

Sonda HER2 FISH, kit

Probe HER2 FISH, kit

Somente para uso profissional

Nome: Sonda HER2 FISH, kit

Especificações da embalagem

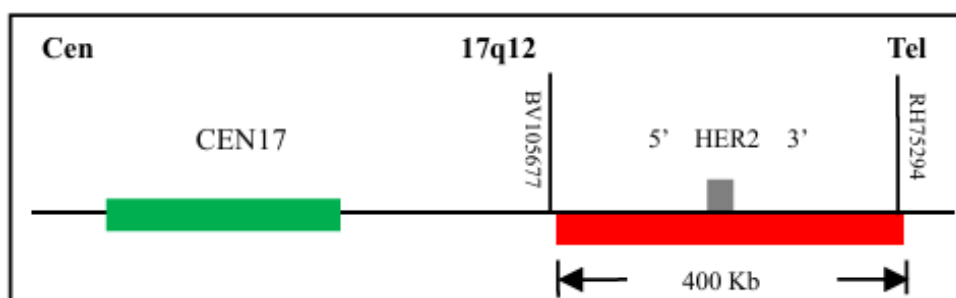
Referência	Descrição	Tamanho Kit
EP-13-11991	Sonda HER2 FISH, kit	5 Testes/Kit
EP-13-11992	Sonda HER2 FISH, kit	10 Testes/Kit
EP-13-11993	Sonda HER2 FISH, kit	20 Testes/Kit

Intenção de uso

O kit de sondas HER2 FISH foi desenvolvido para detectar a amplificação do gene HER-2/neu por meio da técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) em amostras de tecido de câncer de mama humanos fixados em formalina e incluídas em parafina (FFPE), a fim de fornecer ao médico informações complementares para o diagnóstico.

Princípio do teste

Descrição do desenho da sonda



A sonda HER2/CEN17 está localizada no cromossomo 17. Uma sonda de 400 Kb, que cobre a região do gene HER2, é marcada com um corante laranja, enquanto uma parte do cromossomo 17 (CEN17) é marcada com um corante verde. A região marcador do gene HER2 está localizada em 17q12. O resultado é utilizado para orientar a terapia medicamentosa e/ou a avaliação prognóstica do carcinoma invasivo primário de mama.

Descrição técnica

A hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) é uma técnica de ensaio molecular que utiliza fragmentos de DNA ou RNA, denominados sondas, marcados com fluoróforos para hibridizar, por meio do mecanismo de complementaridade de bases, às regiões-alvo dos cromossomos em amostras de pacientes. As sondas emitem sinais de fluorescência em um comprimento de onda específico após serem excitadas por uma fonte de luz, e a

hibridização ao cromossomo pode ser observada diretamente por meio de um microscópio equipado com um conjunto adequado de filtros. Essa técnica permite detectar com precisão alterações cromossômicas e, conseqüentemente, avaliar o estado dos genes localizados nas regiões afetadas dos cromossomos.

Principais Componentes

Especificação	Conteúdo do Kit	Principais componentes	Volume	Quantidade
5 testes/kit 10 testes/kit 20 testes/kit	Sonda HER2/CEN17 (HER2 sonda laranja, CEN17 sonda verde)	Sonda HER2/CEN17, COTI DNA, formamida, SSC, e dextran sulfate, etc.	50 µl 100 µl 200 µl	1 frasco
	DAPI Meio de Montagem	Antifade reagente ,DAPI, e glicerin,etc.	50 µl 100 µl 200 µl	1 frasco

Notas: 1. Os componentes dos kits de lotes diferentes não devem ser trocados entre si.

Reagentes necessários mas não fornecidos no kit:

- Rubber cement
- Solução para desparafinização
- Etanol absoluto
- Água purificada
- 1 M HCl
- 1 N or 2 N Hidróxido de Sódio (NaOH)
- 20× SSC Solução (3 M cloreto de sódio, 0.3 M citrato de sódio, pH 5.3)
- NP-40
- Tiocianato de sódio
- Pepsina (250 U/mg)

Instrumentos necessários

- Microscópio de fluorescência
- Pipeta de microlitro e ponteiros esterilizados
- Microcentrífuga
- Banho Maria
- Microcentrífuga
- Banho Maria
- Jarra de Coplin
- Hibridizador

Notas: Microscópio de fluorescência. A configuração do microscópio de fluorescência necessário inclui: ocular 10× e lentes objetivas 10×, 40× e 100×. Recomenda-se que, antes de utilizar a sonda, o usuário solicite ao fornecedor do conjunto de filtros os detalhes do conjunto de filtros a ser utilizado, de modo a escolher um conjunto de filtros compatível com os corantes fluorescentes marcados.

Fluorescência laranja: excitação máxima: 552 nm, emissão máxima: 576 nm.

Fluorescência verde: excitação máxima: 496 nm, emissão máxima: 520 nm.

DAPI: excitação máxima: 340 nm, emissão máxima: 488 nm.

Condições de armazenamento e prazo de validade

Condições de armazenamento: abaixo de -15 °C, selado e armazenado no escuro.

Condições de envio: Os kits devem ser transportados sob temperatura controlada entre 2 °C e 8 °C. O tempo de envio não deve exceder 10 dias. Durante o transporte, a temperatura não deve ultrapassar a temperatura ambiente.

Prazo de validade: 12 meses.

Nota: consulte a data de produção e o prazo de validade na embalagem externa.

Requisitos da amostra

1. Tipo da amostra: tecido fixado em formalina e emblocado em parafina, Recomenda-se que sejam selecionadas amostras de parafina com menos de dois anos para garantir a precisão do teste.
2. Método de coleta de amostras: os tecidos frescos devem ser fixados em tampão de formalina neutra a 10% por 24-48 horas dentro de 0,5 a 1 hora após serem removidos. O tamanho do tecido não deve exceder 0,5 cm³ e a espessura recomendada da seção é de 3 µm a 5 µm.
3. Armazenamento de amostras: recomenda-se que as seções de parafina preparadas sejam utilizadas imediatamente ou armazenadas a -20±5 °C.

Método teste

A- Preparo das soluções

Reagente de lavagem etanol

Prepare diluições v/v de 70% e 85% utilizando etanol a 100% e água purificada. As diluições podem ser utilizadas durante 1 semana, a menos que ocorra evaporação ou que a solução se dilua devido a utilização excessiva. Armazene à temperatura ambiente em recipientes bem fechados quando não estiver em uso.

Solução Pré-tratamento

- Para preparar, junte:

80 g	Tiocianato de sódio
<u>800 mL</u>	Água purificada
1000 mL	Volume final.

Misture bem. Ajuste o volume para 1 litro com água purificada. Filtre através de uma unidade de filtração com poros de 0,45 µm. Descarte a solução usada no final de cada dia. Se o reagente estiver turvo ou contaminado, deve ser descartado imediatamente.

2× SSC /0.3% NP-40 Solução de lavagem

Para preparar, junte:

100 mL	20× SSC pH 5.3
847 mL	Água purificada
<u>3 mL</u>	NP-40
1000 mL	Volume Final

Misture bem. Meça o pH à temperatura ambiente utilizando um medidor de pH. Ajuste o pH para $7,0 \pm 0,2$ com NaOH 1 N ou 2 N. Ajuste o volume para 1 litro com água purificada. Se o reagente estiver turvo ou contaminado, deve ser descartado imediatamente.

