ZytoVision

Zyto*Fast*

human Ig-kappa Probe

(Digoxigenin-labeled)

REF T-1115-400 Σ 40 (0,4 ml)

Pour la détection qualitative de l'ARNm de la chaîne légère Ig-kappa humaine (κ) par hybridation chromogénique *in situ* (CISH)

4250380P102QE

CE 0483 IVD

Dispositif médical de diagnostic *in vitro*

conformément à l'IVDR (UE) 2017/746

1. Utilisation prévue

La sonde Zyto*Fast* human Ig-kappa Probe (**PF30**) est destinée à la détection qualitative de l'ARNm de la chaîne légère Ig-kappa humaine (κ) dans des échantillons fixés au formol et inclus en paraffine, tels que le myélome multiple, par hybridation chromogénique in situ (CISH). La sonde est destinée à être utilisée en association avec le Zyto*Fast* PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB (Prod. No. T-1063-40).

Le produit est destiné à un usage professionnel uniquement. Tous les tests utilisant le produit doivent être réalisés dans un laboratoire d'anatomie pathologique certifié et agréé, sous la supervision d'un médecin pathologiste/généticien et par du personnel qualifié.

Le produit est destiné à être utilisé comme aide au diagnostic différentiel du myélome multiple et des mesures thérapeutiques ne doivent pas être prises sur la base du seul résultat du test.

2. Principe du test

La technique d'hybridation chromogénique in situ (CISH) permet la détection et la visualisation de séquences d'acides nucléiques spécifiques dans des préparations cellulaires. Les fragments de nucléotides marqués par des haptènes, appelés sondes CISH, et leurs séquences cibles complémentaires dans les préparations sont codénaturés et ensuite hybridés pendant l'hybridation. Les fragments de sondes non spécifiques et non liés sont éliminés par des étapes de lavage stringent. La formation de duplex de la sonde marquée peut être visualisée en utilisant des anticorps primaires (non marqués), qui sont détectés par des anticorps secondaires polymérisés conjugués à une enzyme. La réaction enzymatique avec les substrats chromogènes conduit à la formation de précipités colorés. Après avoir contre-coloré le noyau avec un colorant nucléaire, les fragments de sonde hybridés sont visualisés au microscope optique.

3. Réactifs fournis

Zyto*Fast* human Ig-kappa Probe est compose de:

- Oligonucléotides marqués à la digoxigénin (~ 0,2 ng/µl), qui ciblent les séquences d'ARNm codant pour les régions constantes de la chaîne légère d'Ig-kappa.

La sonde Zyto*Fast* human Ig-kappa Probe est disponible en une seule taille:

- T-1115-400: 0,4 ml (40 réactions de 10 µl chacune)

4. Matériel requis mais non fourni

- Zyto*Fast* PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB (Prod. No. T-1063-40)
- Echantillons de contrôle positif et négatif
- Lames de microscope, chargées positivement
- Bain-marie (55 °C, 98 °C)
- Hybridateur ou plaque chauffante
- Hybridateur ou chambre d'humidité dans le four d'hybridation
- Pipettes calibrées réglables (10 µl, 100 µl, 1000 µl)
- Bocaux ou bains de coloration
- Minuterie
- Thermomètre calibré
- Éthanol ou alcool réactif
- Xylène
- Méthanol à 100%
- Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) 30%
- Eau désionisée ou distillée
- Couvre-objets (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Colle au caoutchouc, par exemple, Fixogum Rubber Cement (Prod. No. E-4005-50/-125) ou similaire
- Microscope optique correctement entretenu (100-200x)

5. Stockage et manipulation

Conserver entre 2 et 8 °C dans une position verticale. Remettre dans les conditions de stockage immédiatement après utilisation. Ne pas utiliser les réactifs après leur date de péremption indiquée sur l'étiquette. Le produit est stable jusqu'à sa date de péremption indiquée sur l'étiquette lorsqu'il est utilisé dans les bonnes conditions.

6. 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) !
- Signaler tout incident grave survenu en rapport avec le produit au fabricant et à l'autorité compétente, conformément à la réglementation locale!
- 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, sauf si la réutilisation est explicitement autorisée!
- Éviter la contamination croisée des échantillons car cela peut entraîner des résultats erronés.
- Les spécimens ne doivent pas être laissés sécher pendant les étapes d'hybridation et de lavage.

