



ZytoDot CISH Implementation Kit

REF C-3018-40

För användning i kromogena *in situ*-hybridiseringsprocedurer (CISH)

4250380N397Z



Medicinteknisk produkt för in vitro diagnostik

i enlighet med IVDR (EU) 2017/746

1. Avsedd användning

ZytoDot CISH Implementation Kit är avsett för användning i kombination med digoxigenin-märkta ZytoDot Probes på formalinfixerade, paraffin-märkta specimen genom kromogen *in situ*-hybridisering (CISH).

Produkten är endast avsedd för professionell användning. Alla tester där produkten används ska genomföras i ett certifierat, licensierat laboratorium av kvalificerad personal under överinseende av en patolog/humangenetiker.

2. Testprincip

Tekniken för kromogen *in situ*-hybridisering (CISH) tillåter detektion och visualisering av specifika nukleinsyrasekvenser i cellberedningar. Hapten-märkta nukleotidfragment, så kallade CISH-prober, och deras komplementära målsekvenser i preparaten samdenatureras och tillåts därefter härda under hybridisering. Efteråt avlägsnas ospecifika och obundna probfragment genom tvättsteg för stringens. Duplexbildning av den märkta proben kan visualiseras med hjälp av primära (omärkta) antikroppar, som detekteras av sekundära polymeriserade enzymkonjugerade antikroppar. Den enzymatiska reaktionen med kromogena substrat leder till bildandet av färgade utfällningar. Efter motfärgning av cellkärnan med ett nukleärt färgämne visualiseras hybridiserade probfragment med ljusmikroskopi.

3. Tillhandahållen reagens

ZytoDot CISH Implementation Kit finns i en storlek och består av:

Kod	Komponent	Kvantitet	Behållare
		Σ 40	
PT2	Heat Pretreatment Solution EDTA	500 ml	Flaska med skruvlock (stor)
ES1	Pepsin Solution	4 ml	Droppflaska, vitt lock
WB1	Wash Buffer SSC	560 ml	Flaska med skruvlock (stor)
WB4	PBS/Tween	2x	Aluminium pack
BS1	Blocking Solution	4 ml	Droppflaska, orange lock
AB1	Mouse Anti-Dig	4 ml	Droppflaska, rosa lock
AB2	Anti-Mouse-HRP-Polymer	4 ml	Droppflaska, lila lock
SB1a	DAB Solution A	0,3 ml	Droppflaska, grönt lock
SB1b	DAB Solution B	10 ml	Droppflaska, grått lock
CS1	Mayer's Hematoxylin Solution	20 ml	Flaska med skruvlock, svart
MT4	Mounting Solution (alcoholic)	4 ml	Glasflaska, brun
	Bruksanvisning	1	

C-3018-40 (40 tester): Komponenterna **ES1**, **BS1**, **AB1**, **AB2**, **SB1a-b**, **CS1**, och **MT4** räcker till 40 reaktioner. Komponent **PT2** räcker till 7 färgningsburkar på 70 ml vardera. Komponent **WB1** räcker till 8 färgningsburkar på 70 ml vardera. Komponent **WB4** räcker för 28 färgningsburkar på 70 ml vardera.

4. Material som krävs, men inte tillhandahålls

- ZytoDot CISH Probe
- Positiv och negativ kontrollvävnad
- Objektglas för mikroskopering, positivt laddade
- Vattenbad (80 °C, 98 °C)
- Hybridiserare eller varm platta
- Hybridiserare eller fukt-kammare i hybridiseringsugn
- Justerbara pipetter (10 µl, 1000 µl)
- Färgningsburkar eller -bad
- Timer
- Kalibrerad termometer
- Etanol eller reagensalkohol
- Xylen
- Metanol 100 %
- Väteperoxid (H₂O₂) 30 %
- Avjoniserat eller destillerat vatten
- Täckglas (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Gummiment, t.ex. Fixogum Rubber Cement (art. nr E-4005-50/-125) eller dylikt
- Adekvat underhållet ljusmikroskop (400-630x)

5. Förvaring och hantering

Förvaras vid 2-8 °C i upprätt läge. Återgå till förvaringsförhållanden omedelbart efter användning. Använd inte reagens efter det utgångsdatum som anges på etiketten. Produkten är stabil fram till det utgångsdatum som anges på etiketten om den hanteras i enlighet med denna.