Tampão enzimático (pH 2.0 HCl)

- Para preparar. Junte:

10 mL	1 M HCl
900 mL	Água purificada
1000 mL	Volume final

Misture bem. Meça o pH à temperatura ambiente utilizando um medidor de pH. Ajuste o pH para $2,0 \pm 0,2$ com HCl 1 M. Ajuste o volume para 1 litro com água purificada. Se o reagente estiver turvo ou contaminado, deve ser descartado imediatamente.

B - Preparação

Nota: Observação: deve-se preparar diariamente uma solução de pepsina a 2 mg/ml (utilize 100 mg de pepsina, adicione 50 ml de tampão enzimático e misture bem).

1. Ligue o banho-maria e ajuste a temperatura para 80 °C. Despeje a solução de pré-tratamento no frasco Coplin, coloque o frasco no banho-maria e preaqueça a 80 °C.
2. Ligue o banho-maria e ajuste a temperatura para 37 °C. Despeje 50 ml de solução de pepsina 2 mg/ml no frasco Coplin, coloque o frasco no banho-maria e preaqueça a 37 °C.
3. Antes da lavagem pós-hibridização, ajuste a temperatura do banho-maria do termostato para 68 °C, despeje a solução de lavagem 2× SSC/0,3% NP-40 no frasco Coplin e coloque o frasco no banho-maria por pelo menos 30 minutos. Certifique-se de que a temperatura da solução de lavagem atinja 68 ± 1 °C antes do uso. Despeje a solução de lavagem 2× SSC/0,3% NP-40 em outro frasco Coplin e mantenha em temperatura ambiente.

Processo de teste

Pré-tratamento amostra

1. Preequeça a lâmina a 65 °C por 5 minutos em estufa ou utilizando o hibridizador (Recomendado Hibridizador Ara EP-31-20147/EasyPath) ou equivalente e, em seguida, realize a desparafinização utilizando a solução transparente de desparafinização (à base de isoparafina) ou xileno, duas vezes, por 15 minutos cada.
2. Desidrate a lâmina em etanol absoluto duas vezes, por 5 minutos cada.
3. Reidrate a lâmina em etanol 85%, etanol 70% e água purificada, em gradiente, por 1 minuto cada.
4. Retire a lâmina e utilize papel absorvente para remover a solução residual da superfície.
5. Coloque a lâmina na solução de pré-tratamento previamente aquecida a 80 °C e mantenha por 30 minutos.
6. Retire a lâmina e mergulhe-a em água purificada por 1 minuto; em seguida, retire-a e remova a solução residual.
7. Mergulhe a lâmina em solução de pepsina a 2 mg/mL, previamente aquecida a 37 °C, por 25 minutos.
8. Após a digestão, mergulhe a lâmina em água purificada por 1 minuto.
9. Desidrate a lâmina em etanol 70%, etanol 85% e etanol 100%, sucessivamente, por 1 minuto cada.
10. Seque a lâmina à temperatura ambiente.

Desnaturação e hibridização da amostra

1. Aqueça as sondas em temperatura ambiente, agite suavemente para homogeneizar, centrifugue brevemente as sondas por 2 a 3 segundos em uma microcentrífuga e deposite 10 µL da sonda sobre a amostra.
2. Coloque a lamínula (18 mm x 18 mm), evitando a formação de bolhas de ar, e sele a lâmina com Rubber Cement.
3. Insira a lâmina no hibridizador e execute o programa conforme descrito a seguir: desnaturação a 85 °C por 5 minutos e hibridização a 42 °C por 16-18 horas.

Nota: Programa rápido de hibridização: desnaturação a 85 °C por 5 minutos; hibridização a 42 °C por 2 horas.

Lavagem Pós-hibridização

1. Remova cuidadosamente o Rubber Cement.
2. Coloque a lâmina em solução de lavagem 2× SSC/0,3% NP-40 no frasco Coplin à temperatura ambiente para lavar a lamínula (2 a 5 minutos).
3. Retire a lâmina e lave-a por 2 minutos com a Solução de Lavagem 2×SSC/0,3% NP-40, previamente aquecida a 68 ± 1 °C.
4. Retire a lâmina e lave-a por 1 minuto com a Solução de Lavagem 2×SSC/0,3% NP-40, previamente mantida em temperatura ambiente.
5. Retire a lâmina, remova a solução residual e coloque-a em etanol 70% à temperatura ambiente, lavando por 1 minuto.
6. Deixe a lâmina secar naturalmente ao ar, no escuro, para uso posterior.



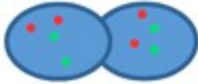

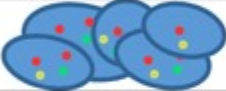
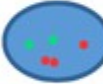
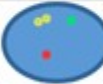

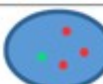

Contra-coloração

1. Adicione 10 µL da solução de contracoloração na área de hibridização (evitando a formação de bolhas). Coloque a lamínula, remova cuidadosamente o excesso de solução de contracoloração com papel absorvente e mantenha a lâmina a -20 ± 5 °C, no escuro, por mais de 20 minutos.
2. Selecione o conjunto de filtros apropriado para observar os resultados ao microscópio de fluorescência.

Visualização da lâmina e coleta de dados

1. Observe a lâmina em um microscópio de fluorescência equipado com os conjuntos de filtros apropriados.
2. Localize a área sob a lente objetiva de 10× e realize a contagem sob a lente objetiva de 100×.
3. Ajuste o foco para encontrar uma área adequada, exigindo contorno nuclear completo, coloração uniforme pela solução de contracoloração, ausência de sobreposição de núcleos e pontos de sinal nítidos.
4. Na região selecionada, localize todos os pontos de sinal em diferentes planos do núcleo e conte os sinais individuais laranja e verde. Núcleos sem sinal ou com sinais fracos não devem ser contados.

Interpretação dos sinais

 = sinal laranja, HER2  = sinal verde, CEN17		
1		Os núcleos estão sobrepostos, de modo que as áreas completas de ambos não podem ser observadas claramente. No entanto, os sinais não estão localizados na área de sobreposição, e há dois sinais laranja e dois sinais verdes em cada núcleo.
2		Dois sinais laranja e dois sinais verdes foram contados, sendo que um dos sinais laranja está disperso.
3		Não contar. Todos os núcleos estão sobrepostos, de modo que as áreas completas não podem ser visualizadas claramente, e alguns sinais estão localizados na área de sobreposição.
4		Dois sinais laranja e dois sinais verdes foram contados, sendo que um dos sinais laranja está fragmentado.
5		Um sinal laranja e dois sinais verdes foram contados, sendo que um dos sinais verdes está fragmentado.
6		Dois sinais laranja e um sinal verde foram contados.
7		Três sinais laranja e um sinal verde foram contados.
8		Quatro sinais laranja e dois sinais verdes foram contados.

