ZYTOVISION

*Zyto*Dot 2C
SPEC ERBB2/CEN 17 Probe Kit

REF C-3022-10 Σ 10

REF C-3022-40 Σ 40

Per il rilevamento qualitativo delle amplificazioni del gene ERBB2 umano e dei satelliti alfa del cromosoma 17 mediante ibridazione *in situ* cromogenica (CISH)

4250380N467W

CE 0483

IVD

Dispositivo medico – diagnostico in vitro

in conformità al Regolamento IVDR (EU) 2017/746

1. Scopo previsto

Il ZytoDot 2C SPEC ERBB2/CEN 17 Probe Kit è destinata all'individuazione qualitativa di amplificazioni che coinvolgono il gene ERBB2 umano e all'individuazione di satelliti alfa del cromosoma 17 in campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina, come il cancro al seno, mediante ibridazione *in situ* cromogenica (CISH).

Il prodotto è destinato esclusivamente ad uso professionale. Tutti i test che utilizzano il prodotto devono essere eseguiti da personale qualificato in un laboratorio di anatomia patologica certificato e autorizzato, sotto la supervisione di un patologo/genetista umano.

La sonda deve essere utilizzata come ausilio per la diagnosi differenziale del tumore al seno e non devono essere avviate misure terapeutiche basate esclusivamente sul risultato del test.

2. Principio del metodo

La tecnica di ibridazione *in situ* cromogenica (CISH) consente la rivelazione e la visualizzazione di sequenze specifiche di acidi nucleici in preparazioni cellulari. I frammenti nucleotidici marcati con apteni, chiamati anche sonde CISH, e le loro sequenze target complementari nelle preparazioni vengono co-denaturati per consentire il successivo annealing durante l'ibridazione. Successivamente, frammenti di sonde aspecifici e non legati vengono rimossi mediante lavaggi stringenti. L'accoppiamento con la sonda marcata può essere visualizzato utilizzando anticorpi primari (non marcati) che sono rivelati mediante anticorpi secondari coniugati con enzimi polimerizzati. La reazione enzimatica con substrati cromogenici porta alla formazione di precipitati colorati. Dopo la controcolorazione dei nuclei con un colorante nucleare, i frammenti di sonda ibridata sono visibili al microscopio ottico.

3. Reagenti forniti

Il ZytoDot 2C SPEC ERBB2/CEN 17 Probe Kit è disponibile in due formati ed è composto da:

Codice	Componenti	Importo Σ 40	Importo Σ 10	Contenitore
PT2	Heat Pretreatment Solution EDTA	500 ml	150 ml	Flacone con tappo a vite (grande)
ES1	Pepsin Solution	4 ml	1 ml	Flacone contagocce, tappo bianco
PD12	ZytoDot 2C SPEC ERBB2/CEN 17 Probe	0.4 ml	0.1 ml	Recipiente di reazione, coperchio marrone
WB1	Wash Buffer SSC	560 ml	210 ml	Flacone con tappo a vite (grande)
WB5	20x Wash Buffer TBS	2x 50 ml	50 ml	Flacone con tappo a vite
AB14	Anti-DIG/DNP-Mix	4 ml	1 ml	Flacone contagocce, tappo giallo
AB13	HRP/AP-Polymer-Mix	4 ml	1 ml	Flacone contagocce, tappo blu
SB6a	AP-Red Solution A	0.4 ml	0.1 ml	Flacone contagocce, tappo rosso (piccolo)
SB6b	AP-Red Solution B	15 ml	4 ml	Flacone contagocce, tappo rosso
SB7a	HRP-Green Solution A	0.8 ml	0.2 ml	Flacone contagocce, tappo verde (piccolo)
SB7b	HRP-Green Solution B	15 ml	4 ml	Flacone contagocce, tappo verde
CS2	Nuclear Blue Solution	20 ml	4 ml	Flacone con tappo a vite, nero
MT4	Mounting Solution (alcoholic)	4 ml	1 ml	Bottiglia di vetro, marrone
	Recipiente di reazione AP-Red	2	1	Tazza graduata, coperchio rosso
	Recipiente di reazione HRP-Green	2	1	Tazza graduata, coperchio verde
	Istruzioni per l'uso	1	1	

C-3022-10 (10 tests): I componenti **PD12, ES1**, **AB14**, **AB13**, **SB6a-b**, **SB7a-b**, **CS2** e **MT4** sono sufficienti per 10 reazioni. Il componente **PT2** è sufficiente per 2 vasi di colorazione da 70 ml ciascuno. Il componente **WB1** è sufficiente per 3 vasi di colorazione da 70 ml ciascuno. Il componente **WB5** è sufficiente per 14 vasi di colorazione da 70 ml ciascuno.

