



ZytoDot 2C SPEC ERBB2/CEN 17 Probe Kit

REF C-3022-10 Σ 10

REF C-3022-40 Σ 40

Kromojenik *in situ* hibridizasyon (CISH) ile insan ERBB2 geni amplifikasyonlarının ve 17. kromozom alfa uydularının kalitatif tespiti için



Vücut dışında kullanılan (*in vitro*) tıbbi tanı cihazı

98/79/EC AB Yönetmeliğine göre

1. Kullanım amacı

ZytoDot 2C SPEC ERBB2/CEN 17 Probe Kit formalin-fikse, parafine gömülü örneklerde insan ERBB2 genini içeren amplifikasyonların ve de 17. kromozom alfa uydularının kromojenik *in situ* hibridizasyon (CISH) ile kalitatif tespitinde kullanılmak içindir.

Sonuçların yorumlanması hastanın diğer klinik ve patolojik verileri dikkate alınarak hastanın klinik geçmişi kapsamında yetkin bir patoloj tarafından yapılmalıdır.

2. Klinik bağlantısı

ERBB2 geni (HER2 ve NEU olarak da bilinir) 17q12 kromozom bölgesinde yer alır ve hücre büyüme faktörü reseptörü p185'i kodlar. Tüm meme kanseri örneklerinin yaklaşık %20'inde gözlenen proto-onkogen ERBB2 amplifikasyonu hastalığın zayıf prognozu ile ilişkilendirilmiştir. Over kanseri, mide kanseri ve tükürük bezi kansinömları gibi çeşitli diğer malin neoplazmlarda benzer sonuçlar elde edilmiştir.

3. Test prensibi

Kromojenik *in situ* hibridizasyon (CISH) tekniği hücre preparatlarında spesifik nükleik asit dizilerinin tespit edilmesine ve görüntülenmesine imkan verir. CISH problemleri deneyim hapten-ışaretleli nükleotid fragmentleri ve preparatlardaki komplementer hedef dizileri birlikte denatüre edilirler ve sonrada hibridizasyon ile birbirine kaynamaları sağlanır. Daha sonra, spesifik olmayan ve bağlanma yapmamış prob fragmentleri güçlü yıkama adımları ile ortamdan uzaklaştırılır. İşaretleli probun dupleks oluşumu sekonder polimerize enzim-konjuge antikorlar tarafından tespit edilen primer (ışaretsiz) antikorlar kullanılarak görüntülenebilir. Kromojenik substratlar ile meydana gelen enzimatik reaksiyon renkli çöktürmelerin oluşmasına yol açar. Hibridize olmuş problemler hücre çekirdeğinin bir çekirdek boyası ile zıt boyanmasından sonra ışık mikroskopunda görüntülenebilir.

4. Sağlanan reaktifler

ZytoDot 2C SPEC ERBB2/CEN 17 Probe Kit iki şekilde temin edilir ve şunları içerir:

Kod	Bileşen	Miktar		Ambalaj
		40 Σ	10 Σ	
PT2	Heat Pretreatment Solution EDTA	500 ml	150 ml	Vidalı kapaklı şişe (büyük)
ES1	Pepsin Solution	4 ml	1 ml	Damlalıklı şişe, beyaz kapaklı
PD12	ZytoDot 2C SPEC ERBB2/CEN 17 Probe	0.4 ml	0.1 ml	Reaksiyon tüpü, kahverengi kapaklı
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 kapak
AB13	HRP/AP-Polymer-Mix	4 ml	1 ml	Damlalıklı şişe, mavi kapak
SB6a	AP-Red Solution A	0.4 ml	0.1 ml	Damlalıklı şişe, kırmızı kapak (küçük)
SB6b	AP-Red Solution B	15 ml	4 ml	Damlalıklı şişe, kırmızı kapak
SB7a	HRP-Green Solution A	0.8 ml	0.2 ml	Damlalıklı şişe, yeşil kapak (küçük)
SB7b	HRP-Green Solution B	15 ml	4 ml	Damlalıklı şişe, yeşil kapak
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	Ölçekli kap, kırmızı kapak
	HRP-Green reaksiyon kabı	2	1	Ölçekli kap, yeşil kapak
	Kullanma kılavuzu	1	1	