Determinação do limiar para amostras FISH negativas

Devem ser selecionadas aleatoriamente vinte amostras que não apresentem anormalidades genéticas conhecidas relacionadas ao conjunto de sondas FISH, para a preparação das lâminas-controle. Após a hibridização, conte 200 células de cada lâmina-controle e registre todos os tipos de padrões de sinal considerados positivos por FISH. Em seguida, calcule a porcentagem de sinais positivos observados e determine o desvio-padrão. O limiar para amostras FISH negativas deve ser definido como a média da porcentagem obtida somada a três vezes o desvio-padrão. As amostras-controle ou amostras FISH negativas devem, preferencialmente, ser do mesmo tipo de tecido ou célula que o alvo destinado à detecção por FISH.

Importância da determinação do limiar

O limiar deve ser estabelecido quando as sondas forem utilizadas pela primeira vez, pois esse valor servirá como referência para diferenciar amostras FISH positivas e negativas. Caso os procedimentos experimentais sejam alterados, como o método de pré-tratamento das amostras ou ocorra substituição de equipamentos, o limiar poderá variar; portanto, deverá ser redefinido de acordo com as novas condições experimentais estabelecidas.

Interpretação dos resultados dos testes

Problemas comuns e soluções no processo de teste

Problema	Possível causa	Solução recomendada
Sem sinal ou sinal fraco	Desnaturação insuficiente das amostras e sondas	Certifique-se de que a temperatura da lâmina esteja em $85 \pm 1^\circ\text{C}$ durante a desnaturação; Aumente o tempo de desnaturação da lâmina em 2-4 minutos.
	Nenhuma sonda adicionada	Descongele completamente as sondas e certifique-se de que o reagente da sonda seja aspirado pela pipeta
	Quantidade insuficiente de sondas	Certifique-se de que as sondas atinjam a temperatura ambiente antes do uso e de que o reagente da sonda seja aspirado pela pipeta.
	Secagem insuficiente da lâmina	Antes de adicionar as sondas sobre a lâmina, certifique-se de que a solução de etanol na lâmina tenha evaporado completamente.
	Secagem muito rápida das sondas	Cubra a área-alvo com a lamínula imediatamente após a adição das sondas; para a eluição, remova a lamínula de apenas uma lâmina por vez e mergulhe a lâmina na solução de lavagem imediatamente antes de remover a lamínula da próxima lâmina.
	Bolhas sob a lamínula durante a hibridização	Cubra a superfície das sondas com a lamínula e pressione suavemente para eliminar as bolhas de ar.
	Condições inadequadas de hibridização	Garanta o cumprimento do tempo e da temperatura de hibridizações especificadas; não deixe nenhuma abertura ao selar a lâmina com meio de montagem. Ajuste o tempo de hibridização e a umidade conforme necessário.
	Solução de lavagem incorreta ou condições de eluição inadequadas	Certifique-se de que a solução de lavagem seja preparada de acordo com o IFU; garanta que a temperatura da solução de lavagem alcance a especificada na etapa de eluição; remova a lamínula antes de mergulhar a lâmina na solução de lavagem.
	Armazenamento inadequado das sondas ou das lâminas de amostra	Armazene as sondas abaixo de -15°C no escuro; seque as lâminas não hibridizadas para armazenamento a longo prazo a $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ ou armazenamento a curto prazo (geralmente não mais do que duas semanas) à temperatura ambiente; Armazene as lâminas hibridizadas a $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ no escuro.
	Seleção inadequada do conjunto de filtros para observação	Use o conjunto de filtros correto para observar a fluorescência da sonda.
Fundo excessivamente intenso nas lâminas	Estrutura inadequada do microscópio e lente objetiva para observação de amostras FISH, ou dano no conjunto de filtros	Entre em contato com o fabricante do microscópio.
	Lavagem insuficiente das lâminas antes do preparo da amostra	Mergulhe a lâmina em etanol absoluto e seque-a com papel absorvente antes de colocar o reagente.
	Eluição inadequada após a hibridização	Certifique-se de que a solução de lavagem está preparada corretamente de acordo com as instruções de utilização; opere de acordo com as instruções de utilização; certifique-se de que a temperatura da solução de lavagem está correta; remova a lamela e repita a etapa de eluição.
	Uso prolongado ou armazenamento inadequado da solução de lavagem	Certifique-se de que a solução de lavagem seja armazenada a uma temperatura entre 2 e 25°C e descarte o reagente se estiver turvo ou contaminado.
Contracoloração muito fraca	Umidade de hibridização muito alta ou muito baixa	Ajuste a umidade da hibridização para o nível ideal.
	Contracoloração insuficiente	Remova a lamínula e mergulhe a lâmina na solução de lavagem por 5 minutos à temperatura ambiente. Coloque a lâmina em soluções de etanol a 70%, 85% e 100% por 1 minuto cada para desidratação gradiente e, em seguida, realize a contra-coloração.
	Vencimento ou exposição excessiva à luz da solução de coloração	Certifique-se de que a solução de coloração seja armazenada abaixo de -15°C no escuro; certifique-se de que a solução de coloração não esteja vencida.









Limitações dos métodos de teste

1. Este kit é baseado na técnica de hibridização in situ por fluorescência (FISH) para a detecção da amplificação do gene HER2.
2. Este reagente é aplicável a cortes de tecidos emblocados em parafina, devendo-se ajustar o processo de pré-tratamento conforme a espessura dos cortes ou o tipo de amostra.

Precauções

1. Este kit se destina apenas a fins de pesquisa.
2. Não reutilize os componentes do kit.
3. A significância clínica do resultado obtido com este kit deve ser avaliada em conjunto com o histórico médico do paciente e outros resultados de exames.
4. Durante a utilização deste kit, é necessário usar luvar de látex para evitar o contato do reagente, com a pele. Em caso de contato acidental, lave imediatamente com água em abundância.
5. As amostras não devem ser expostas a ácidos, bases ou superaquecimento, pois isso pode danificar o DNA e comprometer o teste FISH.
6. Todos os componentes do kit devem ser utilizados dentro do prazo de validade.
7. A solução de coloração contém DAPI, um mutagênico. Deve-se evitar sua inalação, ingestão ou contato com a pele.
8. A sonda contém formamida, uma substância teratogênica. Deve-se evitar o contato com a pele e as membranas mucosas.
9. Para obter resultados ideais, é necessário garantir que os reagentes sejam preparados e armazenados corretamente, de acordo com as instruções de uso (IFU).
10. As amostras e resíduos descartados durante o processo de teste devem ser coletados e eliminados como resíduos médicos.

