



ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit

REF Z-2099-20

20

Für die Verwendung in Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen (FISH)

4250380N727X



In-vitro-Diagnostikum
gemäß IVDR (EU) 2017/746

1. Verwendungszweck

ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit ist für die Verwendung in Kombination mit ZytoLight Sonden in Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen (FISH) in zytologischen Präparaten bestimmt.

Das Produkt ist nur für die professionelle Anwendung bestimmt. Alle Tests, bei denen das Produkt verwendet wird, sollten in einem zertifizierten, zugelassenen anatomisch-pathologischen Labor unter der Aufsicht eines Pathologen/Humangenetikern von qualifiziertem Personal durchgeführt werden.

2. Prinzip der Methode

Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) erlaubt den Nachweis und die Visualisierung von spezifischen Nukleinsäuresequenzen in Zellpräparationen. Fluoreszenzmarkierte DNA-Fragmente, sogenannte FISH-Sonden, und deren komplementäre Zielsequenzen in den Präparationen werden co-denaturiert und können anschließend während der Hybridisierung binden. Danach werden unspezifische und ungebundene Sondenfragmente durch Stringenzwaschschritte entfernt. Nach der Gegenfärbung der DNA mit DAPI werden hybridisierte Sondenfragmente mit einem Fluoreszenzmikroskop visualisiert, welches mit für die Fluorochrome spezifischen Anregungs- und Emissionsfiltern ausgestattet ist, mit denen die FISH-Sondenfragmente direkt markiert wurden.

3. Enthaltene Komponenten

Das ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit besteht aus:

Code	Komponente	Menge	Gefäß
		Σ 20	
ES2	<u>Cytology Pepsin Solution</u>	4 ml	Tropfflasche, transparenter Deckel
WB5	<u>20x Wash Buffer TBS</u>	50 ml	Schraubverschluss-flasche
PT4	<u>10x MgCl₂</u>	50 ml	Schraubverschluss-flasche
PT5	<u>10x PBS</u>	50 ml	Schraubverschluss-flasche
WB7	<u>Cytology Stringency Wash Buffer SSC</u>	500 ml	Schraubverschluss-flasche (groß)
WB8	<u>Cytology Wash Buffer SSC</u>	500 ml	Schraubverschluss-flasche (groß)
MT7	<u>DAPI/DuraTect-Solution</u>	0,8 ml	Reaktionsgefäß, blauer Deckel
	Gebrauchsanweisung	1	

Z-2099-20 (20 Reaktionen): Komponenten **ES2** und **MT7** sind ausreichend für 20 Reaktionen. Komponenten **PT4**, **PT5**, **WB7** und **WB8** sind ausreichend für 7 Küvetten à 70 ml. Komponente **WB5** ist ausreichend für 14 Küvetten à 70 ml.

4. Benötigte, aber nicht bereitgestellte Materialien

- ZytoLight FISH Sonde
- Positive und negative Kontrollproben
- Objektträger, unbeschichtet
- Wasserbad (70°C)
- Hybridizer oder Wärmeplatte
- Hybridizer oder Feuchtekkammer im Hybridisierungssofen
- Verstellbare Pipetten (10 µl, 25 µl)
- Küvetten oder Färbetröge
- Stoppuhr
- Kalibriertes Thermometer
- Ethanol oder denaturierter Alkohol
- 37% Formaldehyd, säurefrei, oder 10% Formalin, neutral gepuffert
- 2x Natriumcitrat Salzlösung (SSC), z.B. aus 20x SSC Solution (Prod. Nr. WB-0003-50)
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser
- Deckgläser (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Naturkautschuk-Klebstoff, z.B. Fixogum Rubber Cement (Prod. Nr. E-4005-50/-125), oder Ähnliches
- Regelmäßig gewartetes Fluoreszenzmikroskop (400-1000x)
- Immersionsöl, geeignet für Fluoreszenzmikroskopie
- Entsprechende Filtersätze

5. Lagerung und Handhabung

Bei 2-8°C in aufrechter Position lagern. Zusätzlich dazu muss die DAPI/DuraTect-Solution (**MT7**) vor Licht geschützt gelagert werden. Unmittelbar nach Gebrauch wieder unter Lagerbedingungen aufbewahren. Keine Reagenzien nach Ablauf des auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatums verwenden. Das Produkt ist bei sachgemäßer Handhabung bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil.

6. Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Gebrauchsanweisung vor der Verwendung lesen!
- Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden!
- Dieses Produkt enthält Substanzen (in geringen Konzentrationen und Volumina), welche gesundheitsschädlich und potentiell infektiös sind. Jeder direkte Kontakt mit den Reagenzien muss vermieden werden. Entsprechende Schutzmaßnahmen (Verwendung von Einmalhandschuhen, Schutzbrille und Laborbekleidung) sind zu ergreifen!
- Schwerwiegende Vorfälle, die im Zusammenhang mit dem Produkt aufgetreten sind, in Übereinstimmung mit den örtlichen Vorschriften dem Hersteller sowie den zuständigen Behörden melden!
- Sollten Reagenzien mit der Haut in Kontakt kommen, die betroffenen Stellen sofort mit viel Wasser abspülen!

- Ein Sicherheitsdatenblatt ist auf Anfrage für den professionellen Anwender verfügbar.
- Die Reagenzien nicht wiederverwenden, außer die Wiederverwendung ist explizit erlaubt!
- Kreuzkontaminationen der Präparate vermeiden, da diese zu fehlerhaften Ergebnissen führen können.
- Die Präparate dürfen während der Hybridisierungs- und Waschstreps nicht austrocknen.
- DAPI/DuraTect-Solution (MT7) sollte nicht für längere Zeit dem Licht, insbesondere intensivem Licht, ausgesetzt werden. Das bedeutet, falls möglich sollten alle Arbeitsschritte im Dunkeln und/oder unter Verwendung von lichtundurchlässigen Behältnissen durchgeführt werden!

Besondere Kennzeichnung von ES2:

EUH210 Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.
< 20 Prozent des Gemisches bestehen aus einem oder mehreren Bestandteilen unbekannter akuter Toxizität (inhalativ).

Gefahren- und Sicherheitshinweise für PT4, PT5, WB5, WB7 und WB8:

Die gefahrbestimmende Komponente ist ein Gemisch aus: 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on [EG-Nr. 247-500-7] und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on [EG-Nr. 220-239-6] (3:1).



Achtung

- H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
P261 Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden.
P272 Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen.
P280 Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
P302+P352 BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Wasser waschen.
P333+P313 Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P362+P364 Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.

Gefahren- und Sicherheitshinweise für MT7:

Das Produkt ist nicht als gefährlich eingestuft im Sinne der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.

7. Einschränkungen

- Für die Verwendung als *In-vitro*-Diagnostikum.
- Nur für die professionelle Anwendung.
- Nur für den nicht-automatisierten Gebrauch.
- Die klinische Interpretation jeglicher positiven Färbung bzw. deren Abwesenheit muss im Kontext mit der klinischen Anamnese, Morphologie, anderer histopathologischer Kriterien sowie weiterer diagnostischer Tests erfolgen. Es obliegt der Verantwortung eines qualifizierten Pathologen, mit ISH Sonden, Reagenzien, Diagnose-Panels und den zur Erstellung von gefärbten Präparaten verwendeten Methoden vertraut zu sein. Die Färbung ist in einem zertifizierten, zugelassenen Labor unter Aufsicht eines unter der Aufsicht eines Pathologen/Humangenetikers durchzuführen, der für die Auswertung der Färbepreparate und für die Sicherstellung der Eignung von positiven und negativen Kontrollen verantwortlich ist.
- Die Färbung der Präparate, insbesondere die Signalintensität und die Hintergrundfärbung, ist abhängig von der Behandlung und Prozessierung der Präparate vor der Färbung. Unsachgemäßes Fixieren, Einfrieren, Auftauen, Waschen, Trocknen, Erhitzen, Schneiden oder Kontamination mit anderen Präparaten oder Flüssigkeiten können Artefakte oder falsche Ergebnisse verursachen. Inkonsistente Ergebnisse können von Variationen bei Fixierungs- und Einbettungsverfahren sowie von inhärenten Unregelmäßigkeiten innerhalb des Präparates resultieren.

