



ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit

REF Z-2028-5 Σ 5

REF Z-2028-20 Σ 20

A utiliser dans les procédures d'hybridation fluorescente in situ (FISH)

4250380N177P



Dispositif médical de diagnostic *in vitro*
conformément à l'IVDR (UE) 2017/746

1. Utilisation prévue

Le kit d' ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit est destiné à être utilisé en combinaison avec les sondes ZytoLight FISH sur des échantillons fixés au formol et inclus en paraffine par hybridation *in situ* par fluorescence (FISH).

Le produit est destiné à un usage professionnel uniquement. Tous les tests utilisant le produit doivent être réalisés dans un laboratoire d'anatomie pathologique certifié et agréé, sous la supervision d'un médecin pathologiste/généticien, par du personnel qualifié.

2. Principe du test

L'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) permet la détection et la visualisation de séquences d'acide nucléique spécifiques dans une préparation cellulaire. Les fragments d'ADN marqués par fluorescence, appelés sondes FISH, et leurs brins d'ADN complémentaires dans les échantillons sont dénaturés et puis ré-appariés pendant l'hybridation. Par la suite, les fragments de sonde non spécifiques et non hybridés sont éliminés par des étapes de lavage stringent. Après une contre coloration de l'ADN avec du DAPI, les fragments de sondes hybridés sont visualisés au moyen d'un microscope à fluorescence équipé de filtres d'excitation et d'émission spécifiques aux fluorochromes avec lesquels les fragments de sondes FISH ont été marqués.

3. Réactifs fournis

ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit est disponible en deux tailles et est composé de :

Code	Composant	Quantité		Contenant
		5	20	
PT1	<u>Heat Pretreatment Solution Citric</u>	150 ml	500 ml	Flacon avec bouchon à visser (grand)
ES1	<u>Pepsin Solution</u>	1 ml	4 ml	Flacon compte-gouttes, bouchon transparent
WB1	<u>Wash Buffer SSC</u>	210 ml	560 ml	Flacon avec bouchon à visser (grand)
WB2	<u>25x Wash Buffer A</u>	50 ml	2x50 ml	Flacon avec bouchon à visser (moyen)
MT7	<u>DAPI/DuraTect-Solution</u>	0,2 ml	0,8 ml	Cuve à réaction, couvercle bleu
	Mode d'emploi	1	1	

Z-2028-5 (5 tests) : Les composants **ES1** et **MT7** suffisent pour 5 réactions. Le composant **WB2** suffit pour 5 x 3 cuves à coloration de 70 ml chacune. Le composant **PT1** suffit pour 2 cuves à coloration de 70 ml chacune. Le composant **WB1** suffit pour 3 cuves à coloration de 70 ml chacune.

Z-2028-20 (20 tests) : Les composants **ES1** et **MT7** suffisent pour 20 réactions. Le composant **WB2** suffit pour 11 x 3 cuves à coloration de 70 ml chacune. Le composant **PT1** suffit pour 7 cuves à coloration de 70 ml chacune. Le composant **WB1** suffit pour 8 cuves à coloration de 70 ml chacune.

4. Matériel requis mais non fourni

- ZytoLight FISH probe
- Echantillons pour les contrôles positifs et négatifs
- Lames pour microscope, chargées positivement
- Bain-marie (37 °C, 98 °C)
- Système d'hybridation ou plaque chauffante
- Système d'hybridation ou chambre humide dans un four à hybridation
- Pipettes ajustables (10 µl, 25 µl)
- Pots ou bacs de coloration
- Chronomètre
- Thermomètre calibré
- Ethanol ou réactif à l'alcool
- Xylène
- Eau distillée ou déminéralisée
- Lamelles (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Ciment caoutchouc, comme par exemple: Fixogum Rubber Cement (Prod. No. E-4005-50/-125) ou similaire
- Microscope à fluorescence adéquatement entretenu (400-1000x)
- Huile à immersion compatible avec la microscopie à fluorescence
- Sets de filtres appropriés

5. Stockage et manipulation

Conserver entre 2 et 8 °C dans une position verticale. En outre, la DuraTect/DAPI-Solution (**MT7**) doit être conservée à l'abri de la lumière. Remettre dans les conditions de stockage immédiatement après utilisation. Ne pas utiliser les réactifs après leur date de péremption indiquée sur l'étiquette. Le produit est stable jusqu'à sa date de péremption indiquée sur l'étiquette lorsqu'il est utilisé dans les bonnes conditions.