Explicações dos sinais

	Limite superior de temperatura		Mantenha seco
	Não use se a embalagem estiver danificada		Consulte as instruções de uso
	Não reutilizar		Mantenha longe da luz solar
	Utilizar até		Número do lote
	Número de referência		Fabricante
	Data de fabricação		Contém quantidade suficiente para <n> testes

Sonda HER2 FISH, kit

Probe HER2 FISH, kit

Solamente para uso profesional

Nombre: Sonda HER2 FISH, kit

Especificaciones de embalaje

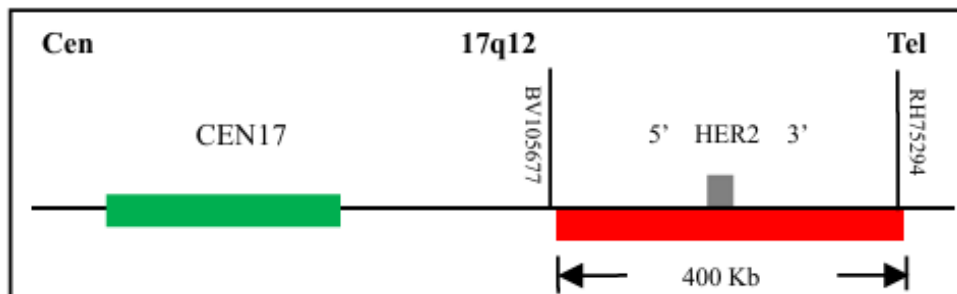
Referencia	Descripción	Tamaño Kit
EP-13-11991	Sonda HER2 FISH, kit	5 Testes/Kit
EP-13-11992	Sonda HER2 FISH, kit	10 Testes/Kit
EP-13-11993	Sonda HER2 FISH, kit	20 Testes/Kit

Intención de uso

El kit de sondas HER2 FISH fue desarrollado para detectar la amplificación del gen HER-2/neu por medio de la técnica en hibridación in situ por fluorescencia (FIS) en muestras de tejido de cáncer de mama humanos fijados en formalina e incluidas en parafina (FFPE), a fin de promover al medico informaciones complementares para el diagnósticos.

Principio de teste

Descripción del diseño de la sonda



La sonda HER2/CEN17 esta localizado en el cromosomas 17. Una sonda de 400 kb, que cobre la región del gen HER2 es marcada con colorante naranja, mientras una parte de cromosomas 17 (CEN17) es marcada con una coloración verde. La región marcador del gen HER2 esta localizada en 17q12. El resultado es utilizado para orientar la terapia medicamentosa o valuación pronostica de carcinoma invasivo primario de mama.

Descripción técnica

La hibridación in situ por fluorescencia (FISH) es una técnica de ensayo molecular que utiliza fragmentos de DNA o RNA, denominados sondas, marcados con fluoruros para hibridizar, por medio de mecanismo de complementariedad de bases, las regiones-albo de los cromosomas en muestra de pacientes. Las sondas emiten señales de fluorescencia en un cumplimiento de onda especifico después ser excitadas por una fuente de luz y a hibridación al cromosomas pude ser observada directamente por medio de un microscopio equipado con un conjunto adecuado de filtros. Esa técnica permite detectar con precisión de alteraciones cromosomicas y consecuentemente, avaliar el estado de gen localizados en las regiones afectadas de los cromosomas.

Principales Componentes

Especificación	Conteúdo del Kit	Principales componentes	Volumen	Cantidad
5 testes/kit 10 testes/kit 20 testes/kit	Sonda HER2/CEN17 (HER2 sonda naranja, CEN17 sonda verde)	Sonda HER2/CEN17, COTI DNA, formamida, SSC, e dextrano sulfato, etc.	50 µl 100 µl 200 µl	1 frasco
	DAPI Medio de Montaje	Antidesvanecimiento regente ,DAPI, e glycerin,etc.	50 µl 100 µl 200 µl	1 frasco

Notas: 1. Los componentes de los kits de lotes diferentes no deben ser cambiados entre si. Regentes necesarios mas no promovidos en el kit.

- Rubber cement
- Solución para desparafinización
- Etanol absoluto
- Agua purificada
- 1 M HCl
- 1 N or 2 N Hidróxido de Sodio (NaOH)
- 20× SSC Solución (3 M clorato de sodio, 0.3 M citrato de sodio, pH 5.3)
- NP-40
- Tio cianato de sodio
- Pepsina (250 U/mg)

Instrumentos necesarios

- Microscopio de fluorescencia
- Pipeta de microlitro y punteras esterilizadas
- Micro centrífuga
- Baño Maria
- Micro centrífuga
- Baño Maria
- Jarra de Coplin
- Hibridizador

Nota: Microcopia de fluorescencia. La configuración de microscopio de fluorescencia necesario incluye: Ocular 10×, lentes objetivas 10×, 40× e 100×. Se recomienda que antes de utilizar la sonda, el usuario solicite al proveedor del conjunto de filtros los detalles del conjunto de filtros ser utilizado de modo a escoger el conjunto de filtro compatibles con la coloración fluorescentes marcados.

Fluorescencia naranja: Excitación máxima: 552 nm, emisión máxima 576 nm.

Fluorescencia verde: Excitación máxima: 496nm, emisión máxima: 520 nm

DAPI: Excitación máxima: 340 nm, emisión máxima: 488 nm.

Condiciones de almacenamiento y plazo de validez

Condiciones de almacenamiento: Abajo de -15°C, sellado y almacenado en lo oscuro.

Condiciones de envío: Los kits deben ser transportados bajo temperatura controlada entre 2 °C y 8 °C. El tiempo de envío no debe exceder los 10 días. Durante el transporte, la temperatura no debe superar la temperatura ambiente.

Plazo de validez 12 meses.

Nota: Consulte la fecha de producción y plazo de validez en la embalaje externa.

Requisitos de muestra

1. Tipo de muestra: Tejido fijado en formalina y encajado en parafina, se recomienda que sea seleccionados muestras de parafina con menos de dos años para garantizar la precisión del teste.
2. Método de recolección de muestra de tejidos frescos deben ser fijados en tampón de formalina neutra a 10% por 24-48 horas dentro de 0,5 a 1 hora después de ser retirados. El tamaño del tejido no debe exceder 0,5 cm³ y la espesura recomendada de la sección es de 3 µm a 5 µm.
3. Almacenamiento de muestra: Se recomienda que las secciones de parafina preparadas sean utilizadas inmediatamente o almacenadas a -20+5°C

Método teste

A-Preparo de las soluciones

Regentes de lavaje etanol

Prepare diluciones v/v de 70% y 85% utilizando etanol 100% y agua purificada. Las diluciones puede ser utilizadas durante 1 semana, a menos que ocurra evaporación o que la solución se diluya debido a la utilización excesiva. Almacene la temperatura ambiente en recipientes bien cerrados cuando no este en uso.

Solución pre tratamiento

Para preparar junte

80g Tio cianato de sodio

800ml Agua purificada

1000ml Volumen final

Mezcle bien, Ajuste el volumen para 1 litro con agua purificada. Filtre través de una unidad de filtración con poros de 0,45 µm. Coloque la solución usada en final de cada día. Se el regente esta turbo o contaminado, debe ser desechado inmediatamente.

2× SSC /0.3% NP-40 Solución de lavaje

Para preparar junte:

100ml 20× SSC pH 5.3

847 ml Agua purificada

3ml NP-40

1000ml Volumen final

Mezcle bien. Mueva el pH a temperatura ambiente utilizando un medidor de pH. Ajuste el pH para 7,0±0,2 con NaOH 1 N o 2 N. ajuste el volumen para 1 litro con agua purificada. Se el regente esta turbo o contaminado debe ser descartado inmediatamente.

B- Preparación

Nota: Observación debe prepararse diariamente una solución de pepsina a 2mg/ml (Utilice 100 ml de pepsina, adiciones 50ml de tampón enzimático y mezcle bien)

1. Encienda el baño maria y ajuste la temperatura para 80°C, Coloque la solución de pre tratamiento en el frasco Coplin, coloque el frasco en baño maria y recaliente a 80°C.
2. Encienda el baño maria y ajuste la temperatura para 37°C. Coloque 50ml de solución de pepsina 2mg/ml en el frasco Coplin, coloque el frasco en el baño maria y recaliente a 37°C
3. Antes de lavaje después de hibridación, ajuste la temperatura del baño maria de termostato para 68°C, Coloque la solución de lavaje 2× SSC/0,3% NP-40 en el frasco Coplin y coloque el frasco en baño maria por lo menos de 30 minutos. Certificarse de que la temperatura de solución de lavaje alcance 68±1°C antes de uso. Coloque la solución de lavado 2× SSC/0,3% NP-40 en otro frasco Coplin y mantenerlo en temperatura ambiente.