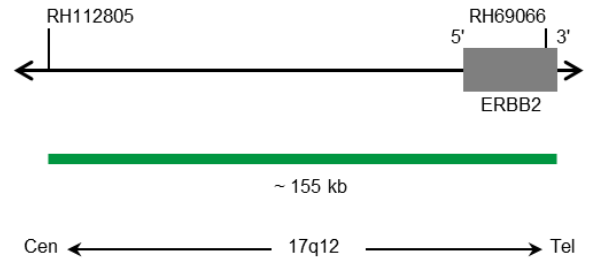
C-3022-10 (10 test): PD12, ES1, AB14, AB13, SB6a-b, SB7a-b, CS2, ve MT4 bileşenleri 10 reaksiyon için yeterlidir. PT2 bileşeni her biri 70 ml olan 2 boyama kabı için yeterlidir. WB1 bileşeni her biri 70 ml olan 3 boyama kabı için yeterlidir. WB5 bileşeni her biri 70 ml olan 14 boyama kabı için yeterlidir.

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.

ZytoDot 2C SPEC ERBB2/CEN 17 Probe (PD12) şunlardan meydana gelir:

- Digoksigenin-ışaretleli polinükleotidler (~1,1 ng/ μ l), 17q12* (chr17:37,725,661-37,882,844) konumunda bulunan ERBB2 gen bölgesini içeren dizileri hedef alır (bkz. Şekil 1).
- Dinitrofenil-ışaretleli polinükleotidler (~1,1 ng/ml) 17p11.1-q11.1 konumunda bulunan, 17. kromozomun D17Z1 alfa uydusu sentromer bölgesine spesifik dizileri hedef alır.
- Formamid tabanlı hibridizasyon tamponu

*Human Genome Assembly GRCh37/hg19'a göre



Şekil 1: SPEC ERBB2 Prob yapısı (ölçekli değildir)

5. Gerekli diğer malzemeler

- Pozitif ve negatif kontrol örnekleri
- Mikroskop lamaları, pozitif yüklü
- Su banyosu (80°C, 98°C)
- Hibridizasyon cihazı veya sıcak levha
- Hibridizasyon cihazı veya hibridizasyon etüvünde nemli kutu
- Ayarlanabilir pipetler (10 µl, 1000 µl)
- Boyama kapları veya banyoları
- Zaman Sayacı
- Kalibre edilmiş termometre
- Etanol veya reaktif dereceli alkol
- Ksilen
- Metanol %100
- Hidrojen Peroksit (H₂O₂) %30
- Deiyonize veya distile su
- Lamel (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Lastik yalıtım solüsyonu, örn., Fixogum Rubber Cement (Ürün No. E-4005-50/-125) veya benzeri
- Uygun donanımlı ışık mikroskobu (400-630x)

6. Saklama ve kullanma koşulları

2-8°C'de dik olarak saklayın. Kullandıktan sonra hemen saklama koşullarına ulaştırın. Reaktifleri etiketleri üzerinde belirtilen son kullanma tarihlerinden sonra kullanmayın. Ürün, uygun şekilde kullanıldığında ve saklandığında etiketi üzerinde belirtilen son kullanma tarihine kadar kullanılabilir.

7. Uyarılar ve önlemler

- Kullanmadan önce kullanma kılavuzunu okuyun!
- Son kullanma tarihi gelen ürünleri kullanmayın!
- Bu ürün sağlığa zararlı ve potansiyel olarak enfeksiyöz maddeler içerir (düşük konsantrasyonlarda ve hacimlerde). Reaktiflere doğrudan temas etmekten sakının. Uygun önlemleri alın (tek kullanımlık eldiven, koruyucu gözlük ve laboratuvar giysileri giyin)!
- Ürün ile ilgili olarak meydana gelen herhangi bir kazayı üreticiye ve yerel mevzuata uygun olarak yetkili makama bildirin!
- Reaktifler cilt ile temas ederse cildi derhal bol miktarda su ile yıkayın!
- Web sitemizde (www.zytovision.com) bir güvenlik bilgi formu bulunmaktadır!
- Aksi açıkça belirtilmemişse reaktifleri tekrar kullanmayın!
- Örnekler arasında çapraz kontaminasyon olmasından ve mikrobakteriyel kontaminasyon olmasından sakının!
- Hibridizasyon ve yıkama aşamaları sırasında örneklerin kurumasına izin verilmemelidir!

