



**ZytoFast**

## human Ig-kappa/Ig-lambda Permanent CISH Kit

REF T-1105-400



40 (0,4 ml)

Für den simultanen qualitativen Nachweis von humaner Ig-kappa ( $\kappa$ ) und Ig-lambda ( $\lambda$ ) mRNA mittels chromogener *in-situ*-Hybridisierung (CISH)



In-vitro-Diagnostikum  
gemäß EU Richtlinie 98/79/EC

### 1. Verwendungszweck

Das ZytoFast human Ig-kappa/Ig-lambda Permanent CISH Kit ist für den simultanen qualitativen Nachweis von humaner Ig-kappa ( $\kappa$ ) und Ig-lambda ( $\lambda$ ) Leichtketten-mRNA in Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Geweben wie beispielsweise Lymphomgeweben mittels chromogener *in-situ*-Hybridisierung (CISH) bestimmt.

Die Interpretation der Ergebnisse muss im Kontext mit der klinischen Anamnese unter Berücksichtigung weiterer klinischer und pathologischer Daten des Patienten durch einen qualifizierten Pathologen erfolgen.

### 2. Klinische Relevanz

B-Zellen (aka B-Lymphozyten) entwickeln sich aus lymphatischen Stammzellen im Knochenmark. Jeder B-Zellklon exprimiert ein einzigartiges Antikörper-Molekül, welches aus zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Ketten besteht, wobei letztere entweder vom  $\kappa$ - oder  $\lambda$ -Typ sind. Die Bestimmung des Kappa/Lambda-Quotienten ist zur Unterscheidung zwischen neoplastischen und reaktiven lymphatischen Proliferationen von Nutzen. Im Gegensatz zur monoklonalen Expression bei malignen Lymphomen, einer der häufigsten hämatologischen Erkrankungen der westlichen Bevölkerung, spiegelt die polyklonale Expression von  $\kappa$ - oder  $\lambda$ -Leichtketten eine reaktive Hyperplasie wieder. Während der Nachweis von Ig- $\kappa$  und Ig- $\lambda$  mittels Immunhistochemie häufig zu starker Hintergrundfärbung führt, erlaubt die *in-situ*-Hybridisierung durch nahezu Hintergrund-freie Signale eine sichere und einfache Analyse der Klonalität einer Lymphozyten-Population.

### 3. Prinzip der Methode

Die chromogene *in-situ*-Hybridisierung (CISH) erlaubt den Nachweis und die Visualisierung von spezifischen Nukleinsäuresequenzen in Zellpräparationen. Haptenmarkierte Nukleotid-Fragmente, sogenannte CISH-Sonden, und deren komplementäre Zielsequenzen in den Präparationen werden co-denaturiert und können anschließend während der Hybridisierung binden. Danach werden unspezifische und ungebundene Sondenfragmente durch Stringenzwaschschritte entfernt. Die Duplex-Bildung der markierten Sonde wird mittels Enzym-konjugierter Antikörper, welche gegen die Sonde gerichtet sind, sichtbar gemacht. Die enzymatische Reaktion mit den chromogenen Substraten führt anschließend zur Bildung von Farbpräzipitaten. Nach der Gegenfärbung des Zellkerns mit einer Zellkern-Färbung können die hybridisierten Sondenfragmente mit einem Lichtmikroskop visualisiert werden.

### 4. Enthaltene Komponenten

Das ZytoFast human Ig-kappa/Ig-lambda Permanent CISH Kit ist verfügbar in einer Größe und besteht aus:

Code	Komponente	Menge $\Sigma$ 40	Gefäß
PF22	<u>ZytoFast human Ig-kappa/Ig-lambda Probe</u>	0,4 ml	Reaktionsgefäß, roter Deckel
ES1	<u>Pepsin Solution</u>	04 ml	Tropfflasche, weißer Deckel
WB5	<u>20x Wash Buffer TBS</u>	2x 50 ml	Schraubverschlussflasche
AB15	<u>Anti-Biotin/DIG-Mix</u>	4 ml	Tropfflasche, gelber Deckel
SB7a	<u>HRP-Green Solution A</u>	0,8 ml	Tropfflasche, grüner Deckel (klein)
SB7b	<u>HRP-Green Solution B</u>	15 ml	Tropfflasche, grüner Deckel
SB8a	<u>Permanent Red Solution A</u>	0,25 ml	Tropfflasche, brauner Deckel
SB8b	<u>Permanent Red Solution B</u>	15 ml	Tropfflasche, roter Deckel
CS2	<u>Nuclear Blue Solution</u>	20 ml	Schraubverschlussflasche, schwarz
MT4	<u>Mounting Solution (alcoholic)</u>	4 ml	Glasflasche, braun
	Gebrauchsanweisung	1	

**T-1105-40 (40 Reaktionen):** Komponenten **ES1**, **PF22**, **AB15**, **SB7a-b**, **SB8a-b**, **CS2** und **MT4** sind ausreichend für 40 Reaktionen. Komponente **WB5** ist ausreichend für 28 Küvetten à 70 ml.

Die ZytoFast human Ig-kappa/Ig-lambda Probe besteht aus:

- Digoxigenin-markierten Polynukleotiden ( $\sim 1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ), die gegen mRNA, welche die konstanten Regionen der Ig-kappa Leichtketten codieren, gerichtet sind.
- Biotin-markierten Polynukleotiden ( $\sim 1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ), die gegen mRNA, welche die konstanten Regionen der Ig-lambda Leichtketten codieren, gerichtet sind.

### 5. Benötigte, aber nicht bereitgestellte Materialien

- Positive und negative Kontrollproben
- Objektträger, positiv geladen
- Wasserbad (55°C, 98°C)
- Hybridizer oder Wärmeplatte
- Hybridizer oder Feuchtekkammer im Hybridisierungssofen
- Verstellbare Pipetten (10  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$ , 1000  $\mu\text{l}$ )
- Küvetten oder Färbetröge
- Stoppuhr
- Kalibriertes Thermometer
- Ethanol oder denaturierter Alkohol
- Xylol
- Methanol 100%
- Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30%
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser
- Deckgläser (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Naturkautschuk-Klebstoff, z.B. Fixogum Rubber Cement (Prod. Nr. E-4005-50/-125) oder Ähnliches
- Regelmäßig gewartetes Lichtmikroskop (100-200x)

## 6. Lagerung und Handhabung

Bei 2-8°C in aufrechter Position lagern. Unmittelbar nach Gebrauch wieder unter Lagerbedingungen aufbewahren. Keine Reagenzien nach Ablauf des auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatums verwenden. Das Produkt ist bei sachgemäßer Handhabung bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil.

## 7. Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Gebrauchsanweisung vor der Verwendung lesen!
- Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden!
- Dieses Produkt enthält Substanzen (in geringen Konzentrationen und Volumina), welche gesundheitsschädlich und potentiell infektiös sind. Jeder direkte Kontakt mit den Reagenzien muss vermieden werden. Entsprechende Schutzmaßnahmen (Verwendung von Einmalhandschuhen, Schutzbrille und Laborbekleidung) sind zu ergreifen!
- Sollten Reagenzien mit der Haut in Kontakt kommen, die betroffenen Stellen sofort mit viel Wasser abspülen!
- Ein Sicherheitsdatenblatt ist auf der Website verfügbar ([www.zytovision.com](http://www.zytovision.com)).
- Die Reagenzien nicht wiederverwenden!
- Kreuzkontaminationen und mikrobielle Kontamination der Reagenzien vermeiden!
- Die Präparate dürfen während der Hybridisierungs- und Waschschrte nicht austrocknen!

### Besondere Kennzeichnung von ES1:

EUH208	Enthält Pepsin A. Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
EUH210	Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich. < 20 Prozent des Gemisches bestehen aus einem oder mehreren Bestandteilen unbekannter akuter Toxizität (inhalativ).

