ZytoDot 2C
Glioma 1p/19q Probe Set

REF	C-3076-10	Σ	10
REF	C-3076-40	Σ	40

Per l'individuazione qualitativa di delezioni che coinvolgono la regione cromosomica umana 1p36.31 e di delezioni che coinvolgono la regione cromosomica umana 19q13.32-q13.33 mediante ibridazione cromogenica *in situ* (CISH)

4250380N9183

CE
0483
IVD

Dispositivo medico – diagnostico in vitro

in conformità al Regolamento IVDR (EU) 2017/746

1. Scopo previsto

Il ZytoDot 2C Glioma 1p/19q Probe Set è destinato a essere utilizzato per la rilevazione qualitativa di delezioni che coinvolgono la regione cromosomica umana 1p36.31 e di delezioni che coinvolgono la regione cromosomica umana 19q13.32-q13.33 in campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina, come il glioma, mediante ibridazione cromogenica in situ (CISH). La sonda deve essere utilizzata in combinazione al kit ZytoDot 2C CISH Implementation Kit (codice n° C-3044-10/-40).

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 glioma e le misure terapeutiche non devono essere avviate sulla base del solo 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 Glioma 1p/19q Probe Set è un set che comprende due sonde separate:

- ZytoDot 2C SPEC 1p36/1q25 Probe (Codice n° C-3036-100/-400)
- ZytoDot 2C SPEC 19q13/19p13 Probe (Codice n° C-3037-100/-400)

La ZytoDot 2C SPEC 1p36/1q25 Probe (**PD21**) è composta da:

- Polinucleotidi marcati con digossigenina (~1,7 ng/µl), le cui sequenze target mappano in 1q25.3* (chr1:184,562,510-184,752,938) (vedere Fig. 1).
- Polinucleotidi marcati con dinitrofenil (~1,7 ng/µl), le cui sequenze target mappano in 1p36.31* (chr1:5,808,946-6,176,336) (vedere Fig. 1).
- Tampone di ibridazione a base di formammide

*conformemente all'Human Genome Assembly GRCh37/hg19

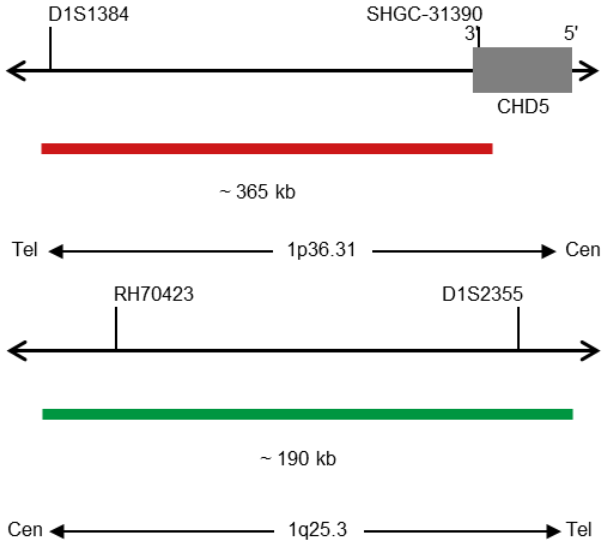

Fig. 1: In alto: SPEC 1p36 Mappa della sonda; in basso: SPEC 1q25 Mappa della sonda (non in scala)

La ZytoDot 2C SPEC 19q13/19p13 Probe (**PD22**) è composta da:

- Polinucleotidi marcati con digossigenina (~0,8 ng/µl), le cui sequenze target mappano in 19p13.3* (chr19:815,938-962,244) (vedere Fig. 2).
- Polinucleotidi marcati con dinitrofenil (~0,8 ng/µl), le cui sequenze target mappano in 19q13.32-q13.33* (chr19:47,857,776-48,339,398) (vedere Fig. 2).
- Tampone di ibridazione a base di formammide

*conformemente all'Human Genome Assembly GRCh37/hg19

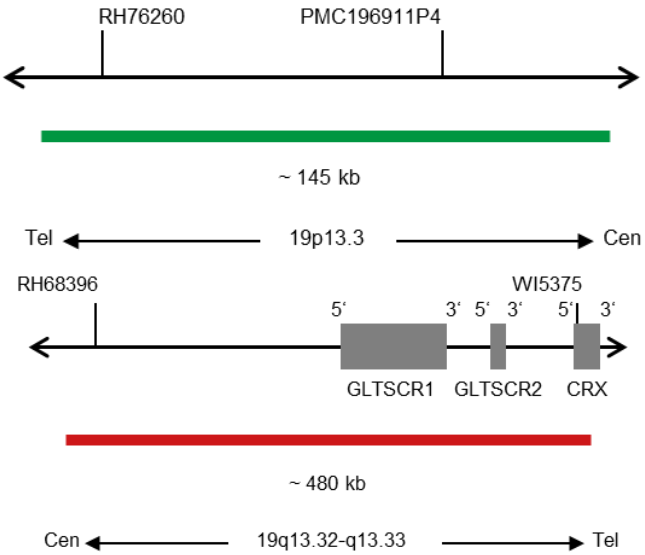

Fig. 2: In alto: SPEC 19q13 Mappa della sonda; in basso: SPEC 19p13 Mappa della sonda (non in scala)

Il ZytoDot 2C Glioma 1p/19q Probe Set è disponibile in due dimensioni:

- C-3076-10: Le singole sonde sono sufficienti per 10 reazioni da 10µl ciascuna.
- C-3076-40: Le singole sonde sono sufficienti per 40 reazioni da 10µl ciascuna.

4. Materiali richiesti ma non forniti

- ZytoDot 2C CISH Implementation Kit (Codice prodotto C-3044-10/-40)
- 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.

