



ZytoLight
FISH-Cytology Implementation Kit

REF Z-2099-20 Σ 20

Til procedurer med fluorescens *in situ*-hybridisering
(FISH)

4250380N727X



Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik
i henhold til IVDR (EU) 2017/746

1. Anvendelsesformål

ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit er beregnet til brug i kombination med ZytoLight FISH-prober til cytologiske prøver med fluorescens *in situ*-hybridisering (FISH).

Produktet må kun anvendes af faguddannet personale. Alle test med produktet skal udføres af faguddannet personale på et certificeret, godkendt patolog-anatomisk laboratorium under supervision af en patolog/humangenetiker.

2. Testprincip

Med FISH-teknikken (fluorescens *in situ*-hybridisering) kan specifikke nukleinsyresekvenser i cellepræparater påvises og visualiseres. Fluorescensmærkede DNA-fragmenter, såkaldte FISH-prober, og deres komplementære DNA-streng i præparaterne co-denatureres og renatureres efterfølgende under hybridisering. Derefter fjernes uspecifikke og ubundne probefragmenter med stringente vasketrin. Efter kontrastfarvning af DNA'et med DAPI visualiseres hybridiserede probefragmenter med et fluorescensmikroskop med excitations- og emissionsfiltre, der er specifikke for de fluorokromer, FISH-probefragmenterne er direkte mærket med.

3. Leverede reagenser

ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit fås i én størrelse og består af:

Kode	Komponent	Mængde	Beholder
		Σ 20	
ES2	<u>Cytology Pepsin Solution</u>	4 ml	Pipetteflaske, gennemsigtigt låg
WB5	<u>20x Wash Buffer TBS</u>	50 ml	Flaske med skruelåg
PT4	<u>10x MgCl₂</u>	50 ml	Flaske med skruelåg
PT5	<u>10x PBS</u>	50 ml	Flaske med skruelåg
WB7	<u>Cytology Stringency Wash Buffer SSC</u>	500 ml	Flaske med skruelåg (stor)
WB8	<u>Cytology Wash Buffer SSC</u>	500 ml	Flaske med skruelåg (stor)
MT7	<u>DAPI/DuraTect-Solution</u>	0,8 ml	Reaktionsbeholder, blåt låg
	Brugsanvisning	1	

Z-2099-20 (20 test): Komponenterne **ES2** og **MT7** er tilstrækkelige til 20 reaktioner. Komponenterne **PT4**, **PT5**, **WB7** og **WB8** er tilstrækkelige til 7 farvebeholdere af 70 ml hver. Komponent **WB5** er tilstrækkelig til 14 farvebeholdere af 70 ml hver.

4. Nødvendige materialer, der ikke medfølger

- ZytoLight FISH-probe
- Positive og negative kontrolprøver
- Mikroskopobjektglas, ucoatede
- Vandbad (70 °C)
- Hybridizer eller varmeplade
- Hybridizer eller fugtighedskammer i hybridiseringsovn
- Justerbare pipetter (10 µl, 25 µl)
- Farvebeholdere eller -bade
- Timerur
- Kalibreret termometer
- Ethanol eller reagensalkohol
- 37 % formaldehyd, syrefri eller 10 % formalin, neutralt bufferet
- 2x saltvand-natriumcitrat (SSC), f.eks. fra 20x SSC Solution (prod. nr. WB-0003-50)
- Afioniseret eller destilleret vand
- Coverslips (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Gummiment, f.eks. Fixogum Rubber Cement (prod. nr. E-4005-50/-125) eller tilsvarende
- Tilstrækkeligt vedligeholdt fluorescensmikroskop (400-1000x)
- Immersionsolie godkendt til fluorescensmikroskopi
- Passende filtersæt

5. Opbevaring og håndtering

Opbevares lodret ved 2-8 °C. Derudover skal DAPI/DuraTect-Solution (MT7) opbevares et mørkt sted. Returneres til opbevaring umiddelbart efter brug. Reagenserne må ikke anvendes efter udløbsdatoen, som er angivet på etiketten. Produktet er stabilt indtil udløbsdatoen, som er angivet på etiketten, når det behandles korrekt.

