



ZytoDot CISH Implementation Kit

REF C-3018-40

40

Til bruk i prosedyrer for kromogen *in situ*-hybridisering
(CISH)

4250380N397Z



In vitro diagnostisk medisinsk utstyr
i henhold til IVDR (EU) 2017/746

1. Beregnet bruk

ZytoDot CISH Implementation Kit er beregnet til å brukes i kombinasjon med digoksigeninmerkede ZytoDot-sonder på formalinfikserte, parafininnstøpte prøver ved hjelp av kromogen *in situ*-hybridisering (CISH).

Produktet er kun beregnet til profesjonell bruk. Alle tester som bruker produktet skal utføres i et sertifisert, lisensiert anatomisk patologilaboratorium av kvalifisert personell og under tilsyn av en patolog/humangenetiker.

2. Testprinsipp

Den kromogene *in situ* hybridiseringsteknikken (CISH) tillater påvisning og visualisering av spesifikke nukleinsyresekvenser i cellepreparater. Haptenmerkede nukleotidfragmenter, såkalte CISH-sonder, og deres komplementære målsekvenser i preparatene ko-denatureres og får deretter anneale under hybridisering. Deretter fjernes uspesifikke og ubundne sondefragmenter med stringent vasketrinn. Dupleksdannelse av den merkede sonden kan visualiseres ved å bruke primære (umerkede) antistoffer, som påvises av sekundære polymeriserte enzymkonjugerte antistoffer. Den enzymatiske reaksjonen med kromogene substrater fører til dannelse av fargede utfellinger. Etter å ha motfarget kjernen med et nukleært fargestoff, blir hybridiserte sondefragmenter visualisert ved lysmikroskopi.

3. Reagenser som følger med

ZytoDot CISH Implementation Kit er tilgjengelig i én størrelse og består av:

Kode	Komponent	Mengde	Beholder
		Σ 40	
PT2	Heat Pretreatment Solution EDTA	500 ml	Flaske med skruhet (stor)
ES1	Pepsin Solution	4 ml	Dråpeflaske, hvit hette
WB1	Wash Buffer SSC	560 ml	Flaske med skruhet (stor)
WB4	PBS/Tween	2x	Aluminiumspakke
BS1	Blocking Solution	4 ml	Dråpeflaske, oransje hette
AB1	Mouse Anti-Dig	4 ml	Dråpeflaske, rosa hette
AB2	Anti-Mouse-HRP-Polymer	4 ml	Dråpeflaske, fiolett hette
SB1a	DAB Solution A	0,3 ml	Dråpeflaske, grønn hette
SB1b	DAB Solution B	10 ml	Dråpeflaske, grå hette
CS1	Mayer's Hematoxylin Solution	20 ml	Flaske med skruhet, svart
MT4	Mounting Solution (alcoholic)	4 ml	Glassflaske, brun
	Bruksanvisning	1	

C-3018-40 (40 tester): Komponentene **ES1**, **BS1**, **AB1**, **AB2**, **SB1a-b**, **CS1** og **MT4** er tilstrekkelig til 40 reaksjoner. Komponent **PT2** er tilstrekkelig for 7 fargingsbeholdere på 70 ml hver. Komponent **WB1** er tilstrekkelig for 8 fargingsbeholdere på 70 ml hver. Komponent **WB4** er tilstrekkelig til 28 fargingsbeholdere på 70 ml hver.

4. Materialer som kreves, men som ikke medfølger

- ZytoDot CISH-sonde
- Positivt og negativt kontrollvev
- Mikroskopobjektglass, positivt ladet
- Vannbad (80 °C, 98 °C)
- Hybridiseringsenhet eller varmeplate
- Hybridiseringsenhet eller fuktighetskammer i hybridiseringsovn
- Justerbare pipetter (10 µl, 1000 µl)
- Fargekrukker eller -bad
- Tidsur
- Kalibrert termometer
- Etanol eller reagensalkohol
- Xylen
- Metanol 100 %
- Hydrogenperoksid (H₂O₂) 30 %
- Avionisert eller destillert vann
- Dekkglass (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Gummisement, f.eks. Fixogum Rubber Cement (Prod. nr. E-4005-50/-125) eller lignende
- Tilstrekkelig vedlikeholdt lysmikroskop (400-630x)

5. Oppbevaring og håndtering

Oppbevares ved 2–8 °C i oppreist stilling. Returneres til lagringsbetingelsene umiddelbart etter bruk. Ikke bruk reagenser etter utløpsdato angitt på etiketten. Produktet er stabilt til utløpsdato angitt på etiketten ved riktig håndtering.