C-3022-40 (40 tests): I componenti **PD12,ES1**, **AB14**, **AB13**, **SB6a-b**, **SB7a-b**, **CS2** e **MT4** sono sufficienti per 40 reazioni. Il componente **PT2** è sufficiente per 7 vasi di colorazione da 70 ml ciascuno. Il componente **WB1** è sufficiente per 8 vasi di colorazione da 70 ml ciascuno. Il componente **WB5** è sufficiente per 28 vasi di colorazione da 70 ml ciascuno.

La ZytoDot 2C SPEC ERBB2/CEN 17 Probe (**PD12**) è composta da:

- Polinucleotidi marcati con digossigenina (~1,1 ng/µl), le cui sequenze target mappano in 17q12* (chr17:37,725,661-37,973,541) che ospitano la regione del gene ERBB2 (vedere Fig. 1).
- Polinucleotidi marcati con dinitrofenil (~1,1 ng/µl) che mirano a sequenze mappate in 17p11.1-q11.1 specifiche per la regione centromerica del satellite alfa D17Z1 del cromosoma 17.
- Tampone di ibridazione a base di formammide

*conformemente all'Human Genome Assembly GRCh37/hg19

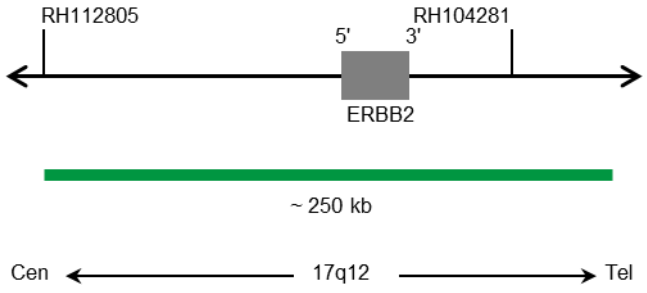

Fig. 1: SPEC ERBB2 Mappa della sonda (non in scala)

4. Materiali richiesti ma non forniti

- Campioni di controlli positivi e negativi
- Vetrini per microscopia a carica positiva
- Bagno termostatato (80 °C, 98 °C)
- Ibridizzatore o piastre calda
- Ibridizzatore o camera umida in stufa da ibridazione
- Pipette a volume variabile (10 µl, 1000 µl)
- Vaschette o bagni di colorazione
- Timer
- Termometro calibrato
- Etanolo o reagente alcolico
- Xilene
- Metanolo 100%
- Perossido d'idrogeno (H_2O_2) 30%
- Acqua distillate o deionizzata
- Vetrini coprioggetto (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Colla, ad esempio Fixogum Rubber Cement (Codice n° E-4005-50/-125) o simili
- Microscopio ottico adeguatamente manutenuto (400-630x)

5. Conservazione e stoccaggio

Conservare a 2-8°C in posizione verticale. Riportare alle condizioni di stoccaggio indicate subito dopo l'utilizzo. Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza indicata in etichetta. Il prodotto è stabile fino alla data di scadenza indicata in etichetta, se correttamente conservato.

6. Avvertenze e precauzioni

- Leggere le istruzioni prima dell'utilizzo!
- Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza!
- Questo prodotto contiene sostanze (in bassa concentrazione e volume) che sono nocive per la salute e potenzialmente infette. Evitare qualsiasi contatto diretto con i reagenti. Prendere le adeguate misure di precauzione (utilizzare I guanti, gli occhiali di protezione e il camice da laboratorio)!
- Segnalare qualsiasi incidente grave relativo al prodotto al produttore e all'autorità competente in conformità alle normative locali.
- Se il reagente dovesse entrare in contatto con la pelle, risciacquare subito abbondantemente!
- La scheda di sicurezza è disponibile su richiesta per usi professionali.
- Non riutilizzare i reagenti, a meno che il riutilizzo sia esplicitamente consentito.
- Evitare la cross-contaminazione dei campioni, in quanto questo potrebbe portare a risultati sbagliati
- Non lasciare che il campione asciughi durante I passaggi di ibridazione e lavaggio.

Etichettatura speciale di ES1:

EUH208	Contiene pepsina A. Può provocare una reazione allergica.
EUH210	Scheda dati di sicurezza disponibile su richiesta.

