F*lex*ISH-
Tissue Implementation Kit

REF Z-2182-5 Σ 5

REF Z-2182-20 Σ 20

Für die Verwendung in Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen (FISH)

4250380N8486

CE

IVD

In-vitro-Diagnostikum

gemäß IVDR (EU) 2017/746

1. Verwendungszweck

F*lex*ISH-Tissue Implementation Kit ist für für die Verwendung in Kombination mit F*lex*ISH Sonden in Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) in Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Geweben bestimmt.

Das Produkt ist nur für die professionelle Anwendung bestimmt. Alle Tests, bei denen das Produkt verwendet wird, sollten in einem zertifizierten, zugelassenen anatomisch-pathologischen Labor unter der Aufsicht eines Pathologen/Humangenetikers von qualifiziertem Personal durchgeführt werden.

2. Prinzip der Methode

Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) erlaubt den Nachweis und die Visualisierung von spezifischen Nukleinsäuresequenzen in Zellpräparationen. Fluoreszenzmarkierte DNA-Fragmente, sogenannte FISH-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. Nach der Gegenfärbung der DNA mit DAPI werden hybridisierte Sondenfragmente mit einem Fluoreszenzmikroskop visualisiert, welches mit für die Fluorochrome spezifischen Anregungs- und Emissionsfiltern ausgestattet ist, mit denen die FISH-Sondenfragmente direkt markiert wurden.

3. Enthaltene Komponenten

Das F*lex*ISH Tissue Implementation Kit ist verfügbar in zwei Größen und besteht aus:

Code	Komponente	Menge		Gefäß
		20 Σ	5	
PT1	Heat Pretreatment Solution Citric	500 ml	150 ml	Schraubverschluss-flasche (groß)
ES1	Pepsin Solution	4 ml	1 ml	Tropfflasche, weißer Deckel
WB10	5x F*lex*ISH Wash Buffer	500 ml	150 ml	Schraubverschluss-flasche (groß)
MT7	DAPI/DuraTect-Solution	0,8	0.,2	Reaktionsgefäß, blauer Deckel
	Gebrauchs-anweisung	1	1	

Z-2182-5 (5 Reaktionen): Die Komponenten **ES1** und **MT7** sind ausreichend für 5 Reaktionen. Die Komponente **WB10** ist ausreichend für 3x 3 Küvetten à 70 ml. Die Komponente **PT1** ist ausreichend für 2 Küvetten à 70 ml.

Z-2182-20 (20 Reaktionen): Die Komponenten **ES1** und **MT7** sind ausreichend für 20 Reaktionen. Die Komponente **WB10** ist ausreichend für 11x 3 Küvetten à 70 ml. Die Komponente **PT1** ist ausreichend für 7 Küvetten à 70 ml.

4. Benötigte, aber nicht bereitgestellte Materialien

- F*lex*ISH Sonde
- Positive und negative Kontrollproben
- Objektträger, positiv geladen
- Wasserbad (37°C, 98°C)
- Hybridizer oder Wärmeplatte
- Hybridizer oder Feuchtekammer im Hybridisierungsofen
- Verstellbare Pipetten (10 µl, 25 µl)
- Küvetten oder Färbetröge
- Stoppuhr
- Kalibriertes Thermometer
- Ethanol oder denaturierter Alkohol
- Xylol
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser
- Deckgläser (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Naturkautschuk-Klebstoff, z.B. Fixogum Rubber Cement (Prod. Nr. E-4005-50/-125) oder Ähnliches
- Regelmäßig gewartetes Fluoreszenzmikroskop (400-1000x)
- Immersionsöl, geeignet für Fluoreszenzmikroskopie
- Entsprechende Filtersätze

5. Lagerung und Handhabung

Bei 2-8°C in aufrechter Position lagern. Zusätzlich dazu muss die DAPI/DuraTect-Solution (**MT7**) vor Licht geschützt gelagert werden. 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.