6. Varningar och försiktighetsåtgärder

- Läs instruktionerna före användning!
- Använd inte reagenserna efter utgångsdatumet!
- Produkten innehåller ämnen (i låga koncentrationer och volymer) som är hälsovådliga. Undvik varje direktkontakt med reagens. Vidta lämpliga skyddsåtgärder (använd engångshandskar, skyddsglasögon och labbkläder)!
- Rapportera alla allvarliga incidenter som inträffat i samband med produkten till tillverkaren och den behöriga myndigheten enligt lokala bestämmelser!

- Om reagens kommer i kontakt med huden, skölj genast huden med rikliga mängder vatten!
- Ett materialsäkerhetsdatablad finns tillgängligt för den professionella användaren på begäran.
- Återanvänd inte reagens, såvida inte återanvändning uttryckligen tillåts!
- Undvik korskontaminering av prov eftersom detta kan leda till felaktiga resultat.
- Specimen får inte tillåtas torka under hybridiserings- och torkningsstegen.

Faro- och skyddsangivelser för BS1, AB1, AB2, PT2, och WB1:

Den farobestämmande komponenten är en blandning av: 5-kloro-2-metyl-4-isotiazolin-3-on [EG-nr 247-500-7] och 2-metyl-2H-isotiazol-3-on [EG-nr 220-239-6] (3:1).



Varning

H317	Kan orsaka en allergisk hudreaktion.
P261	Undvik att inandas damm/rök/gaser/mist/ångor/sprej.
P272	Kontaminerade arbetskläder får inte avlägnas från arbetsplatsen.
P280	Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd.
P302+P352	VID HUDKONTAKT: Tvätta med mycket tvål och vatten.
P333+P313	Vid hudirritation eller utslag: Sök läkarhjälp.
P362+P364	Kontaminerade kläder tas av och tvättas innan de används igen.

Faro- och skyddsangivelser för SB1a:

Den farobestämmande komponenten är bifenyl-3,3',4,4'tetrayltetraamin; diaminobensidin.



Fara

H350	Kan orsaka cancer.
P201	Inhämta särskilda instruktioner före användning.
P202	Använd inte förrän du läst och förstått säkerhetsanvisningarna.
P280	Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd.
P308+P313	Vid exponering eller misstanke om exponering: Sök läkarhjälp.
P405	Förvaras inlåst.

Faro- och skyddsangivelser för SB1b:

Den farobestämmande komponenten är imidazol; en reaktionsblandning av: 5-kloro-2-metyl-4-isotiazolin-3-on [EG-nr 247-500-7] och 2-metyl-2H-isotiazol-3-on [EG-nr 220-239-6] (3:1).



Fara

H317	Kan orsaka en allergisk hudreaktion.
H360D	Kan skada det ofödda barnet.
P201	Inhämta särskilda instruktioner före användning.
P261	Undvik att inandas damm/rök/gaser/mist/ångor/sprej.
P280	Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd.
P302+P352	VID HUDKONTAKT: Tvätta med mycket tvål och vatten.
P308+P313	Vid exponering eller misstanke om exponering: Sök läkarhjälp.
P362+P364	Kontaminerade kläder tas av och tvättas innan de används igen.

Faro- och skyddsangivelser för MT4:

Den farobestämmande komponenten är xylene.