ES1 için özel etiket ifadeleri:

EUH208	Pepsin A içerir. Alerjik reaksiyona yol açabilir.
EUH210	Talep halinde güvenlik bilgi formu sağlanabilir. Karışımın % 20'sinden daha azı bilinmeyen akut toksisiteye (soluma) sahip içerik(ler)den meydana gelir.

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.

PD12 için zararlılık ve önlem ifadeleri:

Zararlılık belirleyici bileşen Formamid'tir.



Tehlike

H351	Kansere yol açma şüphesi var.
H360FD	Üremeye zarar verebilir. Doğmamış çocukta hasara yol açabilir.
H373	Uzun süreli veya tekrarlı maruz kalma sonucu organlarda hasara yol açabilir.
P201	Kullanmadan önce özel talimatları okuyun.
P202	Bütün önlem ifadeleri okunup anlaşılmadan elleçlemeyin.
P260	Tozunu/dumanını/gazını/sisini/buharını/spreyini solumayın.
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.

CS2 için zararlılık ve önlem ifadeleri:

Zararlılık belirleyici etandiol, etilen glikol'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 alın.

MT4 için zararlılık ve önlem ifadeleri:

Zararlılık belirleyici bileşen ksilendir.

**Tehlike**

H226	Alevlenir sıvı ve buhar.
H304	Solunum yoluna nüfuzu ve yutulması halinde öldürücüdür.
H302	Yutulması halinde zararlıdır.
H332	Solunması halinde zararlıdır.
H335	Solunum yolu tahrişine yol açabilir.
H319	Ciddi göz tahrişine yol açar.
H315	Cilt tahrişine yol açar.
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.
P303+P361+P353	DERİ (veya saç) İLE TEMAS HALİNDE İSE: Kirlenmiş tüm giysilerinizi hemen kaldırın/çıkartın. Cildinizi su/duş ile durulayın.
P301+P310	YUTULDUĞUNDA: ULUSAL ZEHİR DANIŞMA MERKEZİNİN 114 NOLU TELEFONUNU veya doktoru/hekimi arayın.
EUH208	methyl 2-methylprop-2-enoate; methyl 2-methylpropenoate; methyl methacrylate içerir. Alerjik reaksiyona yol açabilir.

8. Sınırlamalar

- Yalnızca vücut dışı (*in vitro*) tıbbi tanı amaçlı kullanım içindir.
- Yalnızca profesyonel kullanım içindir.
- Herhangi bir pozitif boyanmanın veya boyanma olmamasının klinik yorumlaması başka tanı testleri ile birlikte klinik geçmiş, morfoloji ve diğer histopatolojik kriterler kapsamında yapılmalıdır. Preparatın boyanmasında kullanılan CISH problemleri, reaktifler, tanı panelleri ve yöntemleri hakkında bilgi sahibi olmak yetkin bir patoloğun sorumluluğudur. Boyama işlemi onaylı ve lisanslı bir laboratuvarında, boyanmış lamaların incelenmesinden sorumlu olan ve pozitif ve negatif kontrollerin yeterliliğini garanti eden bir patoloğun gözetiminde yapılmalıdır.
- Örneğin boyanması, özellikle de sinyalin yoğunluğu ve zemin boyanması, örneğin boyamadan önce geçtiği işlem ve hazırlık süreçlerine bağlıdır. Kötü fiksasyon, dondurma, çözme, yıkama, kurutma, ısıtma, kesit alma veya diğer örneklerle ya da sıvılarla kontamine etme artefaktlara veya yanlış sonuçlara yol açabilir. Tutarsız sonuçlar fiksasyon ve gömme yöntemlerindeki değişikliklerden ve de örneğin kendi içinde olan düzensizliklerden meydana gelebilir.
- Prob yalnızca 4. "Sağlanan reaktifler" bölümünde tanımlanan lokusların tespit edilmesi için kullanılmalıdır.
- Ürünün performansı bu kullanma kılavuzunda tanımlanan prosedürler kullanılarak doğrulanmıştır. Bu prosedürlerde yapılan değişiklikler performansı değiştirebilir ve doğrulanması kullanıcı tarafından yapılmalıdır.