6. 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!
- Schwerwiegende Vorfälle, die im Zusammenhang mit dem Produkt aufgetreten sind, in Übereinstimmung mit den örtlichen Vorschriften dem Hersteller sowie den zuständigen Behörden melden!
- Sollten Reagenzien mit der Haut in Kontakt kommen, die betroffenen Stellen sofort mit viel Wasser abspülen!

- Ein Sicherheitsdatenblatt ist auf Anfrage für den professionellen Anwender verfügbar.
- Die Reagenzien nicht wiederverwenden, außer die Wiederverwendung ist explizit erlaubt!
- Kreuzkontaminationen der Präparate vermeiden, da diese zu fehlerhaften Ergebnissen führen können.
- Die Präparate dürfen während der Hybridisierungs- und Waschschritte nicht austrocknen.
- DAPI/DuraTect-Solution (**MT7**) sollte nicht für längere Zeit dem Licht, insbesondere intensivem Licht, ausgesetzt werden. Das bedeutet, falls möglich sollten alle Arbeitsschritte im Dunkeln und/oder unter Verwendung von lichtundurchlässigen Behältnissen durchgeführt werden!

Besondere Kennzeichnung von ES1:

EUH208	Enthält Pepsin A. Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
EUH210	Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.

Gefahren- und Sicherheitshinweise für PT1 und WB10:

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 MT7:

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

7. Einschränkungen

- Für die Verwendung als *In-vitro*-Diagnostikum.
- Nur für die professionelle Anwendung.
- Nur für den nicht-automatisierten Gebrauch.
- 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 ISH Sonden, Reagenzien, Diagnose-Panels und den zur Erstellung von gefärbten Präparaten verwendeten Methoden vertraut zu sein. Die Färbung ist in einem zertifizierten, zugelassenen Labor unter Aufsicht eines unter der Aufsicht eines Pathologen/Humangenetikers durchzuführen, der für die Auswertung der Färbepräparate 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 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. Dieses IVD ist nur dann CE-zertifiziert, wenn es wie in dieser Gebrauchsanweisung beschrieben im Rahmen des Verwendungszwecks eingesetzt wird.

8. Störsubstanzen

Rote Blutzellen innerhalb des Präparates können Autofluoreszenz verursachen, welche die Signalerkennung behindert.

Folgende Fixierungen sind nicht kompatibel mit FISH:

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

9. Vorbereitung der Präparate

Empfehlungen:

- Fixierung in 10% neutral gepuffertem Formalin für 24h bei Raumtemperatur (18-25°C).
- Probengröße < 0,5 cm³.
- Qualitativ hochwertiges Paraffin verwenden.
- Das Einbetten sollte bei Temperaturen unter 65°C erfolgen.
- 2-4 µm dicke Mikrotomschnitte anfertigen.
- Positiv geladene Objektträger verwenden.
- Für 2-16h bei 50-60°C fixieren.

10. Vorbereitung der Reagenzien

5x F*lex*ISH Wash Buffer (**WB10**) ist wie in der Gebrauchsanweisung unter 11. „Durchführung" beschrieben vorzubereiten. Alle anderen Reagenzien des Kits sind gebrauchsfertig. Kein Rekonstituieren, Mischen oder Verdünnen ist notwendig.

11. Durchführung

11.1 Tag 1

Vorbereitende Schritte

(1) Zwei Ethanolreihen (70%, 90% und 100% Ethanol) vorbereiten: 100% Ethanol mit deionisiertem oder destilliertem Wasser verdünnen. Diese Lösungen können in geeigneten Gefäßen aufbewahrt und wiederverwendet werden.
(2) Heat Pretreatment Solution Citric (**PT1**): In einen Färbetrog füllen und auf 98°C erwärmen.
(3) F*lex*ISH Sonde: Vor der Verwendung auf RT bringen, vor Licht schützen. Vor dem Öffnen durch Vortexen mischen und kurz herunterzentrifugieren

Vorbehandlung (Entparaffinierung/Proteolyse)

(1) Die Objektträger für 2x 10 min in Xylol inkubieren.
(2) In 100%, 100%, 90% und 70% Ethanol jeweils für 5 min inkubieren.
(3) 2x 2 min in deionisiertem oder destilliertem Wasser waschen.
(4) Für 20 min in vorgewärmter Heat Pretreatment Solution Citric (**PT1**) bei 98°C inkubieren.