### Gefahren- und Sicherheitshinweise für AB15, SB7b und WB5:

Die gefahrbestimmende Komponente ist ein Gemisch aus: 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on [EG-Nr. 247-500-7] und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on [EG-Nr. 220-239-6] (3:1).



#### Achtung

H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
P261	Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden.
P272	Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen.
P280	Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
P302+P352	BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Wasser waschen.
P333+P313	Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P362+P364	Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.

### Gefahren- und Sicherheitshinweise für SB7a:

Die gefahrbestimmende Komponenten sind Methanol und 30 % Wasserstoffperoxid in Lösung.



#### Gefahr

H225	Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
H301+H311+H331	Giftig bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen.
H370	Schädigt die Organe.
P210	Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen und anderen Zündquellen fernhalten. Nicht rauchen.
P233	Behälter dicht verschlossen halten.
P260	Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen.
P280	Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
P308+P311	BEI Exposition oder falls betroffen: GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt anrufen.
P403+P235	An einem gut belüfteten Ort aufbewahren. Behälter dicht verschlossen halten.

### Gefahren- und Sicherheitshinweise für MT4:

Die gefahrbestimmende Komponente ist Xylol.



#### Achtung

H226	Flüssigkeit und Dampf entzündbar.
H312+H332	Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt oder Einatmen.
H315	Verursacht Hautreizungen.
H319	Verursacht schwere Augenreizung.
H335	Kann die Atemwege reizen.
H373	Kann die Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition.
P210	Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen und anderen Zündquellen fernhalten. Nicht rauchen.
P260	Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen.
P280	Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
P337+P313	Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P403+P235	An einem gut belüfteten Ort aufbewahren. Kühl halten.
EUH208	Enthält Methyl-methacrylat; Methyl 2-methylprop-2-enoat; MMA. Kann allergische Reaktionen hervorrufen.

**Gefahren- und Sicherheitshinweise für SB8b:**

Die gefahrbestimmende Komponente ist 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on.

**Achtung**

H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
P261	Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden.
P272	Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen.
P280	Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
P302+P352	BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Wasser waschen.
P333+P313	Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P362+P364	Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.

**Gefahren- und Sicherheitshinweise für CS2:**

Die gefahrbestimmende Komponenten sind Ethandiol (vgl. Glykol).

**Achtung**

H373	Kann die Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition.
P260	Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen.
P314	Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

**Gefahren- und Sicherheitshinweise für SB8a:**

Dieses Gemisch ist nicht als gefährlich eingestuft im Sinne der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.

**8. Einschränkungen**

- Für die Verwendung als In-vitro-Diagnostikum.
- Nur für die professionelle Anwendung.
- Die klinische Interpretation jeglicher positiven Färbung bzw. deren Abwesenheit muss im Kontext mit der klinischen Anamnese, Morphologie, anderer histopathologischer Kriterien sowie weiterer diagnostischer Tests erfolgen. Es obliegt der Verantwortung eines qualifizierten Pathologen, mit CISH Sonden, Reagenzien, Diagnose-Panels und den zur Erstellung von gefärbten Präparaten verwendeten Methoden vertraut zu sein. Die Färbung ist in einem zertifizierten, lizenzierten Labor unter Aufsicht eines Pathologen durchzuführen, der für die Auswertung der Färbepreparate und für die Sicherstellung der Eignung von positiven und negativen Kontrollen verantwortlich ist.
- Die Färbung der Präparate, insbesondere die Signalintensität und die Hintergrundfärbung, ist abhängig von der Behandlung und Prozessierung der Präparate vor der Färbung. Unsachgemäßes Fixieren, Einfrieren, Auftauen, Waschen, Trocknen, Erhitzen, Schneiden oder Kontamination mit anderen Präparaten oder Flüssigkeiten können Artefakte oder falsche Ergebnisse verursachen. Inkonsistente Ergebnisse können von Variationen bei Fixierungs- und Einbettungsverfahren sowie von inhärenten Unregelmäßigkeiten innerhalb des Präparates resultieren.
- Die Sonde ist nur für den Nachweis der Zielsequenzen, die in der Gebrauchsanweisung der entsprechenden Sonde beschrieben werden, zu verwenden.
- Die Leistung wurde unter Verwendung der in dieser Gebrauchsanweisung beschriebenen Verfahren validiert. Abweichungen von diesen Verfahren können die Leistung beeinflussen und müssen vom Anwender validiert werden.