6. Advarsler og forsigtighedsregler

- Læs brugsanvisningen før brug!
- Brug ikke reagenserne efter udløbsdatoen!
- Dette produkt indeholder stoffer (i lave koncentrationer og små mængder), som er sundhedsskadelige. Undgå direkte kontakt med reagenserne. Tag de nødvendige forholdsregler (brug engangshandsker, sikkerhedsbriller og laboratoriekitter)!
- Rapportér alle alvorlige hændelser i forhold til produktet til producenten og den kompetente myndighed i henhold til lokale regler!
- Hvis reagenserne kommer i kontakt med huden, skal der straks skylles med rigelige mængder vand!
- Der kan rekvireres et sikkerhedsdatablad til faguddannede brugere.
- Reagenserne må ikke genbruges, medmindre det udtrykkeligt er tilladt!

- Undgå krydskontaminering af prøver, da det kan føre til forkerte resultater.
- Prøverne må ikke tørre ud under hybridiserings- og vasketrinene.
- DAPI/DuraTect-Solution (MT7) må ikke udsættes for lys, især stærkt lys, i længere tid, dvs. alle trinene skal så vidt muligt udføres i mørke og/eller ved hjælp af lystætte beholdere!

Specialmærkning af ES2:

EUH210 Der kan rekvireres et sikkerhedsdatablad.
< 20 % af blandingen består af ingredienser med ukendt akut toksicitet (indånding).

Fare- og sikkerhedssætninger PT4, PT5, WB5, WB7 og WB8:

Den farebestemmende komponent er en blanding af: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EF nr. 247-500-7] og 2-methyl-2H-isothiazol-3-one [EF nr. 220-239-6] (3:1).



Advarsel

H317 Kan forårsage allergisk hudreaktion.
P261 Undgå indånding af pulver/røg/gas/tåge/damp/spray.
P272 Tilsmudset arbejdstøj bør ikke fjernes fra arbejdspladsen.
P280 Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjensbeskyttelse/ansigtsbeskyttelse.
P302+P352 VED KONTAKT MED HUDEN: Vask med rigeligt vand.
P333+P313 Ved hudirritation eller udslet: Søg lægehjælp.
P362+P364 Forurenet tøj tages af og vaskes, før det bruges igen.

Fare- og sikkerhedssætninger for MT7:

Dette produkt er ikke klassificeret som farligt i henhold til forordning (EF) nr. 1272/2008.

7. Begrænsninger

- Til *in vitro*-diagnostisk brug.
- Må kun anvendes af faguddannet personale.
- Kun til ikke-automatisk brug.
- Den kliniske fortolkning af positiv farvning eller fravær af positiv farvning skal udføres på baggrund af klinisk anamnese, morfologi, andre histopatologiske kriterier samt andre diagnostiske test. Det er en kvalificeret patologs/humangenetikers ansvar at være bekendt med de ISH-prober, reagenser, diagnostikpaneler og metoder, som anvendes til at producere det farvede præparat. Farvning skal udføres på et certificeret, godkendt laboratorium under supervision af en patolog/humangenetiker, som er ansvarlig for at gennemgå de farvede objektglas og sikre, at der er tilstrækkeligt med positive og negative kontroller.
- Farvningen af prøver, især signalintensitet og baggrundsfarvning, er afhængig af håndteringen og behandlingen af prøven før farvning. Forkert fiksering, nedfrysning, optøning, vask, tørring, opvarmning, snit eller kontaminering med andre prøver eller væsker kan give artefakter eller falske resultater. Inkonsekvente resultater kan skyldes variationer i fikserings- og indstøbningsmetoder samt uregelmæssigheder i selve prøven.
- Ydeevnen blev valideret med de procedurer, som er beskrevet i brugsanvisningen til den respektive ZytoVision-probe og -implementeringskit. Ændringer i disse procedurer kan ændre ydeevnen og skal valideres af brugeren. Dette *in vitro*-diagnostiske udstyr er kun certificeret som CE, når det anvendes som beskrevet i denne brugsanvisning og inden for anvendelsesformålet.

8. Interfererende stoffer

Røde blodlegemer i prøven kan udvise autofluorescens, som hindrer signalgenkendelse.

9. Præparering af prøver

Inkuber objektglassene i 2 min. i en 2x SSC-opløsning ved 73 °C umiddelbart før proteolyse til aldring.

Alternativt kan aldring af prøver opnås ved inkubation af prøver natten over (12-16 timer) ved 37 °C.