Varning

H226	Brandfarlig vätska och ånga.
H312+H332	Giftigt vid hudkontakt eller inandning.
H315	Irriterar huden.
H319	Orsakar allvarlig ögonirritation.
H335	Kan orsaka irritation i andningsvägarna.
H373	Kan orsaka organskador genom långvarig eller upprepad exponering.
P210	Får inte utsättas för värme, heta ytor, gnistor, öppen låga eller andra antändningskällor. Rökning förbjuden.
P260	Inandas inte damm/rök/gaser/dimma/ångor/sprej.
P280	Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd.
P305+P351+P338	VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja.
P337+P313	Vid bestående ögonirritation: Sök läkarhjälp.
P403+P235	Förvaras på en väl ventilerad plats. Förvaras svalt.
EUH208	Innehåller metyl-2-metylprop-2-enoat; metyl-2-metylpropenoat; metylmetakrylat. Kan orsaka en allergisk reaktion.

Faro- och skyddsangivelser för CS1 och WB4:

Produkten klassificeras inte som farlig enligt förordning (EG) nr 1272/2008.

Specialmärkning av ES1:

EUH208	Innehåller Pepsin A. Kan orsaka en allergisk reaktion.
EUH210	Säkerhetsdatablad finns tillgängligt på förfrågan.

7. Begränsningar

- För *in vitro* diagnostisk användning.
- Endast för professionell användning.
- Endast för icke-automatiserad användning.
- Den kliniska tolkningen av varje positiv färgning, eller dess frånvaro, måste göras inom ramen för klinisk historia, morfologi, andra histopatologiska kriterier samt andra diagnostiska tester. Det är en kvalificerad patolog/humangenetikerns ansvar att vara förtrogen med ISH-proberna, reagensen, diagnostikpanelerna och metoderna som används för att framställa det färgade preparatet. Färgning måste utföras i ett certifierat, licensierat laboratorium under överinseende av en patolog/humangenetiker som ansvarar för att granska de färgade objektglasen och säkerställa att positiva och negativa kontroller är tillräckliga.
- Specimenfärgning, särskilt signalintensitet och bakgrundsfärgning, är beroende av hantering och bearbetning av specimen före färgning. Felaktig fixering, frysning, upptining, tvättning, torkning, uppvärmning, snittning eller kontaminering med andra specimen eller vätskor kan resultera i artefakter eller falska resultat. Inkonsekventa resultat kan orsakas av variationer i fixerings- och inbäddningsmetoder, såväl som från inneboende oregelbundenheter i specimen.
- Prestandan validerades med de procedurer som beskrivs i respektive ZytoVision-probs och -implementeringskits bruksanvisning. Ändringar av dessa procedurer kan förändra effekten, och måste valideras av användaren. Denna IVD är endast certifierad som CE när den används enligt beskrivningen i denna bruksanvisning för användning inom ramen för den avsedda användningen.

8. Störande ämnen

Följande fixativ är inkompatibla med ISH:

- Bouins fixativ
- B5-fixativ
- Sura fixativ (t.ex. pikrinsyra)
- Zenkers fixativ
- Alkoholer (vid användning ensamt)
- Kvicksilverklorid
- Formaldehyd/zinkfixativ
- Hollandes fixativ
- Obuffrad formalin

9. Förberedelse av specimen

Rekommendationer:

- Undvik korskontaminering av prov i något steg av förberedelsen, eftersom detta kan leda till felaktiga resultat.
- Fixation i 10 % neutralt buffrad formalin i 24 h vid rumstemperatur (18-25 °C).
- Provstorlek $\leq 0,5 \text{ cm}^3$.
- Använd paraffin av premiumkvalitet.
- Inbäddning ska utföras vid temperaturer under 65 °C.
- Förbered 3-5 μm mikrotomsnitt.
- Använd positivt laddade objektglas för mikroskopering.
- Fixera vävnadssnitt i 2-16 h vid 50-60 °C.