**9. Störsubstanzen**

Folgende Fixierungen sind nicht kompatibel mit ISH:

- Bouin Fixierung
- B5 Fixierung
- Saure Fixiermittel (z.B. Pikrinsäure)
- Zenker Fixierung
- Alkohole (bei alleiniger Verwendung)
- Quecksilberchlorid
- Formaldehyd/Zink Fixiermittel
- Hollande Fixierung
- Ungepuffertes Formalin

**10. Vorbereitung der Präparate**

Empfehlungen:

- Bei jedem Vorbereitungsschritt Kreuzkontaminationen der Präparate vermeiden, da diese zu fehlerhaften Ergebnissen führen können.
- Fixierung in 10% neutral gepuffertem Formalin für 24h bei Raumtemperatur (18-25°C).
- Probengröße  $\leq 0,5 \text{ cm}^3$ .
- Qualitativ hochwertiges Paraffin verwenden.
- Das Einbetten sollte bei Temperaturen unter 65°C erfolgen.
- 3-5  $\mu\text{m}$  dicke Mikrotomschnitte anfertigen.
- Positiv geladene Objektträger verwenden.
- Für 2-16h bei 50-60°C fixieren.

**11. Vorbereitung der Reagenzien**

20x Wash Buffer TBS (WB5) ist wie in der Gebrauchsanweisung unter 12. „Durchführung“ beschrieben vorzubereiten. Alle anderen Reagenzien des Produkts sind gebrauchsfertig. Kein Rekonstituieren, Mischen oder Verdünnen ist notwendig.

**12. Durchführung****Vorbereitende Schritte**

- (Optional) Eine Ethanolreihe (70%, 90% und 100% Ethanol) vorbereiten: 100% Ethanol mit deionisiertem oder destilliertem Wasser verdünnen. Diese Lösungen können in geeigneten Gefäßen aufbewahrt und wiederverwendet werden.
- Vorbereitung von 1x Wash Buffer TBS: 1 Teil 20x Wash Buffer TBS (WB5) mit 19 Teilen deionisiertem oder destilliertem Wasser verdünnen.  
*Der verdünnte 1x Wash Buffer TBS ist bei 2-8°C eine Woche lang haltbar.*
- 1x Wash Buffer TBS: Für die Stringenzwaschung in einer abgedeckten Küvette auf 55°C erwärmen.
- Vorbereitung von 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ : 1 Teil 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit 9 Teilen 100% Methanol verdünnen.
- ZytoFast CISH Sonde: Vor der Anwendung auf Hybridisierungstemperatur (55°C) bringen und gründlich mischen.
- Anti-Biotin/DIG-Mix (AB15), HRP-Green Solution A (SB7a), HRP-Green Solution B (SB7b), Permanent Red Solution A (SB8a), Permanent Red Solution B (SB8b), Nuclear Blue Solution (CS2), Mounting Solution (alcoholic) (MT4): Vor der Verwendung auf Raumtemperatur (18°C-25°C) bringen.

*Die Komponenten **SB7a** und **SB7b** können Präzipitate bilden, welche nicht die Qualität der Färbung beeinflussen.*

**Vorbehandlung (Entparaffinierung/Proteolyse)**

- Die Objektträger für 10 min bei 70°C inkubieren (z.B. auf einer Wärmeplatte).
- Die Objektträger für 2x 5 min in Xylol inkubieren.
- Die Objektträger für 3x 3 min in 100% Ethanol inkubieren.
- Die Objektträger für 5 min in 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  inkubieren
- Die Objektträger für 2x 1 min in deionisiertem oder destilliertem Wasser waschen.
- Pepsin Solution (ES1) (tropfenweise) auf die Präparate auftragen und für 20-50 min bei 37°C in einer Feuchtekammer inkubieren.