- Die Leistung wurde unter Verwendung der in dieser Gebrauchsanweisung beschriebenen Verfahren validiert. Abweichungen von diesen Verfahren können die Leistung beeinflussen und müssen vom Anwender validiert werden. Dieses IVD ist nur dann CE-zertifiziert, wenn es wie in dieser Gebrauchsanweisung beschrieben im Rahmen des Verwendungszwecks eingesetzt wird.

8. Störsubstanzen

Rote Blutzellen innerhalb des Präparates können Autofluoreszenz verursachen, welche die Signalerkennung behindert.

9. Vorbereitung der Präparate

Unmittelbar vor der Proteolyse die Objektträger für 2 min in einer 2x SSC Lösung bei 73°C zur Alterung inkubieren.

Alternativ kann die Alterung der Präparate ebenfalls durch Inkubation der Präparate über Nacht (12-16h) bei 37°C durchgeführt werden.

10. Vorbereitung der Reagenzien

20x Wash Buffer TBS (WB5), 10x MgCl₂ (PT4), und 10x PBS (PT5) sind wie in der Gebrauchsanweisung unter 11. „Durchführung“ beschrieben vorzubereiten. Die Komponenten **PT4** und **PT5** können bei 2-8°C Präzipitate bilden. Falls notwendig, vor der Verwendung für 10 Minuten auf 37°C erwärmen, bis die Präzipitate vollständig gelöst sind. Alle anderen Reagenzien des Kits sind gebrauchsfertig. Kein Rekonstituieren, Mischen oder Verdünnen ist notwendig.

11. Durchführung

11.1 Tag 1

Vorbereitende Schritte

- *Vorbereitung von 1x Wash Buffer TBS:* 1 Teil 20x Wash Buffer TBS (WB5) mit 19 Teilen deionisiertem und destilliertem Wasser verdünnen.
- *Vorbereitung von 1% Formaldehydlösung:* Für 100 ml 1% Formaldehydlösung entweder 2.7 ml 37% säurefreies Formaldehyd oder 25 ml 10% neutral gepuffertes Formalin (4% Formaldehyd) mit 10 ml 10x MgCl₂ (PT4) und 10 ml 10x PBS (PT5) mischen und das Endvolumen mit deionisiertem oder destilliertem Wasser auf 100 ml bringen. Gründlich mischen.
- *Vorbereitung einer Ethanolreihe (70%, 90% und 100% Ethanol):* Jeweils 7, 9 und 10 Teile 100% Ethanol mit entsprechend 3, 1 und 0 Teilen deionisiertem oder destilliertem Wasser verdünnen. Diese Lösungen können in geeigneten Gefäßen aufbewahrt und wiederverwendet werden.
- *ZytoLight FISH Probe:* Vor der Verwendung auf RT bringen, vor Licht schützen.

Vorbehandlung (Proteolyse/Post-Fixierung)

- (1) Tropfenweise Cytology Pepsin Solution (ES2) auf das zytologische Präparat auftragen und für 10 min bei 37°C in einer Feuchtkammer inkubieren.

Abhängig von verschiedenen Faktoren, wie z.B. Art und Dauer der Fixierung sowie Art der Zellen, können unterschiedliche Inkubationszeiten notwendig sein. Als Richtwert kann eine Inkubationszeit von 5-15 min für zytologische Präparate empfohlen werden. Generell wird eine Bestimmung der optimalen Dauer der Proteolyse in Vortests empfohlen.

