



FlexISH- Tissue Implementation Kit

REF Z-2182-5 Σ 5

REF Z-2182-20 Σ 20

Til bruk i prosedyrer for fluorescerende *in situ*-hybridisering (FISH)

4250380N8486



In vitro diagnostisk medisinsk utstyr

i henhold til IVDR (EU) 2017/746

1. Beregnet bruk

FlexISH-Tissue Implementation Kit er beregnet til å brukes i kombinasjon med FlexISH-sonder på formalinfiksede, parafininnstøpte prøver ved hjelp av fluorescerende *in situ*-hybridisering (FISH).

Produktet er kun beregnet til profesjonell bruk. Alle tester som bruker produktet skal utføres i et sertifisert, lisensiert anatomisk patologilaboratorium av kvalifisert personell og under tilsyn av en patolog/humangenetiker.

2. Testprinsipp

Fluorescerende *in situ* hybridiseringsteknikk (FISH) muliggjør påvisning og visualisering av spesifikke nukleinsyresekvenser i cellepreparater. Fluorescensmerkede DNA-fragmenter, såkalte FISH-sonder, og deres komplementære mål-DNA-tråder i preparatene blir ko-denaturert og kan deretter anneale under hybridisering. Deretter fjernes uspesifikke og ubundne sondefragmenter med stringent vasketrinn. Etter motfarging av DNA med DAPI, blir hybridiserte sondefragmenter visualisert med et fluorescensmikroskop utstyrt med eksitasjons- og emisjonsfiltre som er spesifikke for fluorokromene som FISH-fragmentene er direkte merket med.

3. Reagenser som følger med

FlexISH-Tissue Implementation Kit er tilgjengelig i to størrelser og består av:

Kode	Komponent	Mengde		Beholder
		20	5	
PT1	Heat Pretreatment Solution Citric	500 ml	150 ml	Flaske med skruhet (stor)
ES1	Pepsin Solution	4 ml	1 ml	Dråpeflaske, hvit hette
WB10	5x FlexISH Wash Buffer	500 ml	150 ml	Flaske med skruhet (stor)
MT7	DAPI/DuraTect-Solution	0.8	0.2	Reaksjonskar, blått lokk
	Bruksanvisning	1	1	

Z-2182-5 (5 tester): Komponentene **ES1** og **MT7** er tilstrekkelig til 5 reaksjoner. Komponent **WB10** er tilstrekkelig for 3x 3 fargingsbeholdere på 70 ml hver. Komponent **PT1** er tilstrekkelig for 2 fargingsbeholdere på 70 ml hver.

Z-2182-20 (20 tester): Komponentene **ES1** og **MT7** er tilstrekkelig til 20 reaksjoner. Komponent **WB10** er tilstrekkelig for 11x 3 fargingsbeholdere på 70 ml hver. Komponent **PT1** er tilstrekkelig for 7 fargingsbeholdere på 70 ml hver.

4. Materialer som kreves, men som ikke medfølger

- FlexISH-sonde
- Positive og negative kontrollprøver
- Mikroskopobjektglass, positivt ladet
- Vannbad (37 °C, 98 °C)
- Varmeplate eller hybridiseringsenhet
- Fuktighetskammer + hybridiseringsovn eller hybridiseringsenhet
- Justerbare pipetter (10 µl, 30 µl)
- Fargekrukker eller -bad
- Tidsur
- Kalibrert termometer
- Etanol eller reagensalkohol
- Xylen
- Avionisert eller destillert vann
- Dekkglass (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Gummisement, f.eks. Fixogum Rubber Cement (Prod. nr. E-4005-50/-125) eller lignende
- Tilstrekkelig vedlikeholdt fluorescensmikroskop (400–1000x)
- Immersjonsolje godkjent for fluorescensmikroskopi
- Egnede filtersett

5. Oppbevaring og håndtering

Oppbevares ved 2–8 °C i oppreist stilling. I tillegg må DAPI/DuraTect-Solution (**MT7**) oppbevares beskyttet mot lys. Returneres til lagringsbetingelsene umiddelbart etter bruk. Ikke bruk reagenser etter utløpsdato angitt på etiketten. Produktet er stabilt til utløpsdato angitt på etiketten ved riktig håndtering.

6. Advarsler og forholdsregler

- Les bruksanvisningen før bruk!
- Ikke bruk reagensene etter at utløpsdatoen er nådd!
- Dette produktet inneholder stoffer (i lave konsentrasjoner og volumer) som er helseskadelige. Unngå all direkte kontakt med reagensene. Iverksett egnede beskyttelsestiltak (bruk engangshansker, vernebriller og laboratorieklær!)
- Rapport alle alvorlige hendelser som har forekommet i forhold til produktet til produsenten og den kompetente myndigheten i henhold til lokale forskrifter!

