



**FlexISH-
Tissue Implementation Kit**

REF	Z-2182-5	Σ	5
REF	Z-2182-20	Σ	20

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

4250380N8486



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

1. Anvendelsesformål

FlexISH-Tissue Implementation Kit er beregnet til brug i kombination med FlexISH-prober til formalinfikserede, paraffinindstøbte 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

FlexISH-Tissue Implementation Kit fås i to størrelser og består af:

Kode	Komponent	Mængde		Beholder
		20	5	
PT1	<u>Heat Pretreatment Solution Citric</u>	500 ml	150 ml	Flaske med skruelåg (stor)
ES1	<u>Pepsin Solution</u>	4 ml	1 ml	Pipetteflaske, hvidt låg
WB10	<u>5x FlexISH Wash Buffer</u>	500 ml	150 ml	Flaske med skruelåg (stor)
MT7	<u>DAPI/DuraTect-Solution</u>	0.8	0.2	Reaktionsbeholder, blåt låg
	Brugsanvisning	1	1	

Z-2182-5 (5 test): Komponenterne **ES1** og **MT7** er tilstrækkelige til 5 reaktioner. Komponenten **WB10** er tilstrækkelig til 3 x 3 farvebeholdere af 70 ml hver. Komponenten **PT1** er tilstrækkelig til 2 farvebeholdere af 70 ml hver.

Z-2182-20 (20 tests): Komponenterne **ES1** og **MT7** er tilstrækkelige til 20 reaktioner. Komponenten **WB10** er tilstrækkelig til 11 x 3 farvebeholdere af 70 ml hver. Komponenten **PT1** er tilstrækkelig til 7 farvebeholdere af 70 ml hver.

4. Nødvendige materialer, der ikke medfølger

- FlexISH-probe
- Positive og negative kontrolprøver
- Objektglas, positivt ladet
- Vandbad (37 °C, 98 °C)
- Varmeplade eller hybridizer
- Fugtighedskammer + hybridiseringsovn eller hybridizer
- Justerbare pipetter (10 µl, 30 µl)
- Farvebeholdere eller -bade
- Timerur
- Kalibreret termometer
- Ethanol eller reagensalkohol
- Xylen
- 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 ES1:

EUH208	Indeholder Pepsin A. Kan udløse en allergisk reaktion.
EUH210	Der kan rekvireres et sikkerhedsdatablad.

Fare- og sikkerhedssætninger for PT1 og WB10:

Den farebestemmende komponent er en reaktionsmasse 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/øjenskyttelse/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

Blodlegemer i prøven kan udvise autofluorescens, som hindrer signalgenkendelse.

Følgende fikseringsmidler er uforligelige med ISH:

- Bouin-fikseringsmiddel
- B5-fikseringsmiddel
- Sure fikseringsmidler (f.eks. pikrinsyre)
- Zenker-fikseringsmiddel
- Alkoholer (anvendt alene)
- Kviksølvchlorid
- Formaldehyd/zink-fikseringsmiddel
- Hollande-fikseringsmiddel
- Ikke-bufferet formalin

9. Præparering af prøver

Anbefalinger:

- Fiksering i 10 % neutralt bufferet formalin i 24 timer ved stuetemperatur (18-25 °C).
- Prøvestørrelse $\leq 0,5 \text{ cm}^3$.
- Brug paraffin af bedste kvalitet.
- Indstøbning skal udføres ved temperaturer under 65 °C.
- Præparer mikrotomsnit på 2-4 μm .
- Brug positivt ladede mikroskopobjektglas.
- Fiksér i 2-16 timer ved 50-60 °C.

10. Forberedende behandling af produktet

5x FlexISH Wash Buffer (WB10) skal forbehandles i henhold til anvisningerne i 11. "Analyseprocedure". Alle andre kitreagenser er klar til brug. Rekonstitution, blanding eller fortynding er ikke nødvendig.

11. Analyseprocedure

12.1 Dag 1

Forberedende trin

1. *Præparering af to ethanolserier (70 %, 90 % og 100 % ethanolopløsninger):* Fortynd 100 % ethanol med afioniseret eller destilleret vand. Disse opløsninger kan opbevares i passende beholdere og kan genbruges til op til 160 objektglas.
2. *Heat Pretreatment Solution Citric (PT1):* Fyld en favebeholder, og varm den op til 98 °C.
3. *FlexISH-probe:* Bringes til stuetemperatur før brug. Beskyt mod lys. Før glasset åbnes, skal det blandes ved centrifugering (vortex) og en kort nedspinning.

Forbehandling (afvoksning/proteolyse)

1. Inkuber objektglassene til 2x i 5 min. i xilen.
2. Inkuber i 100 %, 90 % og 70 % ethanol, hver i 2 min.
3. Vask 2x i 2 min. i afioniseret eller destilleret.
4. Inkuber i 20 min. i forvarmet Heat Pretreatment Solution Citric (PT1) ved 98 °C.