Mentions de danger et conseils de prudence :

Le mélange n'est pas classé comme dangereux dans le sens de règlement (CE) n° 1272/2008.

7. Restrictions

- Destiné à une utilisation en diagnostic *in vitro*.
- Destiné à un usage professionnel uniquement.
- Pour une utilisation non automatisée uniquement.
- L'interprétation clinique de toute coloration positive, ou de son absence, doit être faite en prenant compte de l'historique clinique du patient, de la morphologie, des autres critères histopathologiques ainsi que des autres tests diagnostiques. Il est de la responsabilité d'un médecin pathologiste/généticien qualifié de se familiariser avec les sondes CISH, les réactifs, les panels de diagnostic et les méthodes utilisées pour produire la préparation colorée. La coloration doit être effectuée dans un laboratoire certifié et autorisé sous la supervision d'un médecin pathologiste/généticien qui est responsable de l'interpretation des lames colorées et de la vérification du bon fonctionnement du test sur les 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 artéfacts 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 détecter la séquence décrite au chapitre 3. "Réactifs fournis".
- Les performances ont été validées en utilisant les procédures décrites dans ce mode d'emploi. Des modifications de ces procédures peuvent altérer les performances et doivent être validées par l'utilisateur. Ce Reactif IVD est uniquement certifié CE lorsqu'il est utilisé comme décrit dans ce mode d'emploi pour une utilisation dans le cadre de l'utilisation prévue.

8. Substances interférentes

Les fixateurs suivants sont incompatibles avec la ISH :

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

9. Préparation des échantillons

Préparer les échantillons en suivant les instructions d'utilisation de ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB.

10. Traitement préparatoire du produit

Le produit est prêt à l'emploi. Il n'est pas nécessaire de le reconstituer, le mélanger ou le diluer. Amener la sonde à la température d'hybridation (55 °C) et mélanger soigneusement avant l'utilisation.

11. Protocole

Prétraitement de l'échantillon
Effectuer le prétraitement des échantillons (par exemple, déparaffinage, protéolyse) selon les instructions d'utilisation du ZytoFast CISH Implementation Kit.

Dénaturation et hybridation

1. Mettre 10 µl de sonde sur chaque échantillon prétraité.
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 5 min à 75 °C.
4. Transférer les lames dans une chambre humide et les hybrider pendant 1 h à 55 °C (par exemple, dans un four d'hybridation).

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

Post-hybridation
Effectuer le traitement post-hybridation (lavage, détection, contre-coloration, montage, microscopie) en suivant les instructions d'utilisation du ZytoFast CISH Implementation Kit.

12. Interprétation des résultats

Avec le kit de mise en œuvre *ZytoFast* PLUS CISH HRP-DAB, les oligonucléotides hybridés marqués à la digoxigénine apparaissent en brun lorsqu'ils sont détectés par la peroxydase de raifort (HRP) et le DAB.

Une réactivité positive dans les cellules B plasmatiques est indiquée par une coloration cytoplasmique.

Dans le tissu lymphoïde, le rapport normal kappa-lambda est d'environ 2:1, une indication de monoclonalité est donnée si le rapport kappa-lambda est >3:1 ou <0,3:1.

Veuillez noter :

- La visualisation des signaux doit être effectuée à un grossissement d'au moins 100 fois pour obtenir des signaux facilement visibles.
- Ne pas évaluer les zones de nécrose, les noyaux chevauchants, les noyaux surdigérés et les noyaux à faible intensité de signal.
- Un résultat négatif ou non spécifique peut être causé par de multiples facteurs (voir chapitre 16. "Assistance").
- 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.

13. 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 : Un lymphocyte B plasmatique présent dans l'échantillon doit présenter un motif de coloration Ig-kappa ou Ig-lambda. Les cellules de l'échantillon n'appartenant pas au type de cellule B, par exemple les fibroblastes, ne doivent présenter aucun motif de coloration.

Contrôle externe : Echantillons contrôles négatifs et positifs validés.