9. Etkileşimli maddeler

Aşağıdaki fiksatifler ISH ile uyumlu değildir:

- Bouin's fiksatif
- B5 fiksatif
- Asidik fiksatifler (örn., pikrik asit)
- Zenker's fiksatif
- Alkoller (tek başına kullanıldığında)
- Civa klorür
- Formaldehit/çinko fiksatif

- Hollande's fiksatif
- Tamponsuz formalin

10. Örneklerin 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 fikse edin.

11. Ürünün kullanıma hazırlanması

20x Wash Buffer TBS (WB5) 12. "Çalışma Prosedürü" bölümündeki talimatlara göre hazırlanmalıdır. Kitin tüm diğer bileşenleri kullanıma hazırdır. Yeniden sulandırmaya, karıştırmaya veya dilüsyon yapmaya gerek yoktur.

Kullanmadan önce probun oda sıcaklığına ulaşmasına izin verin ve hafifçe karıştırın.

12. Çalışma prosedürü**12.1 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 2C 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 kutu içinde 37°C'de 5-15 dakika inkübe edin.

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 prob 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 79°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.

12.2 İkinci Gün**Hazırlık adımları**

1. Wash Buffer SSC (WB1): Güçlü yıkama işlemi için üstü kapalı bir boyama kabında 80°C'ye ısıtın.
 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 1 hafta 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 presipitat oluşturabilir. Bu oluşum boyama kalitesini etkilemez.

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 TBS içine yerleştirin.
 6. Lamlara Anti-DIG/DNP-Mix (AB14) (her lama1-2 damla) uygulayın ve bir nemli kap içinde 37°C'de 15 dakika inkübe edin.
 7. Lamları 1x Wash Buffer TBS içinde 3x 1 dakika yıkayın.
 8. Lamlara HRP/AP-Polymer-Mix (AB13) (her lama1-2 damla) uygulayın ve bir nemli kap içinde 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 AP-Red Solution uygulayın (her lama 1-2 damla) ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edin.
 12. İnkübasyon sırasında HRP-Green Solution (çalışma solüsyonu) hazırlayın: Ölçekli bir tüpe 1 ml HRP-Green Solution B (SB7b) koyun ve iki damla (2x 20 µl) HRP-Green Solution A (SB7a) ekleyin. İyice karıştırın.
 13. Lamları deiyonize veya distile su ile 2 dakika yıkayın.
 14. Lamlara HRP-Green Solution uygulayın (her lama 1-2 damla) ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edin.
 15. Lamları deiyonize veya distile su ile 2 dakika yıkayın.
 16. Nuclear Blue Solution (CS2) ile lamlara 2 dakika zıt boyama yapın.
 17. Lamları bir boyama kabına aktarın ve akan soğuk suda 2 dakika yıkayın.
 18. %100 etanol ile 3x 30 saniye dehidrasyon yapın (çok saf alkol kullanın)