- (2) Die Objektträger für 5 min in 1x Wash Buffer TBS inkubieren.
- (3) Die Objektträger für 5 min in 1% Formaldehydlösung inkubieren.
- (4) Die Objektträger für 5 min in 1x Wash Buffer TBS inkubieren.
- (5) Dehydrierung: in 70%, 90% und 100% Ethanol für jeweils 1 min.

Schnitte an der Luft trocknen.

Denaturierung und Hybridisierung

1. 10 µl der ZytoLight FISH Probe auf jedes der vorbehandelten Präparate pipettieren.

Längere Licht-Exposition der Sonde vermeiden.

2. Die Präparate mit 22 mm x 22 mm Deckgläsern abdecken (Einschluss von Luftbläschen vermeiden) und das Deckglas versiegeln.

Wir empfehlen die Verwendung von Naturkautschuk-Klebstoff (z.B. Fixogum) zum Versiegeln.

3. Die Objektträger auf einer Wärmeplatte oder in einem Hybridizer platzieren und die Präparate für 5 min bei 72°C denaturieren.
4. Die Objektträger in eine Feuchtekammer überführen und über Nacht bei 37°C hybridisieren (z.B. in einem Hybridisierungsöfen).

Es ist essentiell, dass die Präparate während des Hybridisierungsschritts nicht austrocknen.

11.2 Tag 2

Vorbereitende Schritte

- Cytology Stringency Wash Buffer SSC (WB7): Auf 70°C erwärmen.
- Cytology Wash Buffer SSC (WB8): Auf Raumtemperatur bringen.
- DAPI/DuraTect-Solution (MT7): Vor der Verwendung auf Raumtemperatur bringen, vor Licht schützen.

Post-Hybridisierung und Detektion

- (1) Vorsichtig den Naturkautschuk-Klebstoff oder Kleber entfernen.
- (2) Vorsichtig das Deckglas entfernen.
- (3) Mit Cytology Stringency Wash Buffer SSC (WB7) für 2 min bei 70°C waschen.

Der Cytology Stringency Wash Buffer SSC sollte vorgewärmt sein. Falls notwendig, die Temperatur mit einem Thermometer überprüfen.

Wir empfehlen, nicht mehr als vier Objektträger pro Färbetrog zu verwenden. Falls notwendig, leere Objektträger verwenden, um die Anzahl auf vier anzupassen.

- (4) Mit Cytology Wash Buffer SSC (WB8) für 1 min bei Raumtemperatur waschen.

Der Cytology Wash Buffer SSC sollte auf Raumtemperatur vorgewärmt sein. Falls notwendig, die Temperatur mit einem Thermometer überprüfen.

- (5) Schnitte vor Licht geschützt an der Luft trocknen.
- (6) 25 µl DAPI/DuraTect-Solution (MT7) auf die Objektträger pipettieren. Die Präparate mit einem Deckglas (24 mm x 60 mm) abdecken, dabei den Einschluss von Luftbläschen vermeiden. Im Dunkeln für 15 min inkubieren.

Die Verwendung einer abgeschnittenen Pipettenspitze zur Vergrößerung der Öffnung kann das Pipettieren erleichtern. Nicht lange dem Licht aussetzen.

