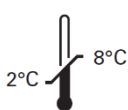


Tissue Digestion Kit II

REF KBI-60004

Containing sufficient volume for up to 25 or 5x5 tests



Kreatech Biotechnology B.V.
Vlierweg 20
1032 LG Amsterdam
The Netherlands
www.LeicaBiosystems.com



1 Intended use/purpose

Fluorescence in situ hybridization (FISH) identifies or labels target genomic sequences so that their location can be studied. DNA sequences from appropriate chromosome specific probes are first labeled with reporter molecules. The labeled DNA probe is then hybridized to the metaphase chromosomes or interphase nuclei on a slide. After washing, the specimen is screened for the reporter molecules by fluorescence microscopy.

This pretreatment kit is specifically developed to obtain optimal results on heavily cross-linked or difficult formalin-fixed paraffin-embedded tissues (FFPE) (e.g. longer fixation or prolonged storage).

This product is intended for In Vitro Diagnostic Use.

2 Product Description

This pretreatment kit is for non-automated FISH hybridizations specifically developed to use for pretreatment and enzyme digestion of FFPE before DNA FISH hybridization procedure. This kit is specifically developed to obtain optimal results on heavily cross-linked or difficult FFPE tissues. The use of the kit will reverse the cross-links in the tissue, permeabilize the cell membrane and digest cell proteins to ease the binding of the FISH probes with the specific cell DNA.

3 Instructions for use

3.1 Specimens

This pretreatment kit is specifically developed to obtain optimal results on heavily cross-linked or difficult formalin-fixed paraffin-embedded tissues (FFPE) (e.g. longer fixation or prolonged storage).

Specimens' pre-analytics: To obtain a successful FISH the pre-analytics play a major role. The specimen should be correctly fixated and embedded in paraffin wax according to a well-established protocol. Over-fixation or under fixation can cause failure of the FISH procedure or at least low reproducibility/signal intensity. Kreatech™ FISH probes have been tested on FFPE tissue sections which were cut at 3-6 µm. Tissue blocks and cut slides should be stored according to the recommended storage and handling conditions for optimal results, see Leica website. Baking can be done either on the BOND using the *Bake and Dewax protocol or separately in an oven or incubator. Recommended baking temperature and time is up to 16 hrs at 56 °C, or 60 - 120 min at 80 °C.

3.2 Pretreatment

Mount 3 - 6 µm formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections on positively charged slides (e.g. aminoalkylsilane). Protocol below is for the use of 5 slides in an upright coplin jar of 50 ml.

1. Bake mounted slides for 2 hours at 80 °C or 16 hours at 56 °C.
2. De-paraffinize warm slides by soaking in xylene or xylene substitute for two times 10 minutes (min).
3. Re-hydrate by soaking in 100%, 85% and 70% ethanol for 3 min each.
4. Wash with dH2O for 3 min at room temperature (RT).
5. Pretreat with 50 ml of 0.2 M HCl (LK-099B) for 20 min at RT, and then wash in dH2O for 3 min at RT.
6. Place slides in 50 ml of Pretreatment Solution B (8% sodium thiocyanate) (LK-100B) at 80 °C for 30 min.
7. Rinse in 50 ml of 2 x SSC (LK-104B) for 3 min at RT.
8. Cover paraffin section with approximately 200 µl Pepsin Solution (LK-101B) and incubate at RT for 5 - 50 min (Time depending on tissue fixation and tissue type. E.g. most breast cancer tissue needs 5 - 15 min digestion; colon tissue 20 - 30 min).
9. Wash in dH2O for 1 min.

10. Wash in 50 ml of 2 x SSC (LK-104B) for 5 min at RT.
11. Dehydrate slides by soaking 70%, 85%, and 100% ethanol for 1 min each time. Air-dry. Proceed with **Probe Preparation**.

3.3 Probe preparation:

Kreatech™ FISH probes for paraffin embedded tissue are supplied Ready to Use (RtU) unless specified otherwise in the product documentation. Consult label on vial and specific probe pack insert for dilution specifics.

3.4 Co-denaturation

Apply 10 µl of probe per 22 x 22 mm field. Cover with glass cover slip and seal with Fixogum or rubber cement. Denature sample and probe on a ThermoBrite (TS-01/02) at 80 ±1 °C for 5 min. Continue with **Hybridization**.

3.5 Hybridization:

Incubate overnight at 37 ±1 °C in a ThermoBrite (TS-01/02) or in a humidified chamber.

3.6 Post-hybridization Wash:

1. Pre-warm 50 ml of Wash Buffer I (0.4 x SSC / 0.3% Igepal) (LK-102) to 72 °C
2. Remove rubber cement.
3. Place slides in 50 ml of Wash Buffer II (2 x SSC / 0.1% Igepal) (LK-103), incubate for 2 min. at RT. Slide off coverslips. Re-use the wash buffer only once for a total of 10 slides.
4. Place slides in 50 ml of pre-warmed Wash Buffer I (0.4 x SSC / 0.3% Igepal) (LK-102), incubate for 2 min at 72 °C (+- 1 °C) without agitation. Re-use the wash buffer only once for a total of 10 slides.
5. Place slides in 50 ml of fresh Wash Buffer II (2 x SSC / 0.1% Igepal) (LK-103), incubate for 1 min. at RT without agitation. Re-use the wash buffer only once for a total of 10 slides.
6. Dehydrate in fresh 70%, 85% and 100% ethanol, incubate for 1 min each at RT. Air dry at RT and proceed to **Counterstaining**.

3.7 Counterstaining:

Apply 15 µl DAPI counterstain (DAPI/Antifade 1 µg/ml) (LK-096B) or a dilution of this using counterstain diluent (LK097B) and apply glass cover slip. Proceed with microscopy.

3.8 Procedural recommendations:

Check protein digestion and pretreatment by applying 15 µl DAPI counterstain and evaluate slides using a fluorescence microscope equipped with a DAPI filter. If the sample is not sufficiently digested: remove cover slip and soak tissue in 2 x SSC (LK-104B) for 2 min and prolong protein digestion. If the sample is over-digested use a fresh sample and reduce protein digestion time.

Temperature and buffer concentration (stringency) of hybridization and washing are important, as lower stringency can result in non-specific binding of the probe to other sequences, and higher stringency can result in a lack of signal. Incomplete denaturation of target DNA can result in lack of signal.

3.9 Recommendations for fluorescence microscopy

For optimal visualization use a well maintained and regularly calibrated microscope equipped with a 100W mercury lamp or other appropriate light source (e.g. Metal Halide Bulb (120W X-cite) or LED based light sources) and a 63x or 100x fluorescence objective. Triple band-pass filters (DAPI/FITC/Cy3 or DAPI/FITC/TRITC) are used to view multiple colors, single band-pass filters are used for individual color visualization. See the Leica website for recommendations on appropriate filters for each microscope brand: <http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/kreatech-fish-probes/>

Suitable excitation and emission range for Kreatech™ fluorophores:

Fluorophore	Excitation	Emission
DAPI	360 ±20 nm	460 ±30 nm
PlatinumBright™ 415	429 ±15 nm	470 ±15 nm
PlatinumBright™ 495	495 ±10 nm	517 ±10 nm
PlatinumBright™ 550	550 ±10 nm	580 ±10 nm

The shown bandwidth corresponds to 80% of the maximum excitation/emission of the fluorophore)

4 Analytical Performance

The performance of Tissue Digestion Kit II has been established using the procedures described in this instruction for use. Modifications to these procedures may alter the performance of the assay. Any deviations from the instructed protocols must be validated by the user. Users who deviate from recommended test procedures must accept responsibility for interpretation of patient results under these circumstances. Protocol times may vary due to variation in fixation and processing. In addition, pepsin incubation time may require optimization depending on processing and fixation conditions.

5 Materials required and supplied with product

Code #	Description	Volume
LK-096B	DAPI/Antifade 1 µg/ml (DAPI Counterstain)	0.5 ml
LK-097B	Antifade (Counterstain diluent)	0.5 ml
LK-099B	0.2 M HCl	250 ml
LK-100B	8% sodium thiocyanate (Pretreatment Solution B)	250 ml
LK-101B	Pepsin Solution	5 ml
LK-102B*	0.4 x SSC / 0.3% Igepal (Wash Buffer I)	250 ml
LK-103B*	2 x SSC / 0.1% Igepal (Wash Buffer II)	2 x 250 ml
LK-104B	2 x SSC	2 x 250 ml

**Please note that LK-102 and LK-103 products containing the same number, but different letters are identical except for the volume. A= 100 ml, B=250 ml*

6 Materials required and not supplied with product

- Xylene
- Ethanol 100%, 85% and 70%
- Fixogum (LK-071A) or rubber cement
- Hot plate with accurate temperature control up to 80 °C or ThermoBrite™ (TS01/TS02)
- Incubator with accurate temperature range of 37 - 56 °C
- Water bath with accurate temperature range of 37 - 80 °C
- Plastic and glass coplin jars
- Variable micropipettes (1 µl - 200 µl)
- Fluorescence microscope equipped with suitable filters (see recommendations for Fluorescence Microscopy).

7 Warning and precautions

- Any serious incident that has occurred in relation to the device shall be reported to the manufacturer and the competent authority of the Member State in which the user and/or the patient is established.
- For in vitro diagnostic use. For laboratory professional use only. In case of emergencies check SDS sheets for safety information.
- The kit is intended to be use only prior and after to DNA FISH on FFPE tissue. This product is not intended to use for frozen tissue.
- For non-automated FISH pretreatment and hybridization only.
- All materials should be disposed of according to your institution's guidelines for hospital waste disposal.
- The use of the KBI-60007 Tissue Digestion Kit I is recommended for use with conventional FFPE samples.
- For metaphase and interphase cells or other cytological samples it is recommended to use pretreatment kit KBI-60005 or KBI-60006.

Labelling according to Regulation (EC) No 1272/2008

Code #	Description	Signal Word	Pictogram	Hazard Statements
LK-096B	DAPI/Antifade 1 µg/ml (DAPI Counterstain)	Warning		H315, H319, H335
LK-097B	Antifade (Counterstain diluent)	Warning		H315, H319, H335
LK-099B	0.2 M HCl	N.A.	N.A.	N.A.
LK-100B	8% sodium thiocyanate (Pretreatment Solution B)	N.A.	N.A.	N.A.
LK-101B	Pepsin Solution	N.A.	N.A.	N.A.
LK-102B	0.4 x SSC / 0.3% Igepal (Wash Buffer I)	N.A.	N.A.	N.A.
LK-103B	2 x SSC / 0.1% Igepal (Wash Buffer II)	N.A.	N.A.	N.A.
LK-104B	2 x SSC	N.A.	N.A.	N.A.

Hazard statement(s)

H315 – Causes skin irritation.

H319 – Causes serious eye irritation.

H335 – May cause respiratory irritation

Precautionary statement(s) Prevention

P271 – Use only outdoors or in a well-ventilated area.

P261 – Avoid breathing mist/vapours/spray.

P264 – Wash all exposed external body areas thoroughly after handling.

P280 – Wear protective gloves, protective clothing, eye protection and face protection.

Precautionary statement(s) Response

P305+P351+P338 – IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

P312 – Call a POISON CENTER/doctor/physician/first aider/if you feel unwell.

P337+P313 – If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

P302+P352 – IF ON SKIN: Wash with plenty of water and soap.

P304+P340 – IF INHALED: Remove person to fresh air and keep comfortable for breathing.

P332+P313 – If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.

P362+P364 – Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

Supplemental Hazard Statements: none

Restricted to laboratory professional users

Explanation of symbols

	Contains hazardous substances
	Country of manufacture
	Do not use if package is damaged
	Consult electronic IfU (elfU)

8 Reagent Storage and Handling

Protect DAPI/Antifade from strong and direct light. Store at 2 - 8 °C. The unopened product is stable under these conditions up to the expiry date indicated on the vial label.

Return undiluted and diluted reagents to 2 - 8 °C immediately after use.

After opening products are stable for up to 18 months, but never longer than the expiry date of each individual product. After this time period the use of the solutions may result in suboptimal results.

9 Technical Support

Technical support is available at www.leicabiosystems.com or via e-mail: Kreatech.Support@Leicabiosystems.com. Please contact us if desired results are not obtained or any anomalies appear when using this product.

A paper printed copy of the IfU can be requested via e-mail by contacting: LBSAMS-IFU@leicabiosystems.com



The elfU is available in additional languages that can be downloaded from: www.leicabiosystems.com

10 Customer Service

Kreatech probes may be ordered through Leica Customer Service +31 20 6919181 or order via e-mail: purchase.orders@leica-microsystems.com.

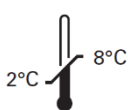
11 History

IfU Version	Date of issue	Changes
2.4	2016-SEP-27	Remove the tagline "The pathology Company "
3.0	2022 April	Update according to IVD regulations

Tissue Digestion Kit II

REF KBI-60004

Съдържа достатъчно количество за до 25 или 5x5 теста



Kreatech Biotechnology B.V.
Vlierweg 20
1032 LG Amsterdam
Нидерландия
www.LeicaBiosystems.com



1 Предназначение/цел

Флуоресцентната *in situ* хибридизация (FISH) идентифицира или бележи прицелни геномни последователности, за да може да се изследва тяхното местоположение. ДНК последователностите от съответните специфични за хромозомите сонди първо се бележат с репортерни молекули. След това белязаната ДНК сонда се хибридузира към метафазните хромозоми или интерфазните ядра върху предметно стъкло. След измиване спесименът се проверява за наличие на репортерни молекули чрез флуоресцентна микроскопия.

Този комплект за предварително третиране е специално разработен за получаване на оптимални резултати при силно кръстосани или трудни фиксирани във формалин и вградени в парафин тъкани (FFPE) (напр. по-дълга фиксация или продължително съхранение).

Този продукт е предназначен за *in vitro* диагностика.

2 Описание на продукта

Този комплект за предварително третиране е за неавтоматизирани FISH хибридизации, специално разработен да се използва за предварително третиране и ензимна дигестия на FFPE преди процедурата за FISH хибридизация на ДНК. Този комплект е специално разработен за получаване на оптимални резултати при силно кръстосани или трудни FFPE тъкани. Използването на комплекта ще обърне кръстосаните връзки в тъканта, ще пермеабелизира клетъчната мембрана и ще разгради клетъчните протеини, за да улесни свързването на FISH сондите със специфичната клетъчна ДНК.

3 Инструкции за употреба

3.1 Спесимени

Този комплект за предварително третиране е специално разработен за получаване на оптимални резултати при силно кръстосани или трудни фиксирани във формалин и вградени в парафин тъкани (FFPE) (напр. по-дълга фиксация или продължително съхранение).

Предварителен анализ на спесимени: Предварителният анализ играе важна роля за получаването на успешна FISH. Спесименът трябва да се фиксира правилно и да се вгради в парафинов восък в съответствие с добре утвърден протокол. Прекомерната или недостатъчната фиксация може да доведе до неуспех на процедурата за FISH или поне до ниска възпроизводимост/нисък интензитет на сигнала. FISH сондите на Kreatech™ са тествани върху FFPE тъканни срези, които са изрязани на 3 – 6 µm. Блоковете от тъкани и предметните стъкла със срязвания трябва да се съхраняват в съответствие с препоръчителните условия за съхранение и работа за постигане на оптимални резултати, вижте уеб сайта на Leica. Изпичането може да се извърши или на BOND, като се използва протоколът *Bake and Dewax (изпичане и обезводняване), или отделно във фурна или инкубатор. Препоръчителната температура и време за изпичане е до 16 часа при 56°C или 60 – 120 минути при 80°C.

3.2 Предварително третиране

Поставете фиксирани във формалин и вградени в парафин тъканни срези от 3 – 6 µm върху положително заредени предметни стъкла (напр. aminoalkylsilane). Протоколът по-долу е за използване на 5 предметни стъкла в изправен коплинов буркан от 50 ml.

1. Изпечете поставените предметни стъкла за 2 часа при 80°C или за 16 часа при 56°C.

2. Депарафинизирайте топлите предметни стъкла, като ги накиснете в ксилен или заместители на ксилена за два пъти по 10 минути (мин.).
3. Рехидратируйте чрез накисване в 100%, 85% и 70% етанол за по 3 минути всеки път.
4. Измийте с dH₂O за 3 минути при стайна температура (СТ).
5. Третирайте предварително с 50 ml 0.2 M HCl (LK-099B) за 20 минути при стайна температура, след което измийте в dH₂O за 3 минути при стайна температура.
6. Поставете предметни стъкла в 50 ml Pretreatment Solution B (8% натриев тиоцианат) (LK-100B) при 80°C за 30 минути.
7. Изплакнете в 50 ml 2 x SSC (LK-104B) за 3 минути при стайна температура.
8. Покрийте парафиновия срез с приблизително 200 µl Pepsin Solution (LK-101B) и инкубирайте при стайна температура за 5 – 50 минути (Времето зависи от фиксацията на тъканта и вида на тъканта. Например повечето тъкани при рак на гърдата се нуждаят от дигестия от 5 – 15 минути; тъканите на дебелото черво от 20 – 30 минути).
9. Измийте в dH₂O за 1 минута.
10. Измийте в 50 ml от 2 x SSC (LK-104B) за 5 минути при стайна температура.
11. Дехидратируйте предметните стъкла, като ги накиснете в 70%, 85% и 100% етанол за по 1 минута всеки път. Изсушете с въздух. Продължете към **Подготвяне на сонда**.

3.3 Подготвяне на сонда:

FISH сондите на Kreotech™ за вградени в парафин тъканни се доставят готови за употреба (RtU), освен ако в документацията на продукта не е посочено друго. Вижте етикета на флакона и листовката на конкретната сонда за спецификите на разреждането.

3.4 Съвместна денатурация

Нанесете 10 µl от сондата на поле от 22 x 22 mm. Покрийте със стъклено покривно стъкло и запечатайте с Fixogum или гумен цимент. Денатурирайте пробата и сондата в ThermoBrite (TS-01/02) при 80 ± 1°C за 5 минути. Продължете към **Хибридизация**.

3.5 Хибридизация:

Инкубирайте през нощта при 37 ± 1°C в ThermoBrite (TS-01/02) или в овлажнена камера.

3.6 Измиване след хибридизация:

1. Загрейте предварително 50 ml от Wash Buffer I (0,4 x SSC / 0,3% Igepal) (LK-102) до 72°C
2. Премахнете гумения цимент.
3. Поставете предметни стъкла в 50 ml Wash Buffer II (2 x SSC / 0,1% Igepal) (LK-103), инкубирайте за 2 минути при стайна температура. Отстранете с приплъзване покривните стъкла. Можете да използвате повторно буфера за измиване само веднъж за общо 10 предметни стъкла.
4. Поставете предметните стъкла в 50 ml предварително загрят Wash Buffer I (0,4 x SSC / 0,3% Igepal) (LK-102), инкубирайте за 2 минути при 72°C (+/- 1°C) без разбъркване. Можете да използвате повторно буфера за измиване само веднъж за общо 10 предметни стъкла.
5. Поставете предметни стъкла в 50 ml нов Wash Buffer II (2 x SSC / 0,1% Igepal) (LK-103), инкубирайте за 1 минута при стайна температура без разбъркване. Можете да използвате повторно буфера за измиване само веднъж за общо 10 предметни стъкла.
6. Дехидратируйте в нов 70%, 85% и 100% етанол, инкубирайте за по 1 минута всеки път при стайна температура. Изсушете с въздух на стайна температура и продължете към **Контраоцветяване**.

3.7 Контраоцветяване

Нанесете 15 µl DAPI контраоцветител (DAPI/Antifade 1 µg/ml) (LK-096B) или разтвор на този контраоцветител с помощта на разрежител за контраоцветители (LK097B) и поставете стъклено покривно стъкло. Продължете към микроскопия.

3.8 Процедурни препоръки:

Проверете предварителното третиране и дигестията на протеините, като нанесете 15 µl DAPI контраоцветител, и оценете предметните стъкла с помощта на флуоресцентен микроскоп, снабден с DAPI филтър. Ако пробата не е достатъчно дигестирана: отстранете покривното стъкло и накиснете тъканта в 2 x SSC (LK-104B) за 2 минути и продължете дигестията на протеините. Ако пробата е прекалено дигестирана, използвайте нова проба и намалете времето за дигестиране на протеините.

Температурата и концентрацията на буфера (строгост) при хибридизацията и измиването са важни, тъй като по-ниска строгост може да доведе до неспецифично свързване на сондата с други последователности, а по-висока строгост може да доведе до липса на сигнал. Непълното денатуриране на прицелната ДНК може да доведе до липса на сигнал.

3.9 Препоръки за флуоресцентна микроскопия

За оптимална визуализация използвайте добре поддържан и редовно калибриран микроскоп, оборудван с живачна лампа от 100 W или друг подходящ източник на светлина (напр. метало-халогенна крушка (120 W X-cite) или светодиодни източници на светлина) и флуоресцентен обектив 63x или 100x. Тройните лентови филтри (DAPI/FITC/Сy3 или DAPI/FITC/TRITC) се използват за визуализиране на множество цветове, а единичните лентови филтри се използват за визуализиране на отделни цветове. Вижте уеб сайта на Leica за препоръки относно подходящите филтри за всяка марка микроскоп: <http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/kreatech-fish-probes/>

Подходящ обхват на възбуждане и емисия за флуорофори Kreatech™:

Флуорофор	Възбуждане	Емисия
DAPI	360 ±20 nm	460 ±30 nm
PlatinumBright™ 415	429 ±15 nm	470 ±15 nm
PlatinumBright™ 495	495 ±10 nm	517 ±10 nm
PlatinumBright™ 550	550 ±10 nm	580 ±10 nm

Показаната честотна лента съответства на 80% от максималното възбуждане/емисия на флуорофора)

4 Аналитично представяне

Ефективността на Tissue Digestion Kit II е установена с помощта на процедурите, описани в настоящата инструкция за употреба. Промените в тези процедури могат да доведат до промяна на резултатите от теста. Всякакви отклонения от инструктираните протоколи трябва да бъдат валидирани от потребителя. Потребителите, които се отклоняват от препоръчаните процедури за тестване, трябва да поемат отговорност за интерпретацията на резултатите на пациентите при тези обстоятелства. Времетраенето по протокол може да варира поради вариации във фиксацията и обработката. В допълнение инкубационното време на пепсина може да изисква оптимизация в зависимост от типа тъкан, условията за обработка и фиксация.

5 Необходими и доставени с продукта материали

Код #	Описание	Обем
LK-096B	DAPI/Antifade 1 µg/ml (DAPI Counterstain)	0,5 ml
LK-097B	Antifade (разредител за контраоцветители)	0,5 ml
LK-099B	0.2 M HCl	250 ml
LK-100B	8% натриев тиоцианат (Pretreatment Solution B)	250 ml
LK-101B	Pepsin Solution	5 ml
LK-102B*	0,4 x SSC / 0,3% Igepal (Wash Buffer I)	250 ml
LK-103B*	2 x SSC / 0,1% Igepal (Wash Buffer II)	2 x 250 ml
LK-104B	2 x SSC	2 x 250 ml

*Имайте предвид, че продуктите LK-102 и LK-103, съдържащи същия номер, но различни букви, са идентични с изключение на обема. A= 100 ml, B=250 ml

6 Необходими и недоставени с продукта материали

- Ксилен
- Етанол 100%, 85% и 70%
- Fixogum (LK-071A) или гумен цимент
- Гореща плоча с точен контрол на температурата до 80°C или ThermoBrite™ (TS01/TS02)
- Инкубатор с точен температурен диапазон от 37 – 56°C

- Водна баня с точен температурен диапазон от 37 – 80°C
- Пластмасови и стъклени коплинови буркани
- Микропипети с променлив обем (1 µl – 200 µl)
- Флуоресцентен микроскоп, снабден с подходящи филтри (вижте препоръките за флуоресцентна микроскопия).