6. Avertissements et précautions

- Lire les instructions avant utilisation !
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
- Ce produit contient des substances (en faibles concentrations et volumes) nocifs pour la santé et potentiellement infectieux. Eviter le contact direct avec ces réactifs. Prenez les mesures de protection appropriées (utilisez des gants jetables, des lunettes de protection et des vêtements de laboratoire) !
- Signaler tout incident grave survenu en rapport avec le produit au fabricant et à l'autorité compétente, conformément à la réglementation locale!
- Si les réactifs entrent en contact avec la peau, rincer immédiatement avec beaucoup d'eau.
- Une fiche signalétique de sécurité à l'usage de l'utilisateur professionnel est disponible sur demande.
- Ne pas réutiliser les réactifs, sauf si la réutilisation est explicitement autorisée!
- Éviter la contamination croisée des échantillons car cela peut entraîner des résultats erronés.
- Les spécimens ne doivent pas être laissés sécher pendant les étapes d'hybridation et de lavage.
- La sonde DAPI/DuraTect-Solution (MT7) ne doit pas être exposée à la lumière, en particulier à une lumière intense, pendant longtemps ; c'est-à-dire que chaque étape doit être effectuée, si possible, dans l'obscurité et/ou en utilisant des récipients opaques !

Étiquetage spécial de l'ES1 :

EUH208	Contient de la pepsine A. Peut provoquer une réaction allergique
EUH210	Fiche de données de sécurité disponible sur demande.

Mentions de danger et conseils de prudence pour PT1, WB1 et WB2 :

Le composant dangereux déterminant est un mélange de 5-chloro-2-méthyl-4-isothiazoline-3-one [EC n° 247-500-7] et 2-méthyl-2H-isothiazol-3-one [EC n° 220-239-6] (3:1).



Avertissement

H317	Peut provoquer une allergie cutanée.
P261	Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols.
P272	Les vêtements de travail contaminés ne devraient pas sortir du lieu de travail.
P280	Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
P302+P352	EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: Laver abondamment à l'eau.
P333+P313	En cas d'irritation ou d'éruption cutanée: Demander un avis médical/Consulter un médecin.
P362+P364	Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation.

7. Restrictions

- Destiné à une utilisation en diagnostic *in vitro*.
- Destiné à un usage professionnel uniquement.
- Pour une utilisation non automatisée uniquement.
- L'interprétation clinique de toute coloration positive, ou de son absence, doit prendre en compte le contexte l'historique clinique, de la morphologie, d'autres critères histopathologiques ainsi que d'autres tests de diagnostic. Il est de la responsabilité d'un médecin pathologiste/généticien qualifié de se familiariser avec les sondes HIS, les réactifs, les panels de diagnostic et les méthodes utilisées pour le marquage des échantillons. Le marquage doit être effectué dans un laboratoire certifié et agréé, sous la supervision d'un pathologiste/généticien qui est responsable de l'examen des lames

colorées et de la vérification de l'adéquation des contrôles positifs et négatifs.

- La coloration de l'échantillon, en particulier l'intensité du signal et le bruit de fond, dépend de la manipulation et de la préparation de l'échantillon avant marquage. Une mauvaise fixation, congélation, décongélation, un mauvais lavage, séchage, chauffage, de mauvaises coupes, ou une contamination avec d'autres échantillons ou fluides peut produire des artefacts et de faux résultats. Des résultats incohérents peuvent résulter des variations des méthodes de fixation et d'inclusion, ainsi que des irrégularités inhérentes à l'échantillon.
- Les performances ont été validées en utilisant les procédures décrites dans le mode d'emploi de la sonde ZytoVision et du kit d'implémentation) respectifs. Des modifications de ces procédures peuvent altérer les performances et doivent être validées par l'utilisateur. Ce produit IVD est uniquement certifié CE lorsqu'il est utilisé comme décrit dans ce mode d'emploi pour une utilisation dans le cadre de l'utilisation prévue.

8. Substances interférentes

Les globules rouges présents dans l'échantillon peuvent présenter une auto-fluorescence qui entrave la reconnaissance du signal.