Vi anbefaler, at der ikke bruges mere end otte objektglas pr. farvebeholder. Kontrollér temperaturen af Heat Pretreatment Solution Citric i beholderen efter nedsænkning af objektglassene, og start tiden, så snart temperaturen af opløsningen har nået mindst 95 °C.

5. Overfør objektglassene øjeblikkeligt til afioniseret eller destilleret vand, vask 2x i 2 min., og afdryp eller dup vandet af.
6. Anvend (drypvís) Pepsin Solution (ES1) til prøverne, og inkuber i 15 min. ved 37 °C i et fugtighedskammer.



ES1 kan danne præcipitater, hvilket ikke påvirker kvaliteten.

Afhængigt af flere faktorer, f.eks. beskaffenheden og varigheden af fiksering, tykkelsen af snittene og beskaffenheden af prøverne, kan forskellige inkubationstider være påkrævet. Som en retningslinje for inkubation anbefaler vi en inkubationstid på 2-30 min. Generelt anbefaler vi, at der fastslås et optimalt tidspunkt til proteolyse i forprøver.

- 7. Vask 2x i 2 min. i afioniseret eller destilleret.
- 8. Dehydrering: i 70 %, 90 % og 100 % ethanol, hver i 1 min.
- 9. Lufttør snittene.

Sørg for at tørre snittene helt før probeapplikation, da tilbageværende fugt kan reducere signalintensiteten og/eller påvirke morfologien af prøven.

Denaturering og hybridisering

- 1. Pipettér 10 µl af FlexISH-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 gummiment (f.eks. Fixogum) til forsegling.

- 3. Anbring objektglassene på en varmeplade eller en hybridizer, og denaturer prøverne i 10 min. ved 75 °C.
- 4. Udfør hybridisering i 2-16 timer (dvs. natten over) ved 37 °C ved enten at overføre objektglassene til en hybridizer eller et fugtighedskammer og en hybridiseringsovn.

Det er ekstremt vigtigt, at prøverne ikke tørrer ud under hybridiseringstrinet.

12.2 Dag 1 eller dag 2

Forberedende trin

- 1. Præparering af 1x FlexISH Wash Buffer: Fortynd 1 del 5x FlexISH Wash Buffer (WB10) med 4 dele afioniseret eller destilleret vand. Fyld tre farvebeholdere med 1x FlexISH Wash Buffer, forvarm én beholder til 72 °C, og opbevare to beholdere ved stuetemperatur.
- 2. DAPI/DuraTect-Solution (MT7): Bringes til stuetemperatur før brug. Beskyt mod lys.

Posthybridisering og påvisning

- 1. Fjern forsigtigt gummimenten eller limen.
- 2. Fjern coverslips ved at nedsænke dem i 1x FlexISH Wash Buffer i 1-2 min. ved stuetemperatur.

For at muliggøre fjernelse af coverslip kan dette trin også udføres i 2 min. ved 37 °C.

- 3. Vask med 1x FlexISH Wash Buffer i 10 min. ved 72 °C.
1x FlexISH Wash Buffer skal forvarmes. Kontrollér med et termometer, om nødvendigt. Brug ikke mere end otte objektglas pr. farvebeholder.

- 4. Vask med 1x FlexISH Wash Buffer i 3 min. ved stuetemperatur.
- 5. Inkuber objektglassene i 70 %, 90 % og 100 % ethanol, hver i 1 min.
- 6. Lufttør prøverne, mens de beskyttes mod lys.
- 7. Pipettér 25 µl DAPI/DuraTect-Solution (MT7) på objektglassene. Undgå luftbobler, og tildæk prøverne med en coverslip (24 mm x 60 mm). Inkubér 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.

- 8. Opbevar objektglassene i mørke. Ved opbevaring i længere tid skal temperaturen være 2-8 °C.
- 9. 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
Prøve er ikke korrekt fikseret	Optimer fikseringstid og fikseringsmiddel
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
Ufuldstændig afvoksning	Brug friske opløsninger; kontrollér varighed af afvoksning
Proteolytisk forbehandling for stærk	Reducer pepsininkubationstid
Objektglas nedkølet til stuetemperatur før hybridisering	Overfør hurtigt objektglassene til 37 °C

Morfologi nedbrudt

Mulig årsag	Handling
Prøve er ikke korrekt fikseret	Optimer fikseringstid og fikseringsmiddel
Proteolytisk forbehandling ikke udført korrekt	Optimer pepsininkubationstid, reducer om nødvendigt
Utilstrækkelig tørring før probeapplikation	Forlæng lufttørring

Overlappende kerner

Mulig årsag	Handling
Upassende tykkelse af vævssnit	Præparer mikrotomsnit på 2-4 µm

Prøver glider af objektglasset

Mulig årsag	Handling
Proteolytisk forbehandling for stærk	Reducer pepsininkubationstid

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 help@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 F/actSH® er varemærker tilhørende ZytoVision GmbH.