*ES1 kann Präzipitate bilden, welche nicht die Qualität beeinflussen.*

*Generell wird eine Bestimmung der optimalen Dauer der Proteolyse in Vortests empfohlen.*

- Die Objektträger in destilliertes oder deionisiertes Wasser bei RT eintauchen.

(8) (Optional) Dehydrierung für jeweils 1 min in 70%, 90% und 100% Ethanol.

(9) Schnitte an der Luft trocknen.

*Bitte beachten: Die Schnitte vollständig trocknen lassen, bevor die Sonde aufgetragen wird.*

#### Denaturierung und Hybridisierung

1. 10 µl der *ZytoFast* CISH Sonde auf jedes der vorbehandelten Präparate pipettieren.

2. Die Präparate mit 22 mm x 22 mm Deckgläsern abdecken (Einschluss von Luftbläschen vermeiden) und das Deckglas versiegeln.

*Wir empfehlen die Verwendung von Naturkautschuk-Klebstoff (z.B. Fixogum) zum Versiegeln.*

3. Die Objektträger auf einer Wärmeplatte oder in einem Hybridizer platzieren und die Proben für 5 min bei 75°C denaturieren.

4. Die Objektträger in eine Feuchtkammer überführen und für 2 h bei 55°C hybridisieren (z.B. in einem Hybridisierungssofen).

*Es ist essentiell, dass die Präparate während des Hybridisierungsschritts nicht austrocknen.*

#### Post-Hybridisierung und Detektion

(1) Vorsichtig den Naturkautschuk-Klebstoff oder Kleber entfernen.

(2) Durch das Eintauchen der Objektträger in 1x Wash Buffer TBS für 5 min bei RT das Deckglas entfernen.

(3) Die Objektträger für 5 min bei 55°C in 1x Wash Buffer TBS waschen.

*Wir empfehlen, acht Objektträger pro Färbetrog zu verwenden (falls notwendig, Dummy-Objektträger hinzufügen).*

(4) Die Objektträger für 5 min bei RT in 1x Wash Buffer TBS waschen.

(5) Anti-Biotin/DIG-Mix (AB15) (1-2 Tropfen pro Objektträger) auf die Objektträger geben und für 30 min bei 37°C in einer Feuchtkammer inkubieren.

(6) Die Objektträger für 3x 1 min bei RT in 1x Wash Buffer TBS waschen.

(7) Während der Waschschritte HRP-Green Solution (working solution) vorbereiten: 1 ml HRP-Green Solution B (SB7b) in ein graduiertes Reaktionsgefäß geben und zwei Tropfen (2x 20 µl) HRP-Green Solution A (SB7a) hinzufügen. Gut mischen.

(8) HRP-Green Solution (1-2 Tropfen pro Objektträger) auf die Objektträger geben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubieren.

(9) Die Objektträger für 3x 1 min bei RT in deionisiertem oder destilliertem Wasser waschen.

(10) Während der Waschschritte Permanent Red Solution (working solution) vorbereiten: 1 ml Permanent Red Solution B (SB8b) in ein graduiertes Reaktionsgefäß geben und 16 µl Permanent Red Solution A (SB8a) hinzufügen. Gut mischen.

(11) Permanent Red Solution (1-2 Tropfen pro Objektträger) auf die Objektträger geben und für 15 min bei 37°C inkubieren.

(12) Permanent Red Solution abtupfen, **aber nicht abspülen!**

(13) Permanent Red Solution (1-2 Tropfen pro Objektträger) auf die Objektträger geben und erneut für 15 min bei 37°C inkubieren.

(14) Die Objektträger für 3x 1 min bei RT in deionisiertem oder destilliertem Wasser waschen.

(15) Die Präparate für 2-5 min mit Nuclear Blue Solution (CS2) gegenfärben.

(16) Die Objektträger in eine Küvette überführen und für 2 min unter fließendem kaltem Leitungswasser waschen.