Proceso de teste

Pre tratamiento muestra.

1. Recaliente la lamina a 65°C por 5 minutos en estufa o utilizando el hibridador (Recomendado Hibridador Ara EP-31-20147/EasyPath) o equivalente enseguida, realice la desparafinización utilizando la solución transparente de desparafinización (La base de isoparafina) o xileno, dos veces por 15 minutos cada.
2. Deshidrate la lamina en etanol absoluto dos veces, por 5 minutos cada.
3. Re hidrate la lamina en etanol a 85%, etanol 70% y agua purificada, en gradiente, por 1 minuto cada.
4. Retire la lamina y utilice papel absorbente para retirar la solución residual de superficie
5. Coloque la lamina en la solución de pre tratamiento previamente calentada a 80°C y mantenerlo por 30 minutos.
6. Retire la lamina y sumergir en agua purificada por 1 minuto; enseguida, retire la solución residual.
7. Sumergir la lamina en solución de pepsina a 2mg/ml, previamente calentada a 37°C por 25 minutos
8. Después de la digestión, sumergir la lamina en agua purificada por 1 minuto.
9. Deshidrate la lamina en etanol 70%. etanol 85% y etanol 100%, sucesivamente por 1 minuto cada.
10. Seque la lamina en temperatura ambiente.

Desnaturalización y hibridación de muestra

1. Caliente las sondas en temperatura ambiente, agite suavemente para homogenizar, centrifugue brevemente las sondas por 2 a 3 segundos en una micro centrifuga y deposite 10 µL de la sonda sobre la muestra.
2. Coloque la laminula (18 mm x 18 mm), evitando la formación de burbujas de aire, selle la lamina con Rubber Cement.
3. Insiera la lamina en el hibridador y ejecute el programa conforme descrito a seguir: Desnaturalización a 85°C por 5 minutos y hibridación a 42° C por 16-18 horas.

Nota: Programe rápido la hibridación: Desnaturalización a 85°C por 5 minutos; hibridación a 42°C por 2 horas.

Lavaje después de hibridación

1. Retirar cuidadosamente el Rubber Cement
2. Coloque la lamina en solución de lavado 2× SSC/0,3% NP-40 en el frasco Coplin a temperatura ambiente para lavar la laminula (2 a 5 minutos)
3. Retire la lamina, lavarla por 2 minutos con la solución de lavaje 2×SSC/0,3% NP-40, previamente calentada a 68°C
4. Retire la lamina y lavarla por 1 minuto con la solución de lavaje 2×SSC/0,3% NP-40 , previamente mantener en temperatura ambiente.
5. Retire la lamina, retirar la solución residual y coloque el etanol 70% a temperatura ambiente, lavando por 1 minuto.
6. Deje la lamina secar naturalmente al aire, em lo oscuro, para uso posterior.

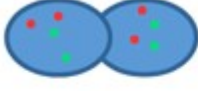

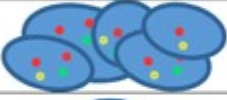
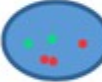
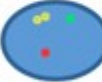

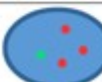

Contra coloración

1. Adicione 10 µL de solución de contra coloración en la área de hibridación (evitando la formación de burbujas) Coloque la laminula, retire cuidadosamente el exceso de solución de contra coloración con papel absorbente, mantener la lamina a -20+5°C en lo oscuro, por mas 20 minutos.
2. Seleccione el conjunto de filtros apropiado para observar los resultados del microscopio de fluorescencia.

Visualización de lamina y recolección de datos.

1. Observe la lamina en un microscopio de fluorescencia equipado con los conjuntos de filtros apropiados.
2. Localice la área sub la lente objetiva de 10×, realice la cuenta sub la lente objetiva de 100×
3. Ajuste el foco para encontrar una area adecuada, exigiendo contorno nuclear completo, coloración uniforme por la solución de contra coloración, ausencia de sobre posición de núcleos y puntos de señal nítidos.
4. En la región seleccionada, localice todos los puntos de señal en diferentes planos de núcleo y cuente los señales individuales naranja y verde. Nucleos sin señal o con señal flaco no deben ser contados.

Interpretación de señales

		● = señal naranja, HER2	● = señal verde, CEN17
1		Los núcleos están sobre puestos, de modo que las áreas completas De ambos no pueden ser observadas claramente. En tanto, los señales no están localizados en la área de sobre posición, Y tiene dos señales naranja y dos señales verde en cada núcleo	
2		Dos señales naranja y dos verdes fueron contados, siendo que un de los señales naranja esta disperso	
3		No contar. Todos los núcleos esta sobre puestos de modo que las áreas completas no pueden ser visualizadas, claramente, algunos señales están localizados en la área de sobre posición	
4		Dos señales naranja y dos verdes fueron contados, siendo Que uno de los señales naranja esta fragmentado.	
5		Un señal naranja e un señal verde fueron contados, siendo Que uno de los señales esta fragmentado	
6		Dos señales naranja y un señal verde fueron contados	
7		Tres señales naranja y un señal verde fueron contados	
8		Quatro señales naranja y dos señales verdes fueron contados	

Determinación de umbral para muestra FISH negativas

Deben ser seleccionadas aleatoriamente veinte muestras que no presentan anomalías genéticas conocidas relacionadas al conjunto de sondas FISH, para la preparación de las laminas control. Después de la hibridación cuente 200 células de cada lamina – control y registre todos los tipos de padrones de señal considerados positivos por FISH. Enseguida calcule el porcentaje de señales positivos observados y determine el desvío padrón. El umbral para muestra FISH negativas deber se definido como la media de porcentaje obtenida a tres veces el desvío padrón. Las muestra control o muestras FISH negativas deben, preferentemente, ser del mismo tipo de tejido o de célula que el albo destinado a la detección por FISH.

Importancia de determinación del umbral.

El umbral debe ser establecido cuando las sondas fueron utilizadas por la primera vez, ese valor servirá como referencia para diferenciar las muestras FISH positivas y negativas. Caso el procedimiento experimentales sean alterados, como el método de pre tratamiento de muestras o ocurra substitución de equipamientos, el umbral puede variar, por lo tanto, tiene que ser redefinido de acuerdo con las nuevas condiciones experimentales establecidas.

Interpretación de los resultados de los teste.

Problemas comunes y soluciones en el proceso de teste.