7 Предупреждение и предпазни мерки

- Всеки сериозен инцидент, възникнал във връзка с изделието, се докладва на производителя и на компетентния орган на държавата членка, в която е установен потребителят и/или пациентът.
- За употреба при *in vitro* диагностика. Само за лабораторна професионална употреба. В случай на спешни случаи проверете листовите ИЛБ за информация относно безопасността.
- Комплектът е предназначен да се използва само преди и след FISH на ДНК върху FFPE тъкан. Този продукт не е предназначен за използване за замразена тъкан.
- Само за неавтоматизирано FISH предварително третиране и хибридизация.
- Всички материали трябва да се изхвърлят в съответствие с насоките на вашата институция за изхвърляне на болнични отпадъци.
- Използването на KBI-60007 Tissue Digestion Kit I се препоръчва за употреба при конвенционални FFPE проби.
- За метафазни и интерфазни клетки или други цитологични проби се препоръчва да се използва комплект за предварително третиране KBI-60005 или KBI-60006.

Етикетиране съгласно Регламент (ЕО) № 1272/2008

Код #	Описание	Сигнална дума	Пиктограма	Предупреждения за опасност
LK-096B	DAPI/Antifade 1 µg/ml (DAPI Counterstain)	Предупреждение		H315, H319, H335
LK-097B	Antifade (разредител за контраоцветители)	Предупреждение		H315, H319, H335
LK-099B	0.2 M HCl	Не е приложимо	Не е приложимо	Не е приложимо
LK-100B	8% натриев тиоцианат (Pretreatment Solution B)	Не е приложимо	Не е приложимо	Не е приложимо
LK-101B	Pepsin Solution	Не е приложимо	Не е приложимо	Не е приложимо
LK-102B	0,4 x SSC / 0,3% Igepal (Wash Buffer I)	Не е приложимо	Не е приложимо	Не е приложимо
LK-103B	2 x SSC / 0,1% Igepal (Wash Buffer II)	Не е приложимо	Не е приложимо	Не е приложимо
LK-104B	2 x SSC	Не е приложимо	Не е приложимо	Не е приложимо

Предупреждения за опасност

H315 – Предизвиква дразнене на кожата.

H319 – Предизвиква сериозно дразнене на очите.

H335 – Може да предизвика дразнене на дихателните пътища.

Препоръки за безопасност Превенция

P271 – Да се използва само на открито или на добре проветриво място.

P261 – Избягвайте вдишване на дим/изпарения/аерозоли.

P264 – Да се измият всички изложени външни части на тялото старателно след употреба.

P280 – Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице.

Препоръки за безопасност Реакция

P305+P351+P338 ПРИ – ПРИ КОНТАКТ С ОЧИТЕ: Промивайте внимателно с вода в продължение на няколко минути. Свалете контактните лещи, ако има такива и доколкото това е възможно.

Продължете с изплакването.

R312 – При неразположение се обадете в ЦЕНТЪР ПО ТОКСИКОЛОГИЯ или на лекар.
 R337+R313 – При продължително дразнене на очите: Потърсете медицински съвет/помощ.
 R302+R352 – ПРИ КОНТАКТ С КОЖАТА: Измийте обилно със сапун и вода.
 R304+R340 – ПРИ ВДИШВАНЕ: Изведете лицето на чист въздух и го поставете в позиция, улесняваща дишането.
 R332+R313 – При поява на кожно дразнене: Потърсете медицински съвет/помощ.
 R362+R364 – Свалете замърсеното облекло и го изперете преди повторна употреба.

Допълнителни предупреждения за опасност: няма
 Само за професионална употреба в лаборатории

Обяснение на символите

	Съдържа опасни вещества
	Държава на производство
	Да не се използва, ако целостта на опаковката е нарушена
	Консултирайте се с електронните ИЗУ (еИЗУ)

8 Съхранение и обработка на реагент

Защитете DAPI/Antifade от силна и директна светлина. Да се съхранява при температура 2 – 8°C. Неотвореният продукт е стабилен при тези условия до изтичане на срока на годност, указан на етикета на флакона.

Разредените и неразредените реагенти да се върнат на температура 2 – 8°C веднага след употреба. След отваряне продуктите са стабилни до 18 месеца, но никога по-дълго от срока на годност на всеки отделен продукт. След изтичането на този период от време използването на разтворите може да доведе до неоптимални резултати.

9 Техническа поддръжка

Техническата поддръжка е на разположение на адрес www.leicabiosystems.com или чрез имейл: Kreatech.Support@Leicabiosystems.com. Свържете се с нас, ако не получите желаните резултати или се появят аномалии при използването на този продукт.

Хартиено печатно копие на ИЗУ може да бъде поискано по имейл, като се свържете с: LBSAMS-IFU@leicabiosystems.com



Можете да изтеглите еИЗУ на различни езици от: www.leicabiosystems.com

10 Обслужване на клиенти

Сондите Kreatech могат да се поръчат през отдела за обслужване на клиенти на Leica +31 20 6919181 или по имейл: purchase.orders@leica-microsystems.com.

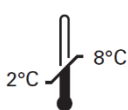
11 Хронология

Версия на ИЗУ	Дата на издаване	Промени
2,4	2016-SEP-27	Премахване на етикета „Доставчик на решения за лабораторна диагностика“
3,0	Април 2022 г.	Актуализация съгласно регламентите за in vitro диагностика

Tissue Digestion Kit II

REF KBI-60004

Obsahuje dostatečný objem až pro 25 nebo 5x5 testů



Kreatech Biotechnology B.V.
Vlierweg 20
1032 LG Amsterdam
Nizozemsko
www.LeicaBiosystems.com



1 Zamýšlené použití / účel

Fluorescenční in situ hybridizace (FISH) identifikuje nebo označuje cílové genomové sekvence, aby bylo možné studovat jejich umístění. Sekvence DNA z příslušných chromozomově specifických sond se nejprve označí reportérovými molekulami. Označená DNA sonda se pak hybridizuje na metafázní chromozomy nebo interfázní jádra na sklíčku. Po promytí se ve vzorku zjistí přítomnost reportérových molekul pomocí fluorescenční mikroskopie.

Tato souprava pro předběžnou úpravu je speciálně vyvinuta pro získání optimálních výsledků u silně zesíťovaných nebo obtížných formalínem fixovaných tkání zalitých v parafinu (FFPE) (např. delší fixace nebo delší skladování).

Tento produkt je určen pouze pro diagnostické použití in vitro.

2 Popis produktu

Tato souprava pro předběžnou úpravu je určena pro neautomatizované hybridizace FISH a byla speciálně vyvinuta pro předběžnou úpravu a enzymovou digesti FFPE před hybridizačním postupem DNA FISH. Tato souprava je speciálně vyvinuta pro dosažení optimálních výsledků u silně zesíťovaných nebo obtížných tkání FFPE. Použití soupravy zruší zesíťování ve tkáni, permeabilizuje buněčnou membránu a štěpí buněčné proteiny, aby usnadnilo vazbu sond FISH se specifickou buněčnou DNA.

3 Návod k použití

3.1 Vzorky

Tato souprava pro předběžnou úpravu je speciálně vyvinuta pro získání optimálních výsledků u silně zesíťovaných nebo obtížných formalínem fixovaných tkání zalitých v parafinu (FFPE) (např. delší fixace nebo delší skladování). Zpracování vzorků před analýzou: Pro dosažení optimálních výsledků FISH hraje velkou roli zpracování vzorků před analýzou. Vzorek by měl být správně fixován a zalit do parafínového vosku podle dobře zavedeného protokolu. Přílišná nebo nedostatečná fixace může způsobit selhání postupu FISH nebo přinejmenším nízkou reprodukovatelnost/intenzitu signálu. FISH sondy Kreatech™ byly testovány na tkáňových řezech FFPE o velikosti 3–6 µm. Pro dosažení optimálních výsledků by se měly tkáňové bločky a sklíčka s řezy skladovat v souladu s doporučenými podmínkami skladování a manipulace, viz webové stránky společnosti Leica. Zapékání lze provádět buď na zařízení BOND pomocí protokolu *Zapékání a odparafinování, nebo samostatně v troubě či inkubátoru. Doporučená teplota a doba zapékání je až 16 hodin při 56 °C nebo 60–120 minut při 80 °C.

3.2 Předběžná úprava

Namontujte 3–6 µm řezy tkáně zalité v parafinu fixované formalínem na pozitivně nabitá sklíčka (např. s aminoalkylsilanem). Níže uvedený protokol je určen pro použití 5 sklíček ve svislé Coplinově nádobce o objemu 50 ml.

1. Pečte namontovaná sklíčka 2 hodiny při 80 °C nebo 16 hodin při 56 °C.
2. Teplá sklíčka odparafinujte ponořením do xylenu nebo náhrady xylenu na dvakrát 10 minut (min).
3. Znovu hydratujte ponořením do 100%, 85% a 70% etanolu vždy na 3 min.
4. Promývejte dH2O po dobu 3 minut při pokojové teplotě (room temperature, RT).
5. Předběžně upravte pomocí 50 ml 0,2M HCl (LK-099B) po dobu 20 min při RT a potom promývejte v dH2O po dobu 3 min při RT.
6. Vložte sklíčka do 50 ml roztoku B pro předběžnou úpravu (8% thiokyanatanu sodného) (LK-100B) při teplotě 80 °C na 30 min.

7. Opláchněte je v 50 ml 2 x SSC (LK-104B) po dobu 3 min při RT.
8. Pokryjte parafínový řez přibližně 200 µl roztoku pepsinu (LK-101B) a inkubujte při RT po dobu 5–50 min (doba závisí na fixaci tkáně a typu tkáně). Např. většina tkání rakoviny prsu potřebuje 5–15 minut digesce; tkáň tlustého střeva 20–30 minut).
9. Promývejte v dH₂O po dobu 1 min.
10. Promývejte v 50 ml 2 x SSC (LK-104B) po dobu 5 min při RT.
11. Odvodněte sklíčka namočením do 70%, 85% a 100% etanolu vždy na 1 minutu. Vysušte na vzduchu. Pokračujte **přípravou sondy**.

3.3 Příprava sondy:

Sondy FISH Kreatech™ pro tkáně zalité v parafínu se dodávají připravené k použití (Ready to Use, RtU), pokud není v dokumentaci produktu uvedeno jinak. Specifika ředění najdete na štítku na lahvičce a v příbalovém letáku konkrétní sondy.

3.4 Společná denaturace

Aplikujte 10 µl sondy na pole 22 x 22 mm. Zakryjte krycím sklíčkem a utěsněte Fixogumem nebo gumovým cementem. Denaturujte vzorek a sondu na ThermoBrite (TS-01/02) při 80 ± 1 °C po dobu 5 min. Pokračujte **hybridizací**.

3.5 Hybridizace:

Inkubujte přes noc při 37 ± 1 °C v ThermoBrite (TS-01/02) nebo ve vlhké komůrce.

3.6 Promývání po hybridizaci:

1. Předehřejte 50 ml promývacího pufru I (0,4 x SSC / 0,3% Igepal) (LK-102) při 72 °C.
2. Odstraňte gumový cement.
3. Vložte sklíčka do 50 ml promývacího pufru II (2 x SSC / 0,1% Igepal) (LK-103), inkubujte 2 min. při RT. Sundejte krycí sklíčka. Promývací pufr použijte opakovaně pouze jednou pro celkem 10 sklíček.
4. Vložte sklíčka do 50 ml promývacího pufru I (0,4 x SSC / 0,3% Igepal) (LK-102), inkubujte 2 min. při 72 °C (± 1 °C) bez míchání. Promývací pufr použijte opakovaně pouze jednou pro celkem 10 sklíček.
5. Vložte sklíčka do 50 ml promývacího pufru II (2 x SSC / 0,1% Igepal) (LK-103), inkubujte 1 min. při RT bez míchání. Promývací pufr použijte opakovaně pouze jednou pro celkem 10 sklíček.
6. Odvodněte v čerstvém 70%, 85% a 100% etanolu, inkubujte vždy 1 min při RT. Vysušte na vzduchu a pokračujte na **Kontrastní barvení**

3.7 Kontrastní barvení:

Aplikujte 15 µl kontrastního barviva DAPI (DAPI/Antifade 1 µg/ml) (LK-096B) nebo jeho ředění pomocí ředícího roztoku kontrastního barviva (LK097B) a přiložte krycí sklíčko. Pokračujte mikroskopováním.

3.8 Doporučení k postupu:

Zkontrolujte digesci proteinů a předběžnou úpravu aplikací 15 µl kontrastního barviva DAPI a vyhodnoťte preparáty pomocí fluorescenčního mikroskopu vybaveného filtrem DAPI. Pokud digesce vzorku není dostatečná: odstraňte krycí sklíčko a ponořte tkáň do 2 x SSC (LK-104B) na 2 min a digesci proteinů prodlužte. Pokud je digesce vzorku nadměrná, použijte čerstvý vzorek a dobu digesce proteinů zkratzte.

Teplota a koncentrace pufru (stringence) při hybridizaci a promývání jsou důležité, protože nižší stringence může vést k nespecifické vazbě sondy na jiné sekvence a vyšší stringence může mít za následek nedostatek signálu. Neúplná denaturace cílové DNA může mít za následek nedostatek signálu.

3.9 Doporučení pro fluorescenční mikroskopii

Pro optimální vizualizaci použijte dobře udržovaný a pravidelně kalibrovaný mikroskop vybavený 100W rtuťovou lampou nebo jiným vhodným zdrojem světla (např. metalhalogenidovou žárovkou (120W X-cite) nebo zdroji světla na bázi LED) a fluorescenčním objektivem 63x nebo 100x. Pro zobrazení více barev se používají třípásmové filtry (DAPI/FITC/Cy3 nebo DAPI/FITC/TRITC), pro vizualizaci jednotlivých barev se používají jednopásmové filtry. Doporučení vhodných filtrů pro jednotlivé značky mikroskopů najdete na webových stránkách společnosti Leica: <http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/kreatech-fish-probes/>.

Vhodný rozsah excitace a emise pro fluorofory Kreatech™:

Fluorofor	Excitace	Emise
DAPI	360 ± 20 nm	460 ± 30 nm
PlatinumBright™ 415	429 ± 15 nm	470 ± 15 nm
PlatinumBright™ 495	495 ± 10 nm	517 ± 10 nm
PlatinumBright™ 550	550 ± 10 nm	580 ± 10 nm

Uvedená šířka pásma odpovídá 80 % maxima excitace/emise fluoroforu)

4 Analytická výkonnost

Výkonnost soupravy Tissue Digestion Kit II byla stanovena při použití postupů popsanych v tomto návodu k použití. Úpravy těchto postupů mohou výkonnost testu změnit. Jakékoli odchylky od uvedených protokolů musí být uživatelem validovány. Uživatelé, kteří se při vyšetření odchýlí od doporučeného postupu, musí za těchto okolností přijmout odpovědnost za interpretaci výsledků u pacienta. Doby uvedené v protokolu se mohou lišit kvůli odlišnému způsobu fixace a zpracování. Dále může být nutné optimalizovat dobu inkubace pepsinu v závislosti na zpracování a podmínkách fixace.

5 Materiály, které jsou nezbytné a jsou dodávány s produktem

Kód č.	Popis	Objem
LK-096B	DAPI/Antifade 1 µg/ml (Kontrastní barvivo DAPI)	0,5 ml
LK-097B	Antifade (Ředící roztok kontrastního barviva)	0,5 ml
LK-099B	0,2M HCl	250 ml
LK-100B	8% thiokyanatan sodný Roztok B pro předběžnou úpravu	250 ml
LK-101B	Roztok pepsinu	5 ml
LK-102B*	0,4 x SSC / 0,3% Igepal (Promývací pufr I)	250 ml
LK-103B*	2 x SSC / 0,1% Igepal (Promývací pufr II)	2 x 250 ml
LK-104B	2 x SSC	2 x 250 ml

*Upozorňujeme, že výrobky LK-102 a LK-103 obsahující stejné číslo, ale různá písmena, jsou identické kromě objemu. A = 100 ml, B = 250 ml

6 Materiály, které jsou nezbytné a nejsou dodávány s produktem

- Xylen
- Etanol 100%, 85% a 70%
- Fixogum (LK-071A) nebo gumový cement
- Horká deska s přesnou regulací teploty až do 80 °C nebo ThermoBrite™ (TS01/TS02)
- Inkubátor s přesným rozsahem teplot 37–56 °C
- Vodní lázeň s přesným rozsahem teplot 37–80 °C
- Plastové a skleněné Coplinovy nádoby
- Různé druhy mikropipet (1 µl – 200 µl)
- Fluorescenční mikroskop vybavený vhodnými filtry (viz doporučení pro fluorescenční mikroskopii).

7 Varování a bezpečnostní opatření

- Každá závažná událost, ke které došlo v souvislosti s tímto prostředkem, má být oznámena výrobcí a příslušnému orgánu členskému státu, v němž je uživatel a/nebo pacient vedený.
- Pro diagnostické použití in vitro. Jen pro profesionální použití v laboratoři. V případě nouze projděte bezpečnostní informace v listech SDS.
- Souprava je zamýšlena k použití pouze před a po DNA FISH na tkáni FFPE. Tento produkt není určen k použití u zmrazené tkáně.
- Pouze pro neautomatizovanou předběžnou úpravu FISH a hybridizaci.
- Všechny materiály by měly být zlikvidovány v souladu s předpisy vaší instituce pro likvidaci nemocničního odpadu.
- Pro použití s běžnými vzorky FFPE se doporučuje použít soupravu KBI-60007 Tissue Digestion Kit I.

- Pro metafázni a interfázni buňky nebo jiné cytologické vzorky se doporučuje použít soupravu pro předběžnou úpravu KBI-60005 nebo KBI-60006.

Označení podle nařízení (ES) č. 1272/2008

Kód č.	Popis	Signální slovo	Piktogram	Standardní věty o nebezpečnosti
LK-096B	DAPI/Antifade 1 µg/ml (Kontrastní barvivo DAPI)	Varování		H315, H319, H335
LK-097B	Antifade (Ředící roztok kontrastního barviva)	Varování		H315, H319, H335
LK-099B	0,2M HCl	Neuvádí se	Neuvádí se	Neuvádí se
LK-100B	8% thiokyanatan sodný Roztok B pro předběžnou úpravu	Neuvádí se	Neuvádí se	Neuvádí se
LK-101B	Roztok pepsinu	Neuvádí se	Neuvádí se	Neuvádí se
LK-102B	0,4 x SSC / 0,3% Igepal (Promývací pufr I)	Neuvádí se	Neuvádí se	Neuvádí se
LK-103B	2 x SSC / 0,1% Igepal (Promývací pufr II)	Neuvádí se	Neuvádí se	Neuvádí se
LK-104B	2 x SSC	Neuvádí se	Neuvádí se	Neuvádí se

Standardní věta (věty) o nebezpečnosti

H315 – Dráždí kůži.

H319 – Způsobuje vážné podráždění očí.

H335 – Může způsobit podráždění dýchacích cest

Pokyny pro bezpečné zacházení

P271 – Používejte pouze venku nebo v dobře větraných prostorách.

P261 – Zamezte vdechování mlhy/par/aerosolu.

P264 – Po manipulaci důkladně omyjte všechny odkryté vnější části těla.

P280 – Používejte ochranné rukavice, ochranný oděv, ochranné brýle a obličejový štít.

Pokyny pro bezpečné zacházení – reakce

P305+P351+P338 – PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně oplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování.

P312 – Necítíte-li se dobře, volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO/lékaře/první pomoc.

P337+P313 – Přetrvává-li podráždění očí: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.

P302+P352 – PŘI STYKU S KŮŽÍ: Omyjte velkým množstvím vody a mýdla.

P304+P340 – PŘI VDECHNUTÍ: Přeneste osobu na čerstvý vzduch a ponechte ji v poloze usnadňující dýchání.

P332+P313 – Při podráždění kůže: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.

P362+ P364 – Kontaminovaný oděv svlékněte a před opětovným použitím vyperte.

Dodatečné standardní věty o nebezpečnosti: žádné

Omezeno na profesionální uživatele v laboratoři

Vysvětlení symbolů

	Obsahuje nebezpečné látky
	Země výroby
	Nepoužívejte, pokud je obal poškozený
	Nahlédněte do elektronického IfU (elfU)

8 Skladování reagensů a manipulace s nimi

Chraňte DAPI/Antifadepřed silným a přímým světlem. Uchovávejte při teplotě 2 – 8 °C. Neotevřený produkt je za těchto podmínek stabilní až do data expirace uvedeného na štítku lahvičky.

Okamžitě po použití vraťte nenařazené i nařazené reagensie do prostředí s teplotou 2– 8 °C.

Po otevření jsou produkty stabilní po dobu až 18 měsíců, nikdy však déle, než je datum expirace jednotlivých produktů. Po uplynutí této doby může použití roztoků vést k neoptimálním výsledkům.

9 Technická podpora

Technická podpora je k dispozici na www.leicabiosystems.com nebo prostřednictvím e-mailu: Kreatech.Support@Leicabiosystems.com. Pokud se při používání tohoto produktu nedostaví požadované výsledky nebo se objeví jakékoli anomálie, kontaktujte nás.

Tištěnou verzi IfU si můžete vyžádat e-mailem na adrese: LBSAMS-IFU@leicabiosystems.com



elfU je k dispozici v dalších jazycích, které si můžete stáhnout ze stránek: www.leicabiosystems.com

10 Zákaznický servis

Sondy Kreatech lze objednat prostřednictvím zákaznického servisu Leica +31 20 6919181 nebo e-mailem: purchase.orders@leica-microsystems.com.

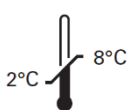
11 Historie

Verze IfU	Datum vydání	Změny
2,4	2016-SEP-27	Odstranění sloganu „Společnost pro patologii“
3,0	duben 2022	Aktualizace podle předpisů pro IVD

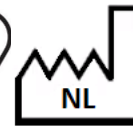
Tissue Digestion Kit II

REF KBI-60004

Indeholder tilstrækkelig volumen til op til 25 eller 5x5 tests



Kreatech Biotechnology B.V.
Vlierweg 20
1032 LG Amsterdam
Holland
www.LeicaBiosystems.com



1 Tiltænkt brug/formål

Fluorescerende in situ-hybridisering (FISH) identificerer eller mærker genomiske målsekvenser, så deres placering kan studeres. DNA-sekvenser fra passende kromosomspecifikke sonder mærkes først med reporter-molekyler. Den mærkede DNA-sonde hybridiseres derefter til metafasekromosomerne eller interfasekernerne på et objektglas. Efter vask screenes prøven for reporter-molekylerne ved fluorescensmikroskopi.

Dette forbehandlingskit er specielt udviklet til at opnå optimale resultater på stærkt tværbundne eller vanskelige formalinfikserede paraffinindlejrede væv (FFPE) (f.eks. længere fiksering eller længere tids opbevaring).

Dette produkt er beregnet til in vitro-diagnostisk anvendelse.

2 Produktbeskrivelse

Dette forbehandlingskit er til ikke-automatiserede FISH-hybridiseringer, der er specielt udviklet til brug til forbehandling og enzymfordøjelse af FFPE før DNA FISH-hybridiseringsproceduren. Dette kit er specielt udviklet til at opnå optimale resultater på stærkt tværbundne eller vanskelige FFPE-væv. Brugen af kittet vil vende tværbindingerne om i vævet, permeabilisere cellemembranen og fordøje celleproteiner for at lette bindingen af FISH-sonderne med det specifikke celle-DNA.