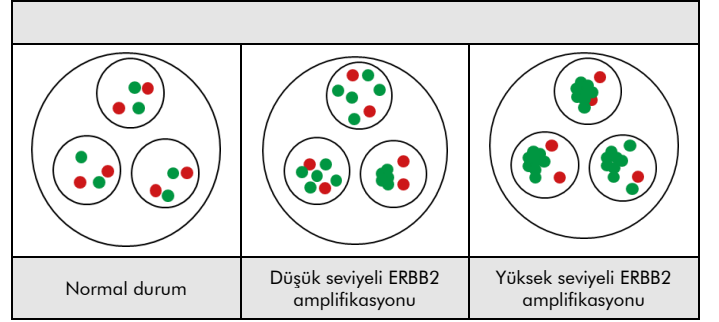
19. Lamları ksilen içinde 2x 30 saniye inkübe edin (çok saf ksilen kullanın).
20. Mounting Solution (alcoholic) (MT4) kullanarak hava kabarcığı bırakmadan örnekleri bir lamel (22 mm x 22 mm; 24 mm x 32 mm) ile kapatın. Lamelin tamamen sabitlenmesi için 20-30 dakika bekleyin.
21. Boyanan örnekleri ışık mikroskopunda değerlendirin.

13. Sonuçların yorumlanması

Digoksinjenin-işaretili polinükleotidlerin hibridizasyon sinyalleri koyu yeşil renkte belirgin noktalar şeklinde (ERBB2 gen bölgesi), Dinitrofenil işaretili polinükleotidler ise parlak kırmızı renkte belirgin noktalar şeklinde (CEN 17) gözlenir.

Normal durum: Normal hücrelerin veya ERBB2 gen bölgesini içeren bir amplifikasyonu olmayan hücrelerin interfazlarında iki adet belirgin nokta şeklinde yeşil sinyal ve iki adet belirgin nokta şeklinde kırmızı sinyal görülür (bkz. Şekil 2).

Anormal durum: ERBB2 gen bölgesinde amplifikasyon olan hücrelerde daha fazla sayıda yeşil sinyal veya yeşil sinyal kümelenmeleri gözlenir (bkz. Şekil 2).



Şekil 2: Normal ve anormal hücre çekirdeklerinde beklenen sonuçlar

Bazı anormal örneklerde yukarıda belirtilenden farklı bir sinyal modeli oluşturabilen başka sinyal dağılımları gözlenebilir ve bu varyant yeniden düzenlenmelerini gösterir. Beklenmeyen sinyal modelleri daha fazla araştırılmalıdır.

Lütfen dikkat edin:

- Kromatinin yoğunluğunu kaybetmesinden dolayı tek CISH sinyalleri küçük kümeler gibi görünebilir. Bu yüzden, aralarında 1 sinyal çapından daha düşük veya ona eşit mesafe bulunan aynı büyüklükteki iki veya üç sinyal tek sinyal sayılmalıdır.
- Sinyal sayımından önce, herhangi bir olası intratümöral heterojenlik bakımından örnek 100 ila 200 büyütmede taranmalıdır.
- Sinyallerin görüntülenmesi en az 400 büyütmede yapılmalıdır, böylece sinyaller daha kolay görüntülenebilir. Kromozom kırılmalarını tespit eden problemler için 630 büyütme kullanılması önerilir. Kontrast güçlendiren filtreler kullanmayın çünkü sinyal rengi bozulabilir. Parlak renkli sinyaller görmek için apertür diyaframını açın. Bir çekirdeği incelerken odağı aşağı ve yukarı kaydırın çünkü kırmızı ve yeşil sinyaller birbirinin üzerinde bulunabilir.
- Nekroz, üst üste gelmiş hücre çekirdekleri, aşırı sindirilmiş hücre çekirdekleri ve sinyal yoğunluğu zayıf olan hücre çekirdekleri bulunan bölgeleri değerlendirmeyin.
- Neoplastik olmayan hücrelerin küçük bir yüzdesinde bile mitoz nedeniyle ilave sinyaller görülebilir. Parafine gömülü örneklerde kesit artefaktları nedeniyle zaman zaman sinyal vermeyen hücre çekirdekleri gözlenebilir.
- Negatif veya spesifik olmayan bir sonuç çok sayıda etken sebebiyle meydana gelebilir (17. Bölüme bakınız).
- Sonuçları doğru yorumlamak için kullanıcı bu ürünü tanı prosedürlerinde kullanmadan önce ulusal ve/veya uluslararası yönergelere göre doğrulanmalıdır.

