



ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit

REF Z-2099-20

Σ 20

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

4250380N727X



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

1. Avsedd användning

ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit är avsett för användning i kombination med ZytoLight FISH probes cytologispecimen 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

ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit finns i en storlek och består av:

Kod	Komponent	Kvantitet	Behållare
		Σ 20	
ES2	<u>Cytology Pepsin Solution</u>	4 ml	Dropplaska, transparent lock
WB5	<u>20x Wash Buffer TBS</u>	50 ml	Flaska med skruvlock
PT4	<u>10x MgCl₂</u>	50 ml	Flaska med skruvlock
PT5	<u>10x PBS</u>	50 ml	Flaska med skruvlock
WB7	<u>Cytology Stringency Wash Buffer SSC</u>	500 ml	Flaska med skruvlock (stor)
WB8	<u>Cytology Wash Buffer SSC</u>	500 ml	Flaska med skruvlock (stor)
MT7	<u>DAPI/DuraTect-Solution</u>	0,8 ml	Reaktionskärl, blått lock
	Bruksanvisning	1	

Z-2099-20 (20 tester): Komponenterna **ES2** och **MT7** räcker till 20 reaktioner. Komponenterna **PT4**, **PT5**, **WB7**, och **WB8** räcker till 7 färgningsburkar på vardera 70 ml. Komponent **WB5** räcker till 14 färgningsburkar på vardera 70 ml.

4. Material som krävs, men inte tillhandahålls

- ZytoLight FISH probe
- Positiva och negativa kontrollspecimen
- Objektglas för mikroskopering, utan beläggning
- Vattenbad (70 °C)
- Hybridiserare eller varm platta
- Hybridiserare eller fuktkammare i hybridiseringsugn
- Justerbara pipetter (10 µl, 25 µl)
- Färgningsburkar eller -bad
- Timer
- Kalibrerad termometer
- Etanol eller reagensalkohol
- 37 %-ig formaldehyd, syrafri, eller 10 %-ig formalin, neutralt buffrad
- 2x Saline-Sodium Citrate (SSC), t.ex. från 20x SSC Solution (art. nr WB-0003-50)
- 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 fluorencensmikroskop (400-1000x)
- Immersionsolja som godkänts för fluorencensmikroskopi
- 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.

Märkning för ES2:

EUH210 Säkerhetsdatablad finns tillgängligt på förfrågan.
 < 20 % av blandningen består av ingredienser av
 okänd akut toxicitet (inhalation).

Faro- och skyddsangivelser för PT4, PT5, WB5, WB7, och WB8:

Den farobestämmande komponenten är en blandning 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 avlägnas från arbetsplatsen.
P280	Använd skyddshandskar/skyddskläder/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.

Faro- 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/humangenetikans 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/humangenetikare som ansvarar för att granska de färgade objektglasen och säkerställa att positiva och negativa kontroller är tillräckliga.
- Specimenfärgning, särskilt signalintensitet och bakgrundsfärgning, 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

Röda blodkroppar som finns i provet kan uppvisa autofluorescens som hindrar signaligenkänning.

9. Förberedelse av specimen

Inkubera objektglasen i 2 min i en 2x SSC solution vid 73 °C omedelbart före proteolys för åldring.

Alternativt kan åldring av prover åstadkommas genom att inkubera prover över natten (12-16 h) vid 37 °C.

10. Förbehandling av enheten

20x Wash Buffer TBS (WB5), 10x MgCl₂ (PT4), och 10x PBS (PT5) ska förbehandlas enligt instruktionerna i 11. "Provförfarande". Komponenter (**PT4**) och (**PT5**) kan bilda fällningar vid 2-8 °C. Värm vid behov upp till 37 °C i 10 min tills fällningarna har lösts upp helt före användning. Alla andra satsreagenser är klara att använda. Det krävs ingen rekonstitution, blandning eller spädning.

11. Provförfarande

11.1 Dag 1

Förberedande steg

- *Förberedelse av 1x Wash Buffer TBS:* Späd 1 del 20x Wash Buffer TBS (WB5) i 19 delar avjoniserat eller destillerat vatten.
- *Förberedelse av 1 % formaldehydlösning:* För 100 ml 1 % formaldehydlösning. Blanda antingen 2,7 ml 37 % syrafri formaldehyd eller 25 ml neutralt buffrad formalin (4 % formaldehyd) med 10 ml 10x MgCl₂ (PT4) och 10 ml 10x PBS (PT5) och justera volymen till 100 ml med avjoniserat eller destillerat vatten. Blanda ordentligt.
- *Förberedelse av en etanolserie (70 %, 90 % och 100 % etanollosningar):* Späd 7, 9, och 10 delar av 100 % etanol med respektive 3, 1, och 0 delar avjoniserat eller destillerat vatten. Lösningarna kan förvaras i lämpliga behållare och återanvändas.

