



ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit

REF Z-2099-20 20

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

4250380N727X



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

1. Scopo previsto

Il ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit è destinato all'uso in combinazione con le sonde ZytoLight FISH su campioni citologici 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-Cytology Implementation Kit è disponibile in un unico formato ed è composto da:

Codice	Componenti	Importo	Contenitore
		20	
ES2	<u>Cytology Pepsin Solution</u>	4 ml	Flacone contagocce, tappo trasparente
WB5	<u>20x Wash Buffer TBS</u>	50 ml	Bottiglia con tappo a vite
PT4	<u>10x MgCl₂</u>	50 ml	Bottiglia con tappo a vite
PT5	<u>10x PBS</u>	50 ml	Bottiglia con tappo a vite
WB7	<u>Cytology Stringency Wash Buffer SSC</u>	500 ml	Bottiglia con tappo a vite (grande)
WB8	<u>Cytology Wash Buffer SSC</u>	500 ml	Bottiglia con tappo a vite (grande)
MT7	<u>DAPI/DuraTect-Solution</u>	0.8 ml	Recipiente di reazione, coperchio blu
	Istruzioni per l'uso	1	

Z-2099-20 (20 tests): I componenti **ES2** e **MT7** sono sufficienti per 20 reazioni. Il componente **PT4**, **PT5**, **WB7** e **WB8** è sufficiente per 7 vasi di colorazione da 70 ml ciascuno. Il componente **WB5** è sufficiente per 14 vasi di colorazione da 70 ml ciascuno.

4. Materiali richiesti ma non forniti

- ZytoLight probe
- Controlli positivi e negativi
- Campioni di controllo positivo e negativo
- Vetrini portaoggetto, non rivestiti
- Bagno termostato (70°C)
- Ibridizzatore o piastra calda
- Ibridizzatore o camera umida in stufa da ibridazione
- Pipette a volume variabile (10 µl, 25 µl)
- Vaschette di colorazione
- Timer
- Termometro calibrato
- Etanolo o altro reagente alcolico
- Formaldeide 37%, acid-free, o formalina 10% neutra tamponata
- 2x Saline-Sodium Citrate (SSC), per esempio, da 20x SSC Solution (Codice prodotto WB-0003-50)
- 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 ES2:

EUH210	Scheda dati di sicurezza disponibile su richiesta. La miscela contiene < 20 % di componenti la cui tossicità acuta non è nota (per inalazione).
--------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Frasì di pericolo e prudenza per PT4, PT5, WB5, WB7, e WB8:

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.

Frasì 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 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.
- 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.

9. Preparazione dei campioni

Incubare i vetrini per 2 minuti in una soluzione 2x SSC a 73°C immediatamente prima della proteolisi per l'invecchiamento.

In alternativa, l'invecchiamento dei campioni può essere effettuato incubando i campioni per una notte (12-16 ore) a 37°C.

10. Trattamento preparatorio del prodotto

20x Wash Buffer TBS (WB5), 10x MgCl₂ (PT4), e 10x PBS (PT5) devono essere pretrattati secondo le istruzioni riportate in 11. "Procedura di lavoro". Procedura di analisi". I componenti (PT4) e (PT5) possono formare precipitati a 2-8°C. Se necessario, riscaldare a 37°C per 10 minuti fino alla completa dissoluzione dei precipitati prima dell'uso. 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

- Preparazione del 1x Wash Buffer TBS: Diluire 1 parte di 20x Wash Buffer TBS (WB5) con 19 parti di acqua deionizzata o distillata.
- Preparazione della soluzione di formaldeide all'1%: Per 100 ml di soluzione di formaldeide all'1% miscelare 2,7 ml di formaldeide al 37% senza acidi o 25 ml di formalina neutralmente tamponata al 10% (4% di formaldeide) con 10 ml di MgCl₂ 10x₂ (PT4) e 10 ml di PBS 10x (PT5) e portare il volume a 100 ml con acqua deionizzata o distillata. Miscelare accuratamente.
- Preparazione di una serie di etanolo (soluzioni di etanolo al 70%, 90% e 100%): Diluire 7, 9 e 10 parti di etanolo al 100% con 3, 1 e 0 parti di acqua deionizzata o distillata, rispettivamente. Queste soluzioni possono essere conservate in contenitori adeguati e possono essere riutilizzate.
- ZytoLight FISH Probe: Portare a temperatura ambiente prima dell'uso, proteggere dalla luce.

Pretrattamento (proteolisi/post-fissazione)

1. Applicare (a gocce) la Cytology Pepsin Solution (ES2) sul campione citologico e incubare per 10 minuti a 37°C in una camera di umidità. **ES2 può formare precipitati, che non influiscono sulla qualità.**
A seconda di diversi fattori, ad esempio la natura e la durata del fissaggio e la natura delle cellule, possono essere necessari tempi di incubazione diversi. Si consiglia un tempo di incubazione di 5-15 minuti per i campioni citologici. Come regola generale, si consiglia di accertare il tempo ottimale per la proteolisi nei test preliminari.
2. Incubare i vetrini per 5 minuti nel 1x Wash Buffer TBS.
3. Incubare i vetrini per 5 minuti nella soluzione di formaldeide all'1%.
4. Incubare i vetrini per 5 minuti nel 1x Wash Buffer TBS.

- Disidratazione: in etanolo al 70%, 90% e 100%, ciascuno per 1 minuto.

Campioni asciugati all'aria.

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 5 minuti a 72°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 citologici non si seccino durante la fase di ibridazione.

11.2 Giorno 2

Fasi preparatorie

- Cytology Stringency Wash Buffer SSC (WB7): Preriscaldare a 70°C.
- Cytology Wash Buffer SSC (WB8): Portare a temperatura ambiente.
- 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 con cautela il coprioggetto.
- Lavare con Cytology Stringency Wash Buffer SSC (WB7) per 2 min a 70°C.

Il Cytology Stringency Wash Buffer SSC deve essere preriscaldato. Se necessario, controllare con un termometro.

Si consiglia di utilizzare quattro vetrini per ogni barattolo di colorazione. Se necessario, utilizzare vetrini vuoti per regolare il numero a quattro.

- Lavare, utilizzando il Cytology Wash Buffer SSC (WB8) per 1 minuto a temperatura ambiente.

Il Cytology Wash Buffer SSC deve essere preriscaldato a temperatura ambiente. Se necessario, controllare con un termometro.

- 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
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
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
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

Controcolorazione debole

Possibile causa	Azione
Bassa concentrazione di soluzione DAPI	Utilizzare <u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (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.