



F/exlSH-Tissue Implementation Kit

REF Z-2182-5 Σ 5

REF Z-2182-20 Σ 20

Floresan *in situ* hibridizasyon prosedürlerinde kullanım için

4250380N8486



İn vitro diagnostik tıbbi cihaz

IVDR (AB) 2017/746'ya göre

1. Kullanım amacı

F/exlSH-Tissue Implementation Kit, floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) ile formalinle sabitlenmiş, parafine gömülü örneklerde F/exlSH problemleri ile birlikte kullanılmak üzere tasarlanmıştır.

Ürün sadece profesyonel kullanım için tasarlanmıştır. Ürünün kullanıldığı tüm testler sertifikalı, lisanslı bir anatomik patoloji laboratuvarında bir patolog/insan genetikçisinin gözetimi altında kalifiye personel tarafından gerçekleştirilmelidir.

2. Test prensibi

Floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) tekniği, hücre preparatlarında spesifik nükleik asit dizilerinin tespit edilmesini ve görüntülenmesini sağlar. FISH problemleri olarak adlandırılan floresan işaretli DNA parçaları ve preparatlardaki tamamlayıcı hedef DNA iplikleri birlikte denatüre edilir ve daha sonra hibridizasyon sırasında tavlanması izin verilir. Daha sonra, spesifik olmayan ve bağlanmamış prob parçaları sık yıkama adımları ile uzaklaştırılır. DNA'nın DAPI ile karşı boyanmasından sonra, hibridize prob parçaları, FISH prob parçalarının doğrudan etiketlendiği florokromlara özgü uyarma ve emisyon filtreleri ile donatılmış bir floresan mikroskopu kullanılarak görselleştirilir.

3. Sağlanan reaktifler

F/exlSH-Tissue Implementation Kit tek şekilde temin edilir ve şunları içerir:

Kod	Bileşen	Miktar		Ambalaj
		5	20	
PT1	<u>Heat Pretreatment Solution Citric</u>	150 ml	500 ml	Vidalı kapaklı şişe (büyük)
ES1	<u>Pepsin Solution</u>	1 ml	4 ml	Damlalıklı şişe, beyaz kapak
WB10	<u>5x FlexISH Wash Buffer</u>	150 ml	500 ml	Vidalı kapaklı şişe, (büyük)
MT7	<u>DAPI/DuraTect-Solution</u>	0.2 ml	0.8 ml	Reaksiyon kabı, mavi kapak
	Kullanma kılavuzu	1	1	

Z-2182-5 (5 tests): ES1 ve MT7 bileşenleri 5 reaksiyon için yeterlidir. WB10 bileşeni her biri 70 ml olan 3x3 boyama kabı için yeterlidir. PT1 bileşeni her biri 70 ml olan 2 boyama kabı için yeterlidir.

Z-2182-20 (20 tests): ES1 ve MT7 bileşenleri 20 reaksiyon için yeterlidir. WB10 bileşeni her biri 70 ml olan 11x3 boyama kabı için yeterlidir. PT1 bileşeni her biri 70 ml olan 7 boyama kabı için yeterlidir.

4. Gerekli ancak sağlanmayan malzemeler

- FlexISH probu
- Pozitif ve negatif kontrol numuneleri
- Mikroskop lamaları, pozitif yüklü
- Su banyosu (37 °C, 98 °C)
- Hibridizatör veya sıcak plaka
- Hibridizasyon fırınında hibridizatör veya nem odası
- Ayarlanabilir pipetler (10 µl, 25 µl)
- Boyama kavanozları veya banyoları
- Zamanlayıcı
- Kalibre edilmiş termometre
- Etanol veya reaktif alkol
- Ksilen
- Deiyonize veya damıtılmış su
- Klipsler (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Kauçuk çimento, örneğin Fixogum Rubber Cement (Ürün No. E-4005-50/-125) veya benzeri
- Yeterince bakımı yapılmış floresan mikroskopu (400-1000x)
- Floresan mikroskopu için onaylı daldırma yağı
- Uygun filtre setleri

5. Depolama ve taşıma

2-8 °C'de dik konumda saklayın. Ayrıca, DAPI/DuraTect-Solution (MT7) ışıktan koruyarak saklanmalıdır. Kullanımdan hemen sonra saklama koşullarına geri döndürün. Etiket üzerinde belirtilen son kullanma tarihinden sonra reaktifleri kullanmayın. Ürün, uygun şekilde kullanıldığında etikette belirtilen son kullanma tarihine kadar stabildir.