(17) Dehydrierung für jeweils 3x 30 s in 100% Ethanol (sehr reinen Ethanol verwenden).

(18) Die Objektträger 2x 2 min in Xylol (sehr reines Xylol verwenden) inkubieren.

(19) Die Präparate mit einem Deckglas (22 mm x 22 mm; 24 mm x 32 mm) mit Hilfe von Mounting Solution (alcoholic) (MT4) abdecken, dabei den Einschluss von Luftbläschen vermeiden. 20-30 min warten, bis das Deckgläschen nicht mehr beweglich ist.

*Die Verwendung einer abgeschnittenen Pipettenspitze zur Vergrößerung der Öffnung kann das Pipettieren erleichtern.*

(20) Die gefärbten Präparate mit einem Lichtmikroskop auswerten.

### 13. Interpretation der Ergebnisse

Bei Verwendung des ZytoFast human Ig-kappa/Ig-lambda Permanent CISH Kits erscheinen die Hybridisierungssignale der Digoxigenin-markierten κ-Polynukleotide als grüne Präzipitate, Biotin-markierte λ-Polynukleotide erscheinen als rote Präzipitate.

Eine positive Reaktivität für Ig-kappa (κ) mRNA in B-Plasmazellen wird durch eine grüne zytoplasmatische Färbung angezeigt.

Eine positive Reaktivität für Ig-lambda (λ) mRNA in B-Plasmazellen wird durch eine rote zytoplasmatische Färbung angezeigt.

Die Gegenfärbung der Proben mit Nuclear Blue Solution (**CS2**) führt zu einer hellen blau-violetten Zellkernfärbung.

Der normale Kappa/Lambda-Quotient in lymphatischen Geweben ist in etwa 2:1, ein Kappa/Lambda-Quotient >3:1 oder <0,3:1 ist ein Indikator für Monoklonalität.

#### Bitte beachten:

- Die Signale sollten mindestens mit einer 100fachen Vergrößerung visualisiert werden, sodass die Signale gut zu erkennen sind.
- Keine nekrotischen Bereiche, sich überlagernde Zellkerne, überverdauete Zellkerne oder Zellkerne mit schwacher Signalintensität auswerten.
- Ein negatives oder unspezifisches Ergebnis kann durch verschiedene Faktoren verursacht werden (siehe Kapitel 17 „Fehlerbehebung“).
- Um die Ergebnisse korrekt zu interpretieren, muss der Anwender das Produkt vor der Anwendung in diagnostischen Verfahren unter Berücksichtigung nationaler und/oder internationaler Richtlinien validieren.

### 14. Empfohlene Qualitätskontrollverfahren

Um die korrekte Leistung der verwendeten Präparate und Testreagenzien zu überwachen, sollte jeder Test von internen und externen Kontrollen begleitet werden. Falls interne und/oder externe Kontrollen keine adäquate Färbung zeigen, müssen die Ergebnisse der Patientenproben als ungültig angesehen werden.

**Interne Kontrolle:** Eine B-Plasmazelle innerhalb des Präparats sollte entweder ein Ig-Kappa- oder ein Ig-Lambda-Signalmuster aufweisen. Zellen innerhalb des Präparats, welche keine B-Zellen sind, wie beispielsweise Fibroblasten sollten keine Färbung aufweisen.

**Externe Kontrolle:** Validierte positive und negative Kontrollproben.

### 15. Leistungsmerkmale

Die Leistung der ZytoFast human Ig-kappa/Ig-lambda Probe wurde mittels der Durchführung von chromogenen *in situ* Hybridisierungen (CISH) mit Leichtketten-Restriktion-positivem und negativem Gewebepräparaten beurteilt. Der Leichtketten-Restriktionsstatus der untersuchten Präparate wurde zuvor durch eine Referenzmethode bestimmt.

**Analytische Sensitivität:** Es wurde eine analytische Sensitivität von 100% berechnet.

**Analytische Spezifität:** Es wurde eine analytische Spezifität von 100% berechnet.

### 16. Entsorgung

Die Entsorgung der Reagenzien muss in Übereinstimmung mit den örtlichen Vorschriften erfolgen.