6. Advarsler og forholdsregler

- Les bruksanvisningen før bruk!
- Ikke bruk reagensene etter at utløpsdatoen er nådd!
- Dette produktet inneholder stoffer (i lave konsentrasjoner og volumer) som er helseskadelige. Unngå all direkte kontakt med reagensene. Iverksett egnede beskyttelsestiltak (bruk engangshansker, vernebriller og laboratoriekjør!)
- Rapport alle alvorlige hendelser som har forekommet i forhold til produktet til produsenten og den kompetente myndigheten i henhold til lokale forskrifter!
- Hvis reagenser kommer i kontakt med huden, må huden skylles umiddelbart med rikelige mengder vann!
- Et sikkerhetsdatablad er tilgjengelig på forespørsel for profesjonelle brukere.
- Ikke gjenbruk reagenser, med mindre gjenbruk er uttrykkelig tillatt!

- Unngå krysskontaminering av prøver da dette kan føre til feil resultater.
- Prøvene må ikke få tørke under hybridiserings- og vasketrinnene.

Fare- og sikkerhetssetninger for BS1, AB1, AB2, PT2 og WB1:

Den farebestemmende komponenten er en blanding av: 5-klor-2-metyl-4-isotiazolin-3-on [EF-nr. 247-500-7] og 2-metyl-2H-isotiazol-3-on [EF-nr. 220-239-6] (3:1).



Advarsel

H317	Kan utløse en allergisk hudreaksjon.
P261	Unngå innånding av støv/røyk/gass/tåke/damp/aerosoler.
P272	Tilsølte arbeidsklær må ikke fjernes fra arbeidsplassen.
P280	Benytt vernehansker/verneklær/øyevern/ansiktsvern.
P302+P352	VED HUDKONTAKT: Vask med mye vann.
P333+P313	Ved hudirritasjon eller utslett: Søk legehjelp.
P362+P364	Tilsølte klær må fjernes og vaskes før bruk.

Fare- og sikkerhetssetninger for SB1a:

Den farebestemmende komponenten er bifeny-3,3',4,4'tetrayltetraamin; diaminobenzidin.



Fare

H350	Kan forårsake kreft.
P201	Innhent særskilt instruks før bruk.
P202	Skal ikke håndteres før alle advarsler er lest og oppfattet.
P280	Benytt vernehansker/verneklær/øyevern/ansiktsvern.
P308+P313	Ved eksponering eller mistanke om eksponering: Søk legehjelp.
P405	Oppbevares innelåst.

Fare- og sikkerhetssetninger for SB1b:

Den farebestemmende komponenten er imidazol; en reaksjonsmasse av: 5-klor-2-metyl-4-isotiazolin-3-on [EF-nr. 247-500-7] og 2-metyl-2H-isotiazol-3-on [EF-nr. 220-239-6] (3:1).



Fare

H317	Kan utløse en allergisk hudreaksjon.
H360D	Kan gi fosterskader.
P201	Innhent særskilt instruks før bruk.
P261	Unngå innånding av støv/røyk/gass/tåke/damp/aerosoler.
P280	Benytt vernehansker/verneklær/øyevern/ansiktsvern.
P302+P352	VED HUDKONTAKT: Vask med mye vann.
P308+P313	Ved eksponering eller mistanke om eksponering: Søk legehjelp.
P362+P364	Tilsølte klær må fjernes og vaskes før bruk.

Fare- og sikkerhetssetninger for MT4:

Den farebestemmende komponenten er xylen.