6. Uyarılar ve önlemler

- Kullanmadan önce kullanım talimatlarını okuyun!
- Reaktifleri son kullanma tarihi geçtikten sonra kullanmayın!
- Bu ürün sağlığa zararlı maddeler (düşük konsantrasyonlarda ve hacimlerde) içerir. Reaktiflerle doğrudan temastan kaçının. Uygun koruyucu önlemleri alın (tek kullanımlık eldivenler, koruyucu gözlükler ve laboratuvar giysileri kullanın)!
- Ürüne ilgili olarak meydana gelen her türlü ciddi olayı yerel yönetmeliklere uygun olarak üreticiye ve yetkili makama bildirin!
- Reaktifler ciltle temas ederse, cildi derhal bol miktarda suyla yıkayın!
- Profesyonel kullanıcılar için talep üzerine bir malzeme güvenlik bilgi formu temin edilebilir.

- Yeniden kullanıma açıkça izin verilmediği sürece reaktifleri yeniden kullanmayın!
- Hatalı sonuçlara yol açabileceğinden numunelerin çapraz kontaminasyonundan kaçının.
- Hibridizasyon ve yıkama adımları sırasında numunelerin kurumasına izin verilmemelidir.
- DAPI/DuraTect-Solution (MT7)** uzun süreli olarak ışığa, özellikle de güçlü ışığa maruz kalmamalıdır, yani, tüm adımlar mümkün olduğu ölçüde karanlıkta ve/veya ışık geçirmez kutular içinde yürütülmelidir!

ES1 için özel etiket ifadeleri:

EUH208	Pepsin A içerir. Alerjik reaksiyona yol açabilir.
EUH210	Talep halinde güvenlik bilgi formu sağlanabilir.

PT1 ve WB10 için zararlılık ve önlem ifadeleri:

Zararlılık belirleyici bileşen 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] ve 2-methyl-2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1) maddelerinin karışımıdır.



Uyarı

H317	Alerjik cilt reaksiyonlarına yol açar.
P261	Tozunu/dumanını/gazını/sisini/buharını/spreyini solumaktan kaçının.
P272	Kirlenmiş kıyafetleri işyeri dışına çıkarmayın.
P280	Koruyucu eldiven/koruyucu kıyafet/göz koruyucu/yüz koruyucu kullanın.
P302+P352	DERİ İLE TEMAS HALİNDE İSE: Bol sabun ve su ile yıkayın.
P333+P313	Ciltte tahriş veya kaşıntı söz konusu ise: Tıbbi yardım/müdahale alın.
P362+P364	Kirlenmiş giysilerinizi çıkarın ve yeniden kullanmadan önce yıkayın.

MT7 için zararlılık ve önlem ifadeleri:

Bu prob 1272/2008 no'lu AB Düzenlemesine göre zararlı olarak sınıflandırılmaz.

7. Sınırlamalar

- In vitro* diagnostik kullanım için.
- Sadece profesyonel kullanım içindir.
- Yalnızca otomatik olmayan kullanım içindir.
- Herhangi bir pozitif boyamanın klinik yorumu veya yokluğu, klinik öykü, morfoloji, diğer histopatolojik kriterler ve diğer tanı testleri bağlamında yapılmalıdır. ISH problemleri, reaktifleri, tanı panelleri ve boyalı preparatı üretmek için kullanılan yöntemler hakkında bilgi sahibi olmak kalifiye bir patolog/insan genetikçisinin sorumluluğundadır. Boyama, boyanmış slaytları gözden geçirmekten ve pozitif ve negatif kontrollerin yeterliliğini sağlamaktan sorumlu olan bir patolog/insan genetikçisinin gözetimi altında sertifikalı, lisanslı bir laboratuvarda yapılmalıdır.
- Numune boyaması, özellikle sinyal yoğunluğu ve arka plan boyaması, boyamadan önce numunenin kullanımına ve işlenmesine bağlıdır. Uygun olmayan fiksasyon, dondurma, çözündürme, yıkama, kurutma, ısıtma, kesit alma veya diğer numuneler veya sıvılarla kontaminasyon artefaktlara veya yanlış sonuçlara neden olabilir. Tutarlı sonuçlar, fiksasyon ve gömme yöntemlerindeki farklılıkların yanı sıra numune içindeki doğal düzensizliklerden de kaynaklanabilir.
- Performans, ilgili ZytoVision probu ve uygulama kitinin kullanım talimatlarında açıklanan prosedürler kullanılarak doğrulanmıştır. Bu prosedürlerde yapılacak değişiklikler performansı değiştirebilir ve kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır. Bu IVD, yalnızca bu talimatta açıklandığı şekilde amaçlanan kullanım kapsamında kullanıldığında CE sertifikasına sahiptir.