## 17. Fehlerbehebung

Jede Abweichung von der Gebrauchsanweisung kann zu schwachen bis gar keinen Färbungen führen.

### Schwache oder keine Signale

Mögliche Ursache	Lösung
Zell- oder Gewebeproben sind nicht korrekt fixiert	Die Fixierzeit und das Fixiermittel optimieren
Temperatur der Proteolyse, Hybridisierung, Denaturierung, Stringenzwaschung oder der Antikörper-Inkubation nicht korrekt	Die Temperatur aller technischen Geräte mit einem kalibrierten Thermometer überprüfen. Bei Lösungen mit einer kritischen Temperatur immer die gleiche Anzahl an Objektträgern verwenden
Proteolytische Vorbehandlung nicht optimal	Abhängig von verschiedenen Faktoren, wie z.B. Art und Dauer der Fixierung, Dicke der Schnitte und Art des Gewebes/der Zellen, können unterschiedliche Inkubationszeiten notwendig sein. Die optimale Dauer der Pepsin-Inkubation in Vortests bestimmen
Hybridisierungszeit zu kurz	Für mindestens 2h hybridisieren, falls notwendig, Hybridisierungszeit verlängern
Zu gering konzentrierter Wash Buffer	Die Konzentration des Wash Buffers überprüfen
Alte Dehydrierungslösungen	Frische Dehydrierungslösungen ansetzen
Verdunstung der Sonde	Bei der Nutzung eines Hybridizers ist die Verwendung von feuchten Vliesstreifen/Wassertanks erforderlich. Bei der Nutzung eines Hybridisierungsofens muss eine Feuchtekammer verwendet werden. Zusätzlich sollte das Deckglas, z.B. mit Fixogum, vollständig versiegelt werden, um ein Austrocknen der Präparate während der Hybridisierung zu verhindern
Inkubationstemperatur der Farbsubstrate nicht korrekt	Die Temperatur aller verwendeten technischen Geräte mit einem kalibrierten Thermometer überprüfen
Dauer der Gegenfärbung zu lang	Die Dauer der Gegenfärbung ist abhängig von der Art des Präparats und sollte dementsprechend optimiert werden. Dunkle Gegenfärbungen vermeiden, da diese positive Signale verdecken könnten
Keine Zielsequenz vorhanden	Verifiziertes positives Gewebe verwenden, um die Leistung des Tests zu bestätigen
Bläuen der Gegenfärbung nicht ausreichend durchgeführt	Für das Bläuen kaltes Leitungswasser verwenden; kein warmes bzw. heißes Wasser oder Bläuungsreagenzien verwenden

### Signale zu stark

Mögliche Ursache	Lösung
Dauer der proteolytischen Vorbehandlung zu lang	Abhängig von verschiedenen Faktoren, wie z.B. Art und Dauer der Fixierung, Dicke der Schnitte und Art des Gewebes/der Zellen, können unterschiedliche Inkubationszeiten notwendig sein. Die optimale Dauer der Pepsin-Inkubation in Vortests bestimmen
Substratreaktion ist zu stark	Inkubationszeit des Substrates verkürzen; die Substratlösung nicht über die in der Gebrauchsanweisung beschriebenen Temperatur hinaus erhitzen

### Signale verblässen oder verschmelzen

Mögliche Ursache	Lösung
Verwendung eines ungeeigneten Eindeckmediums	Nur das mit dem Kit zur Verfügung gestellte oder wässrige Eindeckmedium frei von Unreinheiten verwenden; keine Eindeckfolie verwenden

### Ungleichmäßige oder teils nur sehr leichte Färbung

Mögliche Ursache	Lösung
Unvollständiges Entparaffinieren	Frische Lösungen verwenden, Dauer des Entparaffinierens überprüfen
Volumen der Reagenzien zu gering	Sicherstellen, dass das Volumen der Reagenzien groß genug ist, um den Bereich des Gewebes zu bedecken
Luftbläschen vor der Hybridisierung oder während des Eindeckens eingeschlossen	Luftbläschen vermeiden