Frasi di pericolo e prudenza per AB13, AB14, PT2, SB7b, WB1, e WB5:

Il componente pericoloso è una miscela di: 5-cloro-2-metil-2H-isotiazol-3-one [EC no. 247-500-7]; 2-metil-2H-isotiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1).

Attenzione

H317	Può provocare una reazione allergica cutanea.
P261	Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol.
P272	Gli indumenti da lavoro contaminati non devono essere portati fuori dal luogo di lavoro.
P280	Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.
P302+P352	IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua.
P333+P313	In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.
P362+P364	Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

Frasi di pericolo e prudenza per SB7a:

I componenti che determinano il pericolo sono metanolo e soluzione di perossido di idrogeno al 30%.

Pericolo

H225	Liquido e vapori facilmente infiammabili.
H301+H311 +H331	Tossico se ingerito, a contatto con la pelle o se inalato.
H370	Provoca danni agli organi.
P210	Tenere lontano da fonti di calore, superfici calde, scintille, fiamme libere o altre fonti di accensione. Non fumare.
P233	Tenere il recipiente ben chiuso.
P260	Non respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol.
P280	Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.
P308+P311	IN CASO di esposizione o di possibile esposizione: contattare un CENTRO ANTIVELENI/un medico.
P403+P235	Conservare in luogo fresco e ben ventilato.

Frasi di pericolo e prudenza di PD12:

Il componente pericoloso è la formammide.

Pericolo

H351	Sospettato di provocare il cancro.
H360FD	Può nuocere alla fertilità. Può nuocere al feto.
H373	Può provocare danni agli organi in caso di esposizione prolungata o ripetuta.
P201	Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso.
P202	Non manipolare prima di avere letto e compreso tutte le avvertenze.
P260	Non respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol.
P280	Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.
P308+P313	IN CASO di esposizione o di possibile esposizione, consultare un medico.
P405	Conservare sotto chiave.

Frasi di pericolo e prudenza per CS2:

Il componente pericoloso è etilen glicol, glicol etilenico.

Attenzione

H373	In caso di esposizione prolungata o ripetuta tramite ingestione può danneggiare i reni.
P260	Non respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol.
P314	In caso di malessere, consultare un medico.

Frasi di pericolo e prudenza per MT4:
Il componente che determina il pericolo è lo xilene.

Attenzione

H226	Liquido e vapori infiammabili.
H312+H332	Nocivo a contatto con la pelle o se inalato.
H315	Provoca irritazione cutanea.
H319	Provoca grave irritazione oculare.
H335	Può irritare le vie respiratorie.
H373	Può provocare danni agli organi in caso di esposizione prolungata o ripetuta.
P210	Tenere lontano da fonti di calore, superfici calde, scintille, fiamme libere o altre fonti di accensione. Non fumare.
P260	Non respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol.
P280	Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.
P305+P351+P338	IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo . Continuare a sciacquare.
P337+P313	Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico.
P403+P235	Conservare in luogo fresco e ben ventilato.
EUH208	Contiene metacrilato di metile; metil 2-metilprop-2-enoato; metil-metacrilato, n-butilmetacrilato. Può provocare una reazione allergica.

Frasi di pericolo e prudenza per SB6a:

H412	Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.
P273	Non disperdere nell'ambiente.

7. Limitazioni

- Per uso diagnostico *in vitro*.
- Solo per usi professionali.
- Solo per utilizzo non automatico.
- L'interpretazione clinica di qualsiasi colorazione positiva o meno deve essere condotta considerando il contesto della storia clinica, della morfologia, di altri criteri istopatologici e di altri test diagnostici. È responsabilità di un patologo/genetista umano qualificato avere familiarità con le sonde ISH, i reagenti, i pannelli diagnostici e i metodi utilizzati per la colorazione del preparato. La colorazione deve essere eseguita in un laboratorio certificato e autorizzato sotto la supervisione di un patologo/genetista umano che è responsabile della revisione dei vetrini colorati e della garanzia dell'adeguatezza dei controlli positivi e negativi.
- La colorazione, in particolar modo l'intensità del segnale e il rumore di fondo, dipende da come il campione è stato gestito e processato prima della colorazione stessa. Una fissazione impropria, il congelamento, lo scongelamento, il lavaggio, l'asciugatura, il riscaldamento, il sezionamento o la contaminazione con un altro campione o fluido può produrre artefatti o falsi risultati. Risultati incoerenti possono derivare da variazioni nei metodi di fissazione e inclusione.
- La sonda dovrebbe essere usata solo per identificare I loci descritti nella sezione 3 "Reagenti forniti".
- Le prestazioni sono state convalidate utilizzando le procedure descritte in queste istruzioni per l'uso. Le modifiche a queste procedure potrebbero alterare le prestazioni e devono essere convalidate dall'utente. Questo prodotto IVD è certificato come CE solo se utilizzato come descritto in queste istruzioni nell'ambito dell'uso previsto.

