





**FlexISH-
Tissue Implementation Kit**

| | | | |
|------------|-----------|---|----|
| REF | Z-2182-5 |  | 5 |
| REF | Z-2182-20 |  | 20 |

För användning i fluorescerande *in situ*-hybridiseringsprocedurer (FISH)

4250380N8486



Medicinteknisk produkt för in vitro diagnostik
i enlighet med IVDR (EU) 2017/746

1. Avsedd användning

FlexISH-Tissue Implementation Kit är avsett för användning i kombination med FlexISH probes på formalinfixerade, paraffin-märkta specimen genom fluorescerande *in situ*-hybridisering (FISH).

Produkten är endast avsedd för professionell användning. Alla tester där produkten används ska genomföras i ett certifierat, licensierat laboratorium av kvalificerad personal under överinseende av en patolog/humangenetiker.

2. Testprincip

Tekniken för fluorescerande *in situ*-hybridisering (FISH) möjliggör detektion och visualisering av specifika nukleinsyrasekvenser i cellberedningar. Fluorescensmärkta DNA-fragment, så kallade FISH-prober, och deras komplementära mål-DNA-strängar i preparaten samdenatureras och tillåts därefter härda under hybridisering. Efteråt avlägsnas ospecifika och obundna probfragment genom tvättsteg för stringens. Efter mottfärgning av DNA:t med DAPI visualiseras hybridiserade probfragment med användning av ett fluorescensmikroskop utrustat med excitations- och emissionsfilter specifika för de fluorokromer med vilka FISH-probfragmenten har märkts direkt.

3. Tillhandahållen reagens

FlexISH-Tissue Implementation Kit finns i två storlekar och består av:

| Kod | Komponent | Kvantitet | | Behållare |
|------|--|-----------|--------|-----------------------------|
| | | 20 | 5 | |
| PT1 | <u>Heat Pretreatment Solution Citric</u> | 500 ml | 150 ml | Flaska med skruvlock (stor) |
| ES1 | <u>Pepsin Solution</u> | 4 ml | 1 ml | Droppflaska, vitt lock |
| WB10 | <u>5x FlexISH Wash Buffer</u> | 500 ml | 150 ml | Flaska med skruvlock (stor) |
| MT7 | <u>DAPI/DuraTect-Solution</u> | 0.8 | 0.2 | Reaktionskärl, blått lock |
| | Bruksanvisning | 1 | 1 | |

Z-2182-5 (5 tester): Komponenterna **ES1** och **MT7** räcker till 5 reaktioner. Komponent **WB10** räcker till 3x 3 färgningsburkar på 70 ml vardera. Komponent **PT1** räcker till 2 färgningsburkar på 70 ml vardera.

Z-2182-20 (20 tester): Komponenterna **ES1** och **MT7** räcker till 20 reaktioner. Komponent **WB10** räcker till 11x 3 färgningsburkar på 70 ml vardera. Komponent **PT1** räcker till 7 färgningsburkar på 70 ml vardera.

4. Material som krävs, men inte tillhandahålls

- FlexISH probe
- Positiva och negativa kontrollspecimen
- Objektglas för mikroskopering, positivt laddade
- Vattenbad (37 °C, 98 °C)
- Varm platta eller hybridiserare
- Fuktkammare + hybridiseringsugn eller hybridiserare
- Justerbara pipetter (10 µl, 30 µl)
- Färgningsburkar eller -bad
- Timer
- Kalibrerad termometer
- Etanol eller reagensalkohol
- Xylen
- Avjoniserat eller destillerat vatten
- Täckglas (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Gummiment, t.ex. Fixogum Rubber Cement (art. nr E-4005-50/-125) eller dylikt
- Adekvat underhållet fluorecensmikroskop (400-1000x)
- Immersionsolja som godkänts för fluorecensmikroskopi
- Lämpliga filterset

5. Förvaring och hantering

Förvaras vid 2-8 °C i upprätt läge. Dessutom måste DAPI/DuraTect-Solution (**MT7**) förvaras skyddat från ljus. Återgå till förvaringsförhållanden omedelbart efter användning. Använd inte reagens efter det utgångsdatum som anges på etiketten. Produkten är stabil fram till det utgångsdatum som anges på etiketten om den hanteras i enlighet med denna.

6. Varningar och försiktighetsåtgärder

- Läs instruktionerna före användning!
- Använd inte reagenserna efter utgångsdatumet!
- Produkten innehåller ämnen (i låga koncentrationer och volymer) som är hälsovådliga. Undvik varje direktkontakt med reagens. Vidta lämpliga skyddsåtgärder (använd engångshandskar, skyddsglasögon och labbkläder)!
- Rapportera alla allvarliga incidenter som inträffat i samband med produkten till tillverkaren och den behöriga myndigheten enligt lokala bestämmelser!