Wir empfehlen, nicht mehr als acht Objektträger pro Färbetrog zu verwenden. Nach dem Eintauchen der Objektträger die Temperatur der Heat Pretreatment Solution Citric im Trog überprüfen und die Zeit starten, sobald die Lösung eine Temperatur von mindestens 95°C erreicht hat.

(5) Die Objektträger sofort in destilliertes oder deionisiertes Wasser überführen, für 2x 2 min waschen und das Wasser abtropfen lassen oder abtupfen.
(6) Pepsin Solution (**ES1**) (tropfenweise) auf die Präparate auftragen und für 15 min bei 37°C in einer Feuchtekammer inkubieren.

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. Als Richtwert kann eine

Inkubationszeit von 2-30 min empfohlen werden. Generell wird eine Bestimmung der optimalen Dauer der Proteolyse in Vortests empfohlen.

(7) Für 2x 2 min in deionisiertem oder destilliertem Wasser waschen.
(8) Dehydrierung in 70%, 90%, und 100% Ethanol, jeweils für 1 min
(9) Schnitte an der Luft trocknen.

Bitte beachten: Die Schnitte vollständig trocknen lassen, bevor die Sonde aufgetragen wird, da zurückbleibebende Feuchtigkeit die Signalintensität reduzieren und/oder die Gewebemorphologie beeinflussen kann.

Denaturierung und Hybridisierung

(1) 10 µl der F*lex*ISH Sonde auf jedes der vorbehandelten Präparate pipettieren.

Längere Licht-Exposition der Sonde vermeiden.

(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 10 min bei 75°C denaturieren.
(4) Die Hybridisierung für 2h bis 16h (d.h. über Nacht) bei 37°C durchführen, indem die Objektträger entweder in einen Hybridizer oder in eine Feuchtekammer im Hybridisierungsofen überführt werden.

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

11.2 Tag 1 oder Tag 2

Vorbereitende Schritte

(1) Vorbereitung von 1x F*lex*ISH Wash Buffer: 1 Teil 5x F*lex*ISH Wash Buffer (**WB10**) mit 4 Teilen deionisiertem oder destilliertem Wasser verdünnen. Drei Färbetröge mit dem 1x FlexISH Wash Buffer füllen und einen Trog auf 72°C vorwärmen, die anderen beiden bei Raumtemperatur lassen.
(2) DAPI/DuraTect-Solution (**MT7**): Vor der Verwendung auf Raumtemperatur bringen, vor Licht schützen.

Post-Hybridisierung und Detektion

(1) Vorsichtig den Naturkautschuk-Klebstoff oder Kleber entfernen.
(2) Durch das Eintauchen in 1x F*lex*ISH Wash Buffer für 1-2 min das Deckglas entfernen.

Um das Entfernen des Deckglases zu erleichtern, kann dieser Schritt alternativ für 2 min bei 37°C durchgeführt werden.

(3) Mit 1x F*lex*ISH Wash Buffer für 10 min bei 72°C waschen.

Der 1x FlexISH Wash Buffer sollte vorgewärmt sein. Falls notwendig, die Temperatur mit einem Thermometer überprüfen. Nicht mehr als acht Objektträger pro Färbetrog verwenden.

(4) Mit 1x F*lex*ISH Wash Buffer für 3 min bei Raumtemperatur waschen.
(5) In 70%, 90% und 100% Ethanol jeweils für 1 min inkubieren.
(6) Schnitte vor Licht geschützt an der Luft trocknen.
(7) 25 µl DAPI/DuraTect-Solution (**MT7**) auf die Objektträger pipettieren. Die Präparate mit einem Deckglas (24 mm x 60 mm) abdecken, dabei den Einschluss von Luftbläschen vermeiden. Im Dunkeln für 15 min inkubieren.