3 Brugsanvisning

3.1 Prøver

Dette forbehandlingskit er specielt udviklet til at opnå optimale resultater på stærkt tværbundne eller vanskelige formalinfikserede paraffinindlejrede væv (FFPE) (f.eks. længere fiksering eller længere tids opbevaring).

Præanalyse af prøver: For at opnå en vellykket FISH spiller præanalysen en stor rolle. Prøven skal være korrekt fikseret og indlejret i paraffinvoks i henhold til en veletableret protokol. Overfiksering eller underfiksering kan forårsage fejl i FISH-proceduren eller i det mindste lav reproducerbarhed/signalintensitet. Kreatech™ FISH-sonder er blevet testet på FFPE-vævssnit, som blev skåret ved 3-6 µm. Vævsblokke og afskårne objektglas bør opbevares i overensstemmelse med de anbefalede opbevarings- og håndteringsforhold for optimale resultater. Se Leicas website. Bagning kan foretages enten på BOND ved hjælp af *Bage og afvoksningsprotokollen eller separat i en ovn eller inkubator. Anbefalet bagetemperatur og -tid er op til 16 timer ved 56 °C eller 60-120 minutter ved 80 °C.

3.2 Forbehandling

Monter 3-6 µm formalinfikserede paraffinindlejrede vævssnit på positivt ladede objektglas (f.eks. aminoalkylsilan). Protokol nedenfor er til brug af 5 objektglas i en opretstående coplin-skål på 50 ml.

1. Bag monterede objektglas i 2 timer ved 80 °C eller 16 timer ved 56 °C.
2. Afparaffiniser varme objektglas ved at lægge dem i blød i xylene eller xylenestatning i to gange 10 minutter (min.).
3. Hydrér igen ved at opløde i 100 %, 85 % og 70 % ethanol i 3 minutter hver.
4. Vask med dH₂O i 3 minutter ved rumtemperatur (RT).
5. Forbehandl med 50 ml 0,2 M HCl (LK-099B) i 20 minutter ved rumtemperatur, og vask derefter i dH₂O i 3 minutter ved rumtemperatur.
6. Placer objektglassene i 50 ml forbehandlingsopløsning B (8 % natriumthiocyanat) (LK-100B) ved 80 °C i 30 min.
7. Vask i 50 ml 2 x SSC (LK-104B) i 3 minutter ved rumtemperatur.

8. Dæk paraffinafsnittet med ca. 200 µl pepsinopløsning (LK-101B) og inkubér ved rumtemperatur i 5-50 minutter (tiden afhænger af vævsfiksering og vævstype. For eksempel har det meste brystkræftvæv brug for 5-15 min fordøjelse og tyktarmsvæv 20-30 min).
9. Vask i dH₂O i 1 min.
10. Vask i 50 ml 2 x SSC (LK-104B) i 5 minutter ved rumtemperatur.
11. Dehydrer objektglassene ved at lægge dem i 70 %, 85 % og 100 % ethanol i hver 1 minut. Lufttør. Fortsæt med **klargøring af sonden**.

3.3 Forberedelse af sonde:

Kreatech™ FISH-sonder til paraffinindlejret væv leveres klar til brug, medmindre andet er angivet i produktokumentationen. Se mærket på hætteglasset og indlægssedlen til den specifikke sonde for fortyndingsspecifikationer.

3.4 Co-denaturering

Påfør 10 µl sonde pr. 22 x 22 mm felt. Dæk med glasdæksel og forsegl med Fixogum eller gummiment. Denaturer prøve og sonde på en ThermoBrite (TS-01/02) ved 80 ± 1 °C i 5 min. Fortsæt med **hybridisering**.

3.5 Hybridisering:

Inkubér natten over at 37 ± 1 °C i en ThermoBrite (TS-01/02) eller i et befugtet kammer.

3.6 Post-hybridiseringsvask:

1. Forvarm 50 ml vaskebuffer I (0,4 x SSC/0,3 % Igpal) (LK-102) til 72 °C
2. Fjern gummiment.
3. Placer objektglassene i 50 ml vaskebuffer II (2 x SSC / 0,1 % Igpal) (LK-103), inkubér i 2 min. ved rumtemperatur. Træk dækglasset af. Genbrug kun vaskebufferen én gang til i alt 10 objektglas.
4. Placer objektglassene i 50 ml forvarmet vaskebuffer I (0,4 x SSC / 0,3 % Igpal) (LK-102), inkubér i 2 minutter ved 72 °C (+/- 1 °C) uden omrøring. Genbrug kun vaskebufferen én gang til i alt 10 objektglas.
5. Placer objektglassene i 50 ml frisk vaskebuffer II (2 x SSC / 0,1 % Igpal) (LK-103), inkubér i 1 min. ved rumtemperatur uden omrøring. Genbrug kun vaskebufferen én gang til i alt 10 objektglas.
6. Dehydrer i frisk 70 %, 85 % og 100 % ethanol, inkubér i hver 1 min. ved rumtemperatur. Lufttør ved rumtemperatur, og fortsæt til **Kontrastfarvning**.

3.7 Kontrastfarvning:

Påfør 15 µl DAPI-kontrastfarvning (DAPI/antifade 1 µg/ml) (LK-096B) eller en fortynding af denne med kontrastfarvningsfortynder (LK097B), og sæt glasdækslet på. Fortsæt med mikroskopi.

3.8 Proceduremæssige anbefalinger:

Kontrollér proteinfordøjelse og forbehandling ved at påføre 15 µl DAPI-kontrastfarvning og evaluer objektglas ved hjælp af et fluorescensmikroskop udstyret med et DAPI-filter. Hvis prøven ikke er tilstrækkeligt fordøjet: Fjern dækglasset, og læg vævet i blød i 2 x SSC (LK-104B) i 2 minutter, og forlæng proteinfordøjelsen. Brug en frisk prøve, hvis prøven er overfordøjet, og reducer proteinfordøjelsestiden.

Temperatur og bufferkoncentration (stringens) af hybridisering og vask er vigtige, da lavere stringens kan resultere i ikke-specifik binding af sonden til andre sekvenser, og højere stringens kan resultere i mangel på signal. Ufuldstændig denaturering af mål-DNA kan resultere i mangel på signal.

3.9 Anbefalinger til fluorescensmikroskopi

For optimal visualisering skal der anvendes et velholdt og regelmæssigt kalibreret mikroskop udstyret med en 100W kviksløvlampe eller anden passende lyskilde (f.eks. metalhalogenpære (120W X-cite) eller LED-baserede lyskilder) og et 63x eller 100x fluorescensobjektiv. Tredobbelte båndpasfiltre (DAPI/FITC/Cy3 eller DAPI/FITC/TRITC) bruges til at se flere farver. Enkelt båndpasfiltre bruges til individuel farvevisualisering. Se Leicas website for anbefalinger om passende filtre til hvert mikroskopmærke: <http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/kreatech-fish-probes/>

Egnet excitations- og emissionsområde for Kreatech™-fluoroforer:

Fluorofor	Excitation	Emission
DAPI	360 ±20 nm	460 ±30 nm
PlatinumBright™ 415	429 ±15 nm	470 ±15 nm
PlatinumBright™ 495	495 ±10 nm	517 ±10 nm
PlatinumBright™ 550	550 ±10 nm	580 ±10 nm

Den viste båndbredde svarer til 80 % af maksimum excitation/emission af fluorofor)

4 Analytiske resultater

Ydeevnen af Tissue Digestion Kit II er blevet fastslået ved hjælp af procedurerne beskrevet i denne brugsanvisning. Ændringer af disse procedurer kan ændre udførelsen af analysen. Eventuelle afvigelser fra de instruerede protokoller skal valideres af brugeren. Brugere, som afviger fra anbefalede testprocedurer, må selv tage ansvaret for tolkningen af patientresultater under disse betingelser. Protokoltider kan variere på grund af variation i fiksering og behandling. Derudover kan pepsin-inkubationstid kræve optimering afhængigt af behandlings- og fikseringsbetingelser.

5 Nødvendige materialer, der leveres med produktet

Kodenr.	Beskrivelse	Volumen
LK-096B	DAPI/antifade 1 µg/ml (DAPI-kontrastfarvning)	0,5 ml
LK-097B	Antifade (Kontrastfarvningsfortynder)	0,5 ml
LK-099B	0,2 M HCl	250 ml
LK-100B	8 % natriumthiocyanat (Forbehandlingsopløsning B)	250 ml
LK-101B	Pepsinopløsning	5 ml
LK-102B*	0,4 x SSC / 0,3 % Igepal (Vaskebuffer I)	250 ml
LK-103B*	2 x SSC/0,1 % Igepal (Vaskebuffer II)	2 x 250 ml
LK-104B	2 x SSC	2 x 250 ml

*Bemærk, at LK-102- og LK-103-produkter, der indeholder samme tal, men forskellige bogstaver er identiske bortset fra volumen. A = 100 ml, B = 250 ml

6 Nødvendige materialer, der ikke leveres med produktet

- Xylen
- Ethanol 100 %, 85 % og 70 %
- Fixogum (LK-071A) eller gummiment
- Varmeplade med nøjagtig temperaturstyring op til 80 °C eller ThermoBrite™ (TS01/TS02)
- Inkubator med nøjagtigt temperaturområde på 37-56 °C
- Vandbad med nøjagtigt temperaturområde på 37-80 °C
- Coplin-skåle af glas og plastik
- Variable mikropipetter (1 µl - 200 µl)
- Fluorescensmikroskop udstyret med passende filtre (se anbefalinger for fluorescensmikroskopi).

7 Advarsel og forholdsregler

- Enhver alvorlig hændelse, der er opstået i forbindelse med udstyret, skal rapporteres til fabrikanten og den kompetente myndighed i den medlemsstat, hvor brugeren og/eller patienten er etableret.
- Til in vitro-diagnostisk anvendelse. Kun til professionel laboratoriebrug. I nødstilfælde skal du kontrollere sikkerhedsdatabladene for sikkerhedsinformation.
- Kittet er beregnet til kun at blive brugt før og efter DNA FISH på FFPE-væv. Dette produkt er ikke beregnet til brug på frosset væv.
- Kun til ikke-automatiseret FISH-forbehandling og hybridisering.
- Alle materialer skal bortskaffes i henhold til din institutions retningslinjer for bortskaffelse af hospitalsaffald.
- Brugen af KBI-60007 Tissue Digestion Kit I anbefales til brug med konventionelle FFPE-prøver.

- Til metafase- og interfaseceller eller andre cytologiske prøver anbefales det at bruge forbehandlingskit KBI-60005 eller KBI-60006.

Mærkning i henhold til forordning (EF) nr. 1272/2008

Kodenr.	Beskrivelse	Signalord	Piktogram	Faresætninger
LK-096B	DAPI/antifade 1 µg/ml (DAPI-kontrastfarvning)	Advarsel		H315, H319, H335
LK-097B	Antifade (Kontrastfarvningsfortynder)	Advarsel		H315, H319, H335
LK-099B	0,2 M HCl	Ikke relevant	Ikke relevant	Ikke relevant
LK-100B	8 % natriumthiocyanat (Forbehandlingsopløsning B)	Ikke relevant	Ikke relevant	Ikke relevant
LK-101B	Pepsinopløsning	Ikke relevant	Ikke relevant	Ikke relevant
LK-102B	0,4 x SSC / 0,3 % Igepal (Vaskebuffer I)	Ikke relevant	Ikke relevant	Ikke relevant
LK-103B	2 x SSC/0,1 % Igepal (Vaskebuffer II)	Ikke relevant	Ikke relevant	Ikke relevant
LK-104B	2 x SSC	Ikke relevant	Ikke relevant	Ikke relevant

Faresætning(er)

H315 – Forårsager hudirritation.

H319 – Forårsager alvorlig øjenirritation.

H335 – Kan forårsage irritation af luftvejene

Sikkerhedssætning(er) – forebyggelse

P271 – Brug kun udendørs eller i et rum med god udluftning.

P261 – Undgå indånding af tåge/dampe/spray.

P264 – Vask alle udsatte ydre kropsdele grundigt efter håndtering.

P280 – Bær beskyttelseshandsker, beskyttelsestøj, øjen- og ansigtsbeskyttelse.

Sikkerhedssætning(er) – respons

P305+P351+P338 – VED KONTAKT MED ØJNENE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis dette kan gøres let. Fortsæt skylning.

P312 – Ring til en GIFTINFORMATION/læge/skadestue, hvis du føler dig utilpas.

P337+P313 – Ved vedvarende øjenirritation: Søg lægehjælp/-behandling.

P302+P352 – VED KONTAKT MED HUDEN: Vask med rigeligt vand og sæbe.

P304+P340 – VED INDÅNDING:: Flyt personen til et sted med frisk luft og sørg for, at vejtrækningen lettes.

P332+P313 – Ved hudirritation: Søg lægehjælp/-behandling.

P362+P364 – Alt tilsmudset tøj tages af og vaskes inden genanvendelse.

Supplerende faresætninger: ingen

Begrænset til professionelle laboratoriebrugere

Symbolforklaring

	Indeholder farlige stoffer
	Fremstillingsland
	Må ikke anvendes, hvis emballagen er beskadiget
	Se den elektroniske brugsanvisning

8 Opbevaring og håndtering af reagenser

Beskyt DAPI/Antifade mod stærkt og direkte lys. Opbevares ved 2-8 °C. Det uåbnede produkt er stabilt under disse forhold op til den udløbsdato, der er angivet på hætteglassets mærke.

Returner ufortyndede og fortyndede reagenser til 2-8 °C umiddelbart efter brug.

Efter åbning er produkter stabile i op til 18 måneder, men aldrig længere end udløbsdatoen for hvert enkelt produkt. Brugen af opløsningerne udover denne tidsperiode kan resultere i suboptimale resultater.

9 Teknisk support

Teknisk support er tilgængelig på www.leicabiosystems.com eller via e-mail: Kreatech.Support@Leicabiosystems.com. Kontakt os, hvis de ønskede resultater ikke opnås, eller hvis der opstår uregelmæssigheder i forbindelse med brug af dette produkt.

En papirtrykt kopi af brugsanvisningen kan rekvireres via e-mail ved at kontakte: LBSAMS-IFU@leicabiosystems.com



Den elektroniske brugsanvisning er tilgængelig på yderligere sprog, der kan downloades fra: www.leicabiosystems.com

10 Kundeservice

Kreatech-sonder kan bestilles gennem Leica kundeservice +31 20 6919181 eller bestilles via e-mail: purchase.orders@leica-microsystems.com.

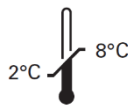
11 Historik

Brugsanvisningsversion	Udstedelsesdato	Ændringer
2,4	2016-SEP-27	Fjern sloganet "The pathology Company"
3,0	April 2022	Opdatering i henhold til IVD-regler

Tissue Digestion Kit II

REF KBI-60004

Volumen ausreichend für bis zu 25 oder 5 x 5 Tests



Kreatech Biotechnology B.V.
Vlierweg 20
1032 LG Amsterdam
Niederlande
www.LeicaBiosystems.com



1 Verwendungszweck

Die Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) identifiziert oder markiert Zielgenomsequenzen, sodass deren Position untersucht werden kann. Zunächst werden DNA-Sequenzen aus entsprechenden chromosomspezifischen Sonden mit Reportermolekülen markiert. Die markierte DNA-Sonde wird dann auf die Metaphasenchromosomen oder Interphasenkerne auf einem Objektträger hybridisiert. Nach dem Waschen wird die Probe mittels Fluoreszenzmikroskopie auf die Reportermoleküle untersucht.

Dieses Vorbehandlungskit wurde speziell entwickelt, um optimale Ergebnisse für stark quervernetztes oder schwieriges formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe (FFPE) zu erhalten (z. B. bei längerer Fixierung oder Lagerung).

Dieses Produkt ist für die In-vitro-Diagnostik bestimmt.

2 Produktbeschreibung

Dieses Vorbehandlungskit ist für nicht-automatisierte FISH-Hybridisierungen bestimmt und wurde speziell zur Verwendung für die Vorbehandlung und Enzymandauung von FFPE vor dem DNA-FISH-Hybridisierungsverfahren entwickelt. Dieses Kit wurde speziell entwickelt, um optimale Ergebnisse für stark quervernetztes oder schwieriges FFPE-Gewebe zu erhalten. Die Verwendung des Kits bewirkt eine Aufhebung der Quervernetzungen im Gewebe, eine Durchlässigkeit der Zellmembran und eine Andauung der Zellproteine, um die Bindung der FISH-Sonden an die spezifische Zell-DNA zu erleichtern.

3 Gebrauchsanweisung

3.1 Specimens

Dieses Vorbehandlungskit wurde speziell entwickelt, um optimale Ergebnisse für stark quervernetztes oder schwieriges formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe (FFPE) zu erhalten (z. B. bei längerer Fixierung oder Lagerung).

Probenpräanalytik: Die Präanalytik spielt eine wesentliche Rolle für den Erfolg des FISH-Verfahrens. Die Probe muss gemäß einem bewährten Protokoll richtig fixiert und in Paraffinwachs eingebettet werden. Eine zu starke oder zu schwache Fixierung kann ein Versagen des FISH-Verfahrens oder zumindest eine geringe Reproduzierbarkeit/Signalintensität zur Folge haben. Kreatech™ FISH-Sonden wurden mit FFPE-Gewebeschnitten getestet, die auf 3–6 µm zugeschnitten wurden. Gewebeblöcke und -schnitte müssen für optimale Ergebnisse entsprechend den empfohlenen Lagerungs- und Handhabungsbedingungen gelagert werden; siehe hierzu die Website von Leica. Das Backen kann entweder gemäß dem *Bake and Dewax Protokoll mit BOND oder separat in einem Ofen oder Inkubator vorgenommen werden. Es werden eine Backtemperatur und -dauer von 16 Stunden bei 56 °C oder 60–120 Minuten bei 80 °C empfohlen.

3.2 Vorbehandlung

Auf 3–6 µm zugeschnittene, formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Gewebeschnitte auf positiv geladenen Objektträgern (z. B. mit Aminoalkylsilan) eindecken. Das folgende Protokoll beschreibt das Verfahren bei Verwendung von 5 Objektträgern in einem aufrecht stehenden 50-ml-Färbetrog nach Coplin.

1. Die eingedeckten Objektträger 2 Stunden lang bei 80 °C oder 16 Stunden lang bei 56 °C backen.
2. Die warmen Objektträger zweimal 10 Minuten (Min.) lang in Xylol oder einen Xylol-Ersatzstoff legen, um sie zu entparaffinieren.
3. Die Objektträger jeweils 3 Min. lang in 100 %, 85 % und 70 % Ethanol legen, um sie zu rehydrieren.

4. Dann 3 Min. lang bei Raumtemperatur (RT) mit dH₂O waschen.
5. Mit 50 ml der 0,2 M HCl (LK-099B) 20 Min. lang bei RT vorbehandeln und anschließend 3 Min. lang bei RT mit dH₂O waschen.
6. Die Objektträger 30 Min. lang bei 80 °C in 50 ml Vorbehandlungslösung B (8 % Natriumthiocyanat) (LK-100B) legen.
7. Dann 3 Min. lang bei RT in 50 ml 2 x SSC (LK-104B) spülen.
8. Den Paraffinschnitt mit ungefähr 200 µl Pepsinlösung (LK-101B) bedecken und 5–50 Min. lang bei RT inkubieren. (Die Dauer ist abhängig von der Fixierung und der Art des Gewebes. Bei den meisten Brustkrebsgeweben dauert die Andauung z. B. 5–15 Min., bei Kolongewebe 20–30 Min.)
9. 1 Min. lang in dH₂O waschen.
10. 5 Min. lang bei RT in 50 ml 2 x SSC (LK-104B) waschen.
11. Die Objektträger jeweils 1 Min. lang in 70 %, 85 % und 100 % Ethanol legen, um sie zu dehydrieren. An der Luft trocknen lassen. Mit der **Sondenvorbereitung** fortfahren.

3.3 Sondenvorbereitung

Kreatech™ FISH-Sonden für in Paraffin eingebettetes Gewebe sind gebrauchsfertig, sofern in der Produktdokumentation nichts anderes angegeben ist. Spezifische Angaben zur Verdünnung sind dem Produktetikett und der Packungsbeilage der jeweiligen Sonde zu entnehmen.

3.4 Co-Denaturierung

Pro Feld (22 x 22 mm) 10 µl der Sonde auftragen. Mit Deckglas versehen und mit Fixogum oder Gummilösung (Rubber Cement) abdichten. Probe und Sonde 5 Min. lang bei 80 ± 1 °C in einem ThermoBrite (TS-01/02) denaturieren. Mit der **Hybridisierung** fortfahren.

3.5 Hybridisierung

Über Nacht bei 37 ± 1 °C in einem ThermoBrite (TS-01/02) oder einer befeuchteten Kammer inkubieren.

3.6 Waschen nach der Hybridisierung

1. 50 ml von Waschpuffer I (0,4 x SSC/0,3 % Igepal) (LK-102) auf 72 °C vorwärmen.
2. Die Gummilösung entfernen.
3. Die Objektträger in 50 ml Waschpuffer II (2 x SSC/0,1 % Igepal) (LK-103) legen und 2 Min. lang bei RT inkubieren. Die Deckgläser abnehmen. Der Waschpuffer darf nur einmal für insgesamt 10 Objektträger wiederverwendet werden.
4. Die Objektträger in 50 ml vorgewärmten Waschpuffer I (0,4 x SSC/0,3 % Igepal) (LK-102) legen und 2 Min. lang ohne Rühren bei 72 °C (+/- 1 °C) inkubieren. Der Waschpuffer darf nur einmal für insgesamt 10 Objektträger wiederverwendet werden.
5. Die Objektträger in 50 ml frischen Waschpuffer II (2 x SSC/0,1 % Igepal) (LK-103) legen und 1 Min. lang ohne Rühren bei RT inkubieren. Der Waschpuffer darf nur einmal für insgesamt 10 Objektträger wiederverwendet werden.
6. In 70 %, 85 % und 100 % frischem Ethanol dehydrieren und jeweils 1 Min. lang bei RT inkubieren. Bei RT an der Luft trocknen lassen und mit der **Gegenfärbung** fortfahren.

3.7 Gegenfärbung

15 µl des DAPI Gegenfärbemittels (DAPI/Antifade 1 µg/ml) (LK-096B) oder einer mit Gegenfärbemittel-Verdüner (LK097B) hergestellten Verdünnungslösung auftragen und mit einem Deckglas versehen. Mit der Mikroskopie fortfahren.

3.8 Empfehlungen für das Verfahren

Die Proteinandauung und Vorbehandlung durch Auftragen von 15 µl DAPI Gegenfärbemittel prüfen und dann eine Bewertung der Objektträger mittels Fluoreszenzmikroskop mit DAPI Filter vornehmen. Bei unzureichender Andauung der Probe das Deckglas abnehmen, das Gewebe 2 Min. lang in 2 x SSC (LK-104B) legen und die Proteinandauungszeit verlängern. Bei einer übermäßigen Andauung der Probe eine frische Probe verwenden und die Proteinandauungszeit verkürzen.

Bei der Hybridisierung und dem Waschen sind die Temperatur und die Pufferkonzentration (Stringenz) wichtig, da eine geringere Stringenz eine unspezifische Bindung der Sonde an andere Sequenzen und eine höhere Stringenz ein fehlendes Signal zur Folge haben kann. Eine unvollständige Denaturierung der Ziel-DNA kann ein fehlendes Signal zur Folge haben.