10. Förbehandling av enheten

PBS/Tween (WB4) ska förberedas enligt instruktionerna i 11. "Provförfarande". Alla andra satsreagenser är klara att använda. Det krävs ingen rekonstitution, blandning eller spädning.

11. Provförfarande

11.1 Dag 1

Förberedande steg

- (1) *Förbered en etanolserie (70 %, 90 % och 100 % etanollosningar):* Späd 100 % etanol med avjoniserat eller destillerat vatten. Lösningarna kan förvaras i lämpliga behållare och återanvändas.
- (2) Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2): Värm till 98 °C i en täckt färgningsburk.
- (3) *Förberedelse av 3 % H_2O_2* : Späd 1 del 30 % H_2O_2 i 9 delar 100 % metanol.
- (4) ZytoDot CISH Probe: Försätt i rumstemperatur (RT) före användning.

Förbehandling (avvaxning/proteolys)

- (1) Placera objektglaset i 10 min vid 70 °C (t.ex. på en varm platta).
- (2) Inkubera objektglaset i 2x 5 minuter i xylen.
- (3) Inkubera objektglaset i 3x 3 minuter i 100 % etanol.
- (4) Inkubera objektglaset i 5 min i 3 % H_2O_2 .
- (5) Tvätta objektglaset 2x 1 min i avjoniserat eller destillerat vatten.
- (6) Inkubera i 15 minuter i förvärmad Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2) vid 98 °C.

Använd åtta objektglas per färgningsburk (lägg till dummy-objektglas vid behov).

- (7) Överför objektglaset omedelbart till avjoniserat eller destillerat vatten och tvätta i 2x 2 minuter.
- (8) Applicera (droppvis) Pepsin Solution (ES1) till provet och inkubera i 5-15 minuter vid 37 °C i en fukt-kammare.

ES1 kan bilda fällningar som inte påverkar kvaliteten. Som en allmän regel rekommenderar vi att fastställa den optimala tiden för proteolys i förtester.

- (9) Doppa objektglaset i avjoniserat eller destillerat vatten.
- (10) Dehydrering i: 70 %, 90 % och 100 % etanol i 1 min. vardera.
- (11) Lufttorka snitten.

Notera: Se till att snitten är helt torra innan proven appliceras.

Denaturering och hybridisering

- (1) Pipettera 10 μl av ZytoDot CISH Probe på varje förbehandlat specimen.
- (2) Täck specimen med ett täckglas på 22 mm x 22 mm (undvik fångade bubblor) och tillslut täckglaset.

Vi rekommenderar att gummiment (t.ex. Fixogum) används för tillslutningen.

- (3) Placera objektglaset på en varm platta eller hybridiserare och denaturera specimen i 5 min vid 94-95 °C.
- (4) Överför objektglaset till en fukt-kammare och hybridisera över natten vid 37 °C (t.ex. i en hybridiseringsugn).

Det är viktigt att specimen inte torkar ut under hybridiseringssteget.

11.2 Dag 2

Förberedande steg

- (1) Wash Buffer SSC (WB1): För stringenstvätt, värm till 80 °C i en täckt färgningsburk. **WB1** kan bilda fällningar vid 2-8 °C, som inte påverkar kvaliteten och som ska lösas upp vid upphettning.
- (2) *Förberedelse av Wash Buffer PBS/Tween*: Tillsätt en tablett PBS/Tween (WB4) till 1000 ml avjoniserat eller destillerat vatten och lös upp den.
- (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): Försätt i rumstemperatur före användning.

Efterhybridisering och detektion

- (1) Ta försiktigt bort gummimentet eller limmet.
- (2) Ta bort täckglaset genom att sänka ned objektglaset i Wash Buffer SSC (WB1) vid rumstemperatur i 5 min.

WB1 kan återanvändas en gång. Förvaras vid 2-8 °C i högst en vecka.

- (3) Tvätta objektglaset 5 min i Wash Buffer SSC (WB1) i 80 °C.

