



## ZytoDot 2C CISH Implementation Kit

**REF** C-3044-10  $\Sigma$  10

**REF** C-3044-40  $\Sigma$  40

Per l'uso nelle procedure di ibridazione *in situ* cromogenica (CISH)

4250380N717V



Dispositivo medico – diagnostico in vitro  
in conformità al Regolamento IVDR (EU) 2017/746

### 1. Scopo previsto

Il ZytoDot 2C CISH Implementation Kit deve essere utilizzato in combinazione con le sonde ZytoDot 2C CISH marcate con digossigenina/dinitrofenile su campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina mediante ibridazione cromogenica *in situ* (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.

### 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 CISH Implementation Kit è disponibile in due formati ed è composto da:

Codice	Componenti	Importo		Contenitore
		40 $\Sigma$	10	
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
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-3044-10 (10 tests):** I componenti **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-3044-40 (40 tests):** I componenti **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.

### 4. Materiali richiesti ma non forniti

- ZytoDot 2C CISH Probe
- Campioni di controlli positivi e negativi
- Vetrini per microscopia a carica positiva
- Bagno termostato (80 °C, 98 °C)
- Ibridizzatore o piastre calda
- Ibridizzatore o camera umida in stufa da ibridazione
- Pipette a volume variabile (10  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l)
- Vaschette o bagni di colorazione
- Timer
- Termometro calibrato
- Etanolo o reagente alcolico
- Xilene
- Metanolo 100%
- Perossido d'idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 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 mantenuto (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.
- Evitare la cross-contaminazione dei campioni, in quanto questo potrebbe portare a risultati sbagliati.
- I campioni non devono essere lasciati asciugare durante le fasi di ibridazione e lavaggio.

### Frase 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.

### Frase 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.

### Frase 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.

### Frase 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-enato; metil-metacrilato, n-butilmetacrilato. Può provocare una reazione allergica.

### Frase di pericolo e prudenza per SB6a:

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

### Etichettatura speciale di ES1:

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

## 7. Limitazioni

- Per uso diagnostico *in vitro*.
- Solo per uso professionale.
- Solo per uso 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 particolare 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.
- Le prestazioni sono state convalidate utilizzando le procedure descritte nelle istruzioni per l'uso della rispettiva sonda o del kit di implementazione ZytoVision. 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 sono incompatibili con ISH:

- Fissativo di Bouin
- Fissativo B5
- Fissativi acidi (es. acido picrico)
- Fissativo di Zenker
- Alcoli (se usati da soli)
- Cloruro mercurico
- Fissativo a base di formaldeide e zinco
- Il 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  $\leq 0,5 \text{ cm}^3$ .
- Utilizzare paraffina di qualità superiore.
- L'inclusione deve essere effettuata a temperature inferiori a 65°C.
- Preparare sezioni al microtomo da 3-5  $\mu\text{m}$ .
- 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%: Diluire 1 parte di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% in 9 parti di metanolo al 100%.
- (4) ZytoDot 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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  $\mu\text{l}$  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 seccino 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**) in un bicchiere graduato e aggiungere una goccia (30  $\mu\text{l}$ ) 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) in un bicchiere graduato e aggiungere due gocce (2x20  $\mu\text{l}$ ) 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

Utilizzando il ZytoDot 2C CISH Implementation Kit, i segnali di ibridazione dei polinucleotidi marcati con digossigenina appaiono come punti distinti di colore verde scuro e i polinucleotidi marcati con dinitrofenile appaiono come punti distinti di colore rosso vivo. Nelle interfasi o metafasi di cellule normali o di cellule senza aberrazioni dei cromosomi esaminati, appariranno due segnali per sonda/etichetta di apotene, tranne che per le sonde che hanno come bersaglio i cromosomi X e/o Y, con il risultato di nessuno o due segnali per sonda/etichetta di apotene, a seconda del sesso. Nelle cellule con aberrazioni cromosomiche, nelle interfasi o nelle metafasi può essere visibile un diverso pattern di segnali. Per maggiori dettagli sull'interpretazione dei risultati, consultare le istruzioni per l'uso della rispettiva sonda ZytoDot 2C CISH.

## 13. Procedure di Controllo qualità raccomandate

Fare riferimento alle istruzioni per l'uso della rispettiva sonda ZytoVision.

## 14. Caratteristiche di performance

Fare riferimento alle istruzioni per l'uso della rispettiva sonda ZytoVision.

## 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](http://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 quantitativi 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 $\mu\text{m}$

**Campione galleggiante sul vetrino**

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

**17. Letteratura**

- Isola J, Tanner M (2004) *Methods Mol Med* 97: 133-44.
- Speel EJ, et al. (1994) *J Histochem Cytochem* 42: 1299-307.
- Tsukamoto T, et al. (1991) *Int J Dev Biol* 35: 25-32.
- Wilkinson DG: *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.

**18. Revisione**

[www.Zytovision.com](http://www.Zytovision.com)

Fare riferimento al sito [www.Zytovision.com](http://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](mailto:helptech@Zytovision.com)



ZytoVision GmbH  
Fischkai 1  
27572 Bremerhaven/ Germania  
Tel.: +49 471 4832-300  
Fax: +49 471 4832-509  
[www.Zytovision.com](http://www.Zytovision.com)  
Email: [info@Zytovision.com](mailto:info@Zytovision.com)

**Marchi registrati:**

ZytoVision® e ZytoDot® sono marchi registrati da ZytoVision GmbH.