



**ZytoLight**  
**FISH-Cytology Implementation Kit**

REF Z-2099-20



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

4250380N727X



In vitro diagnostisk medisinsk utstyr  
i henhold til IVDR (EU) 2017/746

**1. Beregnet bruk**

ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit er beregnet til å brukes i kombinasjon med ZytoLight FISH-sonder på cytologiske 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 patologi-laboratorium 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 stringente 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**

ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit er tilgjengelig i én størrelse og består av:

Kode	Komponent	Mengde	Beholder
		$\Sigma$ 20	
ES2	<u>Cytology Pepsin Solution</u>	4 ml	Dråpeflaske, gjennomsiktig hette
WB5	<u>20x Wash Buffer TBS</u>	50 ml	Flaske med skruhet
PT4	<u>10x MgCl<sub>2</sub></u>	50 ml	Flaske med skruhet
PT5	<u>10x PBS</u>	50 ml	Flaske med skruhet
WB7	<u>Cytology Stringency Wash Buffer SSC</u>	500 ml	Flaske med skruhet (stor)
WB8	<u>Cytology Wash Buffer SSC</u>	500 ml	Flaske med skruhet (stor)
MT7	<u>DAPI/DuraTect-Solution</u>	0,8 ml	Reaksjonskar, blått lokk
	Bruksanvisning	1	

**Z-2099-20 (20 tester):** Komponentene **ES2** og **MT7** er tilstrekkelig til 20 reaksjoner. Komponent **PT4**, **PT5**, **WB7** og **WB8** er tilstrekkelig for 7 fargingsbeholdere på 70 ml hver. Komponent **WB5** er tilstrekkelig for 14 fargingsbeholdere på 70 ml hver.

**4. Materialer som kreves, men som ikke medfølger**

- ZytoLight FISH-sonde
- Positive og negative kontrollprøver
- Mikroskopobjektglass, ubelagt
- Vannbad (70 °C)
- Hybridiseringsenhet eller varmeplate
- Hybridiseringsenhet eller fuktighetskammer i hybridiseringsovn
- Justerbare pipetter (10 µl, 25 µl)
- Fargekrukker eller -bad
- Tidsur
- Kalibrert termometer
- Etanol eller reagensalkohol
- 37 % formaldehyd, syrefri, eller 10 % formalin, nøytralt bufret
- 2x saltvann-natriumsitrat (SSC), f.eks. fra 20x SSC Solution (Prod. nr. WB-0003-50)
- 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 ES2:

EUH210	Sikkerhetsdatablad er tilgjengelig på anmodning. < 20 % av blandingen består av innholdsstoff(er) av ukjent akutt toksisitet (innånding).
--------	--

### Fare- og sikkerhetssetninger for PT4, PT5, WB5, WB7 og WB8:

Den farebestemmende komponenten er en blanding 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/humangenetiker 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

Røde blodlegemer i prøven kan vise autofluorescens som hindrer signalgjenkjenning.

## 9. Klargjøring av prøver

Inkuber objektglassene i 2 min i en 2x SSC-løsning ved 73 °C rett før proteolyse for aldring.

*Alternativt kan aldring av prøver oppnås ved å inkubere prøver over natten (12–16 timer) ved 37 °C.*

## 10. Forberedende behandling av enheten

20x Wash Buffer TBS (WB5), 10x MgCl<sub>2</sub> (PT4) og 10x PBS (PT5) skal forbehandles i samsvar med instruksjonene i 11. «Analyseprosedyre». Komponentene (PT4) og (PT5) kan danne bunnfall ved 2–8 °C. Ved behov må du varme opp til 37 °C i 10 min til bunnfallet er helt oppløst før bruk. Alle andre reagenser i settet er klare til bruk. Ingen rekonstituering, blanding eller fortynning er nødvendig.

## 11. Analyseprosedyre

### 11.1 Dag 1

#### Klargjøringstrinn

- Klargjøring av 1x Wash Buffer TBS:* Fortynn 1 del 20x Wash Buffer TBS (WB5) med 19 deler avionisert eller destillert vann.
- Klargjøring av 1 % formaldehydløsning:* For 100 ml 1 % formaldehydløsning blander du enten 2,7 ml 37 % syrefritt formaldehyd eller 25 ml 10 % nøytralt bufret formalin (4 % formaldehyd) med 10 ml 10x MgCl<sub>2</sub> (PT4) og 10 ml 10x PBS (PT5) og justerer volumet til 100 ml med avionisert eller destillert vann. Bland godt.
- Klargjøring av en etanolserie (70 %, 90 % og 100 % etanoløsninger):* Fortynn 7, 9 og 10 deler av 100 % etanol med 3, 1 og 0 deler av henholdsvis avionisert eller destillert vann. Disse løsningene kan oppbevares i egnede beholdere og kan brukes på nytt.
- ZytoLight FISH-sonde* Bring til romtemperatur før bruk, beskytt mot lys.