Använd åtta objektglas per färgningsburk (lägg till dummy-objektglas vid behov).

- (4) Tvätta objektglaset 2x 1 min i avjoniserat eller destillerat vatten.
- (5) Sänk ned objektglaset i Wash Buffer PBS/Tween.
- (6) Applicera Blocking Solution (BS1) (1-2 droppar per objektglas) till objektglaset och inkubera i 10 min vid RT.
- (7) Torka av Blocking Solution (BS1), **men skölj intel**
- (8) Applicera Mouse-Anti-DIG (AB1) (1-2 droppar per objektglas) till objektglaset och inkubera i 30 min vid RT.
- (9) Tvätta objektglaset 3x 1 min i BS/Tween.
- (10) Applicera Anti-Mouse-HRP-Polymer (AB2) (1-2 droppar per objektglas) till objektglaset och inkubera i 30 min vid RT.
- (11) Tvätta objektglaset 3x 1 min i BS/Tween.
- (12) Förbered DAB Solution (arbetslösning): fyll i 1 ml DAB Solution B (SB1b) i en graderad kopp och tillsätt en droppe (30 μl) DAB Solution A (SB1a). Blanda ordentligt.
- (13) Applicera DAB Solution (1-2 droppar per objektglas) till objektglaset och inkubera i 30 min vid RT.
- (14) Överför objektglaset i en färgningsburk och tvätta 2 minuter under kallt rinnande kranvatten.
- (15) Motfärga specimen i 5-10 s med Mayer's Hematoxylin Solution (CS1).
- (16) Överför objektglaset i en färgningsburk och tvätta 2 minuter under kallt rinnande kranvatten.
- (17) Dehydrering i: 70 %, 90 % och 100 % etanol i 1 min. vardera.
- (18) Inkubera objektglaset i 2x 2 min i xylen (använd mycket ren xylen).
- (19) Undvik instängda bubblor, täck proven med ett täckglas (22 mm x 22 mm; 24 mm x 32 mm) genom användning av Mounting Solution (alcoholic) (MT4). Lagg 20-30 min så att täckglaset immobiliseras.

Användning av en pipettspets som skurits av för att öka storleken på öppningen kan förenkla pipetteringsprocessen.

- (20) Utvärdera färgade prover med ljusmikroskopi.

12. Tolkning av resultaten

Vid användning av ZytoDot CISH Implementation Kit, visas hybridiseringssignaler för Digoxigenin-märkta polynukleotider som brun-till mörkbrunfärgade distinkta punkter. I interfaser eller metafaser av normala celler eller celler utan avvikelser i de undersökta kromosomerna, kommer två signaler per mål att synas förutom målprober som är inriktade på X- eller Y-kromosomer, vilket resulterar i två, ingen eller en signaler beroende på könet och den använda proben. I celler med kromosomavvikelser kan ett annat signalmönster vara synligt i interfaser eller metafaser. För mer information om tolkning av resultat, se bruksanvisningen för respektive ZytoDot CISH Probe.

13. Rekommenderade procedurer för kvalitetskontroll

Se bruksanvisningen för respektive ZytoVision-prob.

14. Prestandaegenskaper

Se bruksanvisningen för respektive ZytoVision-prob.

15. Kassering

Reagensen måste avfallshanteras enligt lokala bestämmelser.

16. Felsökning

Eventuella avvikelser från instruktionerna för användning kan leda till osäkra färgningsresultat eller till att färgningen uteblir helt. Se www.zytovision.com för mer information.