3.9 Empfehlungen für die Fluoreszenzmikroskopie

Für eine optimale Visualisierung ein ordnungsgemäß gewartetes und regelmäßig kalibriertes Mikroskop verwenden, das mit einer 100-W-Quecksilberlampe oder einer anderen geeigneten Lichtquelle (z. B. Metallhalogenid-Lichtquelle (X-cite, 120 W) oder LED-basierte Lichtquellen) und einem Fluoreszenzobjektiv mit 63- oder 100-facher Vergrößerung ausgestattet ist. Es werden Dreifachbandpassfilter (DAPI/FITC/Cy3 oder DAPI/FITC/TRITC) zur Darstellung mehrerer Farben und Einfachbandpassfilter zur Visualisierung einzelner Farben verwendet. Filterempfehlungen für die jeweiligen Mikroskope sind auf der Leica-Website unter <http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/kreatech-fish-probes/> zu finden.

Empfohlene Anregungs- und Emissionsbereiche für Kreatech™ Fluorophore:

Fluorophor	Anregung	Emission
DAPI	360 ± 20 nm	460 ± 30 nm
PlatinumBright™ 415	429 ± 15 nm	470 ± 15 nm
PlatinumBright™ 495	495 ± 10 nm	517 ± 10 nm
PlatinumBright™ 550	550 ± 10 nm	580 ± 10 nm

(Die angegebene Bandbreite entspricht 80 % der maximalen Anregung/Emission des Fluorophors.)

4 Analytische Leistung

Die Leistung des Tissue Digestion Kit II wurde anhand der in dieser Gebrauchsanweisung beschriebenen Verfahren bewertet. Änderungen an diesen Verfahren können sich auf die Leistung des Assays auswirken. Alle Abweichungen von den vorgeschriebenen Protokollen müssen vom Anwender validiert werden. Anwender, die von den empfohlenen Testverfahren abweichen, müssen die Verantwortung für eine Auswertung der Patientenergebnisse unter diesen Umständen übernehmen. Die Protokollzeiten können aufgrund von Unterschieden bei der Fixierung und Verarbeitung schwanken. Zudem kann abhängig von den Verarbeitungs- und Fixierungsbedingungen eine Optimierung der Pepsin-Inkubationszeit erforderlich sein.

5 Erforderliche und im Lieferumfang des Produkts enthaltene Materialien

Code-Nr.	Beschreibung	Volumen
LK-096B	DAPI/Antifade 1 µg/ml (DAPI Gegenfärbemittel)	0,5 ml
LK-097B	Antifade (Gegenfärbemittel-Verdünner)	0,5 ml
LK-099B	0,2 M HCl	250 ml
LK-100B	8 % Natriumthiocyanat (Vorbehandlungslösung B)	250 ml
LK-101B	Pepsinlösung	5 ml
LK-102B*	0,4 x SSC/0,3 % Igepal (Waschpuffer I)	250 ml
LK-103B*	2 x SSC/0,1 % Igepal (Waschpuffer II)	2 x 250 ml
LK-104B	2 x SSC	2 x 250 ml

* Hinweis: Produkte mit der Code-Nummer LK-102 oder LK-103, die aber einen anderen Buchstaben haben, sind identisch, mit Ausnahme des Volumens. A = 100 ml, B = 250 ml

6 Erforderliche, aber nicht im Lieferumfang des Produkts enthaltene Materialien

- Xylol
- Ethanol 100 %, 85 % und 70 %
- Fixogum (LK-071A) oder Gummilösung (Rubber Cement)
- Wärmeplatte mit genauer Temperaturkontrolle bis zu 80 °C oder ThermoBrite™ (TS01/TS02)
- Inkubator mit genauem Temperaturbereich von 37–56 °C
- Wasserbad mit genauem Temperaturbereich von 37–80 °C
- Färbetröge nach Coplin aus Kunststoff und Glas
- Variable Mikropipetten (1–200 µl)
- Fluoreszenzmikroskop mit geeigneten Filtern (siehe die Empfehlungen für die Fluoreszenzmikroskopie)

7 Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Etwaige schwerwiegende Vorfälle, die im Zusammenhang mit dem Produkt aufgetreten sind, müssen dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaates, in dem der Anwender und/oder der Patient ansässig ist, gemeldet werden.
- Für In-vitro-Diagnostik. Nur für die professionelle Anwendung im Labor. Im Notfall die Sicherheitsinformationen in den Sicherheitsdatenblättern beachten.
- Das Kit ist nur zur Verwendung mit FFPE-Gewebe vor und nach dem DNA-FISH-Verfahren bestimmt. Das Produkt ist nicht für die Verwendung mit gefrorenem Gewebe vorgesehen.
- Nur für die nicht-automatisierte FISH-Vorbehandlung und -Hybridisierung bestimmt.
- Alle Materialien müssen in Übereinstimmung mit den Richtlinien zur Entsorgung von Krankenhausabfällen der jeweiligen Einrichtung entsorgt werden.
- Das KBI-60007 Tissue Digestion Kit I wird zur Verwendung mit gewöhnlichen FFPE-Proben empfohlen.
- Für Metaphasen- und Interphasenzellen oder andere zytologische Proben wird empfohlen, das Vorbehandlungskit KBI-60005 oder KBI-60006 zu verwenden.

Kennzeichnung gemäß Verordnung (EG) Nr. 1272/2008

Code-Nr.	Beschreibung	Signalwort	Piktogramm	Gefahrenhinweise (H-Sätze)
LK-096B	DAPI/Antifade 1 µg/ml (DAPI Gegenfärbemittel)	Achtung		H315, H319, H335
LK-097B	Antifade (Gegenfärbemittel-Verdünner)	Achtung		H315, H319, H335
LK-099B	0,2 M HCl	N.A.	N.A.	N.A.
LK-100B	8 % Natriumthiocyanat (Vorbehandlungslösung B)	N.A.	N.A.	N.A.
LK-101B	Pepsinlösung	N.A.	N.A.	N.A.
LK-102B	0,4 x SSC/0,3 % Igepal (Waschpuffer I)	N.A.	N.A.	N.A.
LK-103B	2 x SSC/0,1 % Igepal (Waschpuffer II)	N.A.	N.A.	N.A.
LK-104B	2 x SSC	N.A.	N.A.	N.A.

Gefahrenhinweis(e)

H315 – Verursacht Hautreizungen.

H319 – Verursacht schwere Augenreizung.

H335 – Kann die Atemwege reizen.

Sicherheitshinweis(e) – Prävention

P271 – Nur im Freien oder in gut belüfteten Räumen verwenden.

P261 – Einatmen von Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden.

P264 – Nach Gebrauch alle exponierten äußerlichen Körperstellen gründlich waschen.

P280 – Schutzhandschuhe, Schutzkleidung, Augenschutz und Gesichtsschutz tragen.

Sicherheitshinweis(e) – Reaktion

P305+P351+P338 – BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Evtl. vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.

P312 – Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt/Notarzt anrufen.

P337+P313 – Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P302+P352 – BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen.

P304+P340 – BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen.

P332+P313 – Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P362+P364 – Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.

Zusätzliche Gefahrenhinweise: keine
Nur für professionelle Anwender im Labor

Zeichenerklärung

	Enthält gefährliche Substanzen
	Herstellungsland
	Nicht verwenden, wenn die Verpackung beschädigt ist
	Elektronische Gebrauchsanweisung beachten

8 Lagerung und Handhabung der Reagenzien

DAPI/Antifade vor starker und direkter Lichteinstrahlung schützen. Bei 2–8 °C aufbewahren. Das ungeöffnete Produkt ist unter diesen Bedingungen bis zu dem auf dem Produktetikett angegebenen Ablaufdatum stabil. Verdünnte und unverdünnte Reagenzien müssen direkt nach der Verwendung wieder bei 2–8 °C eingelagert werden.

Nach dem Öffnen sind die Produkte bis zu 18 Monate lang, aber höchstens bis zu dem auf dem jeweiligen Produkt angegebenen Ablaufdatum stabil. Werden die Lösungen darüber hinaus verwendet, können suboptimale Ergebnisse auftreten.

9 Technischer Support

Der Technische Support ist unter www.leicabiosystems.com oder per E-Mail an Kreatech.Support@Leicabiosystems.com erreichbar. Kontaktieren Sie uns, falls nicht die gewünschten Ergebnisse ermittelt werden oder irgendwelche Unregelmäßigkeiten bei der Verwendung des Produkts auftreten.

Wenn Sie eine ausgedruckte Kopie der Gebrauchsanweisung anfordern möchten, senden Sie eine E-Mail an: LBSAMS-IFU@leicabiosystems.com.



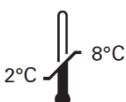
Die elektronische Gebrauchsanweisung kann in unterschiedlichen Sprachen unter www.leicabiosystems.com heruntergeladen werden.

10 Kundendienst

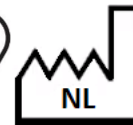
Kreatech Sonden können beim Leica-Kundendienst unter +31 20 6919181 oder per E-Mail an purchase.orders@leica-microsystems.com bestellt werden.

11 Historie

Version der Gebrauchsanweisung	Ausgabedatum	Änderungen
2,4	27. SEP. 2016	Entfernung der Tagline „The pathology Company“
3,0	April 2022	Aktualisierung in Übereinstimmung mit den IVD-Verordnungen



Kreatech Biotechnology B.V.
Vlierweg 20
1032 LG Amsterdam
Ολλανδία
www.LeicaBiosystems.com



1 Προβλεπόμενη χρήση/σκοπός

Η φθορίζουσα υβριδοποίηση in situ (FISH) προσδιορίζει ή επισημαίνει γονιδιωματικές αλληλουχίες-στόχους, ώστε να καταστεί δυνατή η μελέτη της θέσης τους. Οι αλληλουχίες DNA από κατάλληλους χρωμοσωμικούς ανιχνευτές σημαίνονται πρώτα με μόρια αναφοράς. Στη συνέχεια, ο επισημασμένος ανιχνευτής DNA υβριδοποιείται στα χρωμοσώματα της μετάφασης ή στους πυρήνες της ενδιάμεσης φάσης σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα. Μετά την έκπλυση, το δείγμα ελέγχεται για τα μόρια αναφοράς με μικροσκοπία φθορισμού.

Αυτό το κιτ προεπεξεργασίας έχει αναπτυχθεί ειδικά για την επίτευξη βέλτιστων αποτελεσμάτων σε ισχυρά διασυνδεδεμένους ή δύσκολα στερεωμένους με φορμόλη ιστούς εγκλεισμένους σε παραφίνη (FFPE) (π.χ. μεγαλύτερης διάρκειας στερέωση ή παρατεταμένη αποθήκευση).

Το προϊόν αυτό προορίζεται για in vitro διαγνωστική χρήση.

2 Περιγραφή προϊόντος

Αυτό το κιτ προεπεξεργασίας είναι για μη αυτοματοποιημένους υβριδισμούς FISH που αναπτύχθηκε ειδικά για την προεπεξεργασία και την ενζυμική πέψη του FFPE πριν από τη διαδικασία υβριδισμού DNA FISH. Αυτό το κιτ έχει αναπτυχθεί ειδικά για την επίτευξη βέλτιστων αποτελεσμάτων σε βαριά διασυνδεδεμένους ή δύσκολους ιστούς FFPE. Η χρήση του κιτ θα αντιστρέψει τους σταυροειδείς συνδέσμους στον ιστό, θα διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη και θα αφομοιώσει τις κυτταρικές πρωτεΐνες για να διευκολύνει τη σύνδεση των ανιχνευτών FISH με το συγκεκριμένο κυτταρικό DNA.

3 Οδηγίες χρήσης

3.1 Δείγματα

Αυτό το κιτ προεπεξεργασίας έχει αναπτυχθεί ειδικά για την επίτευξη βέλτιστων αποτελεσμάτων σε ισχυρά διασυνδεδεμένους ή δύσκολα στερεωμένους με φορμόλη ιστούς εγκλεισμένους σε παραφίνη (FFPE) (π.χ. μεγαλύτερης διάρκειας στερέωση ή παρατεταμένη αποθήκευση).

Προανάλυση δειγμάτων: Για να επιτευχθεί ένα επιτυχημένο FISH, οι προ-αναλύσεις παίζουν σημαντικό ρόλο. Το δείγμα θα πρέπει να στερεωθεί σωστά και να ενσωματωθεί σε κερύ παραφίνης σύμφωνα με ένα καθιερωμένο πρωτόκολλο. Η υπερβολική ή ελλιπής στερέωση μπορεί να προκαλέσει αποτυχία της διαδικασίας FISH ή τουλάχιστον χαμηλή αναπαραγωγικότητα/ένταση σήματος. Οι ανιχνευτές Kreatech™ FISH έχουν δοκιμαστεί σε τομές ιστών FFPE που κόπηκαν στα 3-6 μm. Τα μπλοκ ιστών και οι κομμένες αντικειμενοφόρες πλάκες πρέπει να αποθηκεύονται σύμφωνα με τις συνιστώμενες συνθήκες φύλαξης και χειρισμού για βέλτιστα αποτελέσματα, βλ. ιστοσελίδα της Leica. Το ψήσιμο μπορεί να γίνει είτε στο BOND χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο *Bake and Dewax είτε ξεχωριστά σε φούρνο ή θερμοκοιτίδα. Η συνιστώμενη θερμοκρασία και χρόνος ψήσιματος είναι έως 16 ώρες στους 56 °C ή 60 - 120 λεπτά στους 80 °C.

3.2 Προεπεξεργασία

Τοποθετήστε σε θετικά φορτισμένες αντικειμενοφόρους πλάκες (π.χ. αμινοακυλοσιλάνιο) τομές ιστών εγκλεισμένων σε παραφίνη με μονιμοποιημένη φορμόλη 3 - 6 μm. Το παρακάτω πρωτόκολλο αφορά τη χρήση 5 αντικειμενοφόρων πλακών σε όρθιο δοχείο corlin των 50 ml.

1. Ψήστε τις τοποθετημένες αντικειμενοφόρους πλάκες για 2 ώρες στους 80 °C ή για 16 ώρες στους 56 °C.

2. Αποπαραφινοποιήστε τις θερμές αντικειμενοφόρους πλάκες με εμβάπτιση σε ξυλόλιο ή υποκατάστατο ξυλόλιου για δύο φορές επί 10 λεπτά (min).
3. Ενυδατώστε ξανά με εμβάπτιση σε αιθανόλη 100%, 85% και 70% για 3 λεπτά το καθένα.
4. Εκπλύνετε με dH₂O για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (RT).
5. Προεπεξεργαστείτε με 50 ml HCl 0,2 M (LK-099B) για 20 λεπτά σε RT και στη συνέχεια, εκπλύνετε σε dH₂O για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (RT).
6. Τοποθετήστε τις αντικειμενοφόρους πλάκες σε 50 ml διαλύματος προεπεξεργασίας B (8% θειοκυανικό νάτριο) (LK-100B) στους 80 °C για 30 λεπτά.
7. Ξεπλύνετε σε 50 ml 2 x SSC (LK-104B) για 3 λεπτά σε RT.
8. Καλύψτε την τομή παραφίνης με περίπου 200 μl διαλύματος πεψίνης (LK-101B) και επωάστε σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 5 - 50 λεπτά (Ο χρόνος εξαρτάται από τη σταθεροποίηση του ιστού και τον τύπο του ιστού. Π.χ. οι περισσότεροι καρκινικοί ιστοί του μαστού χρειάζονται 5 - 15 λεπτά πέψης. Οι ιστοί του παχέος εντέρου 20 - 30 λεπτά).
9. Εκπλύνετε σε dH₂O για 1 λεπτό.
10. Εκπλύνετε σε 50 ml 2 x SSC (LK-104B) για 3 λεπτά σε RT.
11. Αφυδατώστε τις αντικειμενοφόρους πλάκες με εμβάπτιση σε αιθανόλη 70%, 85% και 100% για 1 λεπτό κάθε φορά. Στεγνώστε με αέρα. Προχωρήστε με την **Προετοιμασία του ανιχνευτή**.

3.3 Προετοιμασία ανιχνευτή:

Οι ανιχνευτές Kreatech™ FISH για ιστούς εγκλεισμένους σε παραφίνη σε παραφίνη παρέχονται έτοιμοι προς χρήση (RtU), εκτός εάν ορίζεται διαφορετικά στην τεκμηρίωση του προϊόντος. Συμβουλευτείτε την ετικέτα στο φιαλίδιο και το ειδικό ένθετο της συσκευασίας του ανιχνευτή για τις λεπτομέρειες της αραίωσης.

3.4 Συν-μετουσίωση

Εφαρμόστε 10 μl ανιχνευτή ανά πεδίο 22 x 22 mm. Καλύψτε με γυάλινο κάλυμμα και σφραγίστε με Fixogum ή τσιμέντο από καουτσούκ. Μετουσιώστε το δείγμα και τον ανιχνευτή σε ThermoBrite (TS-01/02) στους 80 ±1 °C για 5 λεπτά. Συνεχίστε με τον υβριδισμό.

3.5 Υβριδισμός:

Επωάστε κατά τη διάρκεια της νύχτας στους 37 ±1 °C σε ThermoBrite (TS-01/02) ή σε θάλαμο με υγρασία.

3.6 Έκπλυση μετά τον υβριδισμό:

1. Προθερμάνετε 50 ml ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης I (0,4 x SSC / 0,3% Igepal) (LK-102) στους 72 °C
2. Αφαιρέστε το τσιμέντο από καουτσούκ.
3. Τοποθετήστε τις αντικειμενοφόρους πλάκες σε 50 ml ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης II (2 x SSC / 0,1% Igepal) (LK-103), επωάστε για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου RT. Αφαιρέστε τις καλυπτρίδες. Επαναχρησιμοποιήστε το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης μόνο μία φορά για συνολικά 10 αντικειμενοφόρους πλάκες.
4. Τοποθετήστε τις αντικειμενοφόρους πλάκες σε 50 ml προθερμασμένου ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης I (0,4 x SSC / 0,3% Igepal) (LK-102), επωάστε για 2 λεπτά στους 72 °C (+/- 1 °C) χωρίς ανάδευση. Επαναχρησιμοποιήστε το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης μόνο μία φορά για συνολικά 10 αντικειμενοφόρους πλάκες.
5. Τοποθετήστε τις αντικειμενοφόρους πλάκες σε 50 ml φρέσκου ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης II (2 x SSC / 0,1% Igepal) (LK-103), επωάστε για 1 λεπτό σε RT χωρίς ανάδευση. Επαναχρησιμοποιήστε το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης μόνο μία φορά για συνολικά 10 αντικειμενοφόρους πλάκες.
6. Αφυδατώστε σε ανανεωμένη αιθανόλη 70%, 85% και 100%, επωάστε για 1 λεπτό το καθένα σε RT. Στεγνώστε με αέρα σε θερμοκρασία δωματίου και προχωρήστε σε **Αντιχρωματισμό**.

3.7 Αντιχρωματισμός:

Εφαρμόστε 15 μl αντίχρωμα DAPI (DAPI/Antifade 1 μg/ml) (LK-096B) ή μια αραίωση αυτού με τη χρήση αραιωτικού αντίχρωσης (LK097B) και εφαρμόστε γυάλινη καλυπτρίδα. Συνεχίστε με τη μικροσκόπηση.

3.8 Διαδικαστικές συστάσεις:

Ελέγξτε την πέψη των πρωτεϊνών και την προεπεξεργασία εφαρμόζοντας 15 μl DAPI και αξιολογήστε τις αντικειμενοφόρους πλάκες χρησιμοποιώντας μικροσκόπιο φθορισμού εξοπλισμένο με φίλτρο DAPI. Σε περίπτωση που το δείγμα δεν έχει υποστεί επαρκή πέψη: αφαιρέστε την καλυπτρίδα και εμποτίστε τον ιστό σε 2 x SSC (LK-104B) για 2 λεπτά και παρατείνετε την πέψη των πρωτεϊνών. Εάν το δείγμα έχει υποστεί υπερβολική πέψη, χρησιμοποιήστε νέο δείγμα και μειώστε το χρόνο πέψης των πρωτεϊνών.

Η θερμοκρασία και η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος (αυστηρότητα) του υβριδισμού και της έκπλυσης είναι σημαντικές, καθώς η χαμηλότερη ακρίβεια μπορεί να οδηγήσει σε μη ειδική σύνδεση του ανιχνευτή με άλλες αλληλουχίες και η υψηλότερη ακρίβεια μπορεί να οδηγήσει σε έλλειψη σήματος. Η ατελής μετουσίωση του DNA-στόχου μπορεί να οδηγήσει σε έλλειψη σήματος.

3.9 Συστάσεις για τη μικροσκοπία φθορισμού

Για βέλτιστη απεικόνιση χρησιμοποιήστε ένα καλά συντηρημένο και τακτικά βαθμονομημένο μικροσκόπιο εξοπλισμένο με λυχνία υδραργύρου 100W ή άλλη κατάλληλη πηγή φωτός (π.χ. λυχνία μεταλλικών αλογονιδίων (120W X-cite) ή πηγές φωτός LED) και αντικειμενικό φθορισμού 63x ή 100x. Τα τριπλά ζωνοπερατά φίλτρα (DAPI/FITC/Cy3 ή DAPI/FITC/TRITC) χρησιμοποιούνται για την απεικόνιση πολλαπλών χρωμάτων, ενώ τα απλά ζωνοπερατά φίλτρα χρησιμοποιούνται για την απεικόνιση μεμονωμένων χρωμάτων. Ανατρέξτε στον ιστότοπο της Leica για συστάσεις σχετικά με τα κατάλληλα φίλτρα για κάθε εμπορική μάρκα μικροσκοπίου: <http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/kreatech-fish-probes/>

Κατάλληλο εύρος διέγερσης και εκπομπής για τα φθοριοφόρα Kreatech™:

Φθοριοφόρο	Διέγερση	Εκπομπή
DAPI	360 ±20 nm	460 ±30 nm
PlatinumBright™ 415	429 ±15 nm	470 ±15 nm
PlatinumBright™ 495	495 ±10 nm	517 ±10 nm
PlatinumBright™ 550	550 ±10 nm	580 ±10 nm

Το εμφανιζόμενο εύρος ζώνης αντιστοιχεί στο 80% της μέγιστης διέγερσης/εκπομπής του φθοριοφόρου)

4 Αναλυτική απόδοση

Η απόδοση του Tissue Digestion Kit II έχει διαπιστωθεί χρησιμοποιώντας τις διαδικασίες που περιγράφονται στις παρούσες οδηγίες χρήσης. Τροποποιήσεις σε αυτές τις διαδικασίες ενδέχεται να μεταβάλλουν την απόδοση της ανάλυσης. Τυχόν αποκλίσεις από τα υποδειχθέντα πρωτόκολλα πρέπει να επικυρώνονται από τον χρήστη. Οι χρήστες που παρεκκλίνουν από τις προτεινόμενες διαδικασίες εξέτασης πρέπει να αναλάβουν την ευθύνη για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων των ασθενών υπό αυτές τις συνθήκες. Οι χρόνοι του πρωτοκόλλου ενδέχεται να διαφέρουν λόγω της διαφοροποίησης της στερέωσης και της επεξεργασίας. Επιπλέον, ο χρόνος επώασης της πεψίνης μπορεί να απαιτεί βελτιστοποίηση ανάλογα με τις συνθήκες επεξεργασίας και στερέωσης.