Advarsel

H226	Brannfarlig væske og damp.
H312+H332	Farlig ved hudkontakt eller innånding.
H315	Irriterer huden.
H319	Forårsaker alvorlig øyeirritasjon.
H335	Kan forårsake irritasjon av luftveiene.
H373	Kan forårsake organskader ved langvarig eller gjentatt eksponering.
P210	Holdes vekk fra varme, varme overflater, gnister, åpen ild og andre antenningskilder. Røyking forbudt.
P260	Ikke innånd støv/røyk/gass/tåke/damp/aerosoler.
P280	Benytt vernehansker/verneklær/øyevern/ansiktsvern.
P305+P351+P338	VED KONTAKT MED ØYNENE: Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser dersom dette enkelt lar seg gjøre. Fortsett skyllingen.
P337+P313	Ved vedvarende øyeirritasjon: Søk legehjelp.
P403+P235	Oppbevares på et godt ventilert sted. Oppbevares kjølig.
EUH208	Inneholder metyl 2-metylprop-2-enoat; metyl 2-metylpropenoat; metylmetakrylat. Kan gi en allergisk reaksjon.

Fare- og sikkerhetssetninger for CS1 og WB4:

Dette produktet er ikke klassifisert som farlig i henhold til forordning (EF) nr. 1272/2008.

Spesiell merking for ES1:

EUH208	Inneholder Pepsin A. Kan gi en allergisk reaksjon.
EUH210	Sikkerhetsdatablad er tilgjengelig på anmodning.

7. Begrensninger

- Til *in vitro* diagnostisk bruk.
- Kun til profesjonell bruk.
- Kun til ikke-automatisert bruk.
- Den kliniske tolkningen av enhver positiv farging, eller fravær av dette, må gjøres innenfor konteksten av klinisk historie, morfologi, andre histopatologiske kriterier og andre diagnostiske tester. Det er en kvalifisert patolog/humangenetikers ansvar å være kjent med ISH-sondene, reagensene, diagnosepanelene og metodene som brukes til å produsere det fargede preparatet. Farging må utføres i et sertifisert, lisensiert laboratorium under tilsyn av en patolog/humangenetiker som er ansvarlig for å gjennomgå de fargede objektglassene og sørge for adekvate positive og negative kontroller.
- Prøvefarging, spesielt signalintensitet og bakgrunnsfarging, avhenger av håndtering og behandling av prøven før farging. Feil fiksering, frysing, tining, vasking, tørking, oppvarming, oppdeling eller kontaminering med andre prøver eller væsker kan gi artefakter eller falske resultater. Inkonsistente resultater kan skyldes variasjoner i fikserings- og innstøpingsmetoder og iboende uregelmessigheter i prøven.
- Informasjon om materialer som kreves til ISH-prosedyrer finnes i bruksanvisningen for den respektive ZytoVision-sonden og implementeringssettet. Endringer i disse prosedyrene kan endre ytelsen og må valideres av brukeren. Denne IVDen er kun sertifisert som CE når den brukes som beskrevet i denne bruksanvisningen innenfor rammen av beregnet bruk.

8. Forstyrrende stoffer

Følgende fikseringsmidler er uforenlige med ISH:

- Bouins fikseringsmiddel
- B5 fikseringsmiddel
- Sure fikseringsmidler (f.eks. pikrinsyre)
- Zenkers fikseringsmiddel
- Alkoholer (når de brukes alene)
- Kvikksølvklorid
- Formaldehyd/sinkfiksativ
- Hollandes fikseringsmiddel
- Ikke-bufret formalin

9. Klargjøring av prøver

Anbefalinger:

- Unngå krysskontaminering av prøver i ethvert klargjøringstrinn, da dette kan føre til feil resultater.
- Fiksering i 10 % nøytralt bufret formalin i 24 timer ved romtemperatur (18–25 °C).
- Prøvestørrelse ≤ 0,5 cm³.
- Bruk parafin av høy kvalitet.
- Innstøping bør utføres ved temperaturer lavere enn 65 °C.
- Klargjør 3–5 µm mikrotomseksjoner.
- Bruk positivt ladede objektglass.
- Fikser vevsseksjoner i 2–16 timer ved 50–60 °C.

10. Forberedende behandling av enheten

PBS/Tween (WB4) skal forbehandles i samsvar med instruksjonene i 11. «Analyseprosedyre». Alle andre reagenser i settet er klare til bruk. Ingen rekonstituering, blanding eller fortyning er nødvendig.