8. Sostanze interferenti

I seguenti fissativi non sono compatibili con la ISH:

- Fissativo di Bouin
- Fissativo B5
- Fissativi acidi (per esempio, acido picrico)
- Fissativo di Zenker
- Alcoli (quando utilizzati da soli)
- Mercurio cloruro
- Formaldeide zincata
- Fissativo di Hollande
- Formalina non tamponata

9. Preparazione dei campioni

Raccomandazioni:

- Evitare la contaminazione incrociata dei campioni per evitare risultati errati.
- Fissazione in formalina tamponata neutra al 10% per 24 ore a temperatura ambiente (18°C-25°C).
- Dimensione del campione ≤ 0,5 cm^3 .
- Utilizzare paraffina di qualità superiore.
- L'inclusione deve essere effettuata a temperature inferiori a 65°C.
- Preparare sezioni al microtomo da 3-5 μm.
- Utilizzare vetrini da microscopio con carica positiva.
- Fissare le sezioni di tessuto per 2-16 ore a 50-60°C.

10. Trattamento preparatorio del prodotto

20x Wash Buffer TBS (**WB5**) deve essere preparato secondo le istruzioni riportate al punto 11. "Procedura di lavoro". Tutti gli altri reagenti del kit sono pronti all'uso. Non è richiesta alcuna ricostituzione, miscelazione o diluizione. Portare la sonda a temperatura ambiente (RT) e mescolare brevemente prima dell'uso.

11. Procedura di lavoro

11.1 Giorno 1

Fasi preparatorie

(1) *Preparare una serie di soluzioni di etanolo (70%, 90% e 100%):* Diluire l'etanolo al 100% con acqua deionizzata o distillata. Queste soluzioni possono essere conservate in contenitori adeguati e possono essere riutilizzate.

(2) *Heat Pretreatment Solution EDTA* (**PT2**): Riscaldare a 98°C in un barattolo di colorazione coperto.
(3) *Preparazione di H_2O_2 al 3%:* Diluire 1 parte di H_2O_2 al 30% in 9 parti di metanolo al 100%.
(4) Zyto*Dot 2C CISH Probe*: Portare a temperatura ambiente (RT) prima dell'uso.

Pretrattamento (decerazione/proteolisi)
(1) Incubare i vetrini per 10 minuti a 70°C (ad esempio, su una piastra).
(2) Incubare i vetrini per 2x 5 min in xilene.
(3) Incubare i vetrini per 3x 3 min in etanolo al 100%.
(4) Incubare i vetrini per 5 min in H_2O_2 al 3%.
(5) Lavare i vetrini 2x 1 min in acqua deionizzata o distillata a temperatura ambiente.
(6) Incubare per 15 min in Heat Pretreatment Solution EDTA (**PT2**) preriscaldata a 98°C.

Utilizzare otto vetrini per ogni barattolo di colorazione (aggiungere vetrini finti se necessario).

(7) Trasferire immediatamente i vetrini in acqua deionizzata o distillata e lavare per 2x 2 min.
(8) Applicare (a gocce) la Pepsin Solution (**ES1**) sul campione e incubare per 5-15 min a 37°C in una camera umida.

***ES1** può formare precipitati, che non influiscono sulla qualità.*
Come regola generale, si consiglia di accertare il tempo ottimale per la proteolisi nei test preliminari.

(9) Immergere i vetrini in acqua deionizzata o distillata a temperatura ambiente.
(10) Disidratazione in: 70%, 90% e 100% etanolo, ciascuno per 1 min.
(11) Asciugare all'aria le sezioni.

Nota: assicurarsi che le sezioni siano completamente asciutte prima dell'applicazione della sonda.

Denaturazione e ibridazione
(1) Pipettare 10 µl di sonda su ciascun campione pretrattato.
(2) Coprire i campioni con un vetrino coprioggetto di 22 mm x 22 mm (per evitare la formazione di bolle) e sigillare il vetrino.

