



FlexISH- Tissue Implementation Kit

REF Z-2182-5 Σ 5

REF Z-2182-20 Σ 20

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

4250380N8486



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

1. Utilisation prévue

Le FlexISH-Tissue Implementation Kit est destiné à être utilisé en combinaison avec les sondes FlexISH sur des échantillons fixés au formol et inclus en paraffine par hybridation *in situ* par 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 stringente. 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 FlexISH-Tissue Implementation Kit est disponible en deux tailles et est composé de:

Code	Composant	Quantité		Contenant
		20	Σ	
PT1	<u>Heat Pretreatment Solution Citric</u>	500 ml	150 ml	Flacon avec bouchon à visser (grand)
ES1	<u>Pepsin Solution</u>	4 ml	1 ml	Flacon compte-gouttes, bouchon transparent
WB10	<u>5x FlexISH Wash Buffer</u>	500 ml	150 ml	Flacon avec bouchon à visser (grand)
MT7	<u>DAPI/DuraTect-Solution</u>	0,8	0,2	Cuve à réaction, couvercle bleu
	Mode d'emploi	1	1	

Z-2182-20 (20 tests) : Les composants **ES1** et **MT7** suffisent pour 20 réactions. Le composant **WB10** suffit pour 11 x 3 cuves à coloration de 70 ml chacune. Le composant **PT1** suffit pour 7 cuves à coloration de 70 ml chacune.

Z-2182-20 (20 tests) : Les composants **ES1** et **MT7** suffisent pour 20 réactions. Le composant **WB10** suffit pour 11 x 3 cuves à coloration de 70 ml chacune. Le composant **PT1** suffit pour 7 cuves à coloration de 70 ml chacune.

4. Matériel requis mais non fourni

- FlexISH probe
- Échantillons pour les contrôles positifs et négatifs
- Lames pour microscope, chargées positivement
- Bain-marie (37 °C, 98 °C)
- Plaque chauffante ou système d'hybridation
- Chambre humide + four à hybridation ou système d'hybridation
- Pipettes ajustables (10 μ l, 30 μ l)
- Pots ou bacs de coloration
- Chronomètre
- Thermomètre calibré
- Ethanol ou réactif à l'alcool
- Xylène
- Eau distillée ou déminéralisée
- Lamelles (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Ciment caoutchouc, par exemple : Fixogum Rubber Cement (Prod. N° E-4005-50/-125) ou similaire
- Microscope à fluorescence adéquatement entretenu (400-1000x)
- Huile à immersion compatible avec la microscopie à fluorescence
- Sets de filtres appropriés

5. Stockage et manipulation

Les composants du kit doivent être conservés entre 2 et 8 °C. En outre, le DuraTect/DAPI-Solution (MT7) doit être conservée à l'abri de la lumière. 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 la date de péremption indiquée sur l'étiquette s'il est manipulé correctement.

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.
- DAPI/DuraTect-Solution (MT7) ne doit pas être exposée à la lumière, en particulier à une lumière intense, pendant longtemps ; c'est-à-dire que chaque étape doit être effectuée, si possible, dans l'obscurité et/ou en utilisant des récipients opaques !

Étiquetage spécial de l'ES1 :

EUH208	Contient de la pepsine A. Peut provoquer une réaction allergique
EUH210	Fiche de données de sécurité disponible sur demande.

Mentions de danger et conseils de prudence pour PT1, WB1 et WB2 :

Le composant dangereux déterminant est un mélange de 5-chloro-2-méthyl-4-isothiazoline-3-one [EC n° 247-500-7] et 2-méthyl-2H-isothiazol-3-one [EC 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: Demander un avis médical/Consulter un médecin.
P362+P364	Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation.

Mentions de danger et conseils de prudence pour 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 auto fluorescence qui entrave la reconnaissance du signal.

Les fixateurs suivants sont incompatibles avec la FISH :

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

9. Préparation des échantillons

Recommandations:

- Fixation in 10% neutrally buffered formalin for 24 h at room temperature (18°C-25°C).
- Sample size $\leq 0.5 \text{ cm}^3$.
- Use premium quality paraffin.
- Embedding should be carried out at temperatures lower than 65°C.
- Prepare 2-4 μm microtome sections.
- Use positively charged microscope slides.
- Fix for 2-16 h at 50-60°C.

10. Traitement préparatoire du produit

5x FlexISH Wash Buffer (WB10) doivent être prétraités conformément aux instructions indiquées au point 11, « Protocole ». Tous les autres réactifs du kit sont prêts à l'emploi. Il n'est pas nécessaire de le reconstituer, le mélanger ou le diluer.

11. Protocole

11.1 1^{er} jour

Étapes préparatoires

- (1) Préparation d'une série d'éthanol (solutions d'éthanol à 70 %, 90 % et 100 %) : Diluer de l'éthanol à 100 % avec de l'eau distillée ou désionisée. Ces solutions peuvent être stockées dans des récipients adaptés et peuvent être réutilisées jusqu'à 160 fois.
- (2) Heat Pretreatment Solution Citric (PT1) : Remplir une cuve à coloration et chauffer à 98 °C.
- (3) FlexISH Probe : Amener à température ambiante avant utilisation, à l'abri de la lumière. Avant d'ouvrir le tube, mélanger à l'aide d'un vortexeur et centrifuger brièvement.