8. Müdahale eden maddeler

Örnekte bulunan kırmızı kan hücreleri, sinyalin tanınmasını engelleyen otofloresans sergileyebilir.

Aşağıdaki fiksatifler FISH ile uyumlu değildir:

- Bouin'in fiksatif
- B5 fiksatif
- Asidik fiksatifler (örn. pikrik asit)
- Zenker fiksatif
- Alkoller (tek başına kullanıldığında)
- Merkürük klorür
- Formaldehit/çinko fiksatif
- Hollande'ın sabitleyicisi
- Tamponlanmamış formalin

9. Numunelerin hazırlanması

Öneriler:

- Oda sıcaklığında 24 saat %10 nötral tamponlu formalin ile fiksasyon (18-25°C).
- Örnek büyüklüğü $\leq 0.5 \text{ cm}^3$.
- En üst kalitede parafin kullanın.
- Gömme işlemi 65°C'den daha düşük sıcaklıklarda yapılmalıdır.
- Mikrotom ile 2-4 μm kalınlığında kesitler alın.
- Pozitif yüklü mikroskop lamaları kullanın.
- 50-60°C'de 2-16 saat fikse edin.

10. Cihazın hazırlık işlemi

5x FlexISH Wash Buffer (WB10) 11. "Tahlil prosedürü" bölümündeki talimatlara göre hazırlanmalıdır. Kitin tüm diğer bileşenleri kullanıma hazırdır. Yeniden sulandırmaya, karıştırmaya veya dilüsyon yapmaya gerek yoktur.

11. Tahlil prosedürü

11.1 Birinci gün

Hazırlık adımları

- İki etanol serisi hazırlayın (%70, %90 ve %100 etanol solüsyonları):* %100 etanolü deiyonize veya distile su ile seyreltin. Bu solüsyonlar uygun kaplarda saklanabilir ve 160 adet lama kadar yeniden kullanılabilir.
- Heat Pretreatment Solution Citric (PT1):** Bir boyama kabını doldurun ve 98°C'ye ısıtın.
- FlexISH Probe:** Kullanmadan önce oda sıcaklığına getirin; ışıktan koruyun. Tüpü açmadan önce vorteks ile karıştırın ve kısaca spin edin.

Ön işlemler (parafin giderme/proteoliz)

- Lamları ksilen içinde 2x5 dakika inkübe edin.
- Her birinde 2 dakika olmak üzere %100, %100, %90 ve %70 etanolde inkübe edin.
- Deiyonize veya distile su ile 2x2 dakika yıkayın.
- 98°C'ye önceden ısıtılmış **Heat Pretreatment Solution Citric (PT1)** içinde 20 dakika inkübe edin.

Bir boyama kabında sekiz adetden fazla lam kullanılmamasını öneririz. Lamları içine yerleştirdikten sonra Heat Pretreatment Solution Citric sıcaklığını kontrol edin ve solüsyonun sıcaklığı 95°C'ye ulaşır ulaşmaz süreyi başlatın.

- Lamları hemen deiyonize veya distile suya aktarın, 2x2 dakika yıkayın, suyunu üzerinden akıtın veya emdirerek alın.
- Örneklere **Pepsin Solution (ES1)** uygulayın (damlatarak) ve bir nemli kap içinde 37°C'de 15 dakika inkübe edin.

ES1, kaliteyi etkilemeyen çöktirler oluşturabilir.

