



F/exSH- Tissue Implementation Kit

REF Z-2182-5 Σ 5

REF Z-2182-20 Σ 20

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

4250380N8486



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

1. Scopo previsto

Il F/exSH-Tissue Implementation Kit è destinato all'uso in combinazione con le sonde F/exSH 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 F/exSH-Tissue Implementation Kit è disponibile in due dimensioni ed è composto da:

Codice	Componenti	Importo		Contenitore
		5	Σ 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
WB10	5x F/exSH Wash Buffer	500 ml	150 ml	Bottiglia con tappo a vite (grande)
MT7	DAPI/DuraTect-Solution	0.2 ml	0.8 ml	Recipiente di reazione, coperchio blu
	Istruzioni per l'uso	1	1	

Z-2182-5 (5 tests): I componenti **ES1** e **MT7** sono sufficienti per 5 reazioni. Il componente **WB10** è sufficiente per 3x3 vasi di colorazione da 70 ml ciascuno. Il componente **PT1** è sufficiente per 2 vasi di colorazione da 70 ml ciascuno.

Z-2182-20 (20 tests): I componenti **ES1** e **MT7** sono sufficienti per 20 reazioni. Il componente **WB10** 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.

4. Materiali richiesti ma non forniti

- F/exSH 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 μ l, 25 μ l)
- 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.

Fraasi di pericolo e prudenza per PT1 e WB10:

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.

Fraasi 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.

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

5x FlexSH Wash Buffer (WB10) 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.

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. *FlexSH Probe:* Portare a temperatura ambiente prima dell'uso, proteggere dalla luce. Prima di aprire la fiala, mescolare con vortex e centrifugare brevemente.

Pretrattamento (decerazione/proteolisi)

1. Incubare i vetrini per 2x 5 min in xilene.
2. Incubare in etanolo al 100%, 100%, 90% e 70%, ciascuno per 2 minuti.
3. Lavare 2x 2 min in acqua deionizzata o distillata.
4. Incubare per 20 minuti in **Heat Pretreatment Solution Citric (PT1)** preriscaldato a 98°C.

Si consiglia di non utilizzare più di otto vetrini per barattolo di colorazione. Dopo l'immersione dei vetrini, controllare la temperatura della Heat Pretreatment Solution Citric all'interno del barattolo e avviare il tempo non appena la temperatura della soluzione ha raggiunto almeno 95°C.

- 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 2x2 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 FlexSH 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.
- Ibridare per un tempo compreso tra le 2 e le 16 ore (per es. overnight) a 37 °C trasferendo i vetrini a un ibridatore, a una camera umida e una stufa d'ibridazione.

È fondamentale che i campioni non si asciugano durante la fase di ibridazione.

11.2 Giorno 1 o giorno 2

Fasi preparatorie

- Preparation of 1x FlexSH Wash Buffer: diluire 1 parte di 5x FlexSH Wash Buffer (WB10) con 4 parti di acqua deionizzata o distillata. Riempire tre vasetti di colorazione con il 1x FlexSH Wash Buffer, preriscaldare un vasetto a 72°C e tenere due vasetti 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 il coprioggetto immergendolo in 1x FlexSH Wash Buffer a temperatura ambiente per 1-2 minuti.

Per facilitare la rimozione del coprioggetto, questa fase può essere eseguita in alternativa per 2 minuti a 37°C.

- Lavare con 1x FlexSH Wash Buffer per 10 minuti a 72°C.

Il 1x FlexSH Wash Buffer deve essere preriscaldato. Se necessario, controllare con un termometro. Non utilizzare più di otto vetrini per barattolo di colorazione.

- Lavare con 1x FlexSH Wash Buffer per 3 minuti a temperatura ambiente.
- 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
Il campione non è stato adeguatamente fissato	Ottimizzare il tempo di fissazione e il fissativo
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. Il filtro triplo fornisce meno luce rispetto al filtro singolo o doppio. I segnali possono quindi apparire più tenui utilizzando il filtro triplo.

Segnali di cross ibridazione; rumori di fondo

Possibile causa	Azione
Sparaffinatura incompleta	Utilizzare soluzioni fresche; controllare la durata della sparaffinatura