14. Önerilen kalite kontrol prosedürleri

İşlenen örneklerin ve test reaktiflerinin doğru performans gösterdiklerini izlemek için her deneye iç ve dış kontroller dahil edilmelidir. İç ve/veya dış kontroller uygun boyanma göstermezse hasta örnekleri ile alınan sonuçlar geçersiz kabul edilmelidir.

İç kontrol: Örnek içindeki normal sinyal modeli gösteren neoplastik-olmayan hücreler, örn., fibroblastlar.

Dış kontrol: Doğrulanmış pozitif ve negatif kontrol örnekleri.

15. Performans özellikleri

Proben performansı dengi olan IVD onaylı FISH probu ile karşılaştırılarak belirlenmiştir. Uyum %100'dür.

Doğruluk: Doğruluk %100 olarak hesaplanmıştır.

Analitik duyarlılık: Analitik duyarlılık %100 olarak hesaplanmıştır.

Analitik özgüllük: Analitik özgüllük %100 olarak hesaplanmıştır.

16. Atık bertarafı

Reaktiflerin bertarafı yerel düzenlemelere uygun olarak yapılmalıdır.

17. Sorun giderme

Çalışma talimatlarına uyulmaması hatalı sonuçların alınmasına veya sonuç alınamamasına sebep olabilir.

Zayıf sinyaller veya hiç sinyal bulunmaması

Olası sebep	Önlem
Hücre veya doku örneği doğru fikse olmamış	Fiksasyon süresini ve fiksatifi optimize edin
Isı ön işleme, proteoliz, hibridizasyon, denatürasyon, güçlü yıkama veya antikör inkübasyonu sıcaklığı doğru değil	Kullanılan tüm teknik araçların sıcaklığını kalibre edilmiş bir termometre ile kontrol edin. Sıcaklığı kritik olan solüsyonlarda her zaman aynı sayıda lam kullanın.
Proteolitik ön işlem doğru yapılmamış	Fiksasyonun yapısı ve süresi, kesitlerin kalınlığı ve dokunun/hücrelerin yapısı gibi çok sayıda faktöre bağlı olarak farklı inkübasyon süreleri gerekebilir. Ön denemeler yaparak pepsin inkübasyonu için optimum süreyi belirleyin.
Hibridizasyon süresi çok kısa	Hibridizasyonu en az 12 saat yapın; gerekirse hibridizasyon süresini uzatın.
Dehidrasyon solüsyonları eski	Taze dehidrasyon solüsyonları hazırlayın.
Prob buharlaşması	Bir hibridizasyon cihazı kullanırken ıslak şartların / su dolu haznelerin kullanılması zorunludur. Bir hibridizasyon etüvü kullanırken bir nemli kutunun kullanılması gerekir. Ayrıca, hibridizasyon sırasında örneğin kurumasını önlemek için lamel iyice yalıtılmalıdır (örn. Fixogum ile)
Kromojenik substratın inkübasyon süresi çok kısa	İnkübasyon süresini uzatın.
Zıt boyama süresi çok uzun	Zıt boyama süresi örneğin yapısına bağlıdır ve buna göre optimize edilmelidir. Koyu zıt boyanma olmasından kaçının çünkü pozitif boyanma sinyallerini engelleyebilir.
Zıt boyamada mavileştirme düzgün yapılmamış	Mavileştirme için soğuk akan çeşme suyu kullanın; ılık veya sıcak su ya da mavileştirme reaktifleri kullanmayın

Sinyaller çok kuvvetli

Olası sebep	Önlem
Yapılan proteoliz ön işleme çok uzun	Fiksasyonun yapısı ve süresi, kesitlerin kalınlığı ve dokunun/hücrelerin yapısı gibi çok sayıda faktöre bağlı olarak farklı inkübasyon süreleri gerekebilir. Ön denemeler yaparak pepsin inkübasyonu için optimum süreyi belirleyin.