Les fixateurs suivants sont incompatibles avec la FISH :

- Fixateur de Bouin
- Fixateur B5
- Fixateurs acides (par exemple l'acide picrique)
- Fixateur de Zenker
- Alcools (lorsqu'ils sont utilisés seuls)
- Chlorure de mercure
- Fixateur formaldéhyde/zinc
- Fixateur de Hollande
- Formol non tamponné

9. Préparation des échantillons

Recommandations:

- Fixation dans 10 % de formol tamponné pendant 24 h à température ambiante (18 à 25 °C)
- Taille de l'échantillon $\leq 0,5 \text{ cm}^3$.
- Utiliser de la paraffine de bonne qualité
- L'inclusion doit être faite à une température inférieure à 65 °C.
- Préparer des sections de 2-4 μm .
- Utiliser des lames pour microscope chargées positivement
- Fixer pendant 2 à 16h à 50-60 %.

10. Traitement préparatoire du produit

25 x Wash Buffer A (WB2) doivent être prétraités conformément aux instructions dans 11.2, « Protocole - 2e jour». Tous les autres réactifs du kit sont prêts à l'emploi. Il n'est pas nécessaire de le reconstituer, le mélanger ou le diluer.

11. Protocole

11.1 1^{er} jour

Étapes préparatoires

1. *Préparation de deux séries d'éthanol (solutions d'éthanol à 70 %, 90 % et 100 %) :* Diluer de l'éthanol à 100 % avec de l'eau distillée ou déminéralisée. Ces solutions peuvent être stockées dans des récipients appropriés et peuvent être réutilisées.
2. *Heat Pretreatment Solution Citric (PT1) :* Chauffer à 98 °C.
3. *Wash Buffer SSC (WB1) :* Amener à température ambiante (TA). **WB1** peut former des précipités à 2-8°C, qui n'affectent pas la qualité et devraient se dissoudre lorsqu'ils sont chauffés
4. *ZytoLight FISH Probe:* Amener à TA avant utilisation, à l'abri de la lumière.

Facultatif, lors de l'étape de post-fixation :

*(vivement recommandé si la fixation des tissus n'est pas optimale)
Préparer une solution de Formaldéhyde 1 % à l'aide du Formaldehyde Dilution Buffer Set (PT-0006-100)*

Prétraitement (déparaffinage/protéolyse)

1. Effectuer l'incubation des lames pendant 10 min à 70 °C (par ex., sur une assiette chaude).
2. Effectuer l'incubation des lames pendant 2 x 10 min dans du xylène.
3. Effectuer l'incubation dans de l'éthanol à 100 %, 100 %, 90 %, et 70 % ethanol, pendant 5 min pour chaque.
4. Laver 2 x 2 min dans de l'eau distillée ou déminéralisée.
5. Effectuer l'incubation pendant 15 min dans la Heat Pretreatment Solution Citric (PT1) préchauffée, à 98 °C.

Il n'est pas recommandé d'utiliser plus de huit lames par cuve à coloration.

6. Transférer les lames immédiatement dans l'eau distillée ou déminéralisée, laver pendant 2 x 2 min et drainer ou éponger l'eau.
7. Appliquer (en gouttelettes) la Pepsin Solution (ES1) aux échantillons et effectuer l'incubation pendant 15 min à 37 °C dans une chambre humide.

ES1 peut former des précipités qui n'affectent pas la qualité du produit.

En fonction de plusieurs facteurs, tels que la nature et la durée de fixation, l'épaisseur des sections, et la nature des tissus/cellules, différents temps d'incubation peuvent être nécessaires. Nos recommandations en matière d'incubation consistent à recommander un temps d'incubation de 2 à 30 min pour les échantillons de tissus et 2 à 15 min pour les échantillons de cellules. En règle générale, nous recommandons de déterminer le temps optimal pour la protéolyse dans des tests préliminaires.

8. Laver pendant 5 min dans le Wash Buffer SSC (WB1).

Facultatif, lors de l'étape de post-fixation

Effectuer l'incubation des lames pendant 15 min dans une solution de Formaldéhyde 1 % et laver ensuite pendant 5 min dans le Wash Buffer SSC (WB1).

9. Laver pendant 1 min dans de l'eau distillée ou déminéralisée
10. Déshydratation : dans l'éthanol à 70 %, 90 % et 100 % pendant 1 min.
11. Sécher à l'air les sections.