10. Forberedende behandling af produktet

20x Wash Buffer TBS (WB5), 10x MgCl₂ (PT4) og 10x PBS (PT5) skal forbehandles i henhold til anvisningerne i 11. "Analyseprocedure". Komponenterne (PT4) og (PT5) kan danne præcipitater ved 2-8°C. Opvarm, om nødvendigt før brug, til 37 °C i 10 min., indtil præcipitaterne er helt opløst. Alle andre kitreagenser er klar til brug. Rekonstitution, blanding eller fortynding er ikke nødvendig.

11. Analyseprocedure

11.1 Dag 1

Forberedende trin

- Præparering af 1x Wash Buffer TBS: Fortynd 1 del 20x Wash Buffer TBS (WB5) med 19 dele afioniseret eller destilleret vand.
- Præparering af 1 % formaldehydopløsning: Til 100 ml 1 % formaldehydopløsning skal du enten blande 2,7 ml 37 % syrefri formaldehyd eller 25 ml 10% neutralt bufferet formalin (4 % formaldehyd) med 10 ml 10x MgCl₂ (PT4) og 10 ml 10x PBS (PT5) og tilpasse mængden til 100 ml med afioniseret eller destilleret vand. Bland omhyggeligt.
- Præparering af en ethanolserie (70 %, 90 % og 100 % ethanolopløsninger): Fortynd 7, 9 og 10 dele 100 % ethanol med hhv. 3, 1 og 0 dele afioniseret eller destilleret vand. Disse opløsninger kan opbevares i passende beholdere og kan genbruges.
- ZytoLight FISH-probe: Bringes til stuetemperatur før brug. Beskyt mod lys.

Forbehandling (proteolyse/postfiksering)

1. Anvend (drypvís) Cytology Pepsin Solution (ES2) til den cytologiske prøve, og inkuber i 10 min. ved 37 °C i et fugtighedskammer.
ES2 kan danne præcipitater, hvilket ikke påvirker kvaliteten. Afhængigt af flere faktorer, f.eks. beskaffenheden og varigheden af fiksering samt beskaffenheden cellerne, kan forskellige inkubationstider være påkrævet. Vi anbefaler en inkubationstid på 5-15 min. for cytologiske prøver. Generelt anbefaler vi, at der fastslås et optimalt tidspunkt til proteolyse i forprøver.
2. Inkuber objektglassene i 5 min. i 1x Wash Buffer TBS.
3. Inkuber objektglassene i 5 min. i 1 % formaldehydopløsning.
4. Inkuber objektglassene i 5 min. i 1x Wash Buffer TBS.
5. Dehydrering: i 70 %, 90 % og 100 % ethanol, hver i 1 min.

Lufttør prøverne.

Denaturering og hybridisering

1. Pipetter 10 µl af ZytoLight FISH-proben på hver forbehandlede prøve.

Undgå længerevarende eksponering af proben for lys.

2. Tildæk prøverne med en 22 mm x 22 mm coverslip (undgå luftbobler), og forsegl coverslip.

Vi anbefaler brug af gummiment (f.eks. Fixogum-gummiment) til forsegling.

3. Anbring objektglassene på en varmeplade eller en hybridizer, og denaturer prøverne i 5 min. ved 72 °C.
4. Overfør objektglassene til et fugtighedskammer, og hybridiser natten over ved 37 °C (f.eks. i en hybridiseringsovn).

Det er ekstremt vigtigt, at de cytologiske prøver ikke tørrer ud under hybridiseringstrinnet.



11.2 Dag 2

Forberedende trin

- Cytology Stringency Wash Buffer SSC (WB7): Forvarm til 70 °C.
- Cytology Wash Buffer SSC (WB8): Bringes til stuetemperatur før brug.
- DAPI/DuraTect-Solution (MT7): Bringes til stuetemperatur før brug. Beskyt mod lys.

Posthybridisering og påvisning

1. Fjern forsigtigt gummicementen eller limen.
2. Fjern forsigtigt coverslip.
3. Vask med Cytology Stringency Wash Buffer SSC (WB7) i 2 min. ved 70 °C.

Cytology Stringency Wash Buffer SSC skal forvarmes. Kontrollér med et termometer, om nødvendigt.