- Om reagens kommer i kontakt med huden, skölj genast huden med rikliga mängder vatten!
- Ett materialsäkerhetsdatablad finns tillgängligt för den professionella användaren på begäran.
- Återanvänd inte reagens, såvida inte återanvändning uttryckligen tillåts!
- Undvik korskontaminering av prov eftersom detta kan leda till felaktiga resultat.
- Specimen får inte tillåtas torka under hybridiserings- och torkningsstegen.
- DAPI/DuraTect-Solution (MT7) ska inte utsättas för ljus, särskilt starkt ljus, under en längre tid, dvs alla steg ska utföras, där möjligt, i mörker och/eller med ljusstäta behållare.

Specialmärkning av ES1:

| | |
|--------|--|
| EUH208 | Innehåller Pepsin A. Kan orsaka en allergisk reaktion. |
| EUH210 | Säkerhetsdatablad finns tillgängligt på förfrågan. |

Färo- och skyddsangivelser PT1 och WB10:

Den färobestämmande komponenten är en reaktionsblandning av: 5-kloro-2-metyl-4-isotiazolin-3-on [EG-nr 247-500-7] och 2-metyl-2H-isotiazol-3-on [EG-nr 220-239-6] (3:1).



Varning

| | |
|-----------|---|
| H317 | Kan orsaka en allergisk hudreaktion. |
| P261 | Undvik att inandas damm/rök/gaser/mist/ångor/sprej. |
| P272 | Kontaminerade arbetskläder får inte avlägsnas från arbetsplatsen. |
| P280 | Använd skyddshandskar/skyddsklädsel/ögonskydd/ansiktsskydd. |
| P302+P352 | VID HUDKONTAKT: Tvätta med mycket tvål och vatten. |
| P333+P313 | Vid hudirritation eller utslag: Sök läkarhjälp. |
| P362+P364 | Kontaminerade kläder tas av och tvättas innan de används igen. |

Färo- och skyddsangivelser för MT7:

Produkten klassificeras inte som farlig enligt förordning (EG) nr 1272/2008.

7. Begränsningar

- För *in vitro* diagnostisk användning.
- Endast för professionell användning.
- Endast för icke-automatiserad användning.
- Den kliniska tolkningen av varje positiv färgning, eller dess frånvaro, måste göras inom ramen för klinisk historia, morfologi, andra histopatologiska kriterier samt andra diagnostiska tester. Det är en kvalificerad patolog/humangenetikers ansvar att vara förtrogen med ISH-proberna, reagensen, diagnostikpanelerna och metoderna som används för att framställa det färgade preparatet. Färgning måste utföras i ett certifierat, licensierat laboratorium under överinseende av en patolog/humangenetiker som ansvarar för att granska de färgade objektglasen och säkerställa att positiva och negativa kontroller är tillräckliga.
- Specimenfärgning, särskilt signalintensitet och bakgrunds-färgning, är beroende av hantering och bearbetning av specimen före färgning. Felaktig fixering, frysning, upptining, tvättning, torkning, uppvärmning, snittning eller kontaminering med andra specimen eller vätskor kan resultera i artefakter eller falska resultat. Inkonsekventa resultat kan orsakas av variationer i fixerings- och inbäddningsmetoder, såväl som från inneboende oregelbundenheter i specimen.

- Prestandan validerades med de procedurer som beskrivs i respektive ZytoVision-probs och -implementeringskits bruksanvisning. Ändringar av dessa procedurer kan förändra effekten, och måste valideras av användaren. Denna IVD är endast certifierad som CE när den används enligt beskrivningen i denna bruksanvisning för användning inom ramen för den avsedda användningen.

8. Störande ämnen

Blodkroppar som finns i provet kan uppvisa autofluorescens som hindrar signaligenkänning.

Följande fixativ är inkompatibla med ISH:

- Bouins fixativ
- B5-fixativ
- Sura fixativ (t.ex. pikrinsyra)
- Zenkers fixativ
- Alkoholer (vid användning ensamt)
- Kvicksilverklorid
- Formaldehyd/zinkfixativ
- Hollandes fixativ
- Obuffrad formalin

9. Förberedelse av specimen

Rekommendationer:

- Fixering i 10 % neutralt buffrad formalin i 24 h vid rumstemperatur (18 °C-25 °C).
- Provstorlek $\leq 0,5 \text{ cm}^3$.
- Använd paraffin av premiumkvalitet.
- Inbäddning ska utföras vid temperaturer under 65 °C.
- Förbered 2-4 μm mikrotomsnitt.
- Använd positivt laddade objektglas för mikroskopering.
- Fixera i 2-16 h vid 50-60 °C.

10. Förbehandling av enheten

5x FlexISH Wash Buffer (WB10) ska förbehandlas enligt instruktionerna i 11. "Provförfarande". Alla andra satsreagenser är klara att använda. Det krävs ingen rekonstitution, blandning eller spädning.

