



ZytoLight

FISH-Tissue Implementation Kit

REF Z-2028-5 5

REF Z-2028-20 20

Per l'uso nelle procedure di ibridazione *in situ* a fluorescenza (FISH)

4250380N177P



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

1. Scopo previsto

Il *ZytoLight* FISH-Tissue Implementation Kit è destinato a essere utilizzato in combinazione con le sonde *ZytoLight* FISH su campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina mediante ibridazione *in situ* a fluorescenza (FISH).

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* fluorescente (FISH) consente la rilevazione e la visualizzazione di sequenze nucleotidiche specifiche in preparazioni cellulari. I frammenti di DNA marcati in modo fluorescente, chiamati sonde FISH, e i loro frammenti di DNA complementare nelle preparazioni sono co-denaturati e riuniti durante l'ibridazione. Successivamente, i frammenti di sonda non specifici e non legati, sono rimossi con lavaggi stringenti. Dopo la controcolorazione del DNA con DAPI, i frammenti di sonda ibridati sono visualizzati utilizzando il microscopio a fluorescenza equipaggiato con filtri specifici per i fluorocromi con cui sono direttamente marcati i frammenti di sonde FISH.

3. Reagenti forniti

Il *ZytoLight* FISH-Tissue Implementation Kit è disponibile in due dimensioni ed è composto da:

| Codice | Componenti | Importo | | Contenitore |
|--------|-----------------------------------|---------|---------|---------------------------------------|
| | | 5 | 20 | |
| PT1 | Heat Pretreatment Solution Citric | 150 ml | 500 ml | Flacone con tappo a vite (grande) |
| ES1 | Pepsin Solution | 1 ml | 4 ml | Flacone contagocce, tappo bianco |
| WB1 | Wash Buffer SSC | 210 ml | 560 ml | Bottiglia con tappo a vite (grande) |
| WB2 | 25x Wash Buffer A | 50 ml | 2x50 ml | Bottiglia con tappo a vite (media) |
| MT7 | DAPI/DuraTect-Solution | 0.2 ml | 0.8 ml | Recipiente di reazione, coperchio blu |
| | Istruzioni per l'uso | 1 | 1 | |

Z-2028-5 (5 tests): I componenti **ES1** e **MT7** sono sufficienti per 5 reazioni. Il componente **WB2** è sufficiente per 5x3 vasi di colorazione da 70 ml ciascuno. Il componente **PT1** 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.

Z-2028-20 (20 tests): I componenti **ES1** e **MT7** sono sufficienti per 20 reazioni. Il componente **WB2** è sufficiente per 11x3 vasi di colorazione da 70 ml ciascuno. Il componente **PT1** 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.

4. Materiali richiesti ma non forniti

- *ZytoLight* probe
- Campione controllo positivo e negativo
- Vetrini portaoggetto a carica positiva
- Bagno termostato (37°C, 98°C)
- Ibridizzatore o piastra calda
- Ibridizzatore o camera umida in stufa di ibridazione
- Pipette a volume variabile (10 µl, 25 µl)
- Vaschette di colorazione
- Timer
- Termometro calibrato
- Etanolo o reagente alcolico
- Xilene
- Acqua deionizzata o distillata
- Vetrini coprioggetto (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Colla per vetrini, per esempio Fixogum Rubber Cement (codice prodotto E-4005-50/-125) o simili
- Microscopio a fluorescenza (400-1000x)
- Olio a immersione per fluorescenza
- Set di filtri appropriato

5. Conservazione e stoccaggio

Conservare a 2-8°C in posizione verticale. Inoltre, la DAPI/DuraTect-Solution (MT7) deve essere conservata al riparo dalla luce. 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.
- La **DAPI/DuraTect-Solution (MT7)** non deve essere esposta alla luce, in particolare a quella forte, per un periodo di tempo prolungato, vale a dire che tutte le fasi devono essere eseguite, ove possibile, al buio e/o utilizzando contenitori a prova di luce.

Etichettatura speciale di ES1:

EUH208 Contiene pepsina A. Può provocare una reazione allergica.

EUH210 Scheda dati di sicurezza disponibile su richiesta.

Frase di pericolo e prudenza per PT1, WB1, e WB2:

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 MT7:

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

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 globuli rossi presenti nel campione potrebbero esibire auto fluorescenza che disturba l'identificazione dei segnali.

