



ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit

REF Z-2099-20

20

A utiliser dans les procédures d'hybridation fluorescente *in situ* (FISH)

4250380N727X



Dispositif médical de diagnostic *in vitro*
conformément à l'IVDR (UE) 2017/746

1. Utilisation prévue

Le ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit est destiné à être utilisé en combinaison avec les sondes ZytoLight FISH sur des spécimens de cytologie par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH).

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, par du personnel qualifié.

2. Principe du test

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

3. Réactifs fournis

Le ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit est disponible en deux tailles et est composé de :

Code	Composant	Quantité	Contenant
		20	
ES2	<u>Cytology Pepsin Solution</u>	4 ml	Flacon compte-gouttes, bouchon transparent
WB5	<u>20x Wash Buffer TBS</u>	50 ml	Flacon avec bouchon à visser
PT4	<u>10x MgCl₂</u>	50 ml	Flacon avec bouchon à visser
PT5	<u>10x PBS</u>	50 ml	Flacon avec bouchon à visser
WB7	<u>Cytology Stringency Wash Buffer SSC</u>	500 ml	Flacon avec bouchon à visser (grand)
WB8	<u>Cytology Wash Buffer SSC</u>	500 ml	Flacon avec bouchon à visser (grand)
MT7	<u>DAPI/DuraTect-Solution</u>	0,8 ml	Cuve à réaction, couvercle bleu
	Mode d'emploi	1	

Z-2099-20 (20 tests) : Les composants **ES2** et **MT7** suffisent pour 20 réactions. Les composants **PT4**, **PT5**, **WB7** et **WB8** suffisent pour 7 cuves à coloration de 70 ml chacune. Le composant **WB5** suffit pour 14 cuves à coloration de 70 ml chacune.

4. Matériel requis mais non fourni

- ZytoLight FISH probe
- Échantillons pour les contrôles positifs et négatifs
- Lames pour microscope, non coatées
- Bain-marie (70 °C)
- Système d'hybridation ou plaque chauffante
- Système d'hybridation ou chambre humide dans un four à hybridation
- Pipettes ajustables (10 µl, 25 µl)
- Cuves ou bacs à coloration
- Chronomètre
- Thermomètre calibré
- Ethanol ou réactif à l'alcool
- Formaldéhyde 37 %, sans acide ou formol 10 % tamponné (pH neutre)
- Citrate de sodium salin 2x (SSC), par exemple à partir de 20 x SSC Solution (Référence N° WB-0003-50)
- Eau distillée ou déminéralisée
- Lamelles (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Ciment caoutchouc, par exemple : Fixogum Rubber Cement (Prod. N° E-4005-50/-125)
- Microscope à fluorescence adéquatement entretenu (400-1000x)
- Huile à immersion compatible avec la microscopie à fluorescence
- Sets de filtres appropriés

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.

Mention Étiquetage particulier de ES2:

EUH210 Fiche de données de sécurité disponible sur demande. Le mélange contient < 20 % de composants dont la toxicité aiguë est inconnue (par inhalation).

Mentions de danger et conseils de prudence pour PT4, PT5, WB5, WB7 et WB8 :

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



Avertissement

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

Mentions de danger et conseils de prudence por MT7:

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 prendre en compte le contexte l'historique clinique, de la morphologie, d'autres critères histopathologiques ainsi que d'autres tests de diagnostic. Il est de la responsabilité d'un médecin pathologiste/généticien qualifié de se familiariser avec les sondes HIS, les réactifs, les panels de diagnostic et les méthodes utilisées pour le marquage des échantillons. Le marquage doit être effectué dans un laboratoire certifié et agréé, sous la supervision d'un pathologiste/généticien qui est responsable de l'examen des lames

colorées et de la vérification de l'adéquation des contrôles positifs et négatifs.