- Hvis reagenser kommer i kontakt med huden, må huden skylles umiddelbart med rikelige mengder vann!
- Et sikkerhetsdatablad er tilgjengelig på forespørsel for profesjonelle brukere.
- Ikke gjenbruk reagenser, med mindre gjenbruk er uttrykkelig tillatt!
- Unngå krysskontaminering av prøver da dette kan føre til feil resultater.
- Prøvene må ikke få tørke under hybridiserings- og vasketrinnene.
- DAPI/DuraTect-Solution (MT7) skal ikke utsettes for lys, spesielt ikke sterkt lys, over lengre tid, det vil si at alle trinn om mulig skal utføres i mørket og/eller ved bruk av lystette beholdere.

Spesiell merking for ES1:

EUH208	Inneholder Pepsin A. Kan gi en allergisk reaksjon.
EUH210	Sikkerhetsdatablad er tilgjengelig på anmodning.

Fare- og sikkerhetssetninger for PT1 og WB10:

Den farebestemmende komponenten er en reaksjonsmasse av: 5-klor-2-metyl-4-isotiazolin-3-on [EF-nr. 247-500-7] og 2-metyl-2H-isotiazol-3-on [EF-nr. 220-239-6] (3:1).



Advarsel

H317	Kan utløse en allergisk hudreaksjon.
P261	Unngå innånding av støv/røyk/gass/tåke/damp/aerosoler.
P272	Tilsølte arbeidsklær må ikke fjernes fra arbeidsplassen.
P280	Benytt vernehansker/verneklær/øyevern/ansiktsvern.
P302+P352	VED HUDKONTAKT: Vask med mye vann.
P333+P313	Ved hudirritasjon eller utslett: Søk legehjelp.
P362+P364	Tilsølte klær må fjernes og vaskes før bruk.

Fare- og sikkerhetssetninger for MT7:

Dette produktet er ikke klassifisert som farlig i henhold til forordning (EF) nr. 1272/2008.

7. Begrensninger

- Til *in vitro* diagnostisk bruk.
- Kun til profesjonell bruk.
- Kun til ikke-automatisert bruk.
- Den kliniske tolkningen av enhver positiv farging, eller fravær av dette, må gjøres innenfor konteksten av klinisk historie, morfologi, andre histopatologiske kriterier og andre diagnostiske tester. Det er en kvalifisert patolog/humangenetikers ansvar å være kjent med ISH-sondene, reagensene, diagnosepanelene og metodene som brukes til å produsere det fargede preparatet. Farging må utføres i et sertifisert, lisensiert laboratorium under tilsyn av en patolog/humangenetikar som er ansvarlig for å gjennomgå de fargede objektglassene og sørge for adekvate positive og negative kontroller.
- Prøvefarging, spesielt signalintensitet og bakgrunnsfarging, avhenger av håndtering og behandling av prøven før farging. Feil fiksering, frysing, tining, vasking, tørking, oppvarming, oppdeling eller kontaminering med andre prøver eller væsker kan gi artefakter eller falske resultater. Inkonsistente resultater kan skyldes variasjoner i fikserings- og innstøpingsmetoder og iboende uregelmessigheter i prøven.

- Informasjon om materialer som kreves til ISH-prosedyrer finnes i bruksanvisningen for den respektive ZytoVision-sonden og implementeringssettet. Endringer i disse prosedyrene kan endre ytelsen og må valideres av brukeren. Denne IVDen er kun sertifisert som CE når den brukes som beskrevet i denne bruksanvisningen innenfor rammen av beregnet bruk.

8. Forstyrrende stoffer

Blodlegemer i prøven kan vise autofluorescens, som hindrer signalgjenkjenning.

Følgende fikseringsmidler er uforenlige med ISH:

- Bouins fikseringsmiddel
- B5 fikseringsmiddel
- Sure fikseringsmidler (f.eks. pikrinsyre)
- Zenkers fikseringsmiddel
- Alkoholer (når de brukes alene)
- Kvikksølvklorid
- Formaldehyd/sinkfiksativ
- Hollandes fikseringsmiddel
- Ikke-bufret formalin

9. Klargjøring av prøver

Anbefalinger:

- Fiksering i 10 % nøytralt bufret formalin i 24 timer ved romtemperatur (18 °C–25 °C).
- Prøvestørrelse $\leq 0,5 \text{ cm}^3$.
- Bruk parafin av høy kvalitet.
- Innstøping bør utføres ved temperaturer lavere enn 65 °C.
- Forbered 2–4 μm mikrotomseksjoner.
- Bruk positivt ladede objektglass.
- Fikser i 2–16 timer ved 50–60 °C.