Per la sigillatura si consiglia di utilizzare del cemento per gomma (ad es. Fixogum).

(3) Posizionare i vetrini su una piastra calda o su un ibridatore e denaturare i campioni per 5 min a 79°C.
(4) Trasferire i vetrini in una camera di umidità e ibridare per una notte a 37°C (ad esempio, in un forno di ibridazione).

È essenziale che i campioni non si secchino durante la fase di ibridazione.

11.2 Giorno 2

Fasi preparatorie
(1) *Wash Buffer SSC* (**WB1**): Per il lavaggio di rigore, riscaldare a 80°C in un barattolo di colorazione coperto. **WB1** può formare precipitati a 2-8°C, che non influiscono sulla qualità e si dissolvono quando vengono riscaldati.
(2) *Preparazione di 1x Wash Buffer TBS:* Diluire 1 parte 20x Wash Buffer TBS (**WB5**) in 19 parti di acqua deionizzata o distillata.

Il diluito 1x Wash Buffer TBS è stabile per una settimana se conservato a 2-8°C.

(3) Blocking Solution (**BS1**), Mouse-Anti-DIG (**AB1**), Anti-Mouse-HRP-Anti-DIG/DNP-Mix (**AB14**), HRP/AP-Polymer-Mix (**AB13**), AP-Red Solution A (**SB6a**), AP-Red Solution B (**SB6b**), HRP-Green Solution A (**SB7a**), HRP-Green Solution B (**SB7b**) Nuclear Blue Solution (**CS2**), Mounting Solution (alcoholic) (**MT4**): Portare a temperatura ambiente prima dell'uso.

*I componenti **SB7a** e **SB7b** possono formare precipitati, che non influiscono sulla qualità della colorazione.*

Post-ibridazione e rilevamento
(1) Rimuovere con cautela il cemento o la colla di gomma.
(2) Rimuovere il coprioggetto immergendolo in Wash Buffer SSC (**WB1**) a temperatura ambiente per 5 min.

WB1 può essere riutilizzato una volta. Conservare a 2-8°C per un massimo di una settimana.

(3) Lavare i vetrini per 5 min in Wash Buffer SSC (**WB1**) a 80°C.

Utilizzare otto vetrini per ogni barattolo di colorazione (aggiungere vetrini finti se necessario).

(4) Lavare i vetrini 2x 1 min in acqua deionizzata o distillata.
(5) Immergere i vetrini in 1x Wash Buffer TBS.
(6) Applicare Anti-DIG/DNP-Mix (**AB14**) (1-2 gocce per vetrino) sui vetrini e incubare per 15 minuti a 37°C in una camera umida.
(7) Lavare i vetrini 3x 1 min in 1x Wash Buffer TBS.
(8) Applicare HRP/AP-Polymer-Mix (**AB13**) (1-2 gocce per vetrino) sui vetrini e incubare per 30 min a RT.
(9) Lavare i vetrini 3x 1 min in 1x Wash Buffer TBS.
(10) Preparare la soluzione AP-Red (soluzione di lavoro): riempire 1 ml di AP-Red Solution B (**SB6b**) i in un bicchiere graduato e aggiungere una goccia (30 µl) di AP-Red Solution A (**SB6a**). Mescolare bene.
(11) Applicare AP-Red Solution (1-2 gocce per vetrino) sui vetrini e incubare al buio per 10 minuti a RT.
(12) Durante l'incubazione, preparare la soluzione HRP-verde (soluzione di lavoro): riempire 1 ml di HRP-Green Solution B (**SB7b**) i in un bicchiere graduato e aggiungere due gocce (2x20 µl) di HRP-Green Solution A (**SB7a**). Mescolare bene.
(13) Lavare i vetrini 2x 1 min in acqua deionizzata o distillata.
(14) Applicare HRP-Green Solution (1-2 gocce per vetrino) sui vetrini e incubare al buio per 10 minuti a RT.
(15) Lavare i vetrini 2x 1 min in acqua deionizzata o distillata.
(16) Controcolorare i campioni per 2 minuti con la Nuclear Blue Solution (**CS2**).
(17) Trasferire i vetrini in un barattolo di colorazione e lavare per 2 minuti con acqua corrente fredda.
(18) Disidratare 3x 30 s in etanolo al 100% (usare etanolo molto puro).
(19) Incubare i vetrini per 2 x30 s in xilene (utilizzare xilene molto puro).

Non prolungare o accorciare il tempo di incubazione per evitare la perdita dei segnali!