- La coloration de l'échantillon, en particulier l'intensité du signal et le bruit de fond, dépend de la manipulation et de la préparation de l'échantillon avant marquage. Une mauvaise fixation, congélation, décongélation, un mauvais lavage, séchage, chauffage, de mauvaises coupes, ou une contamination avec d'autres échantillons ou fluides peut produire des artefacts et de faux résultats. Des résultats incohérents peuvent résulter des variations des méthodes de fixation et d'inclusion, ainsi que des irrégularités inhérentes à l'échantillon.
- Les performances ont été validées en utilisant les procédures décrites dans le mode d'emploi de la sonde ZytoVision et du kit d'implémentation respectifs. Des modifications de ces procédures peuvent altérer les performances et doivent être validées par l'utilisateur. Ce produit 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 globules rouges présents dans l'échantillon peuvent présenter une autofluorescence qui entrave la reconnaissance du signal.

9. Préparation des échantillons

Effectuer l'incubation des lames pendant 2 min dans une 2x solution SSC à 73 °C juste avant la protéolyse pour le vieillissement.

À défaut, le vieillissement des échantillons peut être effectué par l'incubation des échantillons toute la nuit (12 à 16 h) à 37 °C.

10. Traitement préparatoire du produit

20x Wash Buffer TBS (WB5), 10x MgCl₂ (PT4) et 10x PBS (PT5) doivent être prétraités conformément aux instructions dans 11, « Protocole ». Les composants (PT4) et (PT5) peuvent former des précipités à 2-8°C. Si nécessaire, réchauffer à 37°C pendant 10 minutes jusqu'à dissolution complète des précipités avant utilisation. Tous les autres réactifs du kit sont prêts à l'emploi. Il n'est pas nécessaire de le reconstituer, le mélanger ou le diluer.

11. Protocole

11.1 1^{er} jour

Étapes préparatoires

- *Préparation de 1x tampon de lavage au sérum physiologique TBS :* Diluer 1 volume 20x Wash Buffer TBS (WB5) avec 19 volumes d'eau distillée ou déminéralisée.
- *Préparation de formaldéhyde en solution à 1 % :* Pour 100 ml de formaldéhyde en solution à 1 %, mélanger soit 2,7 ml de formaldéhyde à 37 % non acide ou 25 ml de formol neutre tamponné à 10% (formaldéhyde à 4 %) avec 10 ml de 10x MgCl₂ (PT4) et 10 ml de 10x PBS (PT5) et ajuster le volume à 100 ml avec de l'eau distillée ou déminéralisée. Mélanger soigneusement.
- *Préparation d'une série d'éthanol (solutions d'éthanol à 70 %, 90 % et 100 %) :* Diluer 7, 9 et 10 volumes d'éthanol à 100 % avec 3, 1 et 0 volumes d'eau distillée ou déminéralisée, respectivement. Ces solutions peuvent être stockées dans des récipients appropriés et peuvent être réutilisées.
- *ZytoLight FISH Probe:* Amener à TA avant utilisation, à l'abri de la lumière.

Pré-traitement (protéolyse/post-fixation)

- (1) Appliquer (goutte à goutte) la Cytology Pepsin Solution (ES2) à l'échantillon de cytologie et effectuer l'incubation pendant 10 min à 37 °C dans une chambre humide.

En fonction de plusieurs facteurs, tels que la nature et la durée de fixation, ainsi que la nature des cellules, différents temps d'incubation peuvent être nécessaires. Nous recommandons un temps d'incubation de 5 à 15 min pour les échantillons de cytologie. En règle générale, nous recommandons de déterminer le moment optimal pour la protéolyse dans des tests préliminaires.

- (2) Effectuer l'incubation des lames pendant 5 min dans 1x Wash Buffer TBS.

- (3) Effectuer l'incubation des lames pendant 5 min dans une solution de formaldéhyde à 1 %.
- (4) Effectuer l'incubation des lames pendant 5 min dans 1x Wash Buffer TBS.
- (5) Déshydratation : dans l'éthanol à 70 %, 90 % et 100 % pendant 1 min chaque.

Sécher à l'air les échantillons.

Dénaturation et hybridation

- (1) Mettre 10 µl de *ZytoLight FISH Probe* sur chaque échantillon pré-traité.

Éviter une longue exposition de la sonde à la lumière.

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

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

- (3) Placer les lames sur une plaque chauffante ou dans un système d'hybridation pour dénaturer les échantillons pendant 5 min à 72 °C.
- (4) Transférer les lames dans une chambre humide et hybrider toute la nuit à 37 °C (par exemple dans un four à hybridation).

