer l'incubation pendant 15 min à 37 °C dans une chambre humide.

En fonction de plusieurs facteurs, tels que la nature et la durée de fixation, l'épaisseur des sections, et la nature des tissus/cellules, différents temps d'incubation peuvent être nécessaires. Nos recommandations en matière d'incubation consistent à recommander un temps d'incubation de 2 à 30 min pour les échantillons de tissus et 2 à 15 min pour les échantillons de cellules. En règle générale, nous recommandons de déterminer le moment optimal pour la protéolyse dans des tests préliminaires.

- (8) Laver pendant 5 min dans le Wash Buffer SSC (WB1).

Facultatif, lors de l'étape de post-fixation :

Effectuer l'incubation des lames pendant 15 min dans une solution de Formaldéhyde 1 % et laver ensuite pendant 5 min dans le Wash Buffer SSC (WB1).

- (9) Laver pendant 1 min dans de l'eau distillée ou désionisée.
- (10) Déshydratation : dans l'éthanol à 70 %, 90 % et 100 % pendant 1 min.
- (11) Sécher à l'air les sections.

Remarque : Il faut s'assurer de sécher complètement les sections avant l'application de la sonde car des traces d'humidité pourraient réduire l'intensité du signal et/ou modifier la morphologie des tissus.

Dénaturation et hybridation

- (1) Mettre 10 μl de ZytoLight SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe (PLB) sur chaque échantillon prétraité.

Éviter une longue exposition de la sonde à la lumière.

- (2) Couvrir les échantillons avec des lamelles de 22 mm x 22 mm (en évitant les bulles) et sceller les lamelles.

Nous recommandons d'utiliser un ciment caoutchouc (par exemple le Fixogum) pour sceller.

- (3) Placer les lames sur une plaque chauffante ou dans un système d'hybridation pour dénaturer les échantillons pendant 10 min à 75 °C.
- (4) Transférer les lames dans une chambre humide et hybrider toute la nuit à 37 °C (par exemple dans un four à hybridation).

Il est essentiel que les échantillons de tissus/cellules ne sèchent pas pendant l'étape d'hybridation.

12.2 2^e jour

Étapes préparatoires

- (1) *Préparation de 1 x tampon de lavage A :* Diluer 1 volume des 25x Wash Buffer A (WB2) avec 24 volumes d'eau distillée ou désionisée. Remplir trois cuves à coloration avec le 1 x tampon de lavage A et le préchauffer à 37 °C.
- (2) DAPI/DuraTect-Solution (MT7) : Amener à température ambiante avant utilisation, à l'abri de la lumière.

Post-hybridation et détection

- (1) Retirer délicatement la colle caoutchouc ou la colle.
- (2) Retirer la lamelle en la plongeant dans 1 x tampon de lavage A à 37 °C pendant 1 à 3 min.
- (3) Laver à l'aide de 1 x tampon de lavage A pendant 2x 5 min à 37 °C

Le 1x Wash Buffer A doit être préchauffé. Vérifier avec un thermomètre si nécessaire.

- (4) Effectuer l'incubation des lames dans de l'éthanol à 70 %, 90 % et 100 %, pendant 1 min pour chaque.
- (5) Sécher à l'air les échantillons à l'abri de la lumière.
- (6) Mettre 25 μl de DuraTect/DAPI-Solution (MT7) sur les lames. Couvrir les échantillons avec une lamelle (24 mm x 60 mm) en évitant les bulles. Effectuer l'incubation dans l'obscurité pendant 15 min.

L'utilisation d'un embout de pipette qui a été coupé afin d'augmenter la taille de l'ouverture peut simplifier le processus de pipetage. Éviter une longue exposition de la sonde à la lumière.