Vi anbefaler, at der bruges fire objektglas pr. farvebeholder. Brug tomme objektglas til at nå op på fire, når det er nødvendigt.

4. Vask med Cytology Wash Buffer SSC (WB8) i 1 min. ved stuetemperatur.

Cytology Wash Buffer SSC skal forvarmes til stuetemperatur. Kontrollér med et termometer, om nødvendigt.

5. Lufttør prøverne, mens de beskyttes mod lys.
6. Pipetter 25 µl DAPI/DuraTect-Solution (MT7) på objektglassene. Undgå luftbobler, og tildæk prøverne med en coverslip (24 mm x 60 mm). Inkuber i mørke i 15 min.

Pipetteringsprocessen kan lettes ved at bruge en pipettespids, som er klippet af for at gøre åbningen større. Undgå lang eksponering for lys.

7. Objektglasset skal opbevares i mørke. Ved opbevaring i længere tid skal temperaturen være 2-8 °C.
8. Prøvematerialet evalueres med fluorescensmikroskopi. Der kræves filtersæt for følgende bølgelængder:

Fluorescensmarkør	Excitation	Emission
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. Fortolkning af resultater

Ved hjælp af de rette filtersæt i interfaser eller metafaser af normale celler eller celler uden defekter i kromosomerne vises to signaler pr. probe/fluorescensmærkning, med undtagelse af prober, som er rettet mod X- eller Y-kromosomer, hvilket resulterer i to eller ingen signaler pr. probe/fluorescensmærkning, afhængigt af køn. I celler med kromosomdefekter kan et andet signalmønster være synligt i interfaser eller metafaser. Du kan finde flere oplysninger om fortolkning af resultaterne i den respektive manual til proben.

13. Anbefalede kvalitetskontrolprocedurer

Se brugsanvisningen til den relevante ZytoVision-probe.

14. Ydeevnekarakteristika

Se brugsanvisningen til den relevante ZytoVision-probe.

15. Bortskaffelse

Reagenserne skal bortskaffes i henhold til lokale regler.

16. Fejlfinding

Enhver afvigelse fra brugsanvisningen kan føre til dårligere farvningsresultater eller slet ingen farvning. Se www.zytovision.com for yderligere oplysninger.

Svage eller slet ingen signaler

Mulig årsag	Handling
Proteolytisk forbehandling ikke udført korrekt	Optimer pepsininkubationstid, øg eller reducer om nødvendigt

Probefordampning	Når der anvendes en hybridizer, er brug af våde streger/vandfyldte tanke obligatorisk. Når der anvendes en hybridiseringsovn, kræves der brug af fugtighedskammer. Desuden skal coverslip forsegles fuldstændigt, f.eks. med Fixogum, for at forhindre udtørring af prøven under hybridisering
Forkerte filtersæt anvendt	Brug filtersæt, som passer til probens fluorokromer. <i>Tredobbelte båndpasfiltersæt giver mindre lys end enkelte eller dobbelte båndpasfiltersæt. Derfor kan signalerne synes svagere med tredobbelte båndpasfiltersæt.</i>

Krydshybridiseringssignaler; støjende baggrund

Mulig årsag	Handling
Proteolytisk forbehandling for stærk	Reducer pepsininkubationstid
Objektglas nedkølet til stuetemperatur før hybridisering	Overfør hurtigt objektglassene til 37 °C

Morfologi nedbrudt

Mulig årsag	Handling
Proteolytisk forbehandling ikke udført korrekt	Optimer pepsininkubationstid, reducer om nødvendigt
Utilstrækkelig tørring før probeapplikation	Forlæng lufttørring

Svag kontrastfarvning

Mulig årsag	Handling
Lav koncentreret DAPI-opløsning	Brug <u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (prod. nr. MT-0008-0.8) i stedet
DAPI-inkubationstid for kort	Juster DAPI-inkubationstid

17. Litteratur

- 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. Revision

Revision	Beskrivelse af ændringen
1.2.1	11. Analyseprocedure ZyGreen 2.0 tilføjet



www.zytovision.com

Se www.zytovision.com for de nyeste brugsanvisninger samt brugsanvisninger på forskellige sprog.

Vores eksperter kan besvare dine spørgsmål.
Kontakt helptech@zytovision.com



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

Varemærker:

ZytoVision® og Zyto*Light*® er varemærker tilhørende ZytoVision GmbH.