5 Απαιτούμενα και παρεχόμενα με το προϊόν υλικά

Αριθμός κωδικού	Περιγραφή	Όγκος
LK-096B	DAPI/Αντιξεθωριαστικό 1 µg/ml (Αντίχρωμα DAPI)	0.5 ml
LK-097B	Αντιξεθωριαστικό (Αραιωτικό αντιχρωματισμού)	0.5 ml
LK-099B	0.2 M HCl	250 ml
LK-100B	8% θειοκυανικό νάτριο (Διάλυμα προεπεξεργασίας B)	250 ml
LK-101B	Διάλυμα πεψίνης	5 ml
LK-102B*	0.4 x SSC / 0.3% Igepal (Ρυθμιστικό διάλυμα I)	250 ml
LK-103B*	2 x SSC / 0.1% Igepal (Ρυθμιστικό διάλυμα II)	2 x 250ml
LK-104B	2 x SSC	2 x 250ml

*Λαμβάνετε υπόψη ότι τα προϊόντα LK-102 και LK-103 που περιέχουν τον ίδιο αριθμό αλλά διαφορετικά γράμματα είναι πανομοιότυπα εκτός από τον όγκο. A= 100 ml, B=250 ml

6 Απαιτούμενα και μη παρεχόμενα με το προϊόν υλικά

- Ξυλένιο
- Αιθανόλη 100%, 85% και 70%
- Fixogum (LK-071A) ή τσιμέντο από καουτσούκ
- Θερμαινόμενη εστία με ακριβή έλεγχο θερμοκρασίας έως 80 °C ή ThermoBrite™ (TS01/TS02)

- Θερμοκοιτίδα με ακριβές εύρος θερμοκρασίας 37 - 56 °C
- Υδρόλουτρο με ακριβές εύρος θερμοκρασίας 37 - 80 °C
- Πλαστικά και γυάλινα δοχεία corlin
- Μεταβλητές μικροπιπέτες (1 µl - 200 µl)
- Μικροσκόπιο φθορισμού εξοπλισμένο με κατάλληλα φίλτρα (βλέπε συστάσεις για τη μικροσκοπία φθορισμού).

7 Προειδοποίηση και προφυλάξεις

- Κάθε σοβαρό περιστατικό που συνέβη σε σχέση με το προϊόν αναφέρεται στον κατασκευαστή και στην αρμόδια αρχή του κράτους μέλους στο οποίο είναι εγκατεστημένος ο χρήστης ή/και ο ασθενής.
- Για διαγνωστική χρήση in vitro. Μόνο για εργαστηριακή επαγγελματική χρήση. Σε περίπτωση έκτακτης ανάγκης ελέγξτε τα δελτία SDS για πληροφορίες ασφαλείας.
- Το κιτ προορίζεται για χρήση μόνο πριν και μετά το DNA FISH σε ιστό FFPE. Αυτό το προϊόν δεν προορίζεται για χρήση σε κατεψυγμένο ιστό.
- Μόνο για μη αυτοματοποιημένη προεπεξεργασία και υβριδισμό FISH.
- Όλα τα υλικά θα πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τις οδηγίες του ιδρύματός σας για τη διάθεση νοσοκομειακών αποβλήτων.
- Η χρήση του Kit πέψης ιστών I KBI-60007 συνιστάται για χρήση με συμβατικά δείγματα FFPE.
- Για μεταφασικά και μεσοφασικά κύτταρα ή άλλα κυτταρολογικά δείγματα συνιστάται η χρήση του κιτ προεπεξεργασίας KBI-60005 ή KBI-60006.

Επισήμανση σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1272/2008

Αριθμός κωδικού	Περιγραφή	Λέξη σήματος	Εικονόγραμμα	Δηλώσεις κινδύνου
LK-096B	DAPI/Αντιξεθωριαστικό 1 µg/ml (Αντίχρωμα DAPI)	Προειδοποίηση		H315, H319, H335
LK-097B	Αντιξεθωριαστικό (Αραιωτικό αντιχρωματισμού)	Προειδοποίηση		H315, H319, H335
LK-099B	0.2 M HCl	M.Δ.	M.Δ.	M.Δ.
LK-100B	8% θειοκυανικό νάτριο (Διάλυμα προεπεξεργασίας B)	M.Δ.	M.Δ.	M.Δ.
LK-101B	Διάλυμα πεψίνης	M.Δ.	M.Δ.	M.Δ.
LK-102B	0.4 x SSC / 0.3% Igepal (Ρυθμιστικό διάλυμα I)	M.Δ.	M.Δ.	M.Δ.
LK-103B	2 x SSC / 0.1% Igepal (Ρυθμιστικό διάλυμα II)	M.Δ.	M.Δ.	M.Δ.
LK-104B	2 x SSC	M.Δ.	M.Δ.	M.Δ.

Δηλώσεις κινδύνου(ων)

H315 – Προκαλεί ερεθισμό του δέρματος.

H319 – Προκαλεί σοβαρό οφθαλμικό ερεθισμό.

H335 – Μπορεί να προκαλέσει ερεθισμό της αναπνευστικής οδού

Δήλωση(-ες) προφύλαξης Πρόληψη

P271 – Χρησιμοποιήστε το μόνο σε υπαίθριο χώρο ή σε καλά αεριζόμενη περιοχή.

P261 – Αποφύγετε να αναπνέετε συγκεντρώσεις σταγονιδίων/ατμούς/εκνεφώματα.

P264 – Πλύνετε καλά όλες τις εξωτερικά εκτεθειμένες περιοχές του σώματος μετά το χειρισμό.

P280 – Να φοράτε προστατευτικά γάντια, προστατευτικά ενδύματα, μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια και το πρόσωπο.

Δήλωση(-ες) προφύλαξης Ανταπόκριση

P305+P351+P338 – ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΑ ΜΑΤΙΑ: Ξεπλύνετε προσεκτικά με νερό για αρκετά λεπτά. Εάν υπάρχουν φακοί επαφής, αφαιρέστε τους, εφόσον είναι εύκολο. Συνεχίστε να ξεπλένετε.

P312 – Καλέστε το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ/γιατρό/πρώτες βοήθειες εάν αισθανθείτε αδιαθεσία.

P337+P313 – Εάν δεν υποχωρεί ο οφθαλμικός ερεθισμός: Συμβουλευθείτε / Επισκεφθείτε γιατρό.
 P302+P352 – ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΟ ΔΕΡΜΑ: Πλύνετε με άφθονο νερό και σαπούνι.
 P304+P340 – ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΙΣΠΝΟΗΣ: Μεταφέρετε τον παθόντα στον καθαρό αέρα και και φροντίστε να αναπνέει άνετα.
 P332+P313 – Εάν παρατηρηθεί ερεθισμός του δέρματος: Συμβουλευθείτε / Επισκεφθείτε γιατρό.
 P362+P364 – Βγάλτε τα μολυσμένα ρούχα και πλύνετε τα προτού τα ξαναχρησιμοποιήσετε.

Συμπληρωματικές δηλώσεις επικινδυνότητας: καμία
 Περιορίζεται σε επαγγελματίες εργαστηριακούς χρήστες

Επεξήγηση συμβόλων

	Περιέχει επικίνδυνες ουσίες
	Χώρα κατασκευής
	Μη χρησιμοποιείτε εάν η συσκευασία έχει υποστεί ζημιά
	Συμβουλευτείτε το ηλεκτρονικό IfU (elfU)

8 Αποθήκευση και χειρισμός αντιδραστηρίων

Προστατέψτε το DAPI/Αντιξεθωριαστικό από έντονο και άμεσο φως. Φυλάσσεται στους 2-8 °C. Το μη ανοιγμένο προϊόν είναι διατηρήσιμο υπό αυτές τις συνθήκες μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα του φιαλιδίου.

Αμέσως μετά τη χρήση, επιστρέψτε τα μη αραιωμένα και τα αραιωμένα αντιδραστήρια στους 2-8 °C.

Μετά το άνοιγμα, τα προϊόντα παραμένουν διατηρήσιμα έως και 18 μήνες, αλλά ποτέ περισσότερο από την ημερομηνία λήξης του κάθε προϊόντος. Μετά την πάροδο αυτού του χρονικού διαστήματος η χρήση των διαλυμάτων μπορεί να οδηγήσει σε μη βέλτιστα αποτελέσματα.

9 Τεχνική υποστήριξη

Μπορείτε να ζητήσετε τεχνική υποστήριξη στη διεύθυνση www.leicabiosystems.com ή μέσω ηλεκτρονικού ταχυδρομείου: Kreatech.Support@Leicabiosystems.com. Παρακαλούμε επικοινωνήστε μαζί μας εάν δεν επιτευχθούν τα επιθυμητά αποτελέσματα ή εμφανιστούν ανωμαλίες κατά τη χρήση αυτού του προϊόντος.

Ένα έντυπο αντίγραφο του IfU διατίθεται μέσω ηλεκτρονικού ταχυδρομείου, επικοινωνώντας με την ακόλουθη διεύθυνση: LBSAMS-IFU@leicabiosystems.com



Το elfU είναι διαθέσιμο σε επιπλέον γλώσσες, τις οποίες μπορείτε να κατεβάσετε από τη διεύθυνση: www.leicabiosystems.com

10 Εξυπηρέτηση πελατών

Οι ανιχνευτές Kreatech διατίθενται μέσω της υπηρεσίας εξυπηρέτησης πελατών της Leica +31 20 6919181 ή μέσω ηλεκτρονικού ταχυδρομείου: purchase.orders@leica-microsystems.com.

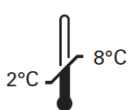
11 Ιστορικό

Έκδοση IfU	Ημερομηνία έκδοσης	Αλλαγές
2,4	2016-SEP-27	Αφαιρέστε το λογότυπο "The pathology Company"
3,0	Απρίλιος 2022	Ενημέρωση σύμφωνα με τους κανονισμούς IVD

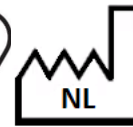
Tissue Digestion Kit II

REF KBI-60004

Con un volumen suficiente para hasta 25 o 5X5 tests



Kreatech Biotechnology B.V.
Vlierweg 20
1032 LG Amsterdam
Países Bajos
www.LeicaBiosystems.com



1 Uso previsto

La hibridación in situ de fluorescencia (FISH) identifica o etiqueta secuencias genómicas meta para poder estudiar su localización. Las secuencias de ADN de las sondas específicas para los cromosomas se etiquetan primero con moléculas reporteras. La sonda de ADN etiquetada es a continuación hibridizada a los cromosomas metafásicos o a los núcleos interfásicos en un portaobjetos. Después del lavado, la preparación se enmarca para las moléculas reporteras mediante microscopía de fluorescencia.

El kit para el pretratamiento está específicamente desarrollado para obtener unos resultados óptimos en tejidos fuertemente interrelacionados o en tejidos difíciles fijados en formol e incluidos en parafina (FFPE) (p. ej. de fijación más duradera o almacenamiento prolongado).

Este producto está indicado para uso diagnóstico in vitro.

2 Descripción del producto

El kit de pretratamiento es para hibridaciones FISH no automatizadas específicamente desarrolladas para su uso para el pretratamiento y la digestión de enzimas de FFPE antes del procedimiento de hibridación FISH del ADN. Este kit está específicamente desarrollado para obtener unos resultados óptimos en tejidos fuertemente interrelacionados o FFPE difíciles. El uso del kit revertirá los vínculos cruzados en el tejido, permeabilizará la membrana celular y digerirá las proteínas celulares para facilitar la unión de las sondas FISH con el ADN específico de la célula.

3 Manual de instrucciones

3.1 Muestras

El kit para el pretratamiento está específicamente desarrollado para obtener unos resultados óptimos en tejidos fuertemente interrelacionados o en tejidos difíciles fijados en formol e incluidos en parafina (FFPE) (p. ej. de fijación más duradera o almacenamiento prolongado).

Preanalíticas de las muestras: Las preanalíticas juegan un papel principal a la hora de obtener una FISH exitosa. La muestra debería estar correctamente fijada y embebida en cera de parafina, de acuerdo con un protocolo firmemente consolidado. El exceso o la falta de fijación puede causar un fallo en el procedimiento FISH o al menos una reducción en la intensidad de la reproducibilidad/señal. Las sondas FISH de Kreatech™ se han probado en secciones de tejidos FFPE cortados a 3-6 µm. Para unos resultados óptimos, los bloques de tejido y los portaobjetos para cortes deberán almacenarse según las condiciones de almacenamiento y manipulación recomendadas, consulte el sitio web de Leica. El secado se puede realizar en el propio BOND utilizando el *Protocolo de secado y desparafinado o por separado en un horno o estufa independiente. El tiempo y la temperatura de secado recomendados son hasta 16 horas a 56 °C, o de 60 a 120 minutos a 80 °C.

3.2 Pretratamiento

Monte las secciones de tejido fijado en formol e incluido en parafina de 3 - 6 µm en portaobjetos con carga positiva (p. ej. aminoalquilsilano). El siguiente protocolo se utiliza para 5 portaobjetos en una cubeta Coplin de 50 ml.

1. Seque los portaobjetos montados durante 2 horas a 80 °C o 16 horas a 56 °C.
2. Desparafine los portaobjetos calientes remojándolos en xileno o un sustituto de xileno dos veces durante 10 minutos (mínimo).
3. Rehidrate remojando en etanol al 100%, 85% y 70% durante 3 minutos cada vez.

4. Lave con dH₂O durante 3 minutos a temperatura ambiente.
5. Pretarte con 50 ml de 0,2 M HCl (LK-099B) durante 20 minutos a temperatura ambiente y lave después en dH₂O durante 3 minutos a temperatura ambiente.
6. Coloque los portaobjetos en una solución B de pretratamiento de 50 ml (8 % de tiocianato de sodio) (LK-100B) a 80 °C durante 30 minutos.
7. Aclare en 50 ml de 2 x SSC (LK-104B) durante 3 minutos a temperatura ambiente.
8. Cubra el corte de parafina con aproximadamente 200 µl de solución de pepsina (LK-101B) e incube a temperatura ambiente entre 5 y 50 minutos (dependiendo de la fijación de los tejidos y del tipo de tejido. p. ej. la mayoría de los tejidos de cáncer de mama necesitan entre 5 y 15 minutos de digestión, los de colon entre 20 y 30 minutos).
9. Lave en dH₂O durante 1 minuto.
10. Lave en 50 ml de 2 x SSC (LK-104B) durante 5 minutos a temperatura ambiente.
11. Deshidrate los portaobjetos remojando en etanol al 70%, 85% y 100% durante 1 minuto cada vez. Deje secar al aire. Proceda con la **Preparación de la sonda**.

3.3 Preparación de la sonda:

Las sondas FISH de Kreatech™ para tejido incluido en parafina se facilitan listas para su uso, a menos que se especifique lo contrario en la documentación del producto. Consulte la etiqueta del vial y del prospecto específico de la sonda para conocer la dilución exacta.

3.4 Co-desnaturalización

Aplique 10 µl de sonda por campo de 22 x 22 mm. Cubra con un cubreobjetos de cristal y selle con Fixogum o pegamento. Desnaturalice la muestra y la sonda en un ThermoBrite (TS-01/02) a 80 ± 1 °C durante 5 minutos. Continúe con la **hibridación**.

3.5 Hibridación:

Incube durante la noche a 37 ± 1 °C en un ThermoBrite (TS-01/02) o en una cámara humidificada.

3.6 Lavado posthibridación:

1. Caliente previamente 50 ml de tampón de lavado I (0,4 x SSC / 0,3 % de Igepal) (LK-102) a 72 °C
2. Quite el pegamento.
3. Coloque los portaobjetos en 50 ml de tampón de lavado II (2 x SSC / 0,1% de Igepal) (LK-103) e incube durante 2 minutos a temperatura ambiente. Quite los cubreobjetos. Reutilice el tampón de lavado una sola vez para un total de 10 portaobjetos.
4. Coloque los portaobjetos en 50 ml de tampón de - lavado I previamente calentado (0,4 x SSC / 0,3% de Igepal) (LK-102) e incube durante 2 minutos a 72 °C (+- 1 °C) sin agitar. Reutilice el tampón de lavado una sola vez para un total de 10 portaobjetos.
5. Coloque los portaobjetos en 50 ml de tampón de lavado II frío (2 x SSC / 0,1% de Igepal) (LK-103) e incube durante 1 minuto a temperatura ambiente sin agitar. Reutilice el tampón de lavado una sola vez para un total de 10 portaobjetos.
6. Deshidrate en etanol frío al 70%, 85% y 100%, e incube durante 1 minuto cada vez a temperatura ambiente. Deje secar al aire a temperatura ambiente y pase a la **Contratinción**.

3.7 Contratinción:

Aplique 15 µl de contratinción DAPI (1 µg/ml de DAPI/Antifade) (LK-096B) o una dilución de esta utilizando un diluyente para contratinción (LK097B) y coloque un portaobjetos de cristal. Proceda con la microscopía.

3.8 Recomendaciones de procedimiento:

Compruebe la digestión proteica y el pretratamiento aplicando 15 µl de contratinción DAPI, y evalúe los portaobjetos utilizando un microscopio para fluorescencia equipado con filtro DAPI. Si la muestra no está suficientemente digerida: quite el cubreobjetos y remoje el tejido en 2 x SSC (LK-104B) durante 2 minutos para prolongar la digestión proteica. Si la muestra está digerida en exceso, utilice una muestra nueva y reduzca el tiempo de digestión proteica.

La temperatura y la concentración del tampón (estringsencia) de hibridación y lavado son importantes, ya que la astringencia puede resultar en la unión no específica de la sonda en otras secuencias, y una mayor astringencia puede dar lugar a una falta de señal. La desnaturalización incompleta del ADN objetivo puede dar lugar a una falta de señal.

3.9 Recomendaciones para la microscopía de fluorescencia

Para una visualización óptima, utilice un microscopio con buen mantenimiento y calibración habitual, equipado con una lámpara de mercurio de 100 vatios o con otra fuente de luz adecuada (p. ej. una bombilla metálica de halogenuro (X-cite de 120 vatios) o fuentes de luz con LED) y un objetivo fluorescente de 63x o 100x. Se utilizan filtros de triple paso de banda (DAPI/FITC/Cy3 o DAPI/FITC/TRITC) para ver los múltiples colores, los filtros de un solo paso de banda se utilizan para la visualización de un color individual. Consulte el sitio web de Leica para obtener recomendaciones sobre los filtros adecuados para cada marca de microscopio: <http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/kreatech-fish-probes/>

Excitación apta y rango de emisión de fluoróforos de Kreatech™:

Fluoróforo	Excitación	Emisión
DAPI	360± 20 nm	460± 30 nm
PlatinumBright™ 415	429± 15 nm	470± 15 nm
PlatinumBright™ 495	495± 10 nm	517± 10 nm
PlatinumBright™ 550	550± 10 nm	580± 10 nm

El ancho de banda mostrado se corresponde al 80% del máximo de excitación/emisión del fluoróforo)

4 Rendimiento analítico

El rendimiento del Tissue Digestion Kit II se ha establecido utilizando los procedimientos descritos en estas instrucciones de uso. Las modificaciones a estos procedimientos pueden alterar el rendimiento del ensayo. El usuario debe validar cualquier desviación de los protocolos indicados. Los usuarios que no sigan los procedimientos de prueba recomendados deben aceptar la responsabilidad de la interpretación de los resultados de pacientes en esas circunstancias. Los tiempos del protocolo varían en función de la fijación y el procesamiento. Además, el tiempo de incubación de la pepsina puede requerir la optimización dependiendo del el procesamiento y las condiciones de fijación.

5 Materiales necesarios y facilitados con el producto

N.º de código	Descripción	positivo
LK-096B	DAPI/Antifade - 1 µg/ml (Contratinción DAPI)	0,5 ml.
LK-097B	Antifade (Diluyente para contratinción)	0,5 ml.
LK-099B	0,2 M HCl	250 ml.
LK-100B	8 % de tiocianato de sodio (Solución B para pretratamiento)	250 ml.
LK-101B	Solución de pepsina	5 ml.
LK-102B*	0,4 x SSC / 0,3% de Igepal (Tampón de lavado I)	250 ml.
LK-103B*	2 x SSC / 0,1% de Igepal (Tampón de lavado II)	2 x 25 ml
LK-104B	2 x SSC	2 x 25 ml

* Recuerde que los productos LK-102 y LK-103 con el mismo número pero distintas letras son idénticos a excepción de su volumen. A= 100 ml, B=250 ml

6 Materiales necesarios y no facilitados con el producto

- Xileno
- Etanol al 100%, 85% y 70%
- Fixogum (LK-071A) o pegamento
- Placa caliente con control preciso de temperatura hasta 80 °C o ThermoBrite™ (TS01/TS02)
- Incubadora con rango de temperatura preciso de 37 a 56 °C
- Baño de agua con rango de temperatura preciso de 37 a 80 °C
- Cubetas Coplin de plástico y cristal
- Micropipetas de distinta capacidad (1 µl - 200 µl)
- Microscopios para fluorescencia equipado con los filtros adecuados (consulte las recomendaciones para microscopía de fluorescencia).

7 Advertencias y precauciones

- Deberá informar de cualquier incidente grave relacionado con el producto al fabricante y a las autoridades competentes del Estado miembro en el que se encuentre el usuario y/o el paciente.
- Para uso diagnóstico *in vitro*. Solo para usuarios profesionales de laboratorio. En caso de emergencia, compruebe las hojas SDS para obtener información de seguridad.
- El kit ha sido diseñado para utilizarse antes y después de FISH de ADN en el tejido FFPE. Este producto no está diseñado para utilizarse con tejido congelado.
- Solo para hibridación y pretratamiento FISH no automatizado.
- Deberá deshacerse de todos los materiales de acuerdo con las directrices de su institución con respecto a la eliminación de residuos hospitalarios.
- Se recomienda el uso del KBI-60007 Tissue Digestion Kit I para muestras FFPE convencionales.
- Para células de la metafase y la interfase u otras muestras citológicas, se recomienda utilizar el kit de pretratamiento KBI-60005 o KBI-60006.

Etiquetado según la Normativa (CE) n.º 1272/2008

N.º de código	Descripción	Palabra de advertencia	Pictograma	Indicaciones de peligro
LK-096B	DAPI/Antifade - 1 µg/ml (Contratinción DAPI)	Advertencia		H315, H319, H335
LK-097B	Antifade (Diluyente para contratinción)	Advertencia		H315, H319, H335
LK-099B	0,2 M HCl	N.A.	N.A.	N.A.
LK-100B	8 % de tiocianato de sodio (Solución B para pretratamiento)	N.A.	N.A.	N.A.
LK-101B	Solución de pepsina	N.A.	N.A.	N.A.
LK-102B	0,4 x SSC / 0,3% de Igepal (Tampón de lavado I)	N.A.	N.A.	N.A.
LK-103B	2 x SSC / 0,1% de Igepal (Tampón de lavado II)	N.A.	N.A.	N.A.
LK-104B	2 x SSC	N.A.	N.A.	N.A.

Indicación(es) de peligro

H315 – Provoca irritación cutánea.

H319 – Provoca irritación grave de los ojos.

H335 – Puede irritar las vías respiratorias.

Prevención y consejos de prudencia

P271 – Utilizar únicamente en exteriores o en un lugar bien ventilado.

P261 – Evitar respirar las vaporizaciones, los vapores y las pulverizaciones.

P264 – Lavar concienzudamente las áreas del cuerpo externas expuestas tras la manipulación.

P280 – Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

Respuesta a los consejos de prudencia

P305 + P351 + P338 – EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quite las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Siga aclarando.

P312 – Llamar a un CENTRO de información toxicológica o a un médico en caso de malestar.

P337 + P313 – Si persiste la irritación ocular: Consultar con un médico.

P302 + P352 – EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.

P304 + P340 – EN CASO DE INHALACIÓN: Trasladar a la persona afectada al aire libre y mantenerla en una posición que le facilite la respiración.

P332 + P313 – Si persiste la irritación en la piel: Consultar con un médico.