- (7) Stocker la lame dans le noir. Pendant des périodes de stockage plus longues, cela doit se faire entre 2 et 8 °C.
- (8) L'évaluation de l'échantillon est réalisée par microscopie à fluorescence. Les sets de filtres pour les plages de longueurs d'onde suivantes sont requis :

| Colorant fluorescent | Excitation | Émission |
|----------------------|------------|----------|
| ZyGreen | 503 nm | 528 nm |
| ZyOrange | 547 nm | 572 nm |

13. Interprétation des résultats

Au moyen de l'utilisation de sets de filtres appropriés, les signaux d'hybridation de la sonde apparaissent en vert (région du gène ERBB2) et en orange (CEN 17).

Situation normale : Dans les interphases de cellules normales ou de cellules sans une translocation impliquant la région du gène ERBB2, deux signaux verts et deux signaux orange apparaissent (voir figure 2).

Situation aberrante : Dans les cellules avec une amplification de la région du gène ERBB2, on observera une augmentation du nombre de signaux verts ou de groupes de signaux verts (voir figure 2).

Des signaux se chevauchant peuvent apparaître comme étant des signaux jaunes.

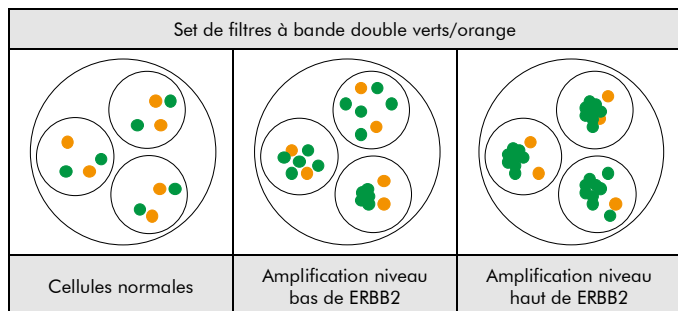


Fig. 2 : Résultats attendus dans les noyaux en interphase normale et présentant une aberration

Une autre distribution de signal peut être observée dans certains échantillons anormaux qui pourraient entraîner un motif de signal différent de celui décrit ci-dessus, ce qui indique des variations de réarrangements. Les modèles de signaux inattendus devraient être étudiés de manière plus approfondie.

Veillez noter :

- En raison de la chromatine décondensée, les signaux FISH simples peuvent apparaître comme de petits groupes de signaux. Ainsi, deux ou trois signaux de même taille, séparés par une distance ≤ 1 au diamètre de signal, doivent être comptés comme un seul signal.
- Ne pas prendre en compte les chevauchements de noyaux.
- Ne pas compter les noyaux trop digérés (reconnaissables par des zones noires visibles dans le noyau).
- Ne pas compter des noyaux ayant une forte auto-fluorescence, ce qui entrave la reconnaissance du signal.
- Un résultat négatif ou équivoque peut être causé par différents facteurs (voir chapitre 17).
- Afin d'interpréter correctement les résultats, l'utilisateur doit valider ce produit avant de l'utiliser dans des procédures de diagnostic conformément aux directives nationales et/ou internationales.

14. Procédures de contrôle qualité recommandées

Afin de surveiller les performances correctes des spécimens traités et des réactifs d'essai, chaque dosage doit être accompagné de contrôles internes et externes. Si les contrôles internes et/ou externes n'indiquent pas une coloration appropriée, les résultats avec les échantillons de patients doivent être considérés comme invalides.

Contrôle interne : Cellules non néoplasiques dans l'échantillon qui présentent un motif de signal normal, par exemple des fibroblastes.

Contrôle externe : Echantillons contrôles négatifs et positifs validés.

15. Caractéristiques de performances

Précision : La localisation de l'hybridation de la sonde a été évaluée sur des étalements de métaphase d'hommes normaux du point de vue du caryotype. Dans tous les échantillons testés, la sonde s'est hybridée uniquement aux loci attendus. Il n'a été observé aucun signal supplémentaire et aucune hybridation croisée supplémentaire. Par conséquent, l'exactitude calculée était de 100 %.