Frasi di pericolo e prudenza:

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.

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

Allestire I campioni come descritto nelle istruzioni per l'uso del ZytoDot 2C CISH Implementation Kit.

10. Trattamento preparatorio del prodotto

Il prodotto è pronto all'uso. Non deve essere ricostituito, mescolato o diluito. Portare la sonda a temperatura ambiente (18-25°C) prima dell'uso, proteggere dalla luce. Prima di aprire la vial, vortexare e centrifugare brevemente.

11. Procedura di lavoro

Pretrattamento del campione
Pretrattare il campione (sparaffinatura, proteolisi) conformemente alle istruzioni per l'uso del kit ZytoDot 2C CISH Implementation Kit.

Denaturazione e ibridazione

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

Raccomandiamo di utilizzare una colla per vetrini (per esempio, Fixogum).

3. Porre i vetrini su piastra calda o su ibridizzatore e denaturare i campioni per 5 min. a 79 °C.
4. Trasferire i vetrini in camera umida e ibridare overnight a 37°C (per esempio in una stufa da ibridazione).

È fondamentale che I campioni non si asciughino durante la fase di ibridazione.

Post-ibridazione
Procedere con i passaggi post-ibridazione (lavaggio, rivelazione, controcolorazione, montaggio e lettura al microscopio) in accordo con le istruzioni d'uso del kit ZytoDot 2C CISH Implementation Kit.

12. Interpretazione dei risultati

ZytoDot 2C SPEC 1p36/1q25 Probe:

Utilizzando il ZytoDot 2C CISH Implementation Kit, i segnali di ibridazione dei polinucleotidi marcati con digossigenina appaiono come punti distinti di colore verde scuro (locus 1q25) e i polinucleotidi marcati con dinitrofenile appaiono come punti distinti di colore rosso vivo (locus 1p36).

Situazione normale: Nelle interfasi di cellule normali o di cellule senza delezioni che coinvolgono il locus 1p36, appaiono due distinti segnali rossi a forma di punto e due distinti segnali verdi a forma di punto. (vedere Fig. 3).

Situazione aberrante: In una cellula con delezione che interessa il locus 1p36, si osserverà un numero ridotto di segnali rossi. Le delezioni che interessano solo parti del locus 1p36 possono dare luogo a un modello di segnale normale con segnali rossi di dimensioni ridotte (vedere Fig. 3).

I segnali che si sovrappongono possono apparire come segnali marroni.

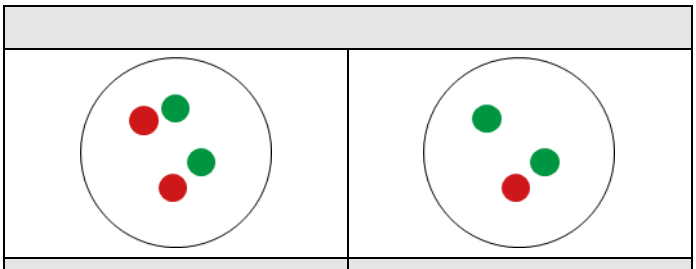

Fig. 3: Risultati attesi in situazione normale e aberrante

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.

ZytoDot 2C SPEC 19q13/19p13 Probe:

Utilizzando il ZytoDot 2C CISH Implementation Kit, i segnali di ibridazione dei polinucleotidi marcati con digossigenina appaiono come punti distinti di colore verde scuro (locus 19p13) e i polinucleotidi marcati con dinitrofenile appaiono come punti distinti di colore rosso vivo (locus 19q13).

Situazione normale: Nelle interfasi di cellule normali o di cellule senza delezioni che coinvolgono il locus 19q13, appaiono due distinti segnali rossi a forma di punto e due distinti segnali verdi a forma di punto. (vedere Fig. 4).

Situazione aberrante: In una cellula con delezione che interessa il locus 19q13, si osserverà un numero ridotto di segnali rossi. Le delezioni che interessano solo parti del locus 19q13 possono dare luogo a un modello di segnale normale con segnali rossi di dimensioni ridotte (vedere Fig. 4).

I segnali che si sovrappongono possono apparire come segnali marroni.

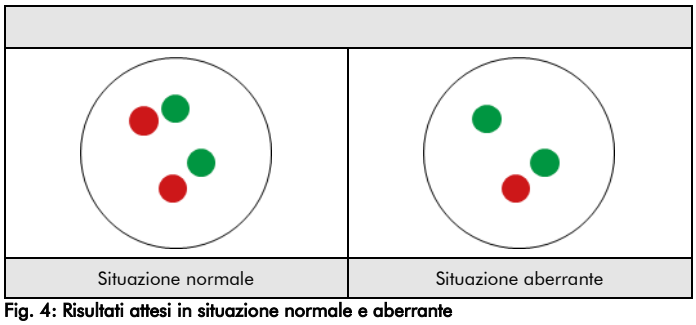

Fig. 4: Risultati attesi in situazione normale e aberrante

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

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:	**ZytoDot 2C SPEC 1p36/1q25 Probe**: 100% (95% CI 91.6 – 100.0) vs FISH **ZytoDot 2C SPEC 19q13/19p13 Probe:** 100% (95% CI 91.4 – 100.0) vs. FISH
Specificità diagnostica:	**ZytoDot 2C SPEC 1p36/1q25 Probe:** 100% (95% CI 91.6 – 100.0) vs FISH **ZytoDot 2C SPEC 19q13/19p13 Probe:** 100% (95% CI 91.4 – 100.0) vs. FISH

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

- Lass U, et al. (2013) *Brain Pathol 23*: 311-8.
- Wilkinson DG: In Situ Hybridization, A Practical Approach, *Oxford University Press* (1992) ISBN 0 19 963327 4.

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.