14. Caractéristiques de performances

14.1 Performance analytique

Sensibilité analytique:	100% (95% CI 97.0 – 100.0)
Spécificité analytique:	100% (95% CI 97.0 – 100.0)

14.2 Performance clinique

Sensibilité diagnostique:	100% (95% CI 86.3 -100.0) vs. IHC 100% vs. RAPID RISH Biocare/ Test de restriction de la chaîne légère sans sérum 88.24% vs. IHC
Spécificité diagnostique:	100% (95% CI 86.3 -100.0) vs. IHC

15. Elimination

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

16. Assistance

Tout écart par rapport au mode d'emploi peut conduire à des résultats de coloration inférieurs ou à aucune coloration du tout. Veuillez consulter le site www.zytovision.com pour plus d'informations.

Faible signal ou aucun signal

Cause possible	Action
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
Préparation insuffisante du substrat chromogène	Au lieu de préparer les substrats colorés par goutte à goutte, utilisez une pipette
Temps de contre coloration trop long	Évitez la contre-coloration sombre, car elle peut masquer les signaux de coloration positive
Le bleuissement de la contre-coloration n'a pas été effectué correctement	Utilisez l'eau courante froide du robinet ; n'utilisez pas d'eau chaude ou tiède, ni de réactifs

Les signaux s'estompent ou fusionnent

Cause possible	Action
Une solution de montage inadaptée a été utilisée	Utilisez uniquement la solution de montage fournie avec le kit ou des solutions de montage à base de xylène exemptes de toute impureté ; n'utilisez pas de ruban adhésif pour couvre-objet

Coloration inégale ou, dans certaines parties, très légère

Cause possible	Action
Déparaffinage incomplet	Utiliser des solutions fraîches ; vérifier la durée des temps de déparaffinage
Volume de réactifs trop faible	Veiller à ce que le volume du réactif soit suffisamment important pour couvrir la zone du tissu

Des résultats incohérents

Cause possible	Action
Séchage insuffisant avant l'application de la sonde	Prolonger le séchage à l'air libre
Trop d'eau/tampon de lavage sur les tissus avant l'application de pepsine, d'anticorps et/ou de substrats colorés	Veillez à ce que l'excès de liquide soit retiré de la section de tissu en l'essuyant ou en le secouant sur la lame. De petites quantités d'eau résiduelle/tampon de lavage n'interfèrent pas avec l'essai
Variations des méthodes de fixation et d'incrustation des tissus	Optimiser les méthodes de fixation et d'encastrement
Variations de l'épaisseur de la coupe de tissu	Optimiser le découpage en sections

Morphologie détériorée

Cause possible	Action
L'échantillon de cellule ou de tissu n'a pas été correctement fixé	Optimiser le temps de fixation et le fixateur
Prétraitement protéolytique effectué trop longtemps	Réduire le temps d'incubation de la pepsine

Bruit de fond important

Cause possible	Action
Sections desséchées à tout moment pendant ou après l'hybridation	Éviter que les sections ne s'assèchent ; utiliser une chambre d'humidité ; sceller correctement les couvercles
Temps d'incubation prolongé du substrat	Réduire la durée d'incubation du substrat
Déparaffinage incomplet	Utiliser des solutions fraîches ; vérifier la durée du déparaffinage
Prétraitement protéolytique trop fort	Optimiser le temps d'incubation de la pepsine
Lames refroidies à température ambiante avant l'hybridation	Transférer rapidement les lames à la température d'hybridation

Noyaux chevauchants

Cause possible	Action
Épaisseur inappropriée des coupes de tissus	Préparer des sections de microtome de 3 à 5 μm

Echantillon glissant sur la lame

Cause possible	Action
Prétraitement protéolytique trop fort	Réduire le temps d'incubation de la pepsine

17. Bibliographie

- Lang G. (2010) *Journal of Histotechnology*.
- Sen A, et al. (2020) *Med J Armed Forces India*.
- Wilkinson DG: In Situ Hybridization, A Practical Approach, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.

18. Révision

Revision	Description du changement
2.1.1	Changement d'organisme notifié

www.zytovision.com

Veuillez consulter le site www.zytovision.com pour obtenir le mode d'emploi le plus récent ainsi que des instructions d'utilisation dans différentes langues.

Nos experts sont disponibles pour répondre à vos questions.
Merci de nous contacter à helptech@zytovision.com
Pour le résumé de la sécurité et des performances, veuillez vous référer à www.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 Zyto*Fast*® sont des marques déposées de ZytoVision GmbH.