Prétraitement (déparaffinage/protéolyse)

- (1) Effectuer l'incubation des lames pendant 2 x 5 min dans du xylène.
- (2) Effectuer l'incubation dans de l'éthanol à 100 %, 100 %, 90 %, et 70 %, pendant 2 min à chaque fois.
- (3) Laver 2 x 2 min dans de l'eau distillée ou désionisée.
- (4) Effectuer l'incubation pendant 20 min dans la Heat Pretreatment Solution Citric (PT1) préchauffée à 98 °C.

Il n'est pas recommandé d'utiliser plus de huit lames par cuve à coloration. Après avoir immergé les lames, vérifier la température de la Heat Pretreatment Solution Citric dans la cuve et démarrer le minuteur dès que la solution a atteint une température d'au moins 95 °C.

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

ES1 peut former des précipités qui n'affectent pas la qualité.

En fonction de plusieurs facteurs, tels que la nature et la durée de fixation, l'épaisseur des coupes, et la nature des échantillons, différents temps d'incubation peuvent être nécessaires. Concernant l'incubation, nous recommandons d'appliquer un temps d'incubation de 2 à 30 minutes. En règle générale, nous recommandons de déterminer le moment optimal pour la protéolyse dans des tests préliminaires.

- (7) Laver 2 x 2 min dans de l'eau distillée ou désionisée.
- (8) Déshydratation : dans l'éthanol à 70 %, 90 % et 100 % pendant 1 min.
- (9) Sécher à l'air les coupes.

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

Dénaturation et hybridation

- (1) Mettre 10 µl de FlexISH Probe sur chaque échantillon prétraité.

Éviter une longue exposition de la sonde à la lumière.

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

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

- (3) Placer les lames sur une plaque chauffante ou dans un système d'hybridation pour dénaturer les échantillons pendant 10 min à 75 °C.
- (4) Procéder à l'hybridation pendant 2 à 16 heures (toute la nuit) à 37 °C, en transférant les lames soit dans un système d'hybridation soit dans une chambre humide et dans un four à hybridation.

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

11.2 1^{er} jour ou 2^e jour

Étapes préparatoires

- (1) Préparation de 1 x tampon de lavage FlexISH : Diluer 1 volume de 5x FlexISH Wash Buffer (WB10) avec 4 volumes d'eau distillée ou désionisée. Remplir trois cuves à coloration avec le tampon de lavage FlexISH. Préchauffer une des cuves à 72 °C et conserver les deux autres à température ambiante.
- (2) DAPI/DuraTect-Solution (MT7) : Amener à température ambiante avant utilisation, à l'abri de la lumière.

Post-hybridation et détection

- (1) Retirer délicatement la colle caoutchouc ou la colle.
- (2) Retirer les lamelles en les plongeant dans 1 x FlexISH Wash Buffer à température ambiante pendant 1 à 2 min.

Pour faciliter le retrait de la lamelle, cette étape peut également être effectuée pendant 2 minutes à 37 °C.

- (3) Laver à l'aide de 1 x FlexISH Wash Buffer pendant 10 minutes à 72 °C.

Le 1 x FlexISH Wash Buffer doit être préchauffé. Vérifier avec un thermomètre si nécessaire. Il n'est pas recommandé d'utiliser plus de huit lames par cuve à coloration.

- (4) Laver à l'aide de 1 x FlexISH Wash Buffer pendant 3 minutes à température ambiante.
- (5) Effectuer l'incubation des lames dans de l'éthanol à 70 %, 90 % et 100 %, pendant 1 min à chaque fois.
- (6) Sécher à l'air les échantillons à l'abri de la lumière.
- (7) 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.

- (8) Stocker la lame dans l'obscurité. Pendant des périodes de stockage plus longues, le stockage doit se faire entre 2 et 8 °C.
- (9) 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

En utilisant des 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 détails 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 spécimen n'a pas été correctement fixé	Optimiser le temps de fixation et le fixateur
Le prétraitement protéolytique n'est pas effectué correctement	Optimiser le temps d'incubation de la pepsine, l'augmenter ou le diminuer si nécessaire
Évaporation 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 <u>Fixogum</u> , afin d'empêcher le séchage de l'échantillon lors de l'hybridation.
Inappropriate filter sets used	Use filter sets appropriate for the fluorochromes of the probe. <i>Triple-bandpass filter sets provide less light compared to single or dual-bandpass filter sets. Consequently, the signals may appear fainter using these triple-bandpass filter sets.</i>

Signaux d'hybridation croisée ; bruit de fond

Cause possible	Action
Déparaffinage incomplet	Utiliser de nouvelles solutions ; vérifier le temps de déparaffinage
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 dégradée

Cause possible	Action
Le spécimen n'a pas été correctement fixé	Modifier le temps de fixation et le fixateur
Le prétraitement protéolytique n'est pas effectué correctement	Modifier le temps d'incubation de la pepsine
Séchage insuffisant avant l'application de la sonde	Prolonger le séchage à l'air

Signaux se chevauchant

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

Echantillon glissant sur la lame

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

Contre coloration faible

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

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

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



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 F/lexSH® sont des marques déposées de ZytoVision GmbH.