11. Analyseprosedyre

11.1 Dag 1

Klargjøringstrinn

- (1) *Klargjør en etanolserie (70 %, 90 % og 100 % etanoløsninger):* Fortynn 100 % etanol med avionisert eller destillert vann. Disse løsningene kan oppbevares i egnede beholdere og kan brukes på nytt.
- (2) Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2): Varm opp til 98 °C i en tildekt fargingsbeholder.
- (3) *Klargjøring av 3 % H₂O₂*: Fortynn 1 del 30 % H₂O₂ i 9 deler 100 % metanol.
- (4) *ZytoDot CISH-sonde*: Bring til romtemperatur før bruk.

Forbehandling (avoksing/proteolyse)

- (1) Inkuber objektglassene i 10 minutter ved 70 °C (f.eks. på en varmeplate).
- (2) Inkuber objektglassene i 2x 5 min i xylen.
- (3) Inkuber objektglassene i 3x 3 min i 100 % etanol.
- (4) Inkuber objektglassene i 5 min i 3 % H₂O₂.
- (5) Vask objektglassene 2x 1 min i avionisert eller destillert vann.
- (6) Inkuber i 15 min i en forvarmet Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2) ved 98 °C.

Bruk åtte objektglass per fargingsbeholder (legg til tomt objektglass ved behov).

- (7) Overfør objektglassene umiddelbart til avionsert eller destillert vann og vask i 2x 2 min.
- (8) Påfør (dråpevis) Pepsin Solution (ES1) i prøven og inkuber i 5–15 min ved 37 °C i et fuktighetskammer.

ES1 kan danne bunnfall, som ikke påvirker kvaliteten. Som en generell regel anbefaler vi å fastslå optimal tid for proteolyse i forhåndstester.

- (9) Senk objektglassene ned i avionisert eller destillert vann.
- (10) Dehydrer i: 70 %, 90 % og 100 % etanol, hver i 1 min.
- (11) Lufttørk seksjonene.

Merk: Sørg for å lufttørke seksjonene helt før sondeapplisering.

Denaturering og hybridisering

- (1) Pipetter 10 µl av *ZytoDot CISH*-sonden på hver forbeholdt prøve.
- (2) Dekk prøver med et 22 mm x 22 mm dekkglass (unngå fastklemt bobler) og forsegl dekkglasset.

Vi anbefaler å bruke gummisement (f.eks. Fixogum) for tetting.

- (3) Plasser objektglassene på en varmeplate eller hybridiseringsenhet og denaturer prøvene i 5 minutter ved 94–95 °C.

- (4) Overfør objektglassene til et fuktighetskammer og hybridiser over natten ved 37 °C (f.eks. i en hybridiseringsovn).

Det er viktig at prøvene ikke tørker ut under hybridiseringstrinnet.

11.2 Dag 2

Klargjøringstrinn

- (1) Wash Buffer SSC (WB1): For en stringent vask varmer du opp til 80 °C i en tildekt fargingsbeholder. **WB1** kan danne bunnfall ved 2–8 °C, noe som ikke påvirker kvaliteten og vil bli oppløst ved oppvarming.
- (2) *Klargjøring av Wash Buffer PBS/Tween*: Tilsett 1 tablett med PBS/Tween (WB4) i 1000 ml avionisert eller destillert vann og løs opp.
- (3) Blocking Solution (BS1), Mouse-Anti-DIG (AB1), Anti-Mouse-HRP-Polymer (AB2), DAB Solution A (SB1a), DAB Solution B (SB1b), Mayer's Hematoxylin Solution (CS1), Mounting Solution (alcoholic) (MT4): Bring til romtemperatur før bruk.

Post-hybridisering og påvisning

- (1) Fjern gummisementen eller limet varsomt.
- (2) Fjern dekkglasset ved å senke objektglassene ned i Wash Buffer SSC (WB1) ved romtemperatur i 5 min.

WB1 kan brukes på nytt én gang. Oppbevar ved 2–8 °C i høyst én uke.

- (3) Vask objektglassene i 5 min i Wash Buffer SSC (WB1) ved 80 °C.