Sensibilité analytique : Pour l'évaluation de la sensibilité analytique, la sonde a été évaluée sur des étalements de métaphase d'hommes normaux du point de vue du caryotype. Tous les noyaux ont présenté un modèle de signaux normaux attendus dans tous les échantillons testés. Par conséquent, la sensibilité analytique calculée était de 100 %.

Spécificité analytique : Pour l'évaluation de la spécificité analytique, la sonde a été évaluée sur des étalements de métaphase d'hommes normaux du point de vue du caryotype. Dans tous les échantillons testés, tous les signaux se sont hybridés uniquement aux loci cibles attendus et pas d'autres loci. Par conséquent, la spécificité analytique calculée était de 100 %.

16. Elimination

L'élimination des réactifs doit être effectuée conformément à la réglementation locale.

17. Assistance

Tout écart par rapport au mode d'emploi peut conduire à des résultats de coloration inférieurs ou à aucune coloration du tout.

Faible signal ou aucun signal

| Cause possible | Action |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Pas de séquence cible disponible | Utiliser les contrôles appropriés |
| L'échantillon de cellules ou de tissu n'est pas correctement fixé | Optimiser le temps de fixation et le fixateur ou ajouter une étape de post-fixation en suivant les instructions dans 12, « Protocole ». |
| Le prétraitement à la chaleur, la protéolyse, la dénaturation, l'hybridation ou le lavage stringent ont été faits à une mauvaise température | Vérifier la température de tous vos instruments utilisés, en utilisant un thermomètre calibré |
| Le prétraitement protéolytique n'est pas effectué correctement | Optimiser le temps d'incubation de la pepsine, l'augmenter ou le diminuer si nécessaire |
| Evaporation de la sonde | Lors de l'utilisation d'un système d'hybridation, l'utilisation des bandes humides/réservoirs remplis d'eau est obligatoire. Lors de l'utilisation d'un four à hybridation, il faut utiliser une chambre humide. En outre, la lamelle doit être complètement scellée, par exemple avec du Fixogum, afin d'empêcher le séchage de l'échantillon lors de l'hybridation |
| Le tampon de lavage stringent a une concentration trop basse | Vérifier la concentration de <u>tampon de lavage A</u> |
| Anciennes solutions de déshydratation | Préparer des nouvelles solutions de déshydratation |
| Microscope à fluorescence mal réglé | Régler correctement |
| Mauvais sets de filtres utilisés | Utiliser les sets de filtres appropriés aux fluorochromes de la sonde. <i>Les sets de filtres à bande triple offrent moins de luminosité par rapport aux sets de filtres à bande unique ou double bande. Par conséquent, les signaux peuvent sembler plus faibles en utilisant les sets de filtres à bande triple</i> |
| Sondes/fluorochromes endommagés par la lumière | Effectuer les étapes d'hybridation et de lavage dans l'obscurité. |

Signaux d'hybridation croisée ; bruit de fond

| Cause possible | Action |
|---------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Déparaffinage incomplet | Utiliser de nouvelles ; vérifier le temps de déparaffinage |
| Prétraitement protéolytique trop fort | Réduire le temps d'incubation de la pepsine |
| Volume de sonde par zone trop important | Réduire le volume de sonde par coupe/zone, distribuer la sonde en gouttelettes pour éviter la concentration locale |
| Les lames sont refroidies à température ambiante avant l'hybridation | Transférer les lames rapidement à 37 °C |
| Concentration du tampon de lavage stringent trop élevée | Vérifier la concentration de <u>tampon de lavage A</u> |
| Température de l'étape de lavage suivant l'hybridation trop basse | Vérifier la température et l'augmenter si nécessaire |
| Déshydratation des échantillons entre les différentes étapes d'incubation | Eviter la déshydratation en scellant les lames et en effectuant les étapes d'incubation dans un environnement humide |