#### Forbehandling (proteolyse/etterfiksering)

- Påfør (dråpevis) Cytology Pepsin Solution (ES2) i den cytologiske prøven og inkuber i 10 min ved 37 °C i et fuktighetskammer.  
*ES2 kan danne bunnfall, som ikke påvirker kvaliteten.*  
*Avhengig av flere faktorer, f.eks. fikseringens natur og varighet samt cellenes natur, kan ulike inkubasjonstider være nødvendig. Vi anbefaler en inkubasjonstid på 5–15 min for cytologiske prøver. Som en generell regel anbefaler vi å fastslå optimal tid for proteolyse i forhåndstester.*
- Inkuber objektglassene i 5 min i 1x Wash Buffer TBS.
- Inkuber objektglassene i 5 min i 1 % formaldehydløsning.
- Inkuber objektglassene i 5 min i 1x Wash Buffer TBS.
- Dehydrering: i 70 %, 90 % og 100 % etanol, hver i 1 min.

Lufttørk prøvene.

#### Denaturering og hybridisering

- Pipetter 10 µl av ZytoLight FISH Probe på hver forbehandlet prøve.  
*Unngå at sonden eksponeres for lys over lang tid.*
- Dekk prøver med et 22 mm x 22 mm dekkglass (unngå fastklemte bobler) og forsegl dekkglasset.  
*Vi anbefaler å bruke gummisement (f.eks. Fixogum) for tetting.*
- Plasser objektglassene på en varmeplate eller hybridisator og denaturer prøvene i 5 minutter ved 72 °C.
- Overfør objektglassene til et fuktighetskammer og hybridiser over natten ved 37 °C (f.eks. i en hybridiseringsovn).

*Det er viktig at de cytologiske prøvene ikke tørker ut under hybridiseringstrinnet.*



11.2 Dag 2

Klargjøringstrinn

- Cytology Stringency Wash Buffer SSC (WB7): Forvarm til 70 °C.
- Cytology Wash Buffer SSC (WB8): Bring til romtemperatur.
- DAPI/DuraTect-Solution (MT7): Bring til romtemperatur før bruk, beskyttet mot lys.

Post-hybridisering og påvisning

1. Fjern gummisementen eller limet varsomt.
2. Fjern dekkglasset varsomt.
3. Vask ved bruk av Cytology Stringency Wash Buffer SSC (WB7) i 2 min ved 70 °C.

Cytology Stringency Wash Buffer SSC skal forvarmes. Kontroller med et termometer ved behov.

Vi anbefaler bruk av fire objektglass per fargingsbeholder. Ved behov bruker du tomme objektglass for å justere antallet til fire.

4. Vask ved bruk av Cytology Wash Buffer SSC (WB8) i 1 min ved romtemperatur.

Cytology Wash Buffer SSC skal forvarmes til romtemperatur. Kontroller med et termometer ved behov.

5. Lufttørk prøvene beskyttet mot lys.
6. 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.

7. Oppbevar objektglasset i mørket. For lengre oppbevaringsperioder bør dette skje ved 2–8 °C.
8. Evaluering av prøvematerialet utføres ved fluorescensmikroskopi. Filtersett for følgende bølgelengdeområder 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. Tolking 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](http://www.zytovision.com) for mer informasjon.

Svake signaler eller ingen signaler i det hele tatt

Mulig årsak	Handling
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 hybridiseringsovn er det nødvendig med bruk av et fuktighetskammer. I tillegg bør dekkglasset forsegles fullstendig, f.eks. med Fixogum, for å forhindre uttørring av prøven under hybridisering
Bruk av uegnet filtersett	Bruk filtersett som passer til fluorokromene til sonden. <i>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</i>

Krysshybridiseringssignaler; støvende bakgrunn

Mulig årsak	Handling
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
Proteolytisk forbehandling ikke utført riktig	Optimer pepsininkubasjonstiden, reduser om nødvendig
Utilstrekkelig tørking før sondepåføring	Forleng lufttørkingen

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](http://www.zytovision.com)

Se [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com) for den nyeste bruksanvisningen samt for bruksanvisning på forskjellige språk.

Våre eksperter er tilgjengelige for å svare på dine spørsmål. Kontakt [helptech@zytovision.com](mailto:helptech@zytovision.com)



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

Varemerker:

ZytoVision® og ZytoLight® er varemerker for ZytoVision GmbH.