Bruk åtte objektglass per fargingsbeholder (legg til tomt objektglass ved behov).

- (4) Vask objektglassene 2x 1 min i avionisert eller destillert vann.
- (5) Senk objektglassene ned i Wash Buffer PBS/Tween.
- (6) Påfør Blocking Solution (BS1) (1–2 dråper per objektglass) på objektglassene og inkuber i 10 min ved romtemperatur.
- (7) Tørk av Blocking Solution (BS1), **men skyl ikke!**
- (8) Påfør Mouse-Anti-DIG (AB1) (1–2 dråper per objektglass) på objektglassene og inkuber i 30 min ved romtemperatur.
- (9) Vask objektglassene 3x 1 min i PBS/Tween.
- (10) Påfør Anti-Mouse-HRP-Polymer (AB2) (1–2 dråper per objektglass) på objektglassene og inkuber i 30 min ved romtemperatur.
- (11) Vask objektglassene 3x 1 min i PBS/Tween.
- (12) Klargjør DAB Solution (arbeidsløsning): fyll 1 ml DAB Solution B (SB1b) i en gradinndelt kopp og tilsett én dråpe (30 µl) DAB Solution A (SB1a). Bland godt.
- (13) Påfør DAB Solution (1–2 dråper per objektglass) på objektglassene og inkuber i 30 min ved romtemperatur.
- (14) Overfør objektglassene til en fargingsbeholder og vask i 2 min under kaldt rennende vann fra springen.
- (15) Kontrastfarg prøvene i 5–10 sekunder med Mayer's Hematoxylin Solution (CS1).
- (16) Overfør objektglassene til en fargingsbeholder og vask i 2 min under kaldt rennende vann fra springen.
- (17) Dehydrer i: 70 %, 90 % og 100 % etanol, hver i 1 min.
- (18) Inkuber objektglassene i 2x 2 min i xylen (bruk svært rent xylen).
- (19) For å unngå luftbobler, dekk prøvene med et dekkglass (22 mm x 22 mm; 24 mm x 32 mm) ved bruk av Mounting Solution (alcoholic) (MT4). Vent i 20–30 min til dekkglasset blir immobilisert.

Bruk av en pipettespiss som er kuttet av for å øke størrelsen på åpningen, kan gjøre pipetteringsprosessen enklere.

- (20) Evaluer fargede prøver ved bruk av lysmikroskopi.

12. Tolkning av resultater

Ved bruk av ZytoDot CISH Implementation Kit vises hybridiserings signaler fra digoksigeninmerkede polynukleotider som brune til mørkebrune tydelige prikker. I interfaser eller metafaser av normale celler eller celler uten aberrasjoner i de undersøkte kromosomene oppstår to signaler per mål, bortsett fra sonder rettet mot X- eller Y-kromosomer, hvilket resulterer i to, null eller ett signal avhengig av kjønn og sonden som brukes. I celler med kromosomaberrasjoner kan et annet signalmønster være synlig i interfaser eller metafaser. Se bruksanvisningen for den relevante *ZytoDot CISH*-sonden for mer informasjon om resultatolkning.

13. Anbefalte kvalitetskontrollprosedyrer

Se bruksanvisningen for den respektive *ZytoVision*-sonden.

14. Ytelsesegenskaper

Se bruksanvisningen for den respektive *ZytoVision*-sonden.

15. Avfallsbehandling

Avfallsbehandling av reagenser må utføres i henhold til lokale forskrifter.

16. Feilsøking

Ethvert avvik fra bruksanvisningen kan føre til dårligere fargeresultater eller ingen farging i det hele tatt. Se www.zytovision.com for mer informasjon.