P362 + P364 – Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

Otras indicaciones de peligro: ninguna

Restringido a usuarios profesionales de laboratorio

Explicación de los símbolos

	Contiene sustancias peligrosas
	País de fabricación
	No utilice el producto si el paquete está dañado
	Consulte las instrucciones de uso electrónicas (eIfU)

8 Almacenamiento y manipulación de reactivos

Proteja DAPI/Antifade de la luz directa y potente. Almacene a entre 2 y 8 °C. El producto no abierto es estable en estas condiciones hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial.

Vuelva a almacenar los reactivos diluidos y no diluidos a 2-8 °C inmediatamente después de su uso.

Una vez abiertos, los productos son estables durante un máximo de 18 meses, en ningún caso pasada la fecha de caducidad de cada producto. Después de este periodo, el uso de las soluciones podría generar unos resultados poco óptimos.

9 Asistencia técnica

Asistencia técnica disponible a través de www.leicabiosystems.com o por correo electrónico: Kreatech.Support@Leicabiosystems.com. Póngase en contacto con nosotros si no obtiene resultados o si observa alguna anomalía al utilizar este producto.

Puede solicitar una copia impresa en papel de las instrucciones de uso por correo electrónico a: LBSAMS-IFU@leicabiosystems.com



Las instrucciones de uso electrónicas están disponibles en más idiomas y se puede descargar desde: www.leicabiosystems.com

10 Servicio de atención al cliente

Puede pedir sondas Kreatech a través del Servicio de atención al cliente de Leica en el +31 20 6919181 o por correo electrónico a: purchase.orders@leica-microsystems.com.

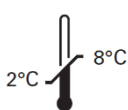
11 Historia

Versión de las instrucciones de uso	Fecha de emisión	Cambios
2,4	2016-SEP-27	Elimine el eslogan «La empresa centrada en la patología»
3,0	Abril de 2022	Actualización conforme a las normativas IVD.

Kudede seedimise komplekt II

REF KBI-60004

Sisaldab piisavat mahtu kuni 25 või 5 × 5 testi jaoks



Kreatech Biotechnology B.V.
Vlierweg 20
1032 LG Amsterdam
Madalmaad
www.LeicaBiosystems.com



1 Kasutusotstarve

Fluorestsentsi in situ hübridisatsioon (FISH) identifitseerib või etiketeerib genoomide sihtjärjestused, nii et nende asukohta saab uurida. Asjakohastest spetsiifilistest kromosoomisondidest pärit DNA järjestused etiketeeritakse esmalt reportertermolekulidega. Seejärel hübridiseeritakse etiketeeritud DNA sond slaidil olevate metafaasi kromosoomide või interfaasi tuumadega. Pärast pesemist skriinitakse proovi reportertermolekulide suhtes fluorestsentsmikroskoopia abil.

See eeltöötlemise komplekt on spetsiifiliselt välja töötatud optimaalsete tulemuste saamiseks tugevalt ristseotud või keerulistel formaliiniga fikseeritud parafiini sisestatud (FFPE) kudedel (nt pikem fikseerimine või pikendatud säilitamine).

See toode on ette nähtud kasutamiseks in vitro diagnostikas.

2 Toote kirjeldus

See eeltöötlemise komplekt on mitteautomaatsete FISH hübridisatsioonide jaoks, mis on spetsiifiliselt välja töötatud eeltöötlemise ja FFPE ensüümide seedimise jaoks kasutamiseks enne DNA FISH hübridisatsiooni protseduuri. See komplekt on spetsiifiliselt välja töötatud optimaalsete tulemuste saamiseks tugevalt ristseotud või keeruliste FFPE kude osas. Komplekti kasutamine pöörab koos ristsidemed ümber, muudab rakumembraani läbilaskvaks ja seedib rakuvalke, et hõlbustada FISH sondide sidumist spetsiifilise raku DNA-ga.

3 Kasutusjuhised

3.1 Proovid

See eeltöötlemise komplekt on spetsiifiliselt välja töötatud optimaalsete tulemuste saamiseks tugevalt ristseotud või keerulistel formaliiniga fikseeritud parafiini sisestatud (FFPE) kudedel (nt pikem fikseerimine või pikendatud säilitamine).

Proovide eelanalüütika: Eduka FISH saamiseks mängib eelanalüütika suurt osa. Proov peab olema korrektselt fikseeritud ja parafiinvahasse sisestatud vastavalt väljakujunenud protokollile. Ülefikseerimine või alafikseerimine võib põhjustada FISH protseduuri ebaõnnestumise või vähemalt madala reprodutseeritavuse / signaali intensiivsuse. Kreatech™ FISH sonde on testitud FFPE koelõikudega, mis olid lõigatud pikkuses 3–6 µm. Koeplokke ja lõigatud slide tuleb optimaalsete tulemuste saamiseks säilitada kooskõlas soovitatud säilitamise ning käitlemise tingimustega, vaata Leica veebilehte. Küpsetamist saab teha kas süsteemi BOND abil, kasutades *küpsetamise ja vaha eemaldamise protokoll või eraldi ahjus või inkubaatoris. Soovitatav küpsetamise temperatuur ja aeg on kuni 16 tundi 56 °C juures või 60–120 min 80 °C juures.

3.2 Eeltöötlemine

Kinnitage 3–6 µm formaliiniga fikseeritud parafiini sisestatud koelõigud positiivselt laetud slaididele (nt aminoalküülsilaan). Allpool toodud protokoll on ette nähtud 5 slaidi kasutamiseks püstises 50 ml Coplini purgis.

1. Küpsetage kinnitatud slide 2 tunni jooksul 80 °C juures või 16 tunni jooksul 56 °C juures.
2. Deparafineerige soojad slaidid, leotades neid kaks korda 10 minuti (min) jooksul ksüleenis või ksüleeni asendajas.
3. Rehüdreerige, leotades neid 100%, 85% ja 70% etanoolis, igaühes 3 min jooksul.
4. Peske 3 min jooksul dH₂O-ga toatemperatuuril (RT).
5. Eeltöödelge 50 ml 0,2 M HCl-ga (LK-099B) 20 min jooksul toatemperatuuril (RT) ja seejärel peske dH₂O-s 3 min jooksul toatemperatuuril (RT).

6. Pange slaidid 50 ml eeltöötlemise lahusesse B (8% naatriumtiotsüanaati) (LK-100B) 80 °C juures 30 min jooksul.
7. Loputage 50 ml 2 × SSC sees (LK-104B) 3 min jooksul toatemperatuuril (RT).
8. Katke parafiinilõik ligikaudu 200 µl pepsiini lahusega (LK-101B) ja inkubeerige toatemperatuuril (RT) 5–50 min jooksul. (Aeg on sõltuv koe fikseerimisest ja koe tüübist. Nt enamik rinnavähi kudesid vajab 5–15 min seedimist; käärsuolo kude 20–30 min.)
9. Peske dH₂O-s 1 min jooksul.
10. Peske 50 ml 2 × SSC sees (LK-104B) 5 min jooksul toatemperatuuril (RT).
11. Dehüdreerige slaidid, leotades neid 70%, 85% ja 100% etanoolis, igaühes 1 min jooksul. Kuivatage õhuga. Jätkake **sondi ettevalmistusega**.

3.3 Sondi ettevalmistus

Kreatech™ FISH sondid parafiini sisestatud koe jaoks tarnitakse kasutusvalmis (RtU) kujul, kui toote dokumentatsioonis ei ole spetsifitseeritud teisiti. Tutvuge viaali etiketil ja spetsiifilise sondi pakendi infolehel olevate lahjenduse spetsiifiliste andmetega.

3.4 Kaasdenaturatsioon

Rakendage 10 µl sondist 22 × 22 mm iga välja kohta. Katke klaasist kattekaanega ja pitseerige Fixogumi või kummitsemendiga. Denatureerige proovi ja sondi süsteemis ThermoBrite (TS-01/02) 80 ± 1 °C juures 5 min jooksul. Jätkake **hübriidisatsiooniga**.

3.5 Hübridisatsioon

Inkubeerige öö jooksul 37 ± 1 °C juures süsteemis ThermoBrite (TS-01/02) või niisutatud kambris.

3.6 Hübridisatsioonijärgne pesu

1. Eelsoojendage 50 ml pesupuhvrit I (0,4 × SSC / 0,3% Igepali) (LK-102) temperatuurini 72 °C
2. Eemaldage kummitsement.
3. Pange slaidid 50 ml pesupuhvri II sisse (2 × SSC / 0,1% Igepali) (LK-103), inkubeerige neid 2 min jooksul toatemperatuuril (RT). Libistage katteklaasid maha. Kasutage pesupuhvrit uuesti ainult üks kord, kokku 10 slaidi jaoks.
4. Pange slaidid 50 ml eelsoojendatud pesupuhvri I sisse (0,4 × SSC / 0,3% Igepali) (LK-102), inkubeerige neid 2 min jooksul 72 °C (+– 1 °C) juures ilma lahust segamata. Kasutage pesupuhvrit uuesti ainult üks kord, kokku 10 slaidi jaoks.
5. Pange slaidid 50 ml värske pesupuhvri II sisse (2 × SSC / 0,1% Igepali) (LK-103), inkubeerige neid 1 min jooksul toatemperatuuril (RT) ilma lahust segamata. Kasutage pesupuhvrit uuesti ainult üks kord, kokku 10 slaidi jaoks.
6. Dehüdreerige värskes 70%, 85% ja 100% etanoolis, inkubeerige igaühes 1 min jooksul toatemperatuuril (RT). Kuivatage õhuga toatemperatuuril (RT) ja jätkake **kontrastvärvimisega**.

3.7 Kontrastvärvimine

Rakendage 15 µl DAPI kontrastvärvi (DAPI/Antifade 1 µg/ml) (LK-096B) või selle lahjendust, kasutades kontrastvärvi lahjendit (LK097B) ja rakendage klaasist kattekaant. Jätkake mikroskoopiaga.

3.8 Protseduurilised soovitused

Kontrollige valkude seedimist ja eeltöötlemist, rakendades 15 µl DAPI kontrastvärvi ja hinnake slide, kasutades fluorestsentsmikroskoopi, mis on varustatud DAPI filtriga. Kui proov ei ole piisavalt seedinud: eemaldage kattekaas ja leotage kude 2 × SSC sees (LK-104B) 2 min jooksul ning pikendage valgu seedimist. Kui proov on üleseeditud, siis kasutage värsket proovi ja vähendage valkude seedimise aega.

Hübriidisatsiooni ning pesemise temperatuur ja puhvri kontsentratsioon (stringentsus) on olulised, kuna madalam stringentsus võib põhjustada sondi mittespetsiifilise sidumise teiste järjestustega ning kõrgem stringentsus võib põhjustada signaali puudulikkuse. Sihtmärgi DNA mittetäielik denatureerimine võib põhjustada signaali puudulikkuse.

3.9 Soovitused fluorestsentsmikroskoopia kohta

Optimaalseks visualiseerimiseks kasutage hästi hooldatud ja regulaarselt kalibreeritud mikroskoopi, mis on varustatud 100 W elavhõbedalambiga või muu sobiva valgusallikaga (nt metallhalogeniidpirn (120 W X-cite) või

LED lampide põhised valgusallikad) ning 63× või 100× fluorestsentsobjektiiviga. Kolmekordseid ribapääsfiltreid (DAPI/FITC/Cy3 või DAPI/FITC/TRITC) kasutatakse mitme värvi kuvamiseks, ühekordseid ribapääsfiltreid kasutatakse individuaalseks värvide visualiseerimiseks. Vaadake Leica veebilehte soovitude leidmiseks sobivate filtrite kohta iga mikroskoobi kaubamärgi jaoks: <http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/kreatech-fish-probes/>

Sobiv ergastuse ja emissiooni vahemik Kreatech™ fluorofooride jaoks:

Fluorofoor	Ergastus	Emissioon
DAPI	360 ±20 nm	460 ±30 nm
PlatinumBright™ 415	429 ±15 nm	470 ±15 nm
PlatinumBright™ 495	495 ±10 nm	517 ±10 nm
PlatinumBright™ 550	550 ±10 nm	580 ±10 nm

Näidatud ribalaius vastab 80%-le maksimaalsest fluorofoori ergastusest/emissioonist

4 Analüütiline toimivus

Kudede seedimise komplekti II toimivus on kindlaks tehtud käesolevas kasutusjuhises kirjeldatud protseduuride abil. Nende protseduuride modifitseerimised võivad analüüsi toimivust muuta. Mistahes kõrvalekalded juhendatud protokollidest peavad olema kasutaja poolt valideeritud. Soovitatud katsemenetlustest kõrvale kalduvad kasutajad peavad võtma vastutuse patsiendi tulemuste tõlgendamise eest nendel tingimustel. Protokollid võivad erineda tulenevalt fikseerimise ja töötlemise erinevustest. Lisaks võib pepsiini inkubatsiooniaeg vajada optimeerimist sõltuvalt töötlemise ja fikseerimise tingimustest.

5 Vajalikud ja koos tootega tarnitud materjalid

Kood #	Kirjeldus	Maht
LK-096B	DAPI/Antifade 1 µg/ml (DAPI kontrastvärv)	0,5 ml
LK-097B	Antifade (Kontrastvärvi lahjendi)	0,5 ml
LK-099B	0,2 M HCl	250 ml
LK-100B	8% naatriumtiotsüanaati (Eeltöötlemise lahus B)	250 ml
LK-101B	Pepsiini lahus	5 ml
LK-102B*	0,4 × SSC / 0,3% Igepali (Pesupuhver I)	250 ml
LK-103B*	2 × SSC / 0,1% Igepali (Pesupuhver II)	2 × 250 ml
LK-104B	2 × SSC	2 × 250 ml

* Palun pange tähele, et LK-102 ja LK-103 tooted, mis sisaldavad sama numbrit, ent erinevaid tähti, on identsed, välja arvatud mahu osas. A = 100 ml, B = 250 ml

6 Vajalikud ja tootega mittetarnitud materjalid

- Ksüleen
- Etanool 100%, 85% ja 70%
- Fixogum (LK-071A) või kummitsement
- Kuum plaat täpse temperatuuri kontrolliga kuni 80 °C või süsteem ThermoBrite™ (TS01/TS02)
- Inkubaator täpse temperatuurivahemikuga 37–56 °C
- Veevann täpse temperatuurivahemikuga 37–80 °C
- Plastist ja klaasist Coplini purgid
- Muudetavad mikropipetid (1 µl – 200 µl)
- Fluorestsentsmikroskoop, mis on varustatud sobivate filtritega (vaata soovitusi fluorestsentsmikroskoopia jaoks)

7 Hoiatus ja ettevaatusabinõud

- Igast seadmega seotud ohu juhtumist tuleb teatada tootjale ning kasutaja ja/või patsiendi asukohajärgse liikmesriigi pädevale asutusele.

- In vitro diagnostiliseks kasutamiseks. Ainult professionaalseks kasutamiseks laboris. Hädaolukorras vaadake ohutusteabe saamiseks ohutuskardi (SDS) lehti.
- Komplekt on ette nähtud kasutamiseks ainult enne ja pärast DNA FISH protseduuri FFPE koel. See toode pole mõeldud külmutatud koe jaoks kasutamiseks.
- Ainult mitteautomaatse FISH eeltöötlemise ja hübriidatsiooni jaoks.
- Kõik materjalid tuleb kõrvaldada vastavalt teie asutuse haiglajäätmete kõrvaldamise juhiste.
- KBI-60007 kudede seedimise komplekti I soovitatakse kasutada tavaliste FFPE proovidega.
- Metafaasi ja interfaasi rakkude või teiste tsütoloogiliste proovide jaoks soovitatakse kasutada eeltöötlemise komplekti KBI-60005 või KBI-60006.

Märgistus vastavalt määrusele (EÜ) nr 1272/2008

Kood #	Kirjeldus	Tunnussõna	Piktogramm	Ohulaused
LK-096B	DAPI/Antifade 1 µg/ml (DAPI kontrastvärv)	Hoiatus		H315, H319, H335
LK-097B	Antifade (Kontrastvärvi lahjendi)	Hoiatus		H315, H319, H335
LK-099B	0,2 M HCl	Ei kohaldata	Ei kohaldata	Ei kohaldata
LK-100B	8% naatriumtiotsüanaati (Eeltöötlemise lahus B)	Ei kohaldata	Ei kohaldata	Ei kohaldata
LK-101B	Pepsiini lahus	Ei kohaldata	Ei kohaldata	Ei kohaldata
LK-102B	0,4 × SSC / 0,3% Igepali (Pesupuhver I)	Ei kohaldata	Ei kohaldata	Ei kohaldata
LK-103B	2 × SSC / 0,1% Igepali (Pesupuhver II)	Ei kohaldata	Ei kohaldata	Ei kohaldata
LK-104B	2 × SSC	Ei kohaldata	Ei kohaldata	Ei kohaldata

Ohulause(d)

H315 – Põhjustab nahaärritust.

H319 – Põhjustab tugevat silmade ärritust.

H335 – Võib põhjustada hingamisteede ärritust

Hoiatuslause(d). Ennetamine

P271 – Käidelda üksnes välitingimustes või hästi ventileeritavas kohas.

P261 – Vältida udu / aurude / pihustatud aine sissehingamist.

P264 – Pärast käitlemist pesta hoolega kõik välised kehapiirkonnad.

P280 – Kanda kaitsekindaid/kaitserõivastust/kaitseprille/kaitsemaski.

Hoiatuslause(d). Reageerimine

P305+P351+P338 – SILMA SATTUMISE KORRAL: Loputada mitme minuti jooksul ettevaatlikult veega.

Eemaldada kontaktläätsed, kui neid kasutatakse ja kui neid on kerge eemaldada. Loputada veel kord.

P312 – Halva enesetunde korral võtta ühendust MÜRGISTUSTEABEKESKUSEGA/arstiga/esmaabiga.

P337+P313 – Kui silmade ärritus ei möödu: Pöörduda arsti poole.

P302+P352 – NAHALE SATTUMISE KORRAL: Pesta rohke vee ja seebiga.

P304+P340 – SISSEHINGAMISE KORRAL: Toimetada isik värske õhu kätte ja hoida asendis, mis võimaldab kergesti hingata.

P332+P313 – Nahaärrituse korral: Pöörduda arsti poole.

P362+P364 – Võtta seljast saastunud rõivad ja pesta enne korduskasutust.

Täiendavad ohulause(d): puuduvad

Piiratud kasutamiseks professionaalsetele kasutajatele laboris

Sümbolite selgitus

	Sisaldab ohtlikke aineid
	Tootja riik
	Ärge kasutage, kui pakend on kahjustatud
	Tutvuge elektroonilise kasutusjuhisega (eIfU)

8 Reaktiivi säilitamine ja käsitlemine

Kaitske DAPI/Antifade tugeva ja otsese valguse eest. Säilitage 2–8 °C juures. Avamata toode on nendel tingimustel stabiilne kuni viaali etiketil märgitud aegumiskuupäevani.

Viige lahjendamata ja lahjendatud reaktiivid vahetult pärast kasutamist tagasi temperatuurile 2–8 °C.

Pärast avamist on tooted stabiilsed kuni 18 kuu jooksul, kuid mitte kunagi kauem kui iga individuaalse toote aegumiskuupäevani. Pärast seda ajavahemikku võib lahuste kasutamine anda suboptimaalseid tulemusi.

9 Tehniline tugi

Tehniline tugi on saadaval aadressilt www.leicabiosystems.com või e-posti teel: Kreatech.Support@Leicabiosystems.com. Palun võtke meiega ühendust, kui soovitud tulemusi ei saavutata või kui selle toote kasutamisel tekivad anomaaliad.

Kasutusjuhise (IfU) paberile trükitud koopiat saab küsida e-posti teel, võttes ühendust aadressil: LBSAMS-IfU@leicabiosystems.com



Elektrooniline kasutusjuhise (eIfU) on saadaval täiendavates keeltes, mida saab alla laadida aadressilt: www.leicabiosystems.com

10 Klienditeenindus

Kreatechi sonde saab tellida Leica klienditeenistuse kaudu +31 20 6919181 või tellimusega e-kirja teel: purchase.orders@leica-microsystems.com.

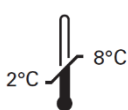
11 Ajalugu

Kasutusjuhise (IfU) versioon	Väljaandmise kuupäev	Muudatused
2.4	2016-SEP-27	Eemaldatakse tunnuslause „Patoloogia ettevõtte“
3.0	April 2022	Värskendus kooskõlas in vitro diagnostika (IVD) määrustega

Kit de digestion tissulaire II

REF KBI-60004

Contient un volume suffisant jusqu'à 25 ou 5x5 tests



Kreatech Biotechnology B.V.
Vlierweg 20
1032 LG Amsterdam
Pays-Bas
www.LeicaBiosystems.com



1 Utilisation/objectif prévu

L'Hybridation in situ en fluorescence (FISH) identifie ou étiquette des séquences génomiques cibles pour permettre l'étude de leur localisation. Des séquences d'ADN provenant des sondes spécifiques des chromosomes appropriées sont d'abord marquées avec des molécules rapporteurs. La sonde d'ADN marquée est ensuite hybridée aux chromosomes en métaphase ou aux noyaux en interphase d'une lame. Après lavage, l'échantillon est analysé par la microscopie en fluorescence pour y déceler les molécules rapporteurs.

Ce kit de pré-traitement est développé spécialement pour obtenir des résultats optimaux sur des tissus fixés au formol et enrobés de paraffine (FFPE) difficiles ou fortement réticulés (ex. : fixation plus longue ou stockage prolongé).

Ce produit est destiné à un usage de diagnostic in vitro.

2 Description du produit

Ce kit de pré-traitement est destiné aux hybridations FISH non automatisées développées spécialement pour être utilisées dans le pré-traitement et la digestion enzymatique des FFPE avant la procédure d'hybridation FISH de l'ADN. Ce kit est développé spécialement pour obtenir des résultats optimaux sur des tissus FFPE difficiles ou fortement réticulés. L'utilisation de ce kit inversera la réticulation dans les tissus, perméabilisera la membrane cellulaire et digérera les protéines cellulaires pour assouplir la liaison des sondes FISH avec un ADN cellulaire spécifique.

3 Mode d'emploi

3.1 Échantillons

Ce kit de pré-traitement est développé spécialement pour obtenir des résultats optimaux sur des tissus fixés au formol et enrobés de paraffine (FFPE) difficiles ou fortement réticulés (ex. : fixation plus longue ou stockage prolongé).

Pré-analyse des échantillons : Pour obtenir une bonne FISH, les analyses préalables jouent un rôle essentiel. L'échantillon doit être correctement fixé et enrobé de paraffine selon un protocole bien établi. Une fixation excessive ou une fixation insuffisante peut entraîner l'échec de la procédure FISH ou tout au moins une faible reproductibilité/intensité du signal. Les sondes FISH Kreatech™ ont été testées sur des coupes de tissus FFPE qui ont été coupées à 3-6 µm. Les blocs de tissus et les lames coupées doivent être conservés dans les conditions de stockage et de manipulation recommandées pour obtenir des résultats optimaux, voir le site Web de Leica. Le séchage peut être réalisé soit sur BOND en utilisant le protocole *Bake and Dewax soit séparément dans un four ou un incubateur. La température et le temps de séchage recommandés vont jusqu'à 16 heures à 56 °C, ou 60 - 120 min à 80 °C.

3.2 Pré-traitement

Monter les coupes de tissus fixés au formol et enrobés de paraffine de 3 - 6 µm sur des lames chargées positivement (ex. : aminoalkylsilane). Le protocole suivant est destiné à l'utilisation de 5 lames dans une jarre de coplin droite de 50 ml.

1. Sécher les lames montées pendant 2 heures à 80 °C ou pendant 16 heures à 56 °C.
2. Déparaffiner les lames chaudes en les trempant dans du xylène ou un substitut de xylène deux fois pendant 10 minutes (min).
3. Les réhydrater en les trempant dans de l'éthanol à 100%, à 85% et à 70% pendant 3 min à chaque fois.