10. Forberedende behandling av enheten

5x FlexISH Wash Buffer (WB10) skal forbehandles i samsvar med instruksjonene i 11. «Analyseprosedyre». Alle andre reagenser i settet er klare til bruk. Ingen rekonstituering, blanding eller fortykning er nødvendig.

11. Analyseprosedyre

11.1 Dag 1

Klargjøringstrinn

1. Klargjøring av to etanolserier (70 %, 90 % og 100 % etanoløsninger): Fortynn 100 % etanol med avionisert eller destillert vann. Disse løsningene kan oppbevares i egnede beholdere og kan brukes på nytt for opptil 160 objektglass.
2. Heat Pretreatment Solution Citric (PT1): Fyll en fargingsbeholder og varm opp til 98 °C.
3. FlexISH-sonde: Bring til romtemperatur før bruk, beskytt mot lys. Før du åpner hetteglasset, bland ved å sentrifugere og spinne ned kort.

Forbehandling (avvoksing/proteolyse)

1. Inkuber objektglassene i 2x 5 min i xylen.
2. Inkuber i 100 %, 100 %, 90 % og 70 % etanol, hver i 2 min.
3. Vask 2x 2 min i avionisert eller destillert vann.
4. Inkuber i 20 min i en forvarmet Heat Pretreatment Solution Citric (PT1) ved 98 °C.

Vi anbefaler ikke å bruke mer enn åtte objektglass per fargingsbeholder. Når objektglassene er senket ned i væsken, må du kontrollere temperaturen til Heat Pretreatment Solution Citric i beholderen og starte tidtakingen så snart temperaturen i løsningen har nådd minst 95 °C.

5. Overfør objektglassene umiddelbart til avionisert eller destillert vann, vask i 2x 2 min og tøm ut eller tørk av vannet.
6. Påfør (dråpevis) Pepsin Solution (ES1) i prøven og inkuber i 15 min ved 37 °C i et fuktighetskammer.



ES1 kan danne bunnfall, som ikke påvirker kvaliteten.

Avhengig av flere faktorer, f.eks. fikseringens natur og varighet, seksjonenes tykkelse og prøvenes natur, kan ulike inkubasjonstider være nødvendig. Som en retningslinje for inkubasjon anbefaler vi en inkubasjonstid på 2–30 min. Som en generell regel anbefaler vi å fastslå optimal tid for proteolyse i forhåndstester.

7. Vask i 2x 2 min i avionisert eller destillert vann.

8. Dehydrering: i 70 %, 90 % og 100 % etanol, hver i 1 min.

9. Lufttørk seksjonene.

Sørg for å lufttørke seksjonene helt før sondeapplisering, siden gjenværende fuktighet kan redusere signalstyrken og/eller påvirke prøvemorfologien.

Denaturering og hybridisering

1. Pipetter 10 µl av FlexISH-sonden på hver forbehandlet prøve.
- Unngå at sonden eksponeres for lys over lang tid.
2. Dekk prøver med et 22 mm x 22 mm dekkglass (unngå fastklemt bobler) og forsegl dekkglasset.
- Vi anbefaler å bruke gummisement (f.eks. Fixogum) for tetting.
3. Plasser objektglassene på en varmeplate eller hybridisator og denaturer prøvene i 10 minutter ved 75 °C.
4. Utfør hybridisering i 2 timer til 16 timer (dvs. over natten) ved 37 °C ved enten å overføre objektglassene til en hybridisator eller til et fuktighetskammer og en hybridiseringssovn.
- Det er viktig at prøvene ikke tørker ut under hybridiseringstrinnet.

11.2 Dag 1 eller dag 2

Klargjøringstrinn

1. Klargjøring av 1x FlexISH Wash Buffer: Fortynn 1 del 5x FlexISH Wash Buffer (WB10) med 4 deler avionisert eller destillert vann. Fyll tre fargingsbeholdere med 1x FlexISH Wash Buffer, forvarm én beholder til 72 °C og hold to beholdere ved romtemperatur.
2. DAPI/DuraTect-Solution (MT7): Bring til romtemperatur før bruk, beskytt mot lys.