Fiksasyonun yapısı ve süresi, kesitlerin kalınlığı ve örneklerin yapısı gibi birçok faktöre bağlı olarak farklı inkübasyon süreleri gerekebilir. Bir inkübasyon rehberi olarak 2-30 dakika inkübasyon süresi öneririz. Bir genel kural olarak, proteoliz için optimum sürenin ön denemeler ile belirlenmesini öneririz.

- Deiyonize veya distile suda 2x2 dakika yıkayın.
- Dehidrasyon: her birinde 1 dakika olmak üzere %70, %90 ve %100 etanol ile yıkayın.

9. Kesitleri havada kurutun.

Kesitlerin nemli kalması sinyal yoğunluğunu azaltabileceği ve/veya dokunun morfolojisini etkileyebileceği için prob uygulamasından önce kesitleri tamamen kuruttuğunuzdan emin olun.

Denatürasyon ve hibridizasyon

1. Ön işlemi yapılmış olan her örneğin üzerine 10 µl FlexISH Probe uygulayın.

Probun uzun süre ışığa maruz kalmasından sakının.

2. Örnekleri 22 mm x 22 mm boyutlarında bir lamel ile kapatın (hava kabarcığı bırakmadan) ve lamelin yalıtımını sağlayın.

Yalıtım için lastik solüsyonu (örn., Fixogum) kullanılmasını öneririz.

3. Lamları bir sıcak levha üzerine ya da bir hibridizasyon cihazına yerleştirin ve örnekleri 75°C'de 10 dakika denatüre edin.
4. Lamları ya bir hibridizasyon cihazına ya da etüv içindeki bir nemli kutuya aktarın ve 37°C'de 2 saat ile 16 saat (yani gece boyu) arasında bir süre hibridize edin.

Hibridizasyon aşamasında örneklerin kurumaması gerekir.

11.2 Birinci gün veya ikinci gün

Hazırlık adımları

1. 1x FlexISH Wash Buffer hazırlanması: 1 birim 5x FlexISH Wash Buffer (WB10) solüsyonunu 4 birim deiyonize veya distile su ile seyreltin. Üç adet boyama kabını 1x FlexISH Wash Buffer ile doldurun, kaplardan birini kullanmadan önce 72°C'ye ısıtın ve diğer ikisini oda sıcaklığında tutun.
2. DAPI/DuraTect-Solution (MT7): Kullanmadan önce oda sıcaklığına getirin; ışıktan koruyun.

Hibridizasyon sonrası ve tespit

1. Lastik solüsyonunu veya yapıştırıcıyı dikkatlice sökün.
2. Oda sıcaklığındaki 1x FlexISH Wash Buffer içinde 1-2 dakika tutarak lamelleri çıkarın.

To facilitate the removal of the coverslip, this step can alternatively be performed for 2 min at 37°C.

3. Wash using 1x FlexISH Wash Buffer for 10 min at 72°C.

Lamelin daha kolay çıkmasını sağlamak için bu adım 37°C'de 2 dakika olarak yapılabilir.

4. Oda sıcaklığında 1x FlexISH Wash Buffer ile 3 dakika yıkayın.
5. Lamları her birinde 1 dakika olmak üzere %70, %90 ve %100 etanol içinde inkübe edin.
6. Örnekleri ışıktan korunaklı şekilde havada kurutun.
7. Lamlara pipetle 25 µl DAPI/DuraTect-Solution (MT7) uygulayın. Hava kabarcığı kalmamasına dikkat ederek örnekleri bir lamel ile (24 mm x 60 mm) kapatın. 15 dakika karanlıkta inkübe edin.

Kesilerek açıklığı genişletilmiş bir pipet ucu kullanmak pipetleme işlemini kolaylaştırabilir. Işığa uzun süre maruz kalmasından sakının.

8. Lami karanlıkta muhafaza edin. Uzun süre saklanmak istenirse 2-8°C'de saklanmalıdır.
9. Örnek materyalinin değerlendirilmesi floresan mikroskobu ile yapılır. Aşağıdaki dalga boyu aralığındaki filtre setleri gereklidir:

Floresan boya	Eksitasyon	Emisyon
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. Sonuçların yorumlanması

Uygun filtre setleri kullanıldığında normal hücrelerin veya kromozomlarında anormallik olmayan hücrelerin interfazlarında veya metafazlarında her prob/floresan işareti için iki sinyal görülür, ancak X ve/veya Y kromozomlarını hedef alan problemler bunun dışındadır; o durumda her prob/floresan işareti için sinyal cinsiyete bağlı olarak hiç bulunmayabilir ya da bir veya iki adet olabilir. Kromozomal anormallikleri olan hücrelerde interfazlarda veya metafazlarda farklı sinyal modeli görülebilir. Sonuçların yorumlanmasına dair ayrıntılar için lütfen ilgili probun kullanma kılavuzuna başvurun.