Problema	Posible causa	Solução recomendada
Sin señal o señal flaco	Desnaturalización insuficiente de las muestras y sondas	Certificarse de que la temperatura de la lamina este en 85+1°C durante la desnaturalización; Aumente el tiempo de desnaturalización de la lamina en 2-4 minutos .
	Ninguna sonda adicionada	Descongele completamente las sondas y certificarse de que el regente de la sonda sea aspirado por la pipeta.
	Cantidad insuficiente de las sondas	Certificarse de que las sondas alcance la temperatura ambiente antes del uso y de que el regente de la sonda aspirado por la pipeta.
	Secado insuficiente de la lamina	Antes de adicionar las sondas sobre la lamina, certificarse de que la solución de etanol en la lamina tenga evaporado completamente
	Secado muy rápido de las sondas	Cubra la área albo con la laminula inmediatamente después de la adición de las sondas; para la elución, remueva la laminula de apenas una lamina por vez, sumergir la lamina en la solución de lavaje inmediatamente antes de remover la laminula de la próxima lamina.
	Burbujas sob la laminula durante la hibridación	Cubra la superficie de las sondas con la laminula y presione suavemente para eliminar las burbujas de aire.
	Condiciones inadecuadas de hibridación	Garantir el cumplimiento del tiempo y de la temperatura de hibridaciones especificadas; no deje ninguna abertura al sellar la lamina con medio de montaje. Ajuste el tiempo de hibridación y humedad conforme necesario.
	Solución de lavaje incorrecta o condiciones de elución inadecuadas	Certificarse de que la solución de lavaje sea preparada de acuerdo con el IFU; Garantir que la temperatura de la solución de lavaje alcance la especifica en la etapa de elución; Remueva la laminula antes de sumergir la lamina en la solución de lavaje
	Almacenamiento inadecuado de las sondas o de las laminas de muestra.	Almacene las sondas abajo de -15°C en lo oscuro seque las laminas no hibridizadas para almacenamiento a lejos plazo a -20+°C o almacenamiento a corto plazo (generalmente no mas que dos semanas) a temperatura ambiente; Almacene las laminas hibridizadas a -20+5°C en lo oscuro
	Selección inadecuada del conjunto de filtros para observación	Use el conjunto de filtros correcto para observar la fluorescencia de la sonda
Fundo excesivamente intenso en las laminas	Estructura inadecuada de microscopio y lente objetiva para observación de muestras FISH, o daño del conjunto de filtros.	Entre en contacto con el fabricante de microscopio
	Lavaje insuficiente de laminas antes del preparo de la muestra.	Sumergir la lamina en etanol absoluto y seque com papel absorbente antes de colocar el regente
	Elución inadecuada después de la hibridación	Certificarse de que la solución de lavaje este preparada correctamente de acuerdo con las instrucciones de utilización; opere de acuerdo con las instrucciones de utilización; certificarse de que a temperatura de solución de lavaje este correcta, remueva la lamina y repita la etapa de elución
	Uso prolongado o almacenamiento inadecuado de la solución de lavaje	Certificarse de que la solución de lavaje sea almacenada a una temperatura entre 2 y 25°C, deseche el regente se esta turbo o contaminando.
Contra coloración muy flaca	Humedad de hibridación muy alta o muy baja	Ajuste la humedad de hibridación para el nivel ideal.
	Contra coloración insuficiente	Remueva la laminula y sumergir la lamina en la solución de lavaje por 5 minutos a temperatura ambiente. Coloque la lamina en soluciones de etanol a 70%, 85% y 100% por 1 minuto cada para deshidratación gradiente, enseguida realice la contra coloración.
	Vencimiento o exposición excesiva a luz de solución de coloración	Certificarse de que la solución de coloración sea almacenada abajo de -15°C en lo oscuro, centrifugue de que la solución de coloración sea vencida.









Limitaciones de los métodos de teste

1. Este kit es basado en la técnica de hibridación in situ por fluorescencia (FISH) para detección de amplificación del gen HER2
2. Este regente es aplicable y cortes de tejidos encajados en parafina, debiendo ajustar el proceso de pre tratamiento conforme la espesura de cortes o del tipo de muestra.

Precauciones

1. Este kit se destina apenas para finales de investigación
2. No reutilice los componentes del kit
3. La significación clínica del resultado obtenido con este kit debe ser avalado en conjunto con el histórico medico del paciente y otros resultados de exámenes
4. Durante la utilización de este kit, es necesario usar guantes látex para evitar el contacto de regente, con la piel. En caso de contacto accidental, lave inmediatamente con agua en abundancia.
5. Las muestras no deben ser expuestas a ácidos, bases o súper calentamientos, por que puede dañar el DNA y comprometer el teste FISH
6. Todos los componentes del kit deben ser utilizados dentro del plazo de validez
7. La solución de coloración contiene DAPI, un mutagénico. Se debe evitar su inhalación, ingestión o contacto con la piel
8. Las sondas contiene formamida, una sustancias teratogénica. Se debe evitar el contacto con la piel y las membranas mucosas
9. Para obtener resultados ideales es necesario garantizar que los regentes sean preparados y almacenados correctamente, de acuerdo con las instrucciones de uso (IFU)
10. Las muestras y residuos desechado durante el proceso de teste deben ser re-coleccionados y eliminados como residuos médicos.

Explicaciones de los seales

	Limite superior de temperatura		Mantener seco
	No use la embalaje si esta dañada		Consulte las instrucciones De uso
	No reutilizar		Mantener lejos de la luz solar
	Utilizar hasta		Numero del lote
	Numero de referencia		Fabricante
	Fecha de fabricación		Contiene cantidad suficiente para <n> testes

Sonda HER2 FISH, kit

Probe HER2 FISH, kit

For professional use only

Product Name: Probe HER2 FISH, kit

Packaging Specifications

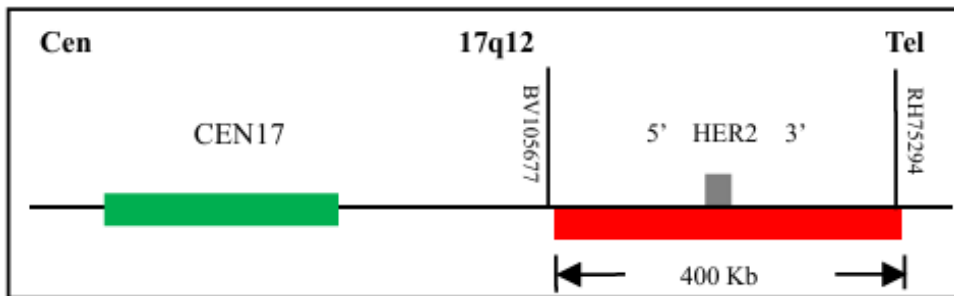
Reference	Description	Kit Size
EP-13-11991	Probe HER2 FISH, kit	5 Tests/Kit
EP-13-11992	Probe HER2 FISH, kit	10 Tests/Kit
EP-13-11993	Probe HER2 FISH, kit	20 Tests/Kit

INTENDED USE

The HER2 FISH Probe Kit is designed to detect amplification of the HER-2/neu gene via fluorescence in situ hybridization (FISH) in formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) human breast cancer tissue specimens, to provide the physician with supporting information for diagnosis.

Test Principle

Probe Design Description



The HER2/CEN17 probe is located on chromosome 17. A 400Kb probe covering the HER2 gene region is labeled with an orange dye, and part of chromosome 17 (CEN17) is labeled with a green dye. The HER2 gene marker region is located on 17q12. The result is used to guide the drug therapy and/or prognosis evaluation of primary invasive carcinoma of breast cancer.