(20) Per evitare la formazione di bolle, coprire i campioni con un coprioggetto (22 mm x 22 mm; 24 mm x 32 mm) utilizzando la Mounting Solution (alcoholic) (**MT4**). Lasciare 20-30 min per immobilizzare il coprioggetto.

L'uso di un puntale tagliato per aumentare le dimensioni dell'apertura può facilitare il processo di pipettaggio.

(21) Valutare i campioni colorati utilizzando la microscopia ottica.

12. Interpretazione dei risultati

I segnali di ibridazione dei polinucleotidi marcati con digossigenina appaiono come punti distinti di colore verde scuro (regione del gene ERBB2) e i polinucleotidi marcati con dinitrofenile appaiono come punti distinti di colore rosso vivo (CEN 17).

Situazione normale: Nelle interfasi di cellule normali o di cellule senza amplificazione che coinvolgono la regione del gene ERBB2, compaiono due segnali distinti a forma di punto verde e due distinti a forma di punto rosso (vedere Fig. 2).

Situazione aberrante: Nelle cellule con un'amplificazione della regione del gene ERBB2, si osserva un numero maggiore di segnali verdi o di gruppi di segnali verdi (vedere Fig. 2).

I segnali che si sovrappongono possono apparire come segnali marroni.

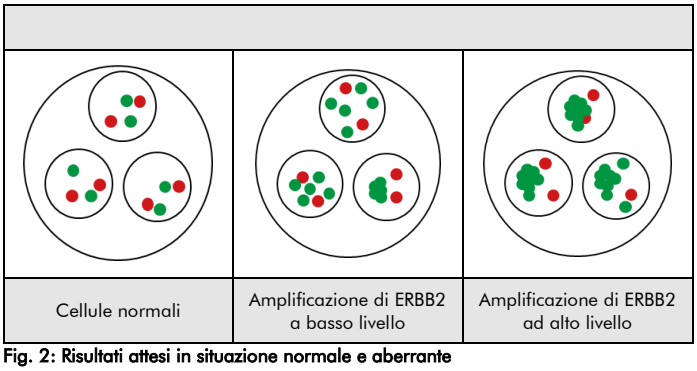

Fig. 2: Risultati attesi in situazione normale e aberrante

Altri pattern di segnali oltre a quelli descritti sopra si potrebbero osservare in alcuni campioni anormali. Questi pattern di segnali inconsueti dovrebbero essere ulteriormente indagati.

Note:
- A causa della cromatina decondensata, i singoli segnali CISH possono apparire come piccoli cluster singoli. Inoltre, due o tre segnali della stessa dimensione, separate da una distanza inferiore o uguale a un singolo diametro, dovrebbero essere considerati come singolo segnale.

- Prima della conta dei segnali, il campione dovrebbe essere scansito a ingrandimenti 100x o 200x per valutare eventuale eterogeneità intratumorale.
- La visualizzazione dei segnali dovrebbe essere condotta almeno a un ingrandimento 400x perché i segnali siano facilmente visibili. Un ingrandimento 630x è raccomandato per sonde che rivelano rotture cromosomali. Non utilizzare lenti con filtro per migliorare il contrasto in quanto ciò potrebbe distorcere il colore del segnale per ottenere segnali luminosi, aprire il diaframma. Assicurarsi una corretta messa a fuoco durante la valutazione di un nucleo, poiché i segnali rosso e verde potrebbero essere sovrapposti.
- Non valutare le aree di necrosi, i nuclei sovrapposti, i nuclei over-digeriti e i nuclei con intensità di segnale scarsa.
- Per via della mitosi, ulteriori segnali aggiuntivi potrebbero essere visibili anche in una piccola percentuale di cellule non neoplastiche. Saltuariamente inoltre, in campioni inclusi in paraffina, si potrebbero vedere nuclei con segnali assenti a causa di artefatti del taglio.
- Un risultato negativo o non specifico potrebbe essere causato da multipli fattori (vedere capitolo 16 "Risoluzione dei problemi").
- Al fine di una corretta interpretazione dei risultati, l'utilizzatore deve validare questo prodotto prima del suo utilizzo in procedure diagnostiche secondo le linee guida nazionali e internazionali.

13. Procedure di Controllo qualità raccomandate

Al fine di monitorare la corretta performance del campione processato e testare i reagenti, ogni test dovrebbe essere associato a controlli interni e esterni. Se i controlli interni e/o esterni non forniscono colorazioni appropriate, i risultati con i campioni dei pazienti devono essere considerati non validi.