AP-Red Solution inkübasyonu doğru değil	Gerekirse inkübasyon süresi 5 dakikaya kısaltılabilir. Substrat solüsyonunu 25°C'nin üzerine ısıtmayın; yalnızca oda sıcaklığında inkübe edin.
HRP-Green Solution inkübasyonu doğru değil	Gerekirse inkübasyon süresi 7 dakikaya kısaltılabilir. Substrat solüsyonunu 25°C'nin üzerine ısıtmayın; yalnızca oda sıcaklığında inkübe edin.

Kırmızı sinyaller çok zayıf

Olası sebep	Önlem
AP-Red Solüsyonu güçlü ışığa doğrudan maruz kalmış	AP-Red solüsyonunu güçlü ışığın doğrudan temasından uzak tutarak hazırlayın ve kullanın.
AP-Red solüsyonu çok erken hazırlanmış	Kullanmadan hemen önce hazırlayın
AP-Red solüsyonunun inkübasyon süresi doğru değil	Gerekirse inkübasyon süresi 15 dakikaya kadar uzatılabilir.
Kromojenik substrat hazırlanması doğru değil	Solution A'nın hacmini artırmayın

Yeşil sinyaller çok zayıf

Olası sebep	Önlem
HRP-Green ile boyama yapılmasından sonraki yıkama adımlarından herhangi birinin inkübasyon süresi çok uzun	Belirten inkübasyon sürelerini aşmayın.
HRP-Green solüsyonunun inkübasyon süresi doğru değil	Gerekirse inkübasyon süresi 15 dakikaya kadar uzatılabilir.
Kromojenik substrat hazırlanması doğru değil	Solution A'nın hacmini artırmayın

Sinyaller soluk veya birbirine girmiş

Olası sebep	Önlem
Uygun olmayan kapama solüsyonu kullanılmış	Yalnızca kit ile birlikte verilen kapama maddesini veya yabancı madde içermeyen ksilen bazlı kapama solüsyonu kullanın; kapama bandı kullanmayın.
Kesitler iyice dehidre edilmemiş	Taze etanol ve ksilen solüsyonları kullanın; yalnızca "saf" kalitede ksilen kullanın.

Düzensiz veya yalnızca bazı kısımlarda çok hafif boyanma

Olası sebep	Önlem
Parafin giderme tamamlanmamış	Taze solüsyonlar kullanın; parafin giderme işleminin süresini kontrol edin
Reaktif hacmi çok düşük	Reaktif hacminin doku alanını kaplamaya yetecek miktarda olmasını sağlayın
Hibridizasyon öncesinde veya kapama sırasında hava kabarcıkları kalmış	Hava kabarcığı bırakmayın

Tutarsız sonuçlar

Olası sebep	Önlem
Proben uygulanmasından önce yeterli kurutma yapılmamış	Havada kuruma süresini uzatın

Pepsinin, antikorların ve/veya renk substratlarının uygulanmasından önce doku üzerinde çok fazla su/yıkama tamponu kalmış	Doku kesiti üzerindeki fazla sıvının emdirilerek veya lamı sallayarak giderilmesini sağlayın. Küçük miktardaki su/yıkama tamponu kalıntısı teste etki etmez
Dokunun fiksasyon ve gömme yöntemlerinde değişiklikler var	Fiksasyon ve gömme yöntemlerini optimize edin
Doku kesiti kalınlığında değişiklikler var	Kesit almayı optimize edin

Doku morfolojisi bozulmuş

Olası sebep	Önlem
Hücre veya doku örneği doğru fikse olmamış	Fiksasyon süresini ve fiksatifi optimize edin
Proteolitik ön işlem doğru yapılmamış	Pepsin inkübasyon süresini optimize edin; gerekirse düşürün.