Svaga signaler eller inga signaler alls

Möjlig orsak	Åtgärd
Proteolytisk förbehandling inte utförd ordentligt	Optimera inkubationstiden för pepsin, öka eller minska den efter behov
Provavdunstning	Vid användning av en hybridiserare är det obligatoriskt att använda de våta remsorna/vattenfyllda tankarna. Vid användning av en hybridiseringsugn krävs användning av en fukt-kammare. Dessutom bör täckglaset förslutas helt, t.ex. med Fixogum, för att förhindra att provet torkar ut under hybridisering
Otillräcklig förberedelse av kromogent substrat	Istället för att använda en droppe DAB-lösning A, använd 30 µl
Motfärgningstiden är för lång	Undvik mörk motfärgning, eftersom det kan skymma positiva färgningssignaler
Blåning av motfärgning inte korrekt utförd	Använd kallt rinnande kranvatten för blåning; använd inte varmt eller hett vatten eller blånande reagenser

Signaler för starka

Möjlig orsak	Åtgärd
Proteolytisk förbehandling utförd för länge	Optimera inkubationstiden för pepsin, öka eller minska den efter behov
Substratreaktion är för intensiv	Förkorta inkubationstiden för substrat; värm inte substratlösningen över 25 °C; inkubera endast i rumstemperatur

Signaler bleknar eller smälter samman

Möjlig orsak	Åtgärd
En olämplig monteringslösning har använts	Använd endast monteringslösningen som medföljer kitet eller xylenbaserade monteringslösningar som är fria från föroreningar; använd inte täckglastejp

Ojämn eller i vissa delar endast mycket lätt färgning

Möjlig orsak	Åtgärd
Ofullständig avväxning	Använd färska lösningar; kontrollera avväxningens varaktigheter
Reagensvolym för liten	Säkerställ att reagensvolymen är tillräckligt stor för att täcka vävnadsytan

Inkonsekventa resultat

Möjlig orsak	Åtgärd
Otillräcklig torkning före probapplicering	Förläng lufttorkningen
För mycket vatten/tvättbuffert på vävnaden innan applicering av pepsin, antikroppar och/eller färgsubstrat	Säkerställ att överflödigt vätska avlägsnas från vävnadssnittet genom att torka eller skaka av den från objektglaset. Små mängder kvarvarande vatten/tvättbuffert stör inte testet
Variationer i vävnadsfixations- och inbäddningsmetoder	Optimera fixations- och inbäddningsmetoder
Variationer i vävnadssnittstjockleken	Optimera snittningen

Morfologi degraderad

Möjlig orsak	Åtgärd
Cell- eller vävnadsprov har inte fixerats ordentligt	Optimera fixeringstid och fixativ
Proteolytisk förbehandling ej utförd för länge	Minska inkubationstiden för pepsin

Korshybridiserings signaler; ojämn bakgrund

Möjlig orsak	Åtgärd
Snitten torkade ut när som helst under eller efter hybridisering	Undvik att snitt torkar ut; använd fukt-kammare; tillslut täckglaset ordentligt
Förlängd inkubationstid för substrat	Förkorta inkubationstiden för substrat
Ofullständig avväxning	Använd färska lösningar; kontrollera avväxningens varaktighet
Proteolytisk förbehandling för stark	Optimera inkubationstiden för pepsin
Objektglaset kyls till rumstemperatur före hybridisering	Överför objektglaset snabbt till hybridiseringstemperatur

Överlappande signaler

Möjlig orsak	Åtgärd
Olämplig tjocklek på vävnadssnitt	Förbered 3-5 µm mikrotomsnitt

Specimen flyter av objektglaset

Möjlig orsak	Åtgärd
Proteolytisk förbehandling för stark	Korta av inkubationstiden för 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. Revision



www.zytovision.com

Se www.zytovision.com för den senaste bruksanvisningen samt för bruksanvisningar på olika språk.

Våra experter finns där för att svara på dina frågor.
Kontakta helptech@zytovision.com



ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/Tyskland
Telefonnummer: +49 471 4832-300
Faxnummer: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
E-postadress: info@zytovision.com

Varumärken:

ZytoVision® och ZytoDot® är varumärken som tillhör ZytoVision GmbH.