Förbehandling (proteolys/etterfixering)

1. Applicera (droppvis) Cytology Pepsin Solution (ES2) till specimen och inkubera i 10 minuter vid 37 °C i en fuktkammare.

ES2 kan bilda fällningar. Dessa påverkar inte kvaliteten.

Beroende på flera faktorer, t.ex. typ och varaktighet för fixering, och typ av celler kan det krävas olika inkubationstider. Vi rekommenderar vi en inkubationstid på 5-15 min för cytologispecimen. Som en allmän regel rekommenderar vi att fastställa den optimala tiden för proteolys i förtester.

2. Inkubera objektglasen 5 min i 1x Wash Buffer TBS.
3. Inkubera objektglasen i 5 min i 1 %-ig formaldehydlösning.
4. Inkubera objektglasen 5 min i 1x Wash Buffer TBS.
5. Dehydrering: i 70 %, 90 % och 100 % etanol, vardera i 1 min.

Lufttorka specimen.

Denaturering och hybridisering

1. Pipettera 10 µl ZytoLight FISH 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 täckglasets.

Vi rekommenderar att gummicement (t.ex. Fixogum Rubber Cement) används för tillslutningen.

3. Placera objektglasen på en varm platta eller hybridiserare och denaturera specimen i 5 min vid 72 °C.
4. Överför objektglasen till en fuktkammare och hybridisera över natten vid 37 °C (t.ex. i en hybridiseringsugn).

Det är viktigt att cytologispecimen inte torkar ut under hybridiseringssteget.

11.2 Dag 2

Förberedande steg

- Cytology Stringency Wash Buffer SSC (WB7): Värm till 70 °C.
- Cytology Wash Buffer SSC (WB8): Försatt i rumstemperatur.
- DAPI/DuraTect-Solution (MT7): Försatt i rumstemperatur före användning, skydda från ljus.

Efterhybridisering och detektion

1. Ta försiktigt bort gummimentet eller limmet.
2. Ta försiktigt bort täckglaset.
3. Tvätta med Cytology Stringency Wash Buffer SSC (WB7) i 2 min vid 70 °C.

Cytology Stringency Wash Buffer SSC ska förvärmas. Kontrollera med en termometer om nödvändigt.

Vi rekommenderar användning av fyra objektglas per färgningsburk. Om nödvändigt, använd blanka objektglas för att justera antalet till fyra.

4. Tvätta med Cytology Wash Buffer SSC (WB8) i 1 min vid rumstemperatur.

Cytology Wash Buffer SSC ska förvärmas till temperatur. Kontrollera med en termometer om nödvändigt.

5. Lufttorka proverna skyddat från ljus.
6. Pipettera 25 µl DAPI/DuraTect-Solution (MT7) på objektglasen. 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.

7. Förvara objektglaset i mörker. Lagring i längre perioder bör äga rum vid 2-8 °C.
8. 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
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 prober 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
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. <i>Filteruppsättningar med tre bandpass ger mindre ljus jämfört med filteruppsättningar med ett eller två bandpass. Följaktligen kan signalerna förefalla vara svagare med dessa trippelbandpassfilterset</i>

Korshybridiserings signaler; ojämn bakgrund

Möjlig orsak	Åtgärd
Proteolytisk förbehandling för stark	Minska inkubationstiden för pepsin
Objektglasen kylda till rumstemperatur före hybridisering	Överför objektglasen snabbt till 37 °C

Morfologi degraderad

Möjlig orsak	Åtgärd
Proteolytisk förbehandling inte utförd ordentligt	Optimera inkubationstiden för pepsin, minska den efter behov
Otillräcklig torkning före probapplikering	Förläng lufttorkningen

Svag mottfärgning

Möjlig orsak	Åtgärd
Lågkoncentrerad DAPI-lösning	Använd <u>DAPI/DuraTect-Solution (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



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 ZytoLight® är varumärken som tillhör ZytoVision GmbH.