Remarque : Il faut s'assurer de sécher complètement les sections avant l'application de la sonde car des traces d'humidité pourraient réduire l'intensité du signal et/ou modifier la morphologie des tissus

Dénaturation et hybridation

1. Mettre 10 µl de ZytoLight FISH Probe sur chaque échantillon pré-traité.

Éviter une longue exposition de la sonde à la lumière

2. Couvrir les échantillons avec des lamelles de 22 mm x 22 mm (en évitant les bulles) et sceller les lamelles.

Nous recommandons d'utiliser un ciment caoutchouc (par exemple le Fixogum) pour sceller..

3. Placer les lames sur une plaque chauffante ou dans un système d'hybridation pour dénaturer les échantillons pendant 10 min à 75 °C.
4. Transférer les lames dans une chambre humide et hybrider toute la nuit à 37 °C (par exemple dans un four à hybridation).

Il est essentiel que les échantillons ne sèchent pas pendant l'étape d'hybridation.

11.2 2e jour

Étapes préparatoires

1. Préparation de 1 x Wash Buffer A : Diluer 1 volume des 25x Wash Buffer A (WB2) avec 24 volumes d'eau distillée ou déminéralisée. Remplir trois cuves à coloration avec le 1 x tampon de lavage A et le préchauffer à 37 °C.

Le 1x Wash Buffer A dilué est stable pendant une semaine lorsqu'il est conservé à 2-8°C.

2. DAPI/DuraTect-Solution (MT7) : Amener à température ambiante avant utilisation, à l'abri de la lumière.

Post-hybridation et détection

1. Retirer délicatement la colle ou la colle caoutchouc.
2. Retirer la lamelle en la plongeant dans 1 x Wash Buffer A à 37 °C pendant 1 à 3 min.
3. Laver à l'aide de 1 x Wash Buffer A pendant 2x 5 min à 37 °C.

Le 1x Wash Buffer A doit être préchauffé. Vérifier avec un thermomètre si nécessaire.

4. Effectuer l'incubation des lames dans de l'éthanol à 70 %, 90 % et 100 %, pendant 1 min pour chaque.
5. Sécher à l'air les échantillons à l'abri de la lumière.
6. Mettre 25 µl de DuraTect/DAPI-Solution (MT7) sur les lames. Couvrir les échantillons avec une lamelle (24 mm x 60 mm) en évitant les bulles. Effectuer l'incubation dans l'obscurité pendant 15 min.

L'utilisation d'un embout de pipette qui a été coupé afin d'augmenter la taille de l'ouverture peut simplifier le processus de pipetage. Éviter une longue exposition de la sonde à la lumière.

7. Stocker la lame dans le noir. Pendant des périodes de stockage plus longues, cela doit se faire entre 2 et 8 °C.
8. L'évaluation de l'échantillon est réalisée par microscopie à fluorescence. Les sets de filtres pour les plages de longueurs d'onde suivantes sont requis :

Colorant fluorescent	Excitation	Émission
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. Interprétation des résultats

Avec l'utilisation de sets de filtres appropriés en interphases ou métaphases des cellules normales ou des cellules sans aberrations des chromosomes, deux signaux par sonde/marque en fluorescence apparaissent, à l'exception des sondes ciblant les chromosomes X et/ou Y, ayant pour résultat zéro à deux signaux par sonde/marque en fluorescence, en fonction du sexe. Dans les cellules présentant des aberrations chromosomiques, un motif de signaux différent peut être visible en interphases ou métaphases. Pour obtenir plus de renseignements sur l'interprétation des résultats, consulter le manuel de sonde respectif.

13. Procédures de contrôle qualité recommandées

Reportez-vous aux instructions d'utilisation de la sonde ZytoVision correspondante.

14. Caractéristiques de performances

Reportez-vous aux instructions d'utilisation de la sonde ZytoVision correspondante.

15. Élimination

L'élimination des réactifs doit être effectuée conformément à la réglementation locale.

16. Assistance

Tout écart par rapport au mode d'emploi peut conduire à des résultats de coloration inférieurs ou à aucune coloration du tout. Pour plus d'informations, veuillez consulter le site www.zytovision.com.

Faible signal ou aucun signal

Cause possible	Action
L'échantillon de cellules ou de tissu n'est pas correctement fixé	Optimiser le temps de fixation et le fixateur ou appliquer une étape de post-fixation comme décrit dans la « procédure d'essai » du manuel du kit <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</u> .