4. Laver à la dH₂O pendant 3 min à la température ambiante (TA).
5. Pré-traiter avec 50 ml de 0,2 M HCl (LK-099B) pendant 20 min à la TA, et ensuite laver à la dH₂O pendant 3 min à la TA.
6. Placer les lames dans 50 ml d'une solution de pré-traitement B (8% thiocyanate de sodium) (LK-100B) à 80 °C pendant 30 min.
7. Rincer dans 50 ml de 2 x SSC (LK-104B) pendant 3 min à la TA.
8. Couvrir les coupes de paraffine avec une solution de pepsine (LK-101B) d'environ 200 µl et incubé à la TA pendant 5 - 50 min (le temps dépend de la fixation des tissus et du type de tissu. Ex. : la plupart des tissus cancéreux du sein nécessitent une digestion de 5 - 15 min ; les tissus du colon 20 - 30 min).
9. Laver dans de la dH₂O pendant 1 min.
10. Laver dans 50 ml de 2 x SSC (LK-104B) pendant 5 min à la TA.
11. Déshydrater les lames en les trempant dans de l'éthanol à 70%, à 85%, et à 100% pendant 1 min à chaque fois. Sécher à l'air. Procéder à la **Préparation des sondes**.

3.3 Préparation des sondes :

Les sondes FISH Kreotech™ pour les tissus enrobés de paraffine sont fournies prêtes à l'emploi sauf indication contraire dans la documentation du produit. Consulter l'étiquette du récipient et la notice de la sonde spécifique concernant les détails de la dilution.

3.4 Co-dénaturation

Appliquer 10 µl de sonde pour un champ de 22 x 22 mm. Couvrir avec un couvre-lame en verre et sceller avec du Fixogum ou une colle polymère. Dénaturer l'échantillon et la sonde sur un ThermoBrite (TS-01/02) à 80 ± 1 °C pendant 5 min. Continuer avec l'**Hybridation**.

3.5 Hybridation :

Incuber pendant la nuit à 37 ± 1 °C dans un ThermoBrite (TS-01/02) ou dans une chambre humidifiée.

3.6 Lavage post-hybridation :

1. Préchauffer 50 ml de Wash Buffer I (0,4 x SSC / 0,3% Igepal) (LK-102) à 72 °C
2. Enlever la colle polymère.
3. Placer les lames dans 50 ml de Wash Buffer II (2 x SSC / 0,1% Igepal) (LK-103), incubé pendant 2 min à la TA. Glisser les couvre-lames. Réutiliser le wash buffer une seule fois pour un total de 10 lames.
4. Placer les lames dans 50 ml de Wash Buffer I pré-chauffé (0,4 x SSC / 0,3% Igepal) (LK-102), incubé pendant 2 min à 72 °C (+/- 1 °C) sans agiter. Réutiliser le wash buffer une seule fois pour un total de 10 lames.
5. Placer les lames dans 50 ml de Wash Buffer II frais (2 x SSC / 0,1% Igepal) (LK-103), incubé pendant 1 min à la TA sans agiter. Réutiliser le wash buffer une seule fois pour un total de 10 lames.
6. Déshydrater dans de l'éthanol frais à 70%, à 85% et à 100%, incubé pendant 1 min à chaque fois à la TA. Sécher à l'air à la TA et procéder à la **Contre-coloration**.

3.7 Contre-coloration :

Appliquer 15 µl de contre-coloration au DAPI (DAPI/Antifade 1 µg/ml) (LK-096B) ou une dilution à l'aide d'un diluent de contre-coloration (LK097B) et mettre une couvre-lame en verre. Poursuivre avec la microscopie.

3.8 Recommandations procédurales :

Vérifier la digestion et le pré-traitement des protéines en appliquant 15 µl de contre-coloration au DAPI et évaluer les lames à l'aide d'un microscope à fluorescence équipé d'un filtre DAPI. Si un échantillon n'est pas suffisamment digéré : enlever le couvre-lame et tremper le tissu dans du 2 x SSC (LK-104B) pendant 2 min et prolonger la digestion des protéines. Si l'échantillon est digéré de façon excessive, utiliser un échantillon frais et réduire le temps de digestion des protéines.

La température et la concentration du buffer (stringence) de l'hybridation et du lavage sont importantes, car une stringence faible peut entraîner une liaison non spécifique de la sonde aux autres séquences, et une stringence élevée peut entraîner l'absence de signal. Une dénaturation incomplète de l'ADN cible peut entraîner l'absence de signal.

3.9 Recommandations pour la microscopie en fluorescence

Pour une visualisation optimale, utiliser un microscope bien entretenu et régulièrement calibré équipé d'une lampe à mercure de 100 W ou d'une autre source de lumière appropriée (ex. : Ampoule aux halogénures (120 W X-cite) ou des sources de lumière à base de LED) et un objectif à fluorescence 63x ou 100x. Des filtres passe-bande triples (DAPI/FITC/Cy3 ou DAPI/FITC/TRITC) sont utilisés pour visualiser plusieurs couleurs, les filtres passe-bande uniques sont utilisés pour la visualisation d'une couleur individuelle. Voir le site Web de Leica pour les recommandations concernant les filtres adaptés à chaque marque de microscope : <http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/kreatech-fish-probes/>

Excitation adéquate et plage d'émission pour les fluorochromes Kreatech™ :

Fluorochromes	Excitation	émission
DAPI	360 ±20 nm	460 ±30 nm
PlatinumBright™ 415	429 ±15 nm	470 ±15 nm
PlatinumBright™ 495	495 ±10 nm	517 ±10 nm
PlatinumBright™ 550	550 ±10 nm	580 ±10 nm

La bande passante montrée correspond à 80% de l'excitation/émission maximale du fluorochrome)

4 Performance analytique

La performance du kit de digestion tissulaire II a été établie en utilisant les procédures décrites dans ce mode d'emploi. Les modifications faites à ces procédures peuvent altérer la réalisation de l'analyse. Tout écart par rapport aux protocoles indiqués doit être validé par l'utilisateur. Les utilisateurs qui s'écartent des procédures de test recommandées doivent accepter la responsabilité de l'interprétation des résultats du patient dans ces circonstances. Les temps d'incubation requis par le protocole peuvent changer en fonction de la variation de la fixation et du traitement. Par ailleurs, la durée d'incubation de la pepsine devra éventuellement être optimisée selon le traitement et les conditions de fixation.

5 Matériel nécessaire et fourni avec le produit

Référence #	Description	Volume
LK-096B	DAPI/Antifade 1 µg/ml (Contre-coloration au DAPI)	0,5 ml
LK-097B	Antifade (Diluent de contre-coloration)	0,5 ml
LK-099B	0,2 M HCl	250 ml
LK-100B	Thiocyanate de sodium 8% (Solution de pré-traitement B)	250 ml
LK-101B	Solution de pepsine	5 ml
LK-102B*	0,4 x SSC / 0,3% Igepal (Wash Buffer I)	250 ml
LK-103B*	2 x SSC / 0,1% Igepal (Wash Buffer II)	2 x 250 ml
LK-104B	2 x SSC	2 x 250 ml

*Veuillez noter que les produits LK-102 et LK-103 contenant le même nombre, mais des lettres différentes sont identiques sauf pour le volume. A= 100 ml, B=250 ml

6 Matériel nécessaire et non fourni avec le produit

- Xylène
- Éthanol 100%, 85% et 70%
- Fixogum (LK-071A) ou colle polymère
- Plaque chauffante avec un contrôle précis de la température jusqu'à 80 °C ou ThermoBrite™ (TS01/TS02)
- Incubateur avec une plage de température précise de 37 - 56 °C
- Bain-marie avec une plage de température précise de 37 - 80 °C
- Jarres de coplin en plastique et en verre
- Micropipettes variables (1 µl - 200 µl)
- Microscope à fluorescence équipé de filtres adéquats (voir Recommandations pour la microscopie en fluorescence).

7 Avertissement et précautions

- Tout incident grave survenu en rapport avec le dispositif doit être signalé au fabricant et à l'autorité compétente de l'État membre dans lequel l'utilisateur et/ou le patient est établi.
- Diagnostic in vitro. Réservé uniquement à l'usage des professionnels de laboratoire. En cas d'urgence, vérifier les fiches FDS pour des informations relatives à la sécurité.
- Le kit est destinée à être utilisée uniquement avant et après l'hybridation FISH de l'ADN sur des tissus FFPE. Ce produit n'est pas destiné à être utilisé pour des tissus congelés.
- Destiné uniquement au pré-traitement et à l'hybridation FISH non automatisés.
- Tout le matériel doit être éliminé conformément aux directives de votre établissement concernant l'élimination des déchets hospitaliers.
- L'utilisation du kit de digestion tissulaire I KBI-60007 est recommandé pour être utilisé avec des échantillons FFPE conventionnelles.
- Pour les cellules ou autres échantillons cytologiques en métaphase et en interphase, il est recommandé d'utiliser le kit de pré-traitement KBI-60005 ou KBI-60006.

Étiquetage conformément à la réglementation (EC) No 1272/2008

Référence #	Description	Mot d'avertissement	Pictogramme	Mentions de danger
LK-096B	DAPI/Antifade 1 µg/ml (Contre-coloration au DAPI)	Avertissement		H315, H319, H335
LK-097B	Antifade (Diluent de contre-coloration)	Avertissement		H315, H319, H335
LK-099B	0,2 M HCl	S.O.	S.O.	S.O.
LK-100B	Thiocyanate de sodium 8% (Solution de pré-traitement B)	S.O.	S.O.	S.O.
LK-101B	Solution de pepsine	S.O.	S.O.	S.O.
LK-102B	0,4 x SSC / 0,3% Igepal (Wash Buffer I)	S.O.	S.O.	S.O.
LK-103B	2 x SSC / 0,1% Igepal (Wash Buffer II)	S.O.	S.O.	S.O.
LK-104B	2 x SSC	S.O.	S.O.	S.O.

Mentions de danger

H315 – Provoque une irritation cutanée.

H319 – Provoque une sévère irritation des yeux.

H335 – Peut irriter les voies respiratoires.

Conseils de prudence Prévention

P271 – Utiliser seulement en plein air ou dans un endroit bien ventilé.

P261 – Éviter de respirer les brouillards/vapeurs/aérosols.

P264 – Laver soigneusement toutes les zones corporelles externes exposées après manipulation.

P280 – Porter des gants de protection, des vêtements de protection, un équipement de protection des yeux et du visage.

Conseils de prudence Réponse

P305 + P351 + P338 – EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.

P312 – Appeler un CENTRE ANTIDOTAGE, un médecin ou un secouriste, en cas de malaise.

P337+P313 – Si l'irritation oculaire persiste : consulter un médecin.

P302+P352 – EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : Laver abondamment à l'eau et au savon.

P304+P340 – EN CAS D'INHALATION : Transporter la personne à l'extérieur et la maintenir dans une position où elle peut confortablement respirer.

P332+P313 – En cas d'irritation cutanée : consulter un médecin.

P362+P364 – Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation.

Mentions de danger supplémentaires : aucune
Réservé aux utilisateurs professionnels de laboratoire

Légende

	Contient des substances dangereuses
	Pays de fabrication
	Ne pas utiliser si l'emballage est endommagé
	Consulter le mode d'emploi électronique (eME)

8 Stockage et manipulation des réactifs

Protéger DAPI/Antifade de la lumière forte et directe. Conserver à une température comprise entre 2 et 8 °C. Le produit, s'il n'est pas ouvert, reste stable dans ces conditions jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du récipient.

Replacer les réactifs non dilués et dilués à une température comprise entre 2 °C et 8 °C immédiatement après utilisation.

Après ouverture, les produits restent stables jusqu'à 18 mois, mais pas au-delà de la date de péremption de chaque produit individuel. Après ce délai, l'utilisation des solutions pourrait donner des résultats insatisfaisants.

9 Assistance technique

Une assistance technique est disponible à www.leicabiosystems.com ou par e-mail : Kreatech.Support@Leicabiosystems.com. Veuillez nous contacter si vous n'obtenez pas les résultats souhaités ou si des anomalies apparaissent lors de l'utilisation de ce produit.

Une copie papier imprimée du ME peut être demandée par e-mail en contactant : LBSAMS-IFU@leicabiosystems.com



Le eME est disponible dans d'autres langues et peut être téléchargé à partir de : www.leicabiosystems.com

10 Service client

Les sondes Kreatech peuvent être commandées via le service client de Leica +31 20 6919181 ou par e-mail : purchase.orders@leica-microsystems.com.

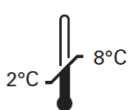
11 Historique

Version du ME	Date de publication	Modifications
2,4	2016-SEP-27	Supprimer le tagline « The pathology Company »
3,0	Avril 2022	Mise à jour conformément à la réglementation IVD

Pribor za digestiju tkiva II

REF KBI-60004

Sadrži dovoljan volumen za do 25 ili 5 x 5 testova



Kreatech Biotechnology B.V.
Vlierweg 20
1032 LG Amsterdam
Nizozemska
www.LeicaBiosystems.com



1 Namjena/svrha

Fluorescencijska in situ hibridizacija (FISH) identificira ili označava ciljane genomske sekvence kako bi se njihov položaj mogao proučavati. DNK sekvence iz odgovarajućih kromosomskih specifičnih sonde prvo su obilježene reporterskim molekulama. Obilježena DNA sonda zatim se hibridizira metafaznim kromosomima ili interfaznim jezgrama na stakalcu. Nakon ispiranja, u uzorku se fluorescencijskom mikroskopijom pregledava prisutnost reporterskih molekula.

Ovaj komplet za prethodnu obradu posebno je razvijen za postizanje optimalnih rezultata na jako umreženim ili teškim tkivima fiksiranim u formalinu i uklopljenima u parafin (FFPE) (npr. dulja fiksacija ili dulje skladištenje).

Ovaj je proizvod namijenjen za in vitro dijagnostičku uporabu.

2 Opis proizvoda

Ovaj komplet za prethodnu obradu je za neautomatizirane FISH hibridizacije posebno razvijene za uporabu za prethodnu obradu i enzimsku digestiju FFPE-a prije postupka FISH hibridizacije DNK. Ovaj komplet za prethodnu obradu posebno je razvijen za postizanje optimalnih rezultata na jako umreženim ili teškim FFPE tkivima. Uporaba kompleta prekinut će poprečne veze u tkivu, permeabilizirati staničnu membranu i digestirati stanične proteine kako bi se olakšalo vezanje FISH sonde sa specifičnom staničnom DNK.

3 Upute za uporabu

3.1 Uzorci

Ovaj komplet za prethodnu obradu posebno je razvijen za postizanje optimalnih rezultata na jako umreženim ili teškim tkivima fiksiranim u formalinu i uklopljenima u parafin (FFPE) (npr. dulja fiksacija ili dulje skladištenje). Predanalitika uzoraka: Za postizanje uspješne FISH hibridizacije predanalitika igra glavnu ulogu. Uzorak treba biti ispravno fiksiran i uklopljen u parafinski vosak prema dobro utvrđenom protokolu. Prekomjerna ili nedovoljna fiksacija može uzrokovati neuspjeh FISH postupka ili nisku ponovljivost/intenzitet signala. Kreatech™ FISH sonde testirane su na FFPE presjecima tkiva koji su izrezani na 3 – 6 µm. Blokovi tkiva i izrezana stakalca trebaju biti pohranjeni u skladu s preporučenim uvjetima skladištenja i rukovanja za optimalne rezultate, pogledajte mrežnu stranicu tvrtke Leica. Toplinska obrada može se obaviti ili na BOND-u uporabom *Bake and Dewax protokola ili zasebno u pećnici ili inkubatoru. Preporučena temperatura i vrijeme toplinske obrade je do 16 sati na 56 °C, odnosno 60 – 120 min na 80 °C.

3.2 Prethodna obrada

Postavite formalinom fiksirane odsječke tkiva veličine 3 – 6 µm uklopljene u parafin na pozitivno nabijena stakalca (npr. aminoalkilsilan). Protokol u nastavku je za korištenje 5 stakalca u uspravnoj posudi za uzorke od 50 ml.

1. Pecite postavljena stakalca 2 sata na 80 °C ili 16 sati na 56 °C.
2. Deparafinirajte toplu stakalca namakanjem u ksilen u dva puta po 10 minuta (min).
3. Rehidratizirajte namakanjem u 100 %, 85 % i 70 % etanolu po 3 minute.
4. Ispirati s dH₂O 3 minute na sobnoj temperaturi.
5. Predtretirati s 50 ml 0,2 M HCl (LK-099B) tijekom 20 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim ispirati u dH₂O 3 minute na sobnoj temperaturi.
6. Stavite stakalce u 50 ml otopine za prethodnu obradu B (8 % natrijeva tiocijanata) (LK-100B) na 80 °C tijekom 30 minuta.

7. Isperite u 50 ml 2 x SSC (LK-104B) 3 minute na sobnoj temperaturi.
8. Pokrijte parafinski dio s približno 200 µl otopine pepsina (LK-101B) i inkubirajte na sobnoj temperaturi 5 – 50 minuta (vrijeme ovisi o fiksaciji tkiva i vrsti tkiva. Npr. većini tkiva raka dojke potrebno je 5 – 15 minuta digestije; tkivo debelog crijeva 20 – 30 min).
9. Isperite u dH₂O 1 minutu.
10. Isperite u 50 ml 2 x SSC (LK-104B) 5 minuta na sobnoj temperaturi.
11. Dehidrirajte stakalce namakanjem u 70 %, 85 % i 100 % etanolu po 1 minutu. Osušite na zraku. Nastavite s **pripremom sonde**.

3.3 Priprema sonde:

Kreatech™ FISH sonde za tkivo uklopljene u parafin isporučuju se spremne za uporabu, osim ako nije drukčije navedeno u dokumentaciji proizvoda. Pojediniosti o razrjeđivanju potražite na naljepnici na bočici i umetku paketa sonde.

3.4 Zajedničko denaturiranje

Nanesite 10 µl sonde na polje 22 x 22 mm. Pokrijte pokrivnim staklom i zatvorite Fixogumom ili gumenim cementom. Denaturirajte uzorak i sondu pomoću sustava ThermoBrite (TS-01/02) na 80 ±1 °C tijekom 5 minuta. Nastavite s **hibridizacijom**.

3.5 Hibridizacija:

Inkubirajte preko noći na 37 ±1 °C pomoću sustava ThermoBrite (TS-01/02) ili u vlažnoj komori.

3.6 Ispiranje nakon hibridizacije:

1. Prethodno zagrijte 50 ml pufera za ispiranje I (0,4 x SSC / 0,3 % Igepal) (LK-102) na 72 °C
2. Uklonite gumeni cement.
3. Stavite stakalca u 50 ml pufera za ispiranje II (2 x SSC / 0,1 % Igepal) (LK-103), inkubirajte 2 minute na sobnoj temperaturi. Uklonite pokrovno staklo. Ponovno upotrijebite pufer za ispiranje samo jednom za ukupno 10 stakalca.
4. Stavite stakalca u 50 ml prethodno zagrijanog pufera za ispiranje I (0,4 x SSC / 0,3 % Igepal) (LK-102), inkubirajte 2 minute na 72 °C (+/- 1 °C) bez pomicanja. Ponovno upotrijebite pufer za ispiranje samo jednom za ukupno 10 stakalca.
5. Stavite stakalca u 50 ml svježeg pufera za ispiranje II (2 x SSC / 0,1 % Igepal) (LK-103), inkubirajte 1 minutu na sobnoj temperaturi bez pomicanja. Ponovno upotrijebite pufer za ispiranje samo jednom za ukupno 10 stakalca.
6. Dehidrirajte u svježem 70 %, 85 % i 100 % etanolu, inkubirajte 1 minutu svaki na sobnoj temperaturi. Osušite na zraku na sobnoj temperaturi i nastavite s **protuboženjem**.

3.7 Protuboženje:

Nanesite 15 µl DAPI protuboje (DAPI/Antifade 1 µg/ml) (LK-096B) ili razrijeđenu otopinu pomoću razrjeđivača za protuboju (LK097B) i nanesite pokrovno staklo. Nastavite s pregledom mikroskopom.

3.8 Preporuke vezane uz postupak:

Provjerite digestiju proteina i prethodnu obradu primjenom 15 µl DAPI protuboje i procijenite stakalca pomoću fluorescencijskog mikroskopa opremljenog DAPI filtrom. Ako uzorak nije dovoljno digestiran: uklonite pokrovno staklo i namočite tkivo u 2 x SSC (LK-104B) na 2 minute i produžite digestiju proteina. Ako je uzorak previše digestiran, upotrijebite svježiji uzorak i skratite vrijeme digestije proteina.

Temperatura i koncentracija pufera (stringentnost) hibridizacije i ispiranja su važni jer niža stringentnost može rezultirati nespecifičnim vezanjem sonde za druge sekvence, a veća stringentnost može rezultirati nedostatkom signala. Nepotpuna denaturacija ciljne DNK može rezultirati nedostatkom signala.

3.9 Preporuke za fluorescencijsku mikroskopiju

Za optimalnu vizualizaciju koristite dobro održavan i redovito kalibriran mikroskop opremljen živinom svjetiljkom od 100 W ili drugim odgovarajućim izvorom svjetlosti (npr. metalhalogenim žaruljama (120 W X-cite) ili LED izvorima svjetlosti) i fluorescencijskim objektivom od 63 x ili 100 x. Trostruki pojasno-propusni filtri (DAPI/FITC/Cy3 ili DAPI/FITC/TRITC) koriste se za prikaz više boja, a jednostruki pojasno-propusni filtri koriste

se za vizualizaciju pojedinačnih boja. Pogledajte mrežnu stranicu tvrtke Leica za preporuke o odgovarajućim filtrima za svaku robnu marku mikroskopa: <http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/kreatech-fish-probes/>

Prikladan raspon pobude i emisije za Kreatech™ fluorofores:

Fluorofor	Pobuda	Emisija
DAPI	360 ±20 nm	460 ±30 nm
PlatinumBright™ 415	429 ±15 nm	470 ±15 nm
PlatinumBright™ 495	495 ±10 nm	517 ±10 nm
PlatinumBright™ 550	550 ±10 nm	580 ±10 nm

Prikazana širina pojasa odgovara 80 % maksimalne pobude/emisije fluorofores.

4 Analitička učinkovitost

Učinkovitost Pribora za digestaciju tkiva II utvrđena je korištenjem postupaka opisanih u ovim uputama za uporabu. Izmjene ovih postupaka mogu promijeniti učinkovitost testa. Korisnik mora potvrditi sva odstupanja od propisanih protokola. Korisnici koji odstupaju od preporučenih postupaka ispitivanja moraju prihvatiti odgovornost za tumačenje rezultata pacijenata u tim okolnostima. Vrijeme protokola može varirati zbog varijacija u fiksiranju i obradi. Osim toga, vrijeme inkubacije pepsina može zahtijevati optimizaciju ovisno o uvjetima obrade i fiksacije.