Technique Description

Fluorescence in situ hybridization (FISH) is a molecular assay technique that uses fluorescently labeled DNA or RNA fragments or probes to hybridize via base complementary mechanism to the targeted regions of chromosomes in specimens. The probes emit fluorescence signals at a specific wavelength after excitation by a light source, and the hybridization to the chromosome can be directly observed through a microscope equipped with a proper filter set. This technique can accurately detect chromosomal abnormalities, therefore, the status of genes located at the affected regions of chromosomes can be evaluated.

Main Components

Specification	Kit content	Main components	Volume	Quantity
5 tests/kit	HER2/CEN17probe (HER2orangeprobe, CEN17greenprobe)	ALK probe formamide, SSC, and dextran sulfate, etc. HER2/CEN17 probe, COTIDNA, formamide,SSC,and dextran sulfate, etc.	50 µl	1 vial
10 tests/kit			100 µl	
20 tests/kit			200 µl	
	DAPI Mounting Medium	Antifade reagent ,DAPI, and glycerin,etc.	50 µl	1 vial
			100 µl	
			200 µl	

Notes: The components in kits of different lots should not be interchanged.

Material need but not provided

- Rubber cement
- Deparaffinization solution
- Absolute ethanol
- Purified water
- 1 M HCl
- 1 N or 2 N Hidróxido de Sódio (NaOH)
- 20×SSCSolution (3 M sodium chloride, 0.3 M sodium citrate, pH 5.3)
- NP-40
- Sodiumthiocyanate
- Pepsin(250 U/mg)

Applicable instruments

- Fluorescence microscope.
- Microliter pipettor and sterile tips
- Microcentrifuge
- Water bath
- Coplin jars
- Hybridization instrument

Notes: Fluorescence microscope. The configuration of the required fluorescence microscope includes: 10× eye piece, and 10×, 40× and 100× objective lenses. It is recommended that before using the probe, the user should ask the filter set supplier for the details of the filter set to be used, so as to choose a filter set that is compatible with the labeled fluorescent dyes.

Orange fluorescence: excitation maximum: 552 nm, emission maximum: 576 nm.

Green fluorescence: excitation maximum: 496 nm, emission maximum: 520 nm.

DAPI: excitation maximum: 340 nm, emission maximum: 488 nm.

Storage Conditions and Shelf Life

Storage conditions: below-15°C, sealed, and stored in the dark.

Shipping conditions: The kits must be transported under controlled temperature conditions between 2 °C and 8 °C. The shipping time must not exceed 10 days. During transport, the temperature must not exceed room temperature.

Shelf life: 12 months.

Note: see the production date and shelf life on the outer package

Sample Requirements

1. Sample type: formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections, it is recommended that paraffin samples less than two years be selected to ensure the accuracy of the test.
2. Sample collection method: the fresh tissues should be fixed in 10% neutral formalin buffer for 24-48 hours within 0.5-1 hour after being removed. The tissue size should not exceed 0.5 cm³ and the recommended section thickness is 3 µm- 5 µm.
3. Sample storage: the prepared paraffin sections are recommended to be used immediately, or stored at -20±5°C.

Test Methods

A - Preparation of Working Reagen

Ethanol Wash Solutions

Prepare v/v dilutions of 70% and 85% using 100% ethanol and purified water. Dilutions may be used for 1 week unless evaporation occurs or the solution becomes diluted due to excessive use. Store at room temperature in tightly capped containers when not in use.

Pretreatment Solution

- To prepare, add together:

80 g	Sodium thiocyanate
800 mL	Purified water
1000 mL	FinalVolume

Mix thoroughly. Adjust volume to 1 liter with purified water. Filter through 0.45 µm pore filtration unit. Discard used solution at the end of each day. If the reagent is turbid or contaminated, it should be discarded immediately.

2× SSC /0.3%NP-40 Washing Solution

- To prepare, add together:

100 mL	20× SSC pH 5.3
847 mL	Purified water
3 mL	NP-40
1000 mL	Final volume

Mix thoroughly. Measure pH at room temperature using a pH meter. Adjust pH to 7.0±0.2 with 1 N or 2 N NaOH. Adjust volume to 1 liter with purified water. If the reagent is turbid or contaminated, it should be discarded immediately.

Enzyme buffer (pH 2.0 HCl)

To prepare, add together:

10 mL	1 M HCl
<u>900mL</u>	Purified water
1000 mL	Final Volume

Mix thoroughly. Measure pH at room temperature using a pH meter. Adjust pH to 2.0 ± 0.2 with 1 M HCl. Adjust volume to 1 liter with purified water. If the reagent is turbid or contaminated, it should be discarded immediately.

B - Preparation of instruments

Note: 2 mg/ml Pepsin solution (Take 100mg pepsin, add 50ml enzyme buffer and mixwell) should be prepared fresh daily.

1. Turn on the thermostat water bath and set the temperature to 80°C. Pour the Pretreatment Solution into the Coplin jar, put the jar in the water bath, and preheat it to 80°C.
2. Turn on the thermostat water bath and set the temperature to 37°C. Pour 50 ml 1 mg/ml Pepsin solution into the Coplin jar, put the jar in the water bath, and preheat it to 37°C.
3. Before post-hybridization wash, set the temperature of the thermostat water bath to 68°C, pour the 2× SSC/0.3% NP-40 Washing Solution into the Coplin jar, and place the jar in the water bath for at least 30 minutes. Ensure that the temperature of the washing solution reaches $68 \pm 1^\circ\text{C}$ before use. Pour the 2× SSC/0.3% NP-40 Washing Solution into another Coplin jar and keep room temperature.

Testing process

Sample pretreatment

1. Preheat the slide at 65°C for 5 min on the hybridization instrument (Recommended Hybridizer: Ara EP-31-20147/EasyPath), and deparaffinize with the transparent deparaffinization solution (isoparaffintype) or xylene twice, 15min each time.
2. Dehydrate the slide in absolute ethanol twice, 5 min each time.
3. Rehydrate the slide in 85% ethanol, 70% ethanol and purified water in gradients for 1 min each.
4. Take out the slide and use the water absorbing paper to remove the residual solution from the slide.
5. Place the slide in the pretreatment solution preheated to 80°C and maintain for 30 min.
6. Take out the slide and immerse it in purified water for 1 min; then, take it out and remove the residual solution from it.
7. Immerse the slide in 2 mg/ml Pepsin solution preheated to 37°C for 25min.
8. After digestion, immerse the slide in purified water for 1 min.
9. Dehydrate the slide in 70% ethanol, 85% ethanol and 100% ethanol in turn for 1 min each.
10. Dry the slide at room temperature for use later.

Sample denaturation and hybridization

1. Preheat the probes to the room temperature, swirl and mix them well, centrifuge the mixture for 2s-3s in a microcentrifuge, and drop 10µl probes to the hybridization area.
2. Place the cover slide (18mmx18mm), avoiding air bubbles, and seal the slide with rubber cement.

3. Set the hybridization instrument program: denaturation: 85°C, 5 min; hybridization: 42°C, 16-18 hours.

Note: The fast hybridization program: denaturation: 85°C, 5 min; hybridization: 42°C, 2 hours.