Post-hybridisering og påvisning

1. Fjern gummisementen eller limet varsomt.
2. Fjern dekkglassene ved å senke ned i 1x FlexISH Wash Buffer ved romtemperatur i 1–2 min.
- For å gjøre det lettere å fjerne dekkglasset kan dette trinnet også utføres i 2 min ved 37 °C.
3. Vask ved bruk av 1x FlexISH Wash Buffer i 10 min ved 72 °C.
- 1x FlexISH Wash Buffer skal forvarmes. Kontroller med et termometer ved behov. Ikke bruk mer enn åtte objektglass per fargingsbeholder.
4. Vask ved bruk av 1x FlexISH Wash Buffer i 3 min ved romtemperatur.
5. Inkuber objektglassene i 70 %, 90 % og 100 % etanol, hvert i 1 min.
6. Lufttørk prøvene beskyttet mot lys.
7. Pipetter 25 µl DAPI/DuraTect-Solution (MT7) på objektglassene. Unngå fastklemt bobler, dekk prøvene med et dekkglass (24 mm x 60 mm). Inkuber i mørket i 15 min.
- Bruk av en pipettespiss som er kuttet av for å øke størrelsen på åpningen, kan gjøre pipetteringsprosessen enklere. Unngå lang eksponering for lys.
8. Oppbevar objektglassene i mørket. For lengre oppbevaringsperioder bør dette skje ved 2–8 °C.
9. Evaluering av prøvematerialet utføres ved fluorescensmikroskopi. Filtersett for følgende bølglengdeområder er nødvendig:

Fluorescerende fargestoff	Eksitasjon	Emisjon
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. Tolkning av resultater

Ved bruk av egnede filtersett i interfaser eller metafaser av normale celler eller celler uten kromosomaberrasjoner oppstår to signaler per sonde/fluorescensetikett, bortsett fra sonder rettet mot X- og/eller Y-kromosomer, hvilket resulterer i null til to signaler per sonde/fluorescensetikett, avhengig av kjønn. I celler med kromosomaberrasjoner kan et annet signalmønster være synlig i interfaser eller metafaser. Se den relevante sondehåndboken for mer informasjon om resultattolkning.

13. Anbefalte kvalitetskontrollprosedyrer

Se bruksanvisningen for den respektive ZytoVision-sonden.

14. Ytelsesegenskaper

Se bruksanvisningen for den respektive ZytoVision-sonden.

15. Avfallsbehandling

Avfallsbehandling av reagenser må utføres i henhold til lokale forskrifter.

16. Feilsøking

Ethvert avvik fra bruksanvisningen kan føre til dårligere fargeresultater eller ingen farging i det hele tatt. Se www.zytovision.com for mer informasjon.

Svake signaler eller ingen signaler i det hele tatt

Mulig årsak	Handling
Prøven har ikke blitt riktig fiksert	Optimer fikseringstid og fikseringsmiddel
Proteolytisk forbehandling ikke utført riktig	Optimer pepsin-inkubasjonstiden, øk eller reduser om nødvendig
Sondefordampning	Ved bruk av hybridisator er bruk av de våte stripene/vannfylte tankene obligatorisk. Ved bruk av en hybridiseringssovn er det nødvendig med bruk av et fuktighetskammer. I tillegg bør dekkglasset forsegles fullstendig, f.eks. med Fixogum, for å forhindre uttørking av prøven under hybridisering.
Bruk av uegnet filtersett	Bruk filtersett som passer til fluorokromene til sonden. Trippel-bandpass-filtersett gir mindre lys sammenlignet med enkelt- eller dual-bandpass-filtersett. Følgelig kan signalene virke svakere ved bruk av disse trippel-bandpass-filtersettene.

Kryshybridiseringssignaler; støvende bakgrunn

Mulig årsak	Handling
Ufullstendig avvoksing	Bruk ferske løsninger; sjekk varigheten på avvoksingen
Proteolytisk forbehandling for sterk	Reduser inkubasjonstiden for pepsin
Objektglass avkjølt til romtemperatur før hybridisering	Overfør objektglassene raskt til 37 °C

Morfologi degradert

Mulig årsak	Handling
Prøven har ikke blitt riktig fiksert	Optimer fikseringstid og fikseringsmiddel
Proteolytisk forbehandling ikke utført riktig	Optimer pepsininkubasjonstiden, reduser om nødvendig
Utilstrekkelig tørking før sondepåføring	Forleng lufttørkingen

Overlappende kjerner

Mulig årsak	Handling
Upassende tykkelse på vevssnitt	Forbered 2–4 µm mikrotomseksjoner

Prøven flyter av objektglasset

Mulig årsak	Handling
Proteolytisk forbehandling for sterk	Reduser inkubasjonstiden for pepsin

Svak motfarging

Mulig årsak	Handling
Lavkonsentrert DAPI-løsning	Bruk <u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (Prod. nr. MT-0008-0.8) i stedet
DAPI-inkubasjonstid for kort	Juster DAPI-inkubasjonstid

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. Revisjon

Revisjon	Beskrivelse av endringen
1.2.1	11. Analyseprosedyre ZyGreen 2.0 lagt til


www.zytovision.com

Se www.zytovision.com for den nyeste bruksanvisningen samt for bruksanvisning på forskjellige språk.

Våre eksperter er tilgjengelige for å svare på dine spørsmål.
Kontakt help@zytovision.com



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

Varemerker:

ZytoVision® og F/xxSH® er varemerker for ZytoVision GmbH.