Morphologie tissulaire dégradée

| Cause possible | Action |
|----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Les échantillons de cellules ou de tissus n'ont pas été fixés correctement | Optimiser le temps de fixation et le fixateur ou ajouter une étape de post-fixation en suivant les instructions dans 12, « Protocole ». |
| Le prétraitement protéolytique n'est pas effectué correctement | Optimiser le temps d'incubation de la pepsine, l'augmenter ou le diminuer si nécessaire |
| Séchage insuffisant avant l'application de la sonde | Prolonger le séchage à l'air |

Noyaux chevauchants

| Cause possible | Action |
|----------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| Epaisseur inappropriée des sections de tissu | Préparer des coupes au microtome de 2-4 µm d'épaisseur |

Echantillon glissant sur la lame

| Cause possible | Action |
|---------------------------------------|---------------------------------------------|
| Revêtement antidérapant inadéquat | Utiliser des lames appropriées |
| Prétraitement protéolytique trop fort | Réduire le temps d'incubation de la pepsine |

Contre coloration faible

| Cause possible | Action |
|--------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| Solution DAPI faiblement concentrée | Utiliser à la place le produit <u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (Prod. N° MT-0008-0.8) |
| Temps d'incubation avec le DAPI trop court | Ajuster le temps d'incubation avec le DAPI |

18. Bibliographie

- Baselga J, et al. (1999) *J Clin Oncol* 26: 78-83.
- Brunello E, et al. (2012) *Histopathology* 60: 482-8.
- Brunner K, et al. (2010) *Anal Quant Cytol Histol* 32: 78-89.
- Cochet A, et al. (2012) *J Nucl Med* 53: 512-20.
- Coussens L, et al. (1985) *Science* 230: 1132-9.
- Ettl T, et al. (2012) *Hum Pathol* 43: 921-31.
- Ettl T, et al. (2012) *Br J Cancer* 106: 719-26.
- Fasching P, et al. (2011) *BMC Cancer* 11: 486.
- Bos M, et al. (2011) *Virchows Arch* 458: 403-11.
- Hillig T, et al. (2012) *APMIS* 120: 1000-7.
- Humbert O, et al. (2012) *Ann Oncol* 23: 2572-7.
- Hwang CC, et al. (2011) *Histopathology* 59: 984-92.
- Hynes NE & Stern DF (1994) *Biochim Biophys Acta* 1198: 165-84.
- Jäger M, et al. (2009) *Cancer Res* 69: 4270-6.
- T. Kievits et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Lang D, et al. (2008) *Diagn Pathol* 3: 49ff.
- Lehmann-Che L, et al. (2011) *Br J Cancer* 104: 1739-46.
- Bos M, et al. (2012) *Oncology* 83: 257-63.
- Moelans CB, et al. (2011) *Crit Rev Oncol Hematol* 80: 380-92.
- Oliveira-Costa JP, et al. (2011) *Diagn Pathol* 6: 73.
- Park JB, et al. (1989) *Cancer Res* 49: 6605-9.
- Parris TZ, et al. (2010) *Clin Cancer Res* 16: 3860-74.
- Perrone G, et al. (2012) *PLoS One* 7: e43110.
- Popescu NC, et al. (1989) *Genomics* 4: 362-6.
- Sassen A, et al. (2008) *Breast Cancer Res* 10: R2.
- Sassen A, et al. (2009) *Breast Cancer Res* 11: R50.
- Schindlbeck C, et al. (2010) *J Cancer Res Clin Oncol* 136: 1029-37.
- Slamon DJ, et al. (1987) *Science* 235: 177-82.
- Vollmann-Zwerenz A, et al. (2010) *Cytometry Part A* 77: 387-99.
- Voutsas IF, et al. (2013) *Int J Radiat Biol* 89: 319-25.
- D.G. Wilkinson: *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.

Nos experts sont disponibles pour répondre à vos questions.

Merci de nous contacter à helptech@zytovision.com



ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/Allemagne
Téléphone : +49 471 4832-300
Fax : +49 471 4832-509
www.zytovision.com
Courriel : info@zytovision.com

Marques déposées :

ZytoVision® et ZytoLight® sont des marques déposées de ZytoVision GmbH.