11. Provförfarande

11.1 Dag 1

Förberedande steg

1. *Förberedelse av två etanolserier (70 %, 90 % och 100 % etanollösningar):* Späd 100 % etanol med avjoniserat eller destillerat vatten. Dessa lösningarna kan förvaras i lämpliga behållare och de kan återanvändas för upp till 160 objektglas.
2. *Heat Pretreatment Solution Citric (PT1):* Fyll en färgningsburk och värm till 98 °C
3. *FlexISH Probe:* Försätt i rumstemperatur före användning, skydda från ljus. Innan flaskan öppnas, blanda innehållet genom att snurra flaskan och låt innehållet cirkulera nedåt en kort stund.

Förbehandling (avvaxning/proteolys)

1. Inkubera objektglasen i 2x 5 minuter i xylene.
2. Inkubera i 100 %, 90 %, och 70 % etanol, i 2 min vardera.
3. Tvätta 2x 2 min i avjoniserat eller destillerat vatten.
4. Inkubera i 20 minuter i förvärmad Heat Pretreatment Solution Citric (PT1) vid 98 °C.

Vi rekommenderar inte användning av mer än åtta objektglas per färgningsburk. Efter nedsänkning av objektglasen, kontrollera temperaturen på Heat Pretreatment Solution Citric inuti burken och starttid så snart lösningens temperatur har nått minst 95 °C.

5. Överför omedelbart objektglasen till avjoniserat eller destillerat vatten och tvätta i 2x 2 minuter och låt vattnet rinna av eller torka av det.
6. Applicera (droppvis) Pepsin Solution (ES1) till specimen och inkubera i 15 minuter vid 37 °C i en fuktkammare.



ES1 kan bilda fällningar som inte påverkar kvaliteten.

Beroende på flera faktorer, t.ex. typ och varaktighet för fixering, tjocklek på snitt och typ av specimen kan det krävas olika inkubationstider. Som en inkubationsriktlinje rekommenderar vi en inkubationstid på 2-30 min. Som en allmän regel rekommenderar vi att fastställa den optimala tiden för proteolys i förtester.

- 7. Tvätta i 2x 2 min i avjoniserat eller destillerat vatten.
- 8. Dehydrering: i 70 %, 90 % och 100 % etanol, vardera i 1 min.
- 9. Lufttorka snitten.

Se till att snitten är helt torra innan proben appliceras eftersom kvarvarande fukt kan minska signalintensiteten och/eller påverka specimenmorfologin.

Denaturering och hybridisering

- 1. Pipettera 10 µl FlexISH Probe på varje förbehandlat specimen.

Undvik långvarig ljusexponering av proben.

- 2. Täck specimen med ett täckglas på 22 mm x 22 mm (undvik fångade bubblor) och tillslut täckglaset.

Vi rekommenderar att gummiment (t.ex. Fixogum) används för tillslutningen.

- 3. Placera objektglaset på en varm platta eller hybridiserare och denaturera specimen i 10 min vid 75 °C.
- 4. Utför hybridisering i 2 timmar upp till 16 timmar (d.v.s. över natten) vid 37 °C genom att antingen överföra objektglaset till en hybridiserare eller till en fuktkammare och en hybridiseringsugn.

Det är viktigt att specimen inte torkar ut under hybridiseringssteget.

11.2 Dag 1 eller dag 2

Förberedande steg

- 1. Förberedelse av 1x FlexISH Wash Buffer: Späd 1 del 5x FlexISH Wash Buffer (WB10) med 4 delar avjoniserat eller destillerat vatten. Fyll tre färgningsburkar med 1x FlexISH Wash Buffer, förvärm en burk till 72 °C och håll två burkar i rumstemperatur.
- 2. DAPI/DuraTect-Solution (MT7): Försätt i rumstemperatur före användning, skydda från ljus.

Efterhybridisering och detektion

- 1. Ta försiktigt bort gummimentet eller limmet.
- 2. Ta bort täckglaset genom att nedsänkning i 1x FlexISH Wash Buffer vid rumstemperatur i 1-2 min.

För att underlätta borttagningen av täckglaset kan detta steg alternativt utföras i 2 min vid 37 °C.

- 3. Tvätta med 1x FlexISH Wash Buffer i 10 min vid 72 °C.
1x FlexISH Wash Buffer ska förvärmas. Kontrollera med en termometer om nödvändigt. Använd inte mer än åtta objektglas per färgningsburk.
- 4. Tvätta med 1x FlexISH Wash Buffer i 3 min vid rumstemperatur.
- 5. Inkubera objektglaset i 70 %, 90 % och 100 % etanol, vardera i 1 min.
- 6. Lufttorka proverna skyddat från ljus.
- 7. Pipettera 25 µl DAPI/DuraTect-Solution (MT7) på objektglaset. Undvik fångade bubblor, täck proven med ett täckglas (24 mm x 60 mm). Inkubera i mörker i 15 min.