I seguenti fissativi non sono compatibili con la FISH:

- 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:

- 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 2-4 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

25x Wash Buffer A (WB2) deve essere preparato secondo le istruzioni riportate al punto 11.2 "Procedura di lavoro - Giorno 2". Tutti gli altri reagenti del kit sono pronti all'uso. Non è richiesta alcuna ricostituzione, miscelazione o diluizione.

11. Procedura di lavoro

11.1 Giorno 1

Fasi preparatorie

1. *Preparare due serie di etanolo (soluzioni di etanolo al 70%, 90% e 100%):* Diluire il 100% di etanolo con acqua deionizzata o distillata. Queste soluzioni possono essere conservate in contenitori adeguati e possono essere riutilizzate.
2. *Heat Pretreatment Solution Citric (PT1):* Riscaldare a 98°C.
3. *Wash Buffer SSC (WB1):* Portare a temperatura ambiente (RT). Il WB1 può formare precipitati a 2-8°C, che non influiscono sulla qualità e si dissolvono se riscaldati.
4. *ZytoLight FISH Probe:* Portare a temperatura ambiente prima dell'uso, proteggere dalla luce.

Opzionale, se si esegue la fase di post-fissazione:

(fortemente raccomandato se la fissazione del tessuto non è ottimale)

*Preparare una soluzione di formaldeide all'1% utilizzando il **Formaldehyde Dilution Buffer Set (PT-0006-100)***

Pretrattamento (decerazione/proteolisi)

1. Incubare i vetrini per 10 minuti a 70°C (ad esempio, su una piastra).
2. Incubare i vetrini per 2x 10 min in xilene.
3. Incubare in etanolo al 100%, 100%, 90% e 70%, ciascuno per 5 minuti.

- Lavare 2x 2 min in acqua deionizzata o distillata.
- Incubare per 15 minuti in Heat Pretreatment Solution Citric (PT1) preriscaldata a 98°C.

Si consiglia di non utilizzare più di otto vetrini per barattolo di colorazione.

- Trasferire immediatamente i vetrini in acqua deionizzata o distillata, lavare per 2x 2 min e scolare o tamponare l'acqua.
- Applicare (a gocce) la Pepsin Solution (ES1) sui campioni e incubare per 15 minuti a 37°C in una camera di umidità.

ES1 può formare precipitati, che non influiscono sulla qualità.

A seconda di diversi fattori, ad esempio la natura e la durata del fissaggio, lo spessore delle sezioni e la natura dei tessuti/cellule, possono essere necessari tempi di incubazione diversi. Come linea guida per l'incubazione, si consiglia un tempo di incubazione di 2-30 minuti per i campioni di tessuto e di 2-15 minuti per i campioni di cellule. Come regola generale, si consiglia di accertare il tempo ottimale per la proteolisi nei test preliminari.

- Lavare per 5 minuti in Wash Buffer SSC (WB1).

Opzionale, se si esegue la fase di post-fissazione:

Incubare i vetrini per 15 minuti nella soluzione di formaldeide all'1% e lavare successivamente per 5 minuti con il Wash Buffer SSC (WB1)

- Lavare per 1 minuto in acqua deionizzata o distillata
- Disidratazione: in etanolo al 70%, 90% e 100%, ciascuno per 1 min
- Asciugare all'aria le sezioni.

Nota: assicurarsi di asciugare completamente le sezioni prima dell'applicazione della sonda, poiché l'umidità residua può ridurre l'intensità del segnale e/o influenzare la morfologia del tessuto.

Denaturazione e ibridazione

- Pipettare 10 µl di ZytoLight FISH Probe su ciascun campione pretrattato.

Evitare una lunga esposizione della sonda alla luce.

- 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 il cemento di gomma (ad es. Fixogum Rubber Cement).

- Posizionare i vetrini su una piastra calda o su un ibridatore e denaturare i campioni per 10 minuti a 75°C.
- 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 di tessuto/cellula non si seccino durante la fase di ibridazione.

11.2 Giorno 2

Fasi preparatorie

- Preparation of 1x Wash Buffer A:** diluire 1 parte di 25x Wash Buffer A (WB2) con 24 parti di acqua deionizzata o distillata. Riempire tre vasetti di colorazione con l'1x tampone di lavaggio A e preriscaldarlo a 37°C.

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

- DAPI/DuraTect-Solution (MT7) Portare a temperatura ambiente prima dell'uso, proteggere dalla luce.

Post-ibridazione e rilevamento

- Rimuovere con cautela il cemento o la colla di gomma.
- Rimuovere il coprioggetto immergendolo in 1x Wash Buffer A a 37°C a 1-3 min.
- Lavare con 1x Wash Buffer A per 2x 5 min a 37°C.