Die Verwendung einer abgeschnittenen Pipettenspitze zur Vergrößerung der Öffnung kann das Pipettieren erleichtern. Nicht lange dem Licht aussetzen.

(8) Die Objektträger im Dunkeln aufbewahren. Bei längerer Lagerung sollte dies bei 2-8°C erfolgen.
(9) Die Auswertung des Probenmaterials erfolgt mittels Fluoreszenzmikroskopie. Es werden Filtersätze für folgende Wellenlängenbereiche benötigt:

Fluoreszenzfarbstoff	Anregung	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. Interpretation der Ergebnisse

Bei Verwendung von geeigneten Filtersätzen erscheinen in Interphasen oder Metaphasen von normalen Zellen oder Zellen ohne eine chromosomale Aberration zwei Signale pro Sonde/Fluoreszenzmarker. Ausnahmen sind Sonden, welche gegen X- und/oder Y-Chromosomen gerichtet sind, was je nach Geschlecht in entweder kein bis zwei Signalen pro Sonde/Fluoreszenzmarker resultiert. In Zellen mit chromosomaler Aberration kann ein anderes Signalmuster in Interphasen oder Metaphasen beobachtet werden. Weitere Informationen zur Interpretation der Ergebnisse sind in der Gebrauchsanleitung der jeweiligen Sonde zu finden.

13. Empfohlene Qualitätskontrollverfahren

Die Gebrauchsanweisung der jeweiligen ZytoVision Sonde beachten.

14. Leistungsmerkmale

Die Gebrauchsanweisung der jeweiligen ZytoVision Sonde beachten.

15. Entsorgung

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

16. 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
Proteolytische Vorbehandlung nicht optimal	Die Inkubationszeit mit Pepsin optimieren, falls notwendig erhöhen oder reduzieren
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 Präparat während der Hybridisierung zu verhindern.
Ungeeignete Filtersätze verwendet	Für die Fluorochrome der Sonde geeignete Filtersätze verwenden. *Triple-Bandpass-Filtersätze liefern im Vergleich zu Single- oder Dual-Bandpass-Filtersätzen weniger Licht. Daher können die Signale unter Verwendung von Triple-Bandpass-Filtersätzen schwächer erscheinen.*

Kreuzhybridisierungssignale, Hintergrundsignale

Mögliche Ursache	Lösung
Unvollständiges Entparaffinieren	Frische Lösungen verwenden, Dauer des Entparaffinierens überprüfen
Proteolytische Vorbehandlung zu stark	Die Inkubationszeit mit Pepsin reduzieren
Objektträger sind vor der Hybridisierung auf Raumtemperatur abgekühlt	Objektträger schnell auf 37°C transferieren

Degradierte 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, falls notwendig reduzieren
Unzureichende Trocknung vor Applikation der Sonde	Lufttrocknung verlängern

Überlagernde Zellkerne

Mögliche Ursache	Lösung
Ungeeignete Dicke der Gewebeschnitte	2-4 µm dicke Mikrotomschnitte anfertigen

Präparat löst sich vom Objektträger

Mögliche Ursache	Lösung
Proteolytische Vorbehandlung ist zu stark	Inkubationszeit mit Pepsin reduzieren

Schwache Gegenfärbung

Mögliche Ursache	Lösung
Gering konzentrierte DAPI-Lösung	DAPI/DuraTect-Solution (ultra) (Prod. Nr. MT-0008-0.8) stattdessen verwenden
Inkubationszeit mit DAPI zu kurz	Inkubationszeit mit DAPI anpassen

17. Literatur

- 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	Beschreibung der Änderung
1.2.1	11. Durchführung ZyGreen 2.0 hinzugefügt

www.zytovision.com

Die aktuellste Version der Gebrauchsanleitungen sowie Gebrauchsanleitungen in verschiedenen Sprachen sind auf www.zytovision.com verfügbar.

Unsere Experten stehen Ihnen für Ihre Fragen zur Verfügung.
Bitte kontaktieren Sie helptech@zytovision.com

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

Warenzeichen:
ZytoVision® und F/*ex*ISH® sind Warenzeichen der ZytoVision GmbH.