13. Önerilen kalite kontrol prosedürleri

İlgili ZytoVision probunun kullanım talimatlarına bakın.

14. Performans özellikleri

İlgili ZytoVision probunun kullanım talimatlarına bakın.

15. Bertaraf

Reaktiflerin imhası yerel yönetmeliklere uygun olarak gerçekleştirilmelidir.

16. Sorun Giderme

Kullanım talimatlarından herhangi bir sapma, düşük boyama sonuçlarına veya hiç boyama olmamasına neden olabilir. Daha fazla bilgi için lütfen www.zytovision.com adresine bakın.

Zayıf sinyaller veya hiç sinyal yok

Olası neden	Eylem
Numune uygun şekilde sabitlenmemiş	Sabitleme süresini ve fiksatif optimize edin
Proteolitik ön işlem düzgün yapılmamış	Pepsin inkübasyon süresini optimize edin, gerekirse artırın veya azaltın
Buharlaştırma probu	Bir hibridizatör kullanırken, ıslak şeritlerin/su dolu tankların kullanılması zorunludur. Bir hibridizasyon fırını kullanıldığında, bir nem odasının kullanılması gereklidir. Ayrıca, hibridizasyon sırasında örneğin kurummasını önlemek için lamel Fixogum ile tamamen kapatılmalıdır.
Kullanılan uygunsuz filtre setleri	Probun flogromlarına uygun filtre setleri kullanın. <i>Üçlü bant geçiren filtre setleri, tekli veya ikili bant geçiren filtre setlerine kıyasla daha az ışık sağlar. Sonuç olarak, bu üçlü bant geçiren filtre setleri kullanıldığında sinyaller daha soluk görünebilir.</i>

Çapraz hibridizasyon sinyalleri; gürültülü arka plan

Olası neden	Eylem
Eksik mum alma	Taze solüsyonlar kullanın; mum alma süresini kontrol edin
Proteolitik ön işlem çok güçlü	Pepsin inkübasyon süresini azaltın
Hibridizasyondan önce oda sıcaklığına soğutulmuş slaytlar	Lamları hızlı bir şekilde 37 °C'ye aktarın

Morfoloji bozulmuş

Olası neden	Eylem
Numune uygun şekilde sabitlenmemiş	Sabitleme süresini ve fiksatif optimize edin
Proteolitik ön işlem düzgün yapılmamış	Pepsin inkübasyon süresini optimize edin, gerekirse azaltın
Prob uygulamasından önce yetersiz kurutma	Hava ile kurutmayı uzatın

Örtüşen çekirdekler

Olası neden	Eylem
Doku kesitlerinin uygun olmayan kalınlığı	2-4 µm mikrotom kesitleri hazırlayın

Numune lam üzerinde yüzer

Olası neden	Eylem
Proteolitik ön işlem çok güçlü	Pepsin inkübasyon süresini azaltın

Zayıf karşı leke

Olası neden	Eylem
Düşük konsantrasyonlu DAPI çözeltisi	Bunun yerine <u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (Ürün No. MT-0008-0.8) kullanın
DAPI inkübasyon süresi çok kısa	DAPI inkübasyon süresini ayarlayın

17. Edebiyat

- 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. Revizyon

Revizyon	Değişikliğin açıklaması
1.2.1	11. Tahlil prosedürü ZyGreen 2.0 eklendi


www.zytovision.com

En güncel kullanım talimatları ve farklı dillerdeki kullanım talimatları için lütfen www.zytovision.com adresine bakın.

Uzmanlarımız sorularınızı yanıtlamak için hazırdır. Lütfen helptech@zytovision.com ile iletişime geçin



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

Ticari markalar:

ZytoVision® ve FlexISH® ZytoVision GmbH'nin ticari markalarıdır.