Controllo interno: Cellule non neoplastiche all'interno di un campione che mostra un pattern normale di segnali, ad esempio, i fibroblasti.

Controllo esterno: Campioni di controlli positivi e negativi validati.

14. Caratteristiche di performance

14.1 Prestazioni analitiche

Le prestazioni della sonda sono state determinate mediante confronto con la corrispondente sonda FISH approvata da IVD.

Sensibilità analitica:	100% (95% CI 98.5 – 100.0)
Specificità analitica:	100% (95% CI 97.0 – 100.0)

La riproducibilità da giorno a giorno è stata testata confrontando i risultati ottenuti da un esaminatore in 10 giorni diversi e valutando l'accordo.

	Percentuale di accordo
campione negativo	100%
campione positivo	100%

La ripetibilità è stata testata confrontando i risultati replicati ottenuti da un esaminatore in 10 giorni diversi e valutando l'accordo.

	Percentuale di accordo
campione negativo	100%
campione positivo	100%

14.2 Prestazioni cliniche

Sensibilità diagnostica:	91% (95% CI 86.0 – 95.0) basato su un modello bivariato
Specificità diagnostica:	97% (95% CI 93.0 – 99.0) basato su un modello bivariato

15. Smaltimento

Lo smaltimento dei reagenti deve avvenire in accordo alle regolamentazioni locali.

16. Risoluzione dei problemi

Qualsiasi modifica dalle istruzioni operative può comportare risultati di colorazione inferiori o a nessuna colorazione. Fare riferimento a www.zytovision.com per altre informazioni.

Segnali deboli o mancanti

Possibile causa	Azione
Trattamento proteolitico non condotto in modo adeguato	Ottimizzare il tempo di incubazione in pepsina, aumentandolo o diminuendolo, se necessario
Evaporazione della sonda	Se si utilizza l'ibridatore, è obbligatorio l'utilizzo di strisce umide o di taniche preriempite d'acqua. Se si utilizza una stufa d'ibridazione, usare una camera umida. Inoltre il coprioggetto deve essere completamente sigillato, per esempio con Fixogum, per prevenire che il campione si asciughi durante l'ibridazione
Il tempo di controcolorazione è troppo lungo	Evitare una controcolorazione scura perché potrebbe oscurare segnali positivi della colorazione
Il lavaggio della controcolorazione non avviene correttamente	Utilizzare acqua di fonte fredda per lavare: non utilizzare acqua tiepida o calda o reagenti di lavaggio.

Segnali troppo forti

Possibile causa	Azione
Trattamento proteolitico non condotto in modo adeguato	Ottimizzare il tempo di incubazione in pepsina, aumentandolo o diminuendolo, se necessario
Il tempo di incubazione in AP-Red Solution non è corretto	Se necessario, il tempo di incubazione può essere accorciato di 5 minuti. Non riscaldare la soluzione substrato oltre i 25 °C; incubare solo a temperatura ambiente
Il tempo di incubazione in HRP-Green solution non è corretto	Se necessario, il tempo di incubazione può essere accorciato di 7 minuti. Non riscaldare la soluzione substrato oltre i 25 °C; incubare solo a temperatura ambiente

Segnali rossi troppo deboli

Possibile causa	Azione
La AP-Red Solution è stata esposta a una forte luce diretta	Preparare e utilizzare la AP-Red Solution proteggendola da forti luci dirette
La AP-Red Solution è stata preparata troppo presto	Preparare immediatamente prima dell'utilizzo
Il tempo di incubazione in AP-Red Solution non è corretto	Se necessario, il tempo di incubazione può essere esteso di 15 minuti
Preparazione insufficiente del substrato cromogenico	Non aumentare il volume della Soluzione A

Segnali verdi troppo deboli

Possibile causa	Azione
Il tempo di incubazione in uno dei passaggi di lavaggio dopo la colorazione con HRP-Green è troppo lungo	Non superare i tempi di incubazione indicati
Il tempo di incubazione in HRP-Green solution non è corretto	Se necessario, il tempo di incubazione può essere esteso di 15 minuti
Preparazione insufficiente del substrato cromogenico	Non aumentare il volume della Soluzione A

Segnali sbiaditi o fusi

Possibile causa	Azione
È stato utilizzato un mezzo di montaggio non idoneo	Utilizzare solo mezzi di montaggio forniti con il kit o mezzi di montaggio a base di xilene privi di impurezze. Non utilizzare il nastro coprioggetto.
Le sezioni non sono state disidratate correttamente	Utilizzare etanolo e xilene nuovi; utilizzare solo xilene di qualità "puro"