- (7) Die Objektträger im Dunkeln aufbewahren. Längere Aufbewahrungsperioden sollten bei 2-8°C stattfinden.
- (8) Die Auswertung des Probenmaterials erfolgt mittels Fluoreszenzmikroskopie. Es werden Filtersätze für folgende Wellenlängenbereiche benötigt:

Fluoreszenzfarbstoff	Anregung	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. Interpretation der Ergebnisse

Bei Verwendung von geeigneten Filtersätzen erscheinen in Interphasen oder Metaphasen von normalen Zellen oder Zellen ohne eine chromosomale Aberration zwei Signale pro Sonde/Fluoreszenzmarker. Ausnahmen sind Sonden, welche gegen X- und/oder Y-Chromosomen gerichtet sind, was je nach Geschlecht in entweder kein bis zwei Signalen pro Sonde/Fluoreszenzmarker resultiert. In Zellen mit chromosomaler Aberration kann ein anderes Signalmuster in Interphasen oder Metaphasen beobachtet werden. Weitere Informationen zur Interpretation der Ergebnisse sind in der Gebrauchsanleitung der jeweiligen Sonde zu finden.

13. Empfohlene Qualitätskontrollverfahren

Die Gebrauchsanweisung der jeweiligen ZytoVision Sonde beachten.

14. Leistungsmerkmale

Die Gebrauchsanweisung der jeweiligen ZytoVision Sonde beachten.

15. Entsorgung

Die Entsorgung der Reagenzien muss in Übereinstimmung mit den örtlichen Vorschriften erfolgen.

16. Fehlerbehebung

Jede Abweichung von der Gebrauchsanweisung kann zu schwachen bis gar keinen Färbungen führen.

Schwache oder keine Signale

Mögliche Ursache	Lösung
Proteolytische Vorbehandlung nicht optimal	Die Inkubationszeit mit Pepsin optimieren, falls notwendig erhöhen oder reduzieren
Verdunstung der Sonde	Bei der Nutzung eines Hybridizers ist die Verwendung von feuchten Vliesstreifen/Wassertanks erforderlich. Bei der Nutzung eines Hybridisierungsöfens muss eine Feuchtekammer verwendet werden. Zusätzlich sollte das Deckglas, z.B. mit Fixogum, vollständig versiegelt werden, um ein Austrocknen der Präparat während der Hybridisierung zu verhindern.
Ungeeignete Filtersätze verwendet	Für die Fluorochrome der Sonde geeignete Filtersätze verwenden. Triple-Bandpass-Filtersätze liefern im Vergleich zu Single- oder Dual-Bandpass-Filtersätzen weniger Licht. Daher können die Signale unter Verwendung von Triple-Bandpass-Filtersätzen schwächer erscheinen.

Kreuzhybridisierungssignale, Hintergrundsignale

Mögliche Ursache	Lösung
Proteolytische Vorbehandlung zu stark	Die Inkubationszeit mit Pepsin reduzieren
Objektträger sind vor der Hybridisierung auf Raumtemperatur abgekühlt	Objektträger zügig auf 37°C überführen

Degradierete Morphologie

Mögliche Ursache	Lösung
Proteolytische Vorbehandlung nicht optimal ausgeführt	Die Inkubationszeit mit Pepsin optimieren, falls notwendig erhöhen oder reduzieren
Unzureichende Trocknung vor Applikation der Sonde	Lufttrocknung verlängern

Schwache Gegenfärbung

Mögliche Ursache	Lösung
Gering konzentrierte DAPI-Lösung	DAPI/DuraTect-Solution (ultra) (Prod. Nr. MT-0008-0.8) stattdessen verwenden
Inkubationszeit mit DAPI zu kurz	Inkubationszeit mit DAPI anpassen

17. Literatur

- 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	Beschreibung der Änderung
1.2.1	11. Durchführung ZyGreen 2.0 hinzugefügt



www.zytovision.com

Die aktuellste Version der Gebrauchsanleitungen sowie Gebrauchsanleitungen in verschiedenen Sprachen sind auf www.zytovision.com verfügbar.

Unsere Experten stehen Ihnen für Ihre Fragen zur Verfügung.
Bitte kontaktieren Sie helptech@zytovision.com



ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/ Deutschland
Telefon: +49 471 4832-300
Fax: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
Email: info@zytovision.com

Warenzeichen:

ZytoVision® und *ZytoLight*® sind Warenzeichen der ZytoVision GmbH.