Post-hybridization wash

1. Carefully remove the Rubber Cement.
2. Place the slide in the room temperature 2×SSC/0.3%NP-40 Washing Solution in the Coplin jar to wash off the cover slide (2min-5min).
3. Take out the slide and rinse it for 2 min with the 2×SSC/0.3%NP-40 Washing Solution preheated to 68±1°C.
4. Take out the slide and rinse it for 1 min with the 2×SSC/0.3%NP-40 Washing Solution preheated at the room temperature
5. Take out the slide, absorb the residual solution, put the slide in 70% ethanol at room temperature, and rinse it for 1 min.
6. Air-dry the slide naturally in the dark for use later.

Counterstaining

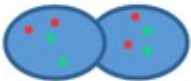


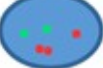




1. Drop 10µl counterstaining solution to the hybridization area (avoiding bubbles), place the cover slide, carefully remove the excess counterstaining solution with water absorbing paper, and counter stain the slide at -20±5°C in the dark for more than 20 min.
2. Select the appropriate filter set to observe the results under the fluorescence microscope

Slide viewing and data collection

1. Select the appropriate filter set to observe the results under the fluorescence microscope.
2. Find the area under a 10× objective lens and count the number under a 100× objective lens.
3. Adjust the focal length to find the suitable area, requiring complete nucleus boundary, uniform staining by the counterstaining solution, no overlap of nuclei, and clear signal points.
4. In the selected region, find all signal points at different levels of the nuclei, and count the individual orange and green signals; the nuclei without signals or with weak signals are not counted.



Interpretation of common signal type

	● =orange signal, HER2	● =green signal, CEN17
1		The nuclei are overlapping, so the entire areas of both nuclei cannot be seen clearly; however, the signals are not in the overlapped area, and there are two orange signals and two green signals in each nucleus
2		Two orange signals and two green signals are counted, and one of the orange signals is dispersed
3		Don't count. All nuclei overlap, so all areas cannot be seen clearly, and some signals are in the overlapped area
4		Two orange signals and two green signals are counted, and one of the orange signals is split
5		One orange signal and two green signals are counted, and one of the green signals is split
6		Two orange signals and one green signal are counted
7		Three orange signals and one green signal are counted
8		Four orange signals and two green signals are counted

Threshold determination for FISH negative specimen

Twenty specimens without the known genetic abnormalities to the FISH probe set are required to be randomly selected to prepare control slides. After hybridization, count 200 cells from each control slide and record any types of signal patterns that are considered to be FISH positive. Calculate the percentage of positive signals observed and determine the standard deviation. The threshold for FISH-negative specimens is set as the average value of percentage plus 3 times the standard deviation. The control or FISH-negative specimens are usually chosen to be the same type of tissue or cell as that of the intended target of detection by FISH.

Importance of threshold determination

The threshold must be set when probes are used for the first time since this value will serve as the reference to distinguish FISH-positive and negative specimens. If the experimental procedures are altered, such as the method of specimen pre-treatment or a change of equipment, the threshold may vary; therefore must be reset under the newly established experimental conditions.

Interpretation of Test Results

Common problems and solutions in the testing process:

Problem	Possible cause	Recommended solution
Nosignal or weak signal	Insufficient denaturation of samples and probes	Ensure that the temperature of the slide is $85\pm 1^{\circ}\text{C}$ during the denaturation; Extend the slide denaturation time by 2-4 min.
	No probe added	Fully thaw the probes, and ensure that the probe reagent is drawn by the pipette.
	Insufficient quantity of probes	Ensure that the probes reach room temperature before use, and ensure that the probe reagent is drawn by the pipette.
	Insufficient drying of slide	Before adding the probes onto the slide, ensure that the ethanol solution on the slide has completely volatilized.
	Too fast drying of probes	Cover the target area by the cover slide immediately after the probes are added; for the elution, remove the cover slide on only one slide at a time, and immerse the slide in the washing solution immediately before the cover slide on the next slide is removed.
	Bolhas sob a lâmina durante a hibridização	Cover the surface of the probes with the cover slide, and gently squeeze it to eliminate the air bubbles.
	Inappropriate hybridization conditions	Ensure the compliance with the specified hybridization time and temperature; do not leave any gap when sealing the slide with fluoro gel; Adjust the hybridization time and humidity as appropriate.
	Incorrect washing solution or elution conditions	Ensure that the washing solution is prepared in accordance with the IFU; ensure that the temperature of the washing solution reaches the temperature specified in the elution step; remove the cover slide before immersing the slide in the washing solution.
	Improper storage of probes or sample slides	Store the probes below -15°C in the dark; dry the unhybridized slides for long-term storage at $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ or short-term storage (generally no more than two weeks) at room temperature; Store the hybridized slides at $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ in the dark.
	Inappropriate selection of filter set for observation	Use the correct filter set to observe the probe fluorescence.
Excessively intense background of slides	Inappropriate microscope structure and objective lens for observing FISH samples, or damage of the filter set	Please contact the microscope manufacturer.
	Insufficient washing of slides before sample preparation	Immerse the slide in absolute ethanol and wipe it dry with water absorbing paper before dropping the reagent.
	Inadequate elution after the hybridization	Ensure that the washing solution is prepared correct in accordance with the IFU; operate in accordance with the IFU; ensure that the temperature of the washing solution is correct; remove the cover slide and repeat the elution step.
	Long-term use or improper storage of washing solution	Ensure that the washing solution is stored at $2-25^{\circ}\text{C}$, and discard the reagent if it is turbid or contaminated.
Too weak counterstaining	Too high or too low hybridization humidity	Adjust the hybridization humidity to the optimum.
	Too weak counterstaining	Remove the cover slide and immerse the slide in the washing solution for 5 min at room temperature. Place the slide in 70%, 85% and 100% ethanol solutions for 1 min each for gradient dehydration, and then perform counterstaining.
	Expiration or excessive light exposure of staining solution	Ensure that the staining solution is stored below -15°C in the dark; ensure that the staining solution is not expired.















Limitations of Test Methods

1. This kit is based on the fluorescence in situ hybridization technique for the HER2 gene amplification.
2. This reagent is applicable to paraffin tissue sections, and adjust the pretreatment process according to the thickness of the tissue sections or the type of samples.

Precautions

1. This kit is only for research.
2. Do not reuse the kit components.
3. The clinical significance of the test result of this kit should be evaluated in conjunction with the patient's past medical history and do their examination results.
4. During the operation of this kit, it is necessary to wear latex gloves to avoid the contact of the reagent with the skin. In the case of accidental contact, rinse immediately with plenty of water.
5. Samples should not be exposed to acid and alkali or be overheated, which may damage DNA and lead to failure of FISH test.
6. All components in the kit should be used within the shelf life.
7. The staining solution contains DAPI, which is a mutagen. Inhalation, ingestion or contact with the skin should be avoided.
8. The probe contains a teratogen called formamide. Contact of it with the skin and mucous membranes should be avoided.
9. In order to obtain ideal results, it is necessary to ensure that the reagents are properly prepared and stored in accordance with the IFU.
10. The discarded samples and wastes in the testing process should be collected and disposed of as medical waste.

Explanation of Signs

	Upper limit of temperature		Keep Dry
	Do Not Use if Package is Damage		Consult instructions for use
	Do not reuse		Keep away from sunlight
	Use By		Lot Number
	Reference Number		Manufacturer
	Date of Manufacture		Contains sufficient for <n> tests