### Inkonsistente Ergebnisse

Mögliche Ursache	Lösung
Unzureichende Trocknung vor Applikation der Sonde	Lufttrocknung verlängern
Zu viel Wasser/Waschpuffer auf dem Gewebe vor Applikation von Pepsin, Antikörpern und/oder Farbsubstraten	Überschüssige Flüssigkeit durch Abklopfen oder Abschütteln des Objektträgers von dem Gewebeschnitt entfernen. Kleinere Mengen an restlichem Wasser/Waschpuffer beeinträchtigen den Test nicht
Variierende Methoden der Gewebefixierung oder Einbettung	Methoden der Fixierung und Einbettung optimieren
Variierende Gewebedicke	Schneiden optimieren

### Degradierete Morphologie

Mögliche Ursache	Lösung
Zell- oder Gewebeproben sind nicht optimal fixiert	Die Fixierzeit und das Fixiermittel optimieren
Proteolytische Vorbehandlung nicht optimal ausgeführt	Die Inkubationszeit mit Pepsin optimieren

### Hintergrundsignale

Mögliche Ursache	Lösung
Temperatur der Stringenzwaschung nicht korrekt	Die Temperatur aller technischen Geräte mit einem kalibrierten Thermometer überprüfen. Immer die gleiche Anzahl an Objektträgern verwenden. Bei Hitze-Inkubationsschritten nicht mehr als acht Objektträger pro Küvette verwenden
Objektträger nicht ausreichend gespült	Wenn angegeben, ausreichend und frischen Waschpuffer bzw. deionisiertes oder destilliertes Wasser verwenden
Schnitte sind während oder nach der Hybridisierung ausgetrocknet	Das Austrocknen der Schnitte vermeiden; Feuchtekammern verwenden; Deckglas sorgfältig abdichten
Verlängerte Inkubationszeit des Substrates	Inkubationszeit des Substrates verkürzen
Unvollständiges Entparaffinieren	Frische Lösungen verwenden, Dauer des Entparaffinierens überprüfen
Proteolytische Vorbehandlung zu stark	Inkubationszeit von Pepsin optimieren
Objektträger sind vor der Hybridisierung auf Raumtemperatur abgekühlt	Die Objektträger zügig auf Hybridisierungstemperatur überführen

### Überlagernde Zellkerne

Mögliche Ursache	Lösung
Ungeeignete Dicke der Gewebeschnitte	3-5 µm dicke Mikrotomschnitte anfertigen

### Präparat löst sich vom Objektträger

Mögliche Ursache	Lösung
Ungeeignete Beschichtung der Objektträger	Geeignete Objektträger (positiv geladen) verwenden
Proteolytische Vorbehandlung ist zu stark	Inkubationszeit mit Pepsin reduzieren

### 18. Literatur

- Erber WN, et al. (1993) *Pathology* 25: 63-7.
- Hieter PA, et al. (1980) *Cell* 22: 197-207.
- Hieter PA, et al. (1981) *Nature* 294: 536-40.
- Marti GE, et al. (2005) *Br J Haematol* 130: 325-32.
- McNicol AM, Farquharson MA (1997) *J Pathol* 182: 250-61.
- Pringle JH, et al. (1990) *J Pathol* 162: 197-207.
- Wilkinson DG: *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.

Unsere Experten stehen Ihnen für Ihre Fragen zur Verfügung.  
Bitte kontaktieren Sie [helptech@zytovision.com](mailto:helptech@zytovision.com)



ZytoVision GmbH  
Fischkai 1  
27572 Bremerhaven/ Deutschland  
Telefon: +49 471 4832-300  
Fax: +49 471 4832-509  
[www.zytovision.com](http://www.zytovision.com)  
Email: [info@zytovision.com](mailto:info@zytovision.com)

#### Warenzeichen:

ZytoVision® und ZytoFast® sind Warenzeichen der ZytoVision GmbH.