ZYTOVISION

Zyto*Fast*

human Ig-kappa Probe

(Digoxigenin-labeled)

REF T-1115-400 Σ 40 (0,4 ml)

Per il rilevamento qualitativo dell'mRNA della catena leggera Ig-kappa umana (κ) mediante ibridazione cromogenica *in situ* (CISH)

4250380P102QE

CE 0483

IVD

Dispositivo medico – diagnostico in vitro

in conformità al Regolamento IVDR (EU) 2017/746

1. Scopo previsto

La Zyto*Fast* human Ig-kappa Probe (**PF30**) è destinata a essere utilizzata per la rilevazione qualitativa della catena leggera mRNA di Ig-kappa umana (κ) in campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina, come il mieloma multiplo, mediante ibridazione cromogenica *in situ* (CISH). La sonda è destinata ad essere utilizzata in combinazione Zyto*Fast* PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB (Codice n° T-1063-40).

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.

Il prodotto è destinato a essere utilizzato come ausilio per la diagnosi differenziale del mieloma multiplo 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 rilevazione e la visualizzazione di sequenze nucleotidiche specifiche in preparazioni cellulari. Frammenti nucleotidici aptenici marcati, chiamati sonde CISH, e le loro sequenze target complementari nelle preparazioni sono co-denaturati e successivamente riuniti durante l'ibridazione. Successivamente, i frammenti di sonda aspecifici e non legati, sono rimossi con 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

La Zyto*Fast* human Ig-kappa Probe è composta da:

- Oligonucleotidi marcati con digossigenina (~0.2 ng/µl), che hanno come bersaglio sequenze di mRNA che codificano le regioni costanti della catena leggera di Ig-kappa.

La Zyto*Fast* human Ig-kappa Probe è disponibile nei seguenti formati è disponibile in un'unica dimensione:

- T-1115-400: 0,4 ml (40 reazioni da 10 µl ciascuna)

4. Materiali richiesti ma non forniti

- Zyto*Fast* PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB (Codice n° T-1063-40)
- Campioni di controlli positivi e negativi
- Vetrini per microscopia a carica positiva
- Bagno termostatato (55 °C, 98 °C)
- Ibridizzatore o piastre calda
- Ibridizzatore o camera umida in stufa da ibridazione
- Pipette a volume variabile (10 µl, 100 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 (100-200x)

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:

La miscela non è classificata come pericolosa ai sensi del regolamento (CE) n. 1272/2008.

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 ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB.

10. Trattamento preparatorio del prodotto

Il prodotto è pronto all'uso. Non deve essere ricostituito, mescolato o diluito. Portare la sonda alla temperatura di ibridazione (55 °C) e miscelare con accuratezza prima dell'uso.

11. Procedura di lavoro

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

Denaturazione e ibridazione

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

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 75 °C.
4. Trasferire i vetrini in camera umida e ibridare per 1 h 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 ZytoFast CISH Implementation Kit.

12. Interpretazione dei risultati

Utilizzando il ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB, gli oligonucleotidi ibridati marcati con digossigenina appaiono come un pattern marrone quando vengono rilevati dalla perossidasi di rafano (HRP) e dal DAB.

Una reattività positiva nelle cellule B plasmatiche è indicata dalla colorazione citoplasmatica.

Nel tessuto linfoide, il rapporto normale kappa-lambda è all'incirca di 2:1; un'indicazione di monoclonalità viene data se il rapporto kappa-lambda è >3:1 o <0,3:1.

Note:

- La visualizzazione dei segnali dovrebbe essere condotta con un obiettivo almeno 100x per rendere i segnali facilmente visibili.
- Non valutare le aree di necrosi, i nuclei sovrapposti, i nuclei over-digeriti e i nuclei con intensità di segnale scarsa.
- 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: Nei casi non chiari, è necessario utilizzare le sonde di controllo dell'RNA per ulteriori chiarimenti.

Controllo esterno: Campioni di controlli positivi e negativi validati.

14. Caratteristiche di performance

14.1 Prestazioni analitiche

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

14.2 Prestazioni cliniche

Sensibilità diagnostica:	100% (95% CI 86.3 -100.0) vs. IHC 100% vs. RAPID RISH Biocare/ Test di restrizione della catena leggera senza siero 88.24% vs. IHC
Specificità diagnostica:	100% (95% CI 86.3 -100.0) vs. IHC

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
Insufficiente preparazione del substrato cromogenico	Preparare il substrato colorato, utilizzando una pipetta anziché dispensare goccia a goccia
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 deboli o mancanti

Possibile causa	Azione
È stata utilizzata una soluzione di montaggio non adeguata	Utilizzare solo la soluzione di montaggio fornita con il kit o raccomandata nelle istruzioni per l'uso. Utilizzare soluzioni libere da impurezze; non utilizzare il nastro coprioggetto

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

Rumore di fondo

Possibile causa	Azione
Sezioni essiccate durante o dopo l'ibridazione	Evitare che le sezioni asciughino; utilizzare una camera umida; sigillare in modo appropriato con un coprioggetto
Tempo di incubazione del substrato prolungato	Accorciare il tempo di incubazione del substrato
Sparaffinatura incompleta	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

- Lang G. (2010) *Journal of Histotechnology*.
- Sen A, et al. (2020) *Med J Armed Forces India*.
- Wilkinson DG: In Situ Hybridization, A Practical Approach, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.

18. Revisione

Revisione	Descrizione della modifica
2.1.1	Modifica dell'organismo notificato

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*Fast*® sono marchi registrati da ZytoVision GmbH.