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

11.2 2^e jour

Étapes préparatoires

- Cytology Stringency Wash Buffer SSC (WB7) : Préchauffer à 70 °C.
- Cytology Wash Buffer SSC (WB8) : Amener à température ambiante.
- DAPI/DuraTect-Solution (MT7) : Amener à température ambiante avant utilisation, à l'abri de la lumière.

Post-hybridation et détection

- (1) Retirer délicatement la colle ou la colle caoutchouc.
- (2) Retirer délicatement la lamelle.
- (3) Laver au moyen d'un Cytology Stringency Wash Buffer SSC (WB7) pendant 2 min à 70 °C.

Le Cytology Stringency Wash Buffer SSC doit être préchauffé. Vérifier avec un thermomètre si nécessaire.

Nous recommandons d'utiliser quatre lames par cuve à coloration. Lorsque c'est nécessaire, utiliser des lames vides afin de régler le nombre à quatre.

- (4) Laver, au moyen du Cytology Wash Buffer SSC (WB8) pendant 1 min à température ambiante.

Le Cytology Stringency Wash Buffer SSC doit être préchauffé à température ambiante. Vérifier avec un thermomètre si nécessaire.

- (5) Sécher à l'air les échantillons à l'abri de la lumière.
- (6) Mettre 25 µl de DuraTect/DAPI-Solution (MT7) sur les lames. Couvrir les échantillons avec une lamelle (24 mm x 60 mm) en évitant les bulles. Effectuer l'incubation dans l'obscurité pendant 15 min.

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

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

Colorant fluorescent	Excitation	Émission
ZyBlue	418 nm	467 nm
ZyGreen	503 nm	528 nm
ZyGreen 2.0	493 nm	518 nm
ZyGold	532 nm	553 nm
ZyOrange	547 nm	572 nm
ZyRed	580 nm	599 nm

12. Interprétation des résultats

Avec l'utilisation de sets de filtres appropriés en interphases ou métaphases des cellules normales ou des cellules sans aberrations des chromosomes, deux signaux par sonde/marque en fluorescence apparaissent, à l'exception des sondes ciblant les chromosomes X et/ou Y, ayant pour résultat zéro à deux signaux par sonde/marque en fluorescence, en fonction du sexe. Dans les cellules présentant des aberrations chromosomiques, un modèle de signal différent peut être visible en interphases ou métaphases. Pour obtenir plus de renseignements sur l'interprétation des résultats, consulter le manuel de sonde respectif.

13. Procédures de contrôle qualité recommandées

Reportez-vous aux instructions d'utilisation de la sonde *ZytoVision* correspondante.

14. Caractéristiques de performances

Reportez-vous aux instructions d'utilisation de la sonde *ZytoVision* correspondante.

15. Élimination

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. Pour plus d'informations, veuillez consulter le site www.zytovision.com.

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 la 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
Mauvais sets de filtres utilisés	Utiliser les sets de filtres appropriés aux fluorochromes de la sonde. <i>Les sets de filtres à bande triple offrent moins de luminosité par rapport aux sets de filtres à bande unique ou double bande. Par conséquent, les signaux peuvent sembler plus faibles en utilisant les sets de filtres à bande triple</i>

Signaux d'hybridation croisée ; bruit de fond

Cause possible	Action
Prétraitement protéolytique trop fort	Réduire le temps d'incubation de la pepsine
Les lames sont refroidies à température ambiante avant l'hybridation	Transférer les lames rapidement à 37 °C

Morphologie dégradé

Cause possible	Action
Le prétraitement protéolytique n'est pas effectué correctement	Optimiser le temps d'incubation de la pepsine, l'augmenter ou la diminuer si nécessaire
Séchage insuffisant avant l'application de la sonde	Prolonger le séchage à l'air

Contre-coloration légère

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

17. Bibliographie

- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* **53**: 134-6.
- Wilkinson DG: *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.

18. Revision

Revision	Description du changement
1.2.1	11. Protocole ZyGreen 2.0 ajouté



www.zytovision.com

Veillez 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 help@zytovision.com



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

Marques déposées :

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