SVake signaler eller ingen signaler i det hele tatt

Mulig årsak	Handling
Proteolytisk forbehandling ikke utført riktig	Optimer pepsin-inkubasjonstiden, øk eller reduser om nødvendig
Sondefordampning	Ved bruk av hybridisator er bruk av de våte stripene/vannfylte tankene obligatorisk. Ved bruk av en hybridiseringsovn er det nødvendig med bruk av et fuktighetskammer. I tillegg bør dekkglasset forsegles fullstendig, f.eks. med Fixogum, for å forhindre uttørring av prøven under hybridisering
Utilstrekkelig klargjøring av kromogent substrat	I stedet for å bruke én dråpe DAB Solution A, bruk 30 µl
Motfargingstid for lang	Unngå mørk motfarging, fordi det kan skjule positive fargingssignaler
Blåning av motfarge ikke utført på riktig måte	Bruk kaldt rennende vann fra springen til å blåne; ikke bruk varmt eller varmt vann, eller blånende reagenser

Signalene er for sterke

Mulig årsak	Handling
Proteolytisk forbehandling utført for lenge	Optimer pepsin-inkubasjonstiden, øk eller reduser om nødvendig
Underlagets reaksjon er for intens	Forkort inkubasjonstiden for substratet; ikke varm opp substratløsningen til over 25 °C; inkuber kun ved romtemperatur

Signaler blekner eller smelter sammen

Mulig årsak	Handling
Det er brukt en uegnet monteringsløsning	Bruk kun monteringsløsningen som følger med settet eller xylenebaserte monteringsløsninger fri for urenheter; ikke bruk dekktepe

Ujevn eller til dels kun svært lett farging

Mulig årsak	Handling
Ufullstendig avvoksing	Bruk ferske løsninger; sjekk varigheten av avvoksingstidene
Reagensvolumet er for lite	Sørg for at reagensvolumet er stort nok til å dekke vevsområdet

Inkonsistente resultater

Mulig årsak	Handling
Utilstrekkelig tørking før sondepåføring	Forleng lufttørkingen
For mye vann/vaskebuffer på vev før påføring av pepsin, antistoffer og/eller fargesubstrater	Sørg for at overflødig væske fjernes fra vevsseksjonen ved å blotte eller riste det av objektglasset. Små mengder gjenværende vann/vaskebuffer forstyrrer ikke testen
Variasjoner i vevsfiksering og innstøpingsmetoder	Optimer fikserings- og innebyggingsmetoder

Variasjoner i vevsnittykkelse	Optimer seksjonering
-------------------------------	----------------------

Morfologi degradert

Mulig årsak	Handling
Celle- eller vevsprøve har ikke blitt ordentlig fiksert	Optimer fikseringstid og fikseringsmiddel
Proteolytisk forbehandling ikke utført for lenge	Reduser inkubasjonstiden for pepsin

Krysshybridiseringssignaler; støvende bakgrunn

Mulig årsak	Handling
Seksjoner tørket ut når som helst under eller etter hybridisering	Unngå at seksjoner tørkes ut; bruk fuktighetskammer; forsegle dekkglass ordentlig
Forlenget substratinkubasjonstid	Forkort inkubasjonstiden for substratet
Ufullstendig avvoksing	Bruk ferske løsninger; sjekk varigheten på avvoksing
Proteolytisk forbehandling for sterk	Optimer inkubasjonstiden for pepsin
Objektglass avkjølt til romtemperatur før hybridisering	Overfør objektglassene raskt til hybridiseringstemperatur

Overlappende signaler

Mulig årsak	Handling
Upassende tykkelse på vevsnitt	Forbered 3–5 µm mikrotomseksjoner

Prøven flyter av objektglasset

Mulig årsak	Handling
Proteolytisk forbehandling for sterk	Forkort inkubasjonstiden for pepsin

17. Litteratur

- Isola J, Tanner M (2004) *Methods Mol Med* 97: 133-44.
- Speel EJ, et al. (1994) *J Histochem Cytochem* 42: 1299-307.
- Tsukamoto T, et al. (1991) *Int J Dev Biol* 35: 25-32.
- Wilkinson DG: *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.

18. Revisjon



www.zytovision.com

Se www.zytovision.com for den nyeste bruksanvisningen samt for bruksanvisning på forskjellige språk.

Våre eksperter er tilgjengelige for å svare på dine spørsmål. Kontakt helptech@zytovision.com



ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/Tyskland
Telefon: +49 471 4832-300
Faks: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
E-post: info@zytovision.com

Varemerker:

ZytoVision® og ZytoDot® er varemerker for ZytoVision GmbH.