Çapraz hibridizasyon sinyalleri, kötü zemin

Olası sebep	Önlem
Güçlü yıkama sıcaklığı doğru değil	Kullanılan tüm teknik araçların sıcaklığını kalibre edilmiş bir termometre ile kontrol edin. Sıcaklığı kritik olan solüsyonlarda her zaman aynı sayıda lam kullanın. Sıcaklık inkübasyonu olan adımlarda sekizden fazla lam kullanılmamasını öneririz
Lamlar iyice yıkanmamış	Belirtilen adımlarda taze ve yeterli miktarda yıkama tamponu ve deiyonize veya distile su kullanın.
Kesitler hibridizasyon sırasında veya sonrasında bir zaman kurumuş	Kesitlerin kurumasını önleyin; nemli kutu kullanın; lameli düzgün şekilde yalıtın
Substrat inkübasyon süresi uzun	Substrat inkübasyon süresini düşürün
Parafin giderme tamamlanmamış	Taze solüsyonlar kullanın; parafin giderme işleminin süresini kontrol edin
Proteolitik ön işlem çok güçlü	Pepsin inkübasyon süresini optimize edin
Lamlar hibridizasyondan önce oda sıcaklığına soğutulmuş	Lamları çabucak hibridizasyon sıcaklığına aktarın

Sinyaller üst üste gelmiş

Olası sebep	Önlem
Doku kesitlerinin kalınlıkları uygun değil	3-5 µm kalınlığında mikrotom kesitleri alın

Örnek lama iyi yapılmamış

Olası sebep	Önlem
Lamın kaplaması uygun değil	Uygun lamlar (pozitif yüklü) kullanın
Proteolitik ön işlem çok güçlü	Pepsin inkübasyon süresini düşürün

18. Literatür

- Bhargava R, et al. (2005) *Am J Clin Pathol* 123: 237-43.
- Brunello E, et al. (2012) *Histopathology* 60: 482-8.
- Brunner K, et al. (2010) *Anal Quant Cytol Histol* 32: 78-89.
- Carbone A, et al. (2008) *J Mol Diagn* 10: 527-36.
- Coussens L, et al. (1985) *Science* 230: 1132-9.
- Ethel T, et al. (2012) *Hum Pathol* 43: 921-31.
- Fasching P, et al. (2011) *BMC Cancer* 11: 486.
- Haas M, et al. (2011) *Virchows Arch* 458: 403-11.
- Hauser-Kronberger C & Dandachi N (2004) *J Mol Histol* 35: 647-53.
- Hopman AHN, et al. (1997) *Histochem Cell Biol* 108: 291-8.
- Hwang CC, et al. (2011) *Histopathology* 59: 984-92.
- Kounelis S, et al. (2005) *Anticancer Res* 25: 939-46.
- Lehmann-Che L, et al. (2011) *Br J Cancer* 104: 1739-46.
- Mayr D, et al. (2009) *Histopathology* 55: 716-23.
- Moelans CB, et al. (2011) *Crit Rev Oncol Hematol* 80: 380-92.
- Mosch B, et al. (2007) *J Neuroscience* 27: 6859-67.
- Nie X, et al. (2013) *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 33: 379-84.
- Oliveira-Costa JP, et al. (2010) *Hum Pathol* 41: 1624-30.
- Oliveira-Costa JP, et al. (2011) *Diagn Pathol* 6: 73.
- Santos PB, et al. (2012) *Diagn Pathol* 7: 104.
- Schiavon BN, et al. (2012) *Am J Surg Pathol* 36: 1489-96.
- Silveira G, et al. (2012) *Histol Histopathol* 27: 1353-9.
- Speel EJ, et al. (1994) *J Histochem Cytochem* 42: 1299-307.
- Vasconcellos FA, et al. (2013) *Acta Histochem* 115: 240-4.
- Wachter DL, et al. (2013) *Arch Gynecol Obstet* 287: 337-44.
- Wilkinson DG: *In Situ Hybridization, A Practical Approach, Oxford University Press* (1992) ISBN 0 19 963327 4.
- Yildirim S, et al. (2012) *UHOD* 3: 156-62.
- Wilkinson DG: *In Situ Hybridization, A Practical Approach, Oxford University Press* (1992) ISBN 0 19 963327 4.

19. Revizyon

Kullanma kılavuzlarının en güncel ve farklı dillerdeki versiyonlarına ulaşmak için www.zytovision.com sitesine bakın.

Uzmanlarımız sorularınızı yanıtlamaya hazırdır. Lütfen help@zytovision.com adresine yazınız.



ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/ Germany
Telefon: +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.