Användning av en pipettspets som skurits av för att öka storleken på öppningen kan förenkla pipetteringsprocessen. Undvik exponering för ljus.

- 8. Förvara objektglaset i mörker. Lagring i längre perioder bör äga rum vid 2-8 °C.
- 9. Granskning av provmaterial utförs med fluorescensmikroskopi. Filteruppsättningar för följande våglängdsområden krävs:

| Fluorescerande färgämne | 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. Tolkning av resultaten

Med användningen av lämpliga filteruppsättningar vid interfaser eller metafaser av normala celler eller celler utan avvikelser i de undersökta kromosomerna kommer två signaler per prob/hapten-märkning att synas, förutom prover som är inriktade på X- och/eller Y-kromosomer, vilket resulterar i ingen till två signaler per prob/hapten-märkning, beroende på kön. I celler med kromosomavvikelser kan ett annat signalmönster vara synligt i interfaser eller metafaser. För mer information om tolkning av resultaten, se bruksanvisningen för respektive prob.

13. Rekommenderade procedurer för kvalitetskontroll

Se bruksanvisningen för respektive ZytoVision-prob.

14. Prestandaegenskaper

Se bruksanvisningen för respektive ZytoVision-prob.

15. Kassering

Reagensen måste avfallshanteras enligt lokala bestämmelser.

16. Felsökning

Eventuella avvikelser från instruktionerna för användning kan leda till osäkra färgningsresultat eller till att färgningen uteblir helt. Se www.zytovision.com för mer information.

Svaga signaler eller inga signaler alls

| Möjlig orsak | Åtgärd |
|---|---|
| Specimen har inte fixerats ordentligt | Optimera fixeringstid och fixativ |
| Proteolytisk förbehandling inte utförd ordentligt | Optimera inkubationstiden för pepsin, öka eller minska den efter behov |
| Provavdunstning | Vid användning av en hybridiserare är det obligatoriskt att använda de våta remsorna/vattenfyllda tankarna. Vid användning av en hybridiseringsugn krävs användning av en fuktkammare. Dessutom bör täckglaset förslutas helt, t.ex. med Fixogum, för att förhindra att provet torkar ut under hybridisering. |
| Olämpliga filterset används | Använd filterset som är lämpliga för probens fluorokromer. Filteruppsättningar med tre bandpass ger mindre ljus jämfört med filteruppsättningar med ett eller två bandpass. Följaktligen kan signalerna förefalla vara svagare med dessa trippelbandpassfilterset. |

Korshybridiserings signaler; ojämn bakgrund

| Möjlig orsak | Åtgärd |
|---|--|
| Ofullständig avväxning | Använd färsk lösningar; kontrollera avväxningens varaktighet |
| Proteolytisk förbehandling för stark | Minska inkubationstiden för pepsin |
| Objektglaset kylda till rumstemperatur före hybridisering | Överför objektglaset snabbt till 37 °C |

Morfologi degraderad

| Möjlig orsak | Åtgärd |
|---|--|
| Specimen har inte fixerats ordentligt | Optimera fixeringstid och fixativ |
| Proteolytisk förbehandling inte utförd ordentligt | Optimera inkubationstiden för pepsin, minska den efter behov |
| Otillräcklig torkning före probapplikering | Förläng lufttorkningen |

Överlappande cellkärnor

| Möjlig orsak | Åtgärd |
|-----------------------------------|------------------------------------|
| Olämplig tjocklek på vävnadssnitt | Förbered 2-4 μ m mikrotomsnitt |

Specimen flyter av objektglaset

| Möjlig orsak | Åtgärd |
|--------------------------------------|------------------------------------|
| Proteolytisk förbehandling för stark | Minska inkubationstiden för pepsin |

Svag motfärgning

| Möjlig orsak | Åtgärd |
|------------------------------|---|
| Lågkoncentrerad DAPI-lösning | Använd DAPI/DuraTect-Solution (<u>ultra</u>) (art. nr MT-0008-0.8) istället |
| DAPI-inkubationstid för kort | Justera DAPI-inkubationstiden |

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 | Beskrivning av förändringen |
|----------|---|
| 1.2.1 | 11. Provförfarande ZyGreen 2.0 tillagd |


www.zytovision.com

Se www.zytovision.com för den senaste bruksanvisningen samt för bruksanvisningar på olika språk.

Våra experter finns där för att svara på dina frågor.
Kontakta help@zytovision.com



ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/Tyskland
Telefonnummer: +49 471 4832-300
Faxnummer: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
E-postadress: info@zytovision.com

Varumärken:

ZytoVision® och F/exSH® är varumärken som tillhör ZytoVision GmbH.