Il 1x Wash Buffer A deve essere preriscaldata. Se necessario, controllare con un termometro.

- Incubare i vetrini in etanolo al 70%, 90% e 100%, ciascuno per 1 minuto.
- Asciugare all'aria i campioni al riparo dalla luce.
- Pipettare 25 µl di DAPI/DuraTect-Solution (MT7) sui vetrini. Per evitare la formazione di bolle, coprire i campioni con un coprioggetto (24 mm x 60 mm). Incubare al buio per 15 minuti.

L'uso di un puntale tagliato per aumentare le dimensioni dell'apertura può facilitare il processo di pipettaggio. Evitare una lunga esposizione alla luce.

- Conservare il vetrino al buio. Per periodi di conservazione più lunghi, la conservazione dovrebbe avvenire a 2-8°C.
- La valutazione del materiale del campione viene effettuata mediante microscopia a fluorescenza. Sono necessari set di filtri per i seguenti intervalli di lunghezze d'onda:

| Colorante fluorescente | Eccitazione | Emissione |
|------------------------|-------------|-----------|
| ZyBlue | 418 nm | 467 nm |
| ZyGreen | 503 nm | 528 nm |
| ZyGreen 2.0 | 493 nm | 518 nm |
| ZyGold | 532 nm | 553 nm |
| ZyOrange | 547 nm | 572 nm |
| ZyRed | 580 nm | 599 nm |

12. Interpretazione dei risultati

Con l'uso di set di filtri appropriati, nelle interfasi o nelle metafasi di cellule normali o di cellule senza aberrazioni cromosomiche, appaiono due segnali per sonda/etichetta di fluorescenza, tranne che per le sonde mirate ai cromosomi X e/o Y, che risultano da nessuno a due segnali per sonda/etichetta di fluorescenza, a seconda del genere. 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 il manuale della rispettiva sonda.

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 per altre informazioni.

Segnali deboli o mancanti

| Possibile causa | Azione |
|--|---|
| Campioni cellulari o fissati non correttamente fissati | Ottimizzare il tempo di fissazione e il fissativo o aggiungere un passaggio di post-fissazione come descritto in "procedure" del manuale d'uso del kit <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</u> |
| 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 |
| Utilizzo di set di fluorescenza non corretto | Utilizzare un set di filtri appropriato per i fluorocromi della sonda. <i>Il filtro triplo fornisce meno luce rispetto al filtro singolo o doppio. I segnali possono quindi apparire più tenui utilizzando il filtro triplo.</i> |

Segnali di cross ibridazione; rumori di fondo

| Possibile causa | Azione |
|---|--|
| Sparaffinatura incompleta | Utilizzare soluzioni fresche; controllare la durata della sparaffinatura |
| Pretrattamento proteolitico troppo forte | Ridurre il tempo di incubazione in pepsina |
| Vetrini raffreddati a temperature ambiente prima dell'ibridazione | Trasferire i vetrini rapidamente a 37°C |

Morfologia degradata

| Possibile causa | Azione |
|---|---|
| Il campione cellulare o tissutale non è stato fissato correttamente | Ottimizzare il tempo di fissazione e il fissativo o aggiungere un passaggio di post-fissazione come descritto in "procedure" nel manuale d'uso del kit ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit |
| Pretrattamento proteolitico non condotto correttamente | Ottimizzare il tempo di incubazione in pepsina, aumentandolo o diminuendolo se necessario |
| Asciugatura insufficiente prima dell'applicazione della sonda | Aumentare i tempi di asciugatura |

Nuclei sovrapposti

| Possibile causa | Azione |
|--|--|
| Inadeguato spessore della sezione di tessuto | Preparare sezioni al microto dello spessore di 2-4 μm |

Campione galleggiante sul vetrino

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

Controcolorazione debole

| Possibile causa | Azione |
|---|---|
| Bassa concentrazione di soluzione DAPI | Utilizzare DAPI/DuraTect-Solution (ultra) (Codice prodotto MT-0008-0.8) |
| Tempo di incubazione in DAPI troppo breve | Aggiustare il tempo di incubazione in DAPI |

17. Letteratura

- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Wilkinson DG: *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.

18. Revisione

| Revisione | Descrizione della modifica |
|-----------|--|
| 1.2.1 | 11. Procedura di lavoro ZyGreen 2.0 aggiunto |



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



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 ZytoLight® sono marchi registrati da ZytoVision GmbH.