Colorazione debole non uniforme o solo in alcune porzioni

Possibile causa	Azione
Sparaffinatura incompleta	Utilizzare soluzioni fresche; controllare la durata della sparaffinatura
Il volume del reagente è troppo piccolo	Assicurarsi che il volume del reagente sia sufficiente a ricoprire l'area del tessuto

Risultati inconsistenti

Possibile causa	Azione
Asciugatura insufficiente prima dell'applicazione della sonda	Aumentare i tempi di asciugatura
Troppa acqua / tampone di lavaggio sul tessuto prima dell'applicazione della pepsina, degli anticorpi o dei substrati	Assicurarsi che l'eccesso di liquido sia rimosso dalla sezione di tessuto tamponando o sgocciolando il vetrino. Piccoli quantitative di acqua residua o di tampone di lavaggio non interferiscono con il test
Variazioni nella fissazione del tessuto o nel metodo di inclusione	Ottimizzare i metodi di fissazione e inclusione
Variazione dello spessore delle sezioni tissutali	Ottimizzare il taglio

Morfologia degradata

Possibile causa	Azione
Il campione cellulare o tissutale non è stato fissato correttamente	Ottimizzare il tempo di fissazione e il fissativo
Pretrattamento proteolitico non condotto per un tempo adeguato	Diminuire il tempo di incubazione in pepsina

Segnali di cross ibridazione; rumori di fondo

Possibile causa	Azione
Sezioni asciutte durante o post ibridazione	Evitare che le sezioni si asciughino; utilizzare una camera umida e sigillare adeguatamente i vetrini
Tempo di incubazione del substrato prolungato	Diminuire il tempo di incubazione del substrato
Sparaffinatura incomplete	Utilizzare soluzioni fresche; controllare la durata della sparaffinatura
Pretrattamento proteolitico troppo forte	Ottimizzare il tempo di incubazione in pepsina
Vetrini raffreddati a temperature ambiente prima dell'ibridazione	Trasferire rapidamente i vetrini alla temperatura di ibridazione

Nuclei sovrapposti

Possibile causa	Azione
Inadeguato spessore della sezione di tessuto	Preparare sezioni al microto dello spessore di 3-5 μm

Campione galleggiante sul vetrino

Possibile causa	Azione
Pretrattamento proteolitico troppo forte	Ridurre il tempo di incubazione in pepsina

17. Letteratura

- Ali AHM, et al. (2019) *Open Access Maced J Med Sci 7*: 1917.
- Bhargava R, et al. (2005) *Am J Clin Pathol 123*: 237-43.
- Hwang CC, et al. (2011) *Histopathology 59*: 984-92.
- Kurihara N, et al. (2019) *J Clin Pathol 72*: 603-608.
- Mayr D, et al. (2009) *Histopathology 55*: 716-23.
- Miligy IM, et al. (2019) *Br J Cancer 120*: 1075-1082.
- Nie X, et al. (2013*) J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci 33*: 379-84.
- Pfarr N, et al. (2017) *Genes chromosomes cancer 56*: 255-264.
- Saito Y, et al. (2016) *Sci Rep 6*: 1-8.
- Schiavon BN, et al. (2012) *Am J Surg Pathol.*
- Tabarestani S, et al. (2015*) Asian Pac J Cancer Prev 16*: 7997-8002.
- Wilkinson DG: In Situ Hybridization, A Practical Approach, *Oxford University Press* (1992) ISBN 0 19 963327 4.
- Wolf FF, et al. (2015) *J Bras Patol Med Lab 51*: 407-414..

18. Revisione

Revisione	Descrizione della modifica
5.1.1	Modifica dell'organismo notificato 14. Caratteristiche di performance aggiungere precisione

www.zytovision.com

Fare riferimento al sito www.zytovision.com per le istruzioni d'uso più recenti e per le istruzioni d'uso nelle diverse lingue.

I nostri esperti sono disponibili per rispondere alle vostre domande.
Contattare per cortesia helptech@zytovision.com
Per il riassunto delle prestazioni e della sicurezza del prodotto, fare riferimento a www.zytovision.com.

ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/ Germania
Tel.: +49 471 4832-300
Fax: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
Email: info@zytovision.com

Marchi registrati:
ZytoVision® e Zyto*Dot*® sono marchi registrati da ZytoVision GmbH.