5 Potrebni materijali koji se isporučuju s proizvodom

Šifra #	Opis	Volumen
LK-096B	DAPI/Antifade 1 µg/ml (DAPI protuboja)	0,5 ml
LK-097B	Antifade (Razrjeđivač protuboje)	0,5 ml
LK-099B	0.2 M HCl	250 ml
LK-100B	8 % natrijev tiocijanat (Otopina za predtretman B)	250 ml
LK-101B	Otopina pepsina	5 ml
LK-102B*	0,4 x SSC / 0,3 % Igepal (Pufer za ispiranje I)	250 ml
LK-103B*	2 x SSC / 0,1 % Igepal (Pufer za ispiranje II)	2 x 250 ml
LK-104B	2 x SSC	2 x 250 ml

* Napomena: Proizvodi LK-102 i LK-103 koji sadrže isti broj, ali različita slova identični osim volumena. A = 100 ml, B = 250 ml

6 Potrebni materijali koji se ne isporučuju s proizvodom

- Ksilen
- Etanol 100 %, 85 % i 70 %
- Fixogum (LK-071A) ili gumeni cement
- Grijača ploča s preciznom kontrolom temperature do 80 °C ili ThermoBrite™ (TS01/TS02)
- Inkubator s preciznim temperaturnim rasponom od 37 do 56 °C
- Vođena kupka s preciznim temperaturnim rasponom od 37 do 80 °C
- Plastične i staklene posude za uzorke
- Varijabilne mikropipete (1 µl – 200 µl)
- Fluorescencijski mikroskop opremljen odgovarajućim filtrima (vidi preporuke za fluorescencijsku mikroskopiju).

7 Upozorenje i mjere opreza

- Svaki ozbiljan incident koji se dogodio u vezi s uređajem prijavljuje se proizvođaču i nadležnom tijelu države članice u kojoj korisnik i/ili pacijent ima sjedište.
- Za in vitro dijagnostičku uporabu. Isključivo za profesionalnu uporabu u laboratoriju. U slučaju nužde provjerite sigurnosne informacije u STL listovima.
- Komplet je namijenjen za korištenje isključivo prije i nakon DNA FISH na FFPE tkivu. Ovaj proizvod nije namijenjen za uporabu na smrznutom tkivu.

- Samo za neautomatiziranu FISH prethodnu obradu i hibridizaciju.
- Sav materijal treba zbrinuti u skladu sa smjernicama vaše ustanove za zbrinjavanje bolničkog otpada.
- KBI-60007 Komplet za digestaciju tkiva I preporučuje se za korištenje s konvencionalnim FFPE uzorcima.
- Za metafazne i interfazne stanice ili druge citološke uzorke preporučuje se korištenje kompleta za prethodnu obradu KBI-60005 ili KBI-60006.

Označivanje u skladu s Uredbom (EZ) br. 1272/2008

Šifra #	Opis	Signalna riječ	Piktogram	Obavijesti o opasnostima
LK-096B	DAPI/Antifade 1 µg/ml (DAPI protuboja)	Upozorenje:		H315, H319, H335
LK-097B	Antifade (Razrjeđivač protuboje)	Upozorenje:		H315, H319, H335
LK-099B	0.2 M HCl	Nije primjenjivo.	Nije primjenjivo.	Nije primjenjivo.
LK-100B	8 % natrijev tiocijanat (Otopina za predtretman B)	Nije primjenjivo.	Nije primjenjivo.	Nije primjenjivo.
LK-101B	Otopina pepsina	Nije primjenjivo.	Nije primjenjivo.	Nije primjenjivo.
LK-102B	0,4 x SSC / 0,3 % Igepal (Pufer za ispiranje I)	Nije primjenjivo.	Nije primjenjivo.	Nije primjenjivo.
LK-103B	2 x SSC / 0,1 % Igepal (Pufer za ispiranje II)	Nije primjenjivo.	Nije primjenjivo.	Nije primjenjivo.
LK-104B	2 x SSC	Nije primjenjivo.	Nije primjenjivo.	Nije primjenjivo.

Obavijest(i) o opasnostima

H315 – Nadražuje kožu.

H319 – Uzrokuje jako nadraživanje oka.

H335 – Može nadražiti dišni sustav.

Obavijest(i) o mjerama opreza Prevenirica

P271 – Rabiti samo na otvorenom ili u dobro prozračenom prostoru.

P261 – Izbjegavati udisanje magle/pare/aerosola.

P264 – Nakon uporabe temeljito oprati sve izložene vanjske dijelove tijela.

P280 – Nositi zaštitne rukavice, zaštitno odijelo, zaštitu za oči i zaštitu za lice.

Obavijest(i) o mjerama opreza Odgovor

P305+P351+P338 – U SLUČAJU DODIRA S OČIMA: Oprezno ispirati vodom nekoliko minuta. Ukloniti kontaktne leće ako ih nosite i ako se one lako uklanjaju. Nastaviti ispiranje.

P312 – U slučaju zdravstvenih tegoba nazvati CENTAR ZA KONTROLU OTROVANJA / liječnika / hitnu pomoć

P337+P313 – Ako nadražaj oka ne prestaje: Zatražiti savjet/pomoć liječnika.

P302+P352 – U SLUČAJU DODIRA S KOŽOM: Oprati velikom količinom vode i sapunom.

P304+P340 – AKO SE UDIŠE: Premjestiti osobu na svjež zrak i postaviti ju u položaj koji olakšava disanje.

P332+P313 – U slučaju nadražaja kože: Zatražiti savjet/pomoć liječnika.

P362+P364 – Skinuti zagađenu odjeću i oprati ju prije ponovne uporabe.

Dopunske obavijesti o opasnostima: nema

Ograničeno na stručne korisnike u laboratorijima.

Objašnjenje značenja simbola.

	Sadrži opasne tvari.
	Zemlja proizvodnje.
	Nemojte koristiti paket ako je oštećen.
	Pogledajte elektroničke UU (eUU).

8 Skladištenje reagensa i rukovanje

Zaštititi DAPI/Antifade od jake i izravne svjetlosti. Čuvati na temperaturi 2 – 8 °C. Neotvoreni proizvod stabilan je u ovim uvjetima do roka valjanosti navedenog na naljepnici bočice.

Nerazrijeđene i razrijeđene reagentse vratiti na 2 – 8 °C odmah nakon uporabe.

Nakon otvaranja proizvoda su stabilni do 18 mjeseci, ali nikad duže od roka valjanosti svakog pojedinog proizvoda. Nakon tog vremenskog razdoblja uporaba otopina može rezultirati suboptimalnim rezultatima.

9 Tehnička podrška

Tehnička podrška dostupna je na www.leicabiosystems.com ili putem e-pošte: Kreatech.Support@Leicabiosystems.com. Kontaktirajte nas ako ne dobijete željene rezultate ili se pojave bilo kakve anomalije prilikom korištenja ovog proizvoda.

Papirnati tiskani primjerak UU možete zatražiti putem e-pošte: LBSAMS-IFU@leicabiosystems.com



Dokument eUU je dostupan na dodatnim jezicima i može se preuzeti na: www.leicabiosystems.com

10 Korisnička služba

Kreatech sonde se mogu naručiti putem korisničke službe tvrtke Leica +31 20 6919181 ili putem e-pošte: purchase.orders@leica-microsystems.com.

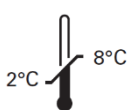
11 Povijest

Verzija UU	Datum izdanja	Izmjene
2,4	2016-SEP-27	Uklonjen slogan „Društvo za patologiju“
3,0	Travanj 2022.	Ažuriranje u skladu s propisima o IVD-u

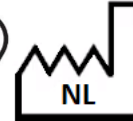
Szövetemésztő kit II

REF KBI-60004

25 vagy 5 × 5 teszthez elegendő térfogatot tartalmaz



Kreatech Biotechnology B.V.
Vlierweg 20
1032 LG Amsterdam
Hollandia
www.LeicaBiosystems.com



1 Alkalmazási terület/cél

A fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH) azonosítja vagy megjelöli a cél-genomszekvenciákat, hogy azok helyét tanulmányozni lehessen. A megfelelő kromoszóma-specifikus próbából származó DNS-szekvenciákat először riportermolekulákkal jelölik. A megjelölt DNS-próbát ezután metafázisos kromoszómákkal vagy interfázisos sejtmagokkal hibridizálják egy tárgylemezen. Mosás után fluoreszcens mikroszkóppal vizsgálják a riportermolekulák jelenlétét a mintában.

Ezt az előkezelő kitet kifejezetten az erősen keresztkötött vagy nehéz, formalinban fixált, paraffinba ágyazott szövetek (FFPE) optimális eredményeinek eléréséhez fejlesztették ki (pl. hosszabb fixálás vagy elhúzódó tárolás).

Ez a termék in vitro diagnosztikai felhasználásra szolgál.

2 Termékleírás

Ez az előkezelő kit nem automatizált FISH hibridizációhoz készült, amelyet kifejezetten az FFPE előkezelésre és enzimikus emésztésre való felhasználásra fejlesztettek ki, a DNS FISH hibridizációs eljárás előtt. Ezt a kitet kifejezetten az erősen keresztkötött vagy nehéz FFPE-szövetek optimális eredményeinek eléréséhez fejlesztették ki. A kit használata megfordítja a szövetben lévő keresztkötéseket, permeabilissá teszi a sejtmembránt és emészteti a sejtfehérjéket, hogy megkönnyítse a FISH-próbák kötődését a specifikus sejt-DNS-hez.

3 Használati útmutató

3.1 Minták

Ezt az előkezelő kitet kifejezetten az erősen keresztkötött vagy nehéz, formalinban fixált, paraffinba ágyazott szövetek (FFPE) optimális eredményeinek eléréséhez fejlesztették ki (pl. hosszabb fixálás vagy elhúzódó tárolás).

Minták előanalitikája: A sikeres FISH eredmény elérésében az előanalitika nagy szerepet játszik. A mintát megfelelően kell fixálni és paraffinvaszba ágyazni egy jól megalapozott protokoll szerint. A túlságosan erős vagy gyenge fixálás a FISH-eljárás sikertelenségét, vagy legalábbis alacsony reprodukálhatóságot/jelintenzitást okozhat. A Kreatech™ FISH-próbákat 3–6 µm-es FFPE szövetmetszeteken teszteltük. A szövetblokkokat és a metszeteket az optimális eredmények érdekében az ajánlott tárolási és kezelési feltételek szerint kell tárolni, lásd a Leica weboldalát. A hőkezelés történhet a BOND-on a *Bake and Dewax protokoll használatával, vagy külön kemencében vagy inkubátorban. Az ajánlott hőkezelési hőmérséklet és idő legfeljebb 16 óra 56 °C-on, vagy 60–120 perc 80 °C-on.

3.2 Előkezelés

A 3–6 µm-es, formalinban fixált, paraffinba ágyazott szövetmetszeteket pozitív töltésű tárgylemezekre (pl. aminoalkilszilán) kell helyezni. Az alábbi protokoll 5 tárgylemez használatára vonatkozik egy 50 ml-es függőleges Coplin-edényben.

1. Hőkezelje a rögzített preparátumokat 2 órán át 80 °C-on vagy 16 órán át 56 °C-on.
2. Paraffinmentesítse a meleg tárgylemezeket xilolban vagy xilolpótlóban való áztatással kétszer 10 percig.
3. Rehidratálja 100%-os, 85%-os és 70%-os etanolban való áztatással, egyenként 3 percig.
4. Mossa dH₂O-val 3 percig szobahőmérsékleten.
5. Kezelje elő 50 ml 0,2 M HCl (LK-099B) oldattal 20 percig szobahőmérsékleten, majd mossa dH₂O-ban 3 percig szobahőmérsékleten.

6. Helyezze a tárgylemezeket 50 ml-nyi B előkezelő oldatba (8% nátrium-tiocianát) (LK-100B) 80 °C-on 30 percre.
7. Mossa 50 ml 2 × SSC-ben (LK-104B) 3 percig szobahőmérsékleten.
8. Fedje a paraffinos metszetet kb. 200 µl pepszinoldattal (LK-101B), és inkubálja szobahőmérsékleten 5–50 percig. (Az idő a szövet fixálásától és a szövet típusától függ. Pl. a legtöbb emlőrákszövetnek 5–15 perc emésztésre van szüksége; vastagbéliszövetnek 20–30 percre.)
9. Mossa dH₂O-ban 1 percig.
10. Mossa 50 ml 2 × SSC-ben (LK-104B) 5 percig szobahőmérsékleten.
11. Dehidratálja a tárgylemezeket 70%-os, 85%-os és 100%-os etanolban való áztatással, egyenként 1 percig. Szárítsa meg levegőn. Folytassa a **Próbaelőkészítéssel**.

3.3 Próbaelőkészítés:

A Kreotech™ FISH próbák paraffinba ágyazott szövetekkel való használatra készen (RtU) kerülnek szállításra, hacsak a termékdokumentáció másként nem specifikálja. A hígítási sajátosságokat lásd az injekciós üveg címkéjén és az adott próba betétlapján.

3.4 Egyidejű denaturálás

Alkalmazzon 10 µl próbát 22 × 22 mm-es mezőnként. Fedje le üveg fedőlemezzel, és zárja le Fixogummal vagy gumicementtel. Denaturálja a mintát és a próbát ThermoBrite (TS-01/02) készülékben 80 ± 1 °C-on 5 percig. Folytassa a **Hibridizációval**.

3.5 Hibridizáció:

Inkubálja egy éjszakán át 37 ± 1 °C-on ThermoBrite (TS-01/02) készülékben vagy pára kamrában.

3.6 Hibridizáció utáni mosás:

1. Melegítsen elő 50 ml mosópuffer I-et (0,4 × SSC/0,3% Igepal) (LK-102) 72 °C-ra.
2. Távolítsa el a gumicementet.
3. Helyezze a tárgylemezeket 50 ml mosópuffer II-be (2 × SSC/0,1% Igepal) (LK-103), inkubálja 2 percig szobahőmérsékleten. Csúsztassa le a fedőlemezeket. A mosópuffert csak egyszer használja fel újra, összesen 10 tárgylemezre.
4. Helyezze a tárgylemezeket 50 ml előmelegített mosópuffer I-be (0,4 × SSC/0,3% Igepal) (LK-102), inkubálja 2 percig 72 °C-on (± 1 °C), keverés nélkül. A mosópuffert csak egyszer használja fel újra, összesen 10 tárgylemezre.
5. Helyezze a tárgylemezeket 50 ml friss mosópuffer II-be (2 × SSC/0,1% Igepal) (LK-103), és inkubálja 1 percig szobahőmérsékleten, keverés nélkül. A mosópuffert csak egyszer használja fel újra, összesen 10 tárgylemezre.
6. Dehidratálja friss 70%-os, 85%-os és 100%-os etanolban, inkubálja egyenként 1 percig szobahőmérsékleten. Szárítsa meg levegőn szobahőmérsékleten, és folytassa a **Kontrasztfestéssel**.

3.7 Kontrasztfestés:

Vigyen fel 15 µl DAPI kontrasztfestéket (DAPI/Antifade 1 µg/ml) (LK-096B) vagy ennek hígítását kontrasztfesték-hígítóval (LK097B), és helyezze fel az üveg fedőlemezt. Folytassa a mikroszkópos vizsgálattal.

3.8 Eljárásra vonatkozó ajánlások:

Ellenőrizze a fehérjeemésztést és az előkezelést 15 µl DAPI-kontrasztfesték alkalmazásával, és értékelje ki a tárgylemezeket DAPI-szűrővel felszerelt fluoreszcens mikroszkóp segítségével. Ha a minta nem kellően emésztett: vegye le a fedőlemezt, és áztassa a szövetet 2 × SSC-ben (LK-104B) 2 percig, és hosszabbítsa meg a fehérjeemésztést. Ha a minta túlságosan emésztett, használjon friss mintát, és csökkentse a fehérjeemésztés idejét.

A hibridizáció és a mosás hőmérséklete és pufferkoncentrációja (szigorú pontosság) fontos, mivel az alacsonyabb szigorúság a próba nem specifikus kötődését eredményezheti más szekvenciákhoz, a magasabb szigorúság pedig jelhiányt eredményezhet. A cél-DNS nem teljes denaturációja jelhiányt eredményezhet.

3.9 Ajánlások a fluoreszcens mikroszkópos vizsgálathoz

Az optimális vizualizációhoz használjon jól karbantartott és rendszeresen kalibrált mikroszkópot, amely 100 W-os higanylámpával vagy más megfelelő fényforrással (pl. fémhalogén izzó (120 W-os X-cite) vagy LED-alapú

fényforrás) és 63× vagy 100× fluoreszcens objektívvel van felszerelve. Háromszoros sávszűrő (DAPI/FITC/Cy3 vagy DAPI/FITC/TRITC) használható több szín megjelenítéséhez, egyszeres sávszűrők pedig az egyes színek megjelenítéséhez. Az egyes mikroszkópmárkákhoz megfelelő szűrőkre vonatkozó ajánlásokat a Leica weboldalán találja: <http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/kreatech-fish-probes/>

Megfelelő gerjesztési és emissziós tartomány a Kreatech™ fluorofórokhoz:

Fluorofór	Gerjesztés	Emisszió
DAPI	360 ±20 nm	460 ±30 nm
PlatinumBright™ 415	429 ±15 nm	470 ±15 nm
PlatinumBright™ 495	495 ±10 nm	517 ±10 nm
PlatinumBright™ 550	550 ±10 nm	580 ±10 nm

(A feltüntetett sávszélesség a fluorofór maximális gerjesztési/emissziós értéke 80%-ának felel meg.)

4 Analitikai teljesítmény

A Szövetemésztő kit II teljesítményét a jelen használati utasításban leírt eljárások alkalmazásával állapították meg. Ezen eljárások módosítása megváltoztathatja a vizsgálat teljesítményét. Az utasításokban leírt protokolloktól való bármilyen eltérést a felhasználónak validálnia kell. A tesztelési eljárásoktól való eltérés esetén a felhasználó felelőssége a betegeredmények értelmezése az adott körülmények között. A protokollok végrehajtásához szükséges idő a fixálás és a feldolgozás eltérései miatt változhat. Ezenkívül a pepszin inkubációs ideje a feldolgozási és fixálási körülményektől függően optimalizálást igényelhet.

5 Szükséges és a termékkel együtt biztosított anyagok

Kódszám	Leírás	Térfogat
LK-096B	DAPI/Antifade 1 µg/ml (DAPI Kontrasztfesték)	0,5 ml
LK-097B	Antifade (Kontrasztfesték-hígító)	0,5 ml
LK-099B	0,2 M HCl	250 ml
LK-100B	8% nátrium-tiocianát (B előkezelő oldat)	250 ml
LK-101B	Pepszinoldat	5 ml
LK-102B*	0,4 × SSC/0,3% Igepal (Mosópuffer I)	250 ml
LK-103B*	2 × SSC/0,1% Igepal (Mosópuffer II)	2 × 250 ml
LK-104B	2 × SSC	2 × 250 ml

*Figyelem, az azonos számot, de különböző betűket tartalmazó LK-102 és LK-103 termékek a térfogattól eltekintve azonosak.

A = 100 ml, B = 250 ml

6 Szükséges és a termékkel nem biztosított anyagok

- Xilol
- Etanol 100%, 85% és 70%
- Fixogum (LK-071A) vagy gumicement
- Melegítőlap pontos hőmérséklet-szabályozással 80 °C-ig vagy ThermoBrite™ (TS01/TS02)
- Inkubátor 37–56 °C közötti pontos hőmérséklet-tartománnyal
- Vízfürdő 37–80 °C közötti pontos hőmérséklet-tartománnyal
- Műanyag és üveg Coplin-edények
- Változtatható mikropipetták (1 µl – 200 µl)
- Megfelelő szűrőkkel felszerelt fluoreszcens mikroszkóp (lásd a fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatra vonatkozó ajánlásokat).

7 Figyelmeztetés és óvintézkedések

- Az eszközzel kapcsolatban bekövetkezett minden súlyos eseményt jelenteni kell a gyártónak és a felhasználó és/vagy a beteg székhelye szerinti tagállam illetékes hatóságának.
- In vitro diagnosztikai használatra. Kizárólag professzionális laboratóriumi használatra. Vészhelyzet esetén ellenőrizze az SDS lapokat a biztonsági információkért.

- A kit kizárólag FFPE szöveten végzett DNS FISH előtt és után használható. Ez a termék nem használható fagyasztott szöveteken.
- Kizárólag nem automatizált FISH előkezeléshez és hibridizációhoz.
- Minden anyagot az intézménye kórházi hulladékok ártalmatlanítására vonatkozó irányelveinek megfelelően kell ártalmatlanítani.
- A KBI-60007 Szövetemésztő kit I használata hagyományos FFPE mintákhoz ajánlott.
- Metafázisos és interfázisos sejtek vagy más citológiai minták esetében ajánlott a KBI-60005 vagy KBI-60006 előkezelő kit használata.

Az 1272/2008/EK rendelet szerinti címkézés

Kódszám	Leírás	Jelzőszó	Piktogram	Figyelmeztető mondatok
LK-096B	DAPI/Antifade 1 µg/ml (DAPI Kontrasztfesték)	Figyelem		H315, H319, H335
LK-097B	Antifade (Kontrasztfesték-hígító)	Figyelem		H315, H319, H335
LK-099B	0,2 M HCl	N.A.	N.A.	N.A.
LK-100B	8% nátrium-tiocianát (B előkezelő oldat)	N.A.	N.A.	N.A.
LK-101B	Pepszinoldat	N.A.	N.A.	N.A.
LK-102B	0,4 × SSC/0,3% Igepal (Mosópuffer I)	N.A.	N.A.	N.A.
LK-103B	2 × SSC/0,1% Igepal (Mosópuffer II)	N.A.	N.A.	N.A.
LK-104B	2 × SSC	N.A.	N.A.	N.A.

Figyelmeztető mondatok

H315 – Bőrirritáló hatású.

H319 – Súlyos szemirritációt okoz.

H335 – Légúti irritációt okozhat

Óvintézkedésre vonatkozó mondatok – megelőzés

P271 – Kizárólag szabadban vagy jól szellőző helyiségben használható.

P261 – Kerülje a köd/gőzök/permet belélegzését.

P264 – A használatot követően az expozíciónak kitett külső testrészeket alaposan meg kell mosni.

P280 – Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő használata kötelező.

Óvintézkedésre vonatkozó mondatok – válasz

P305 + P351 + P338 – SZEMBE KERÜLÉS ESETÉN: Óvatos öblítés vízzel több percen keresztül. Adott esetben kontaktlencsék eltávolítása, ha könnyen megoldható. Az öblítés folytatása.

P312 – Rosszullét esetén forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ vagy orvoshoz/elsősegélynyújtó szakemberhez.

P337 + P313 – Ha a szemirritáció nem múlik el: orvosi ellátást kell kérni.

P302 + P352 – HA BŐRRE KERÜL: Lemosás bő szappanos vízzel.

P304 + P340 – BELÉLEGZÉS ESETÉN: Az érintett személyt friss levegőre kell vinni, és olyan nyugalmi testhelyzetbe kell helyezni, hogy könnyen tudjon lélegezni.

P332 + P313 – Bőrirritáció esetén: orvosi ellátást kell kérni.

P362 + P364 – A szennyezett ruhadarabot le kell vetni és újbóli használat előtt ki kell mosni.

Kiegészítő figyelmeztető mondatok: nincsenek

Kizárólag professzionális laboratóriumi felhasználók számára

A szimbólumok magyarázata

	Veszélyes anyagokat tartalmaz
	Gyártás helye szerinti ország
	Ne használja, ha a csomagolás sérült
	Lásd az elektronikus használati útmutatót

8 Reagensek tárolása és kezelése

Védje a DAPI/Antifade-et az erős és közvetlen fénytől. Tárolja 2–8 °C-on. A felbontatlan termék ilyen körülmények között az injekciós üveg címkéjén feltüntetett lejárat dátumig stabil.

A hígítatlan és hígított reagenteket felhasználás után azonnal tegye vissza 2–8 °C-ra.

Felbontás után a termékek legfeljebb 18 hónapig, de legkésőbb az egyes termékek lejárat dátumáig stabilak. Ezen időszak után az oldatok használata szuboptimális eredményekhez vezethet.

9 Műszaki támogatás

A műszaki támogatás a www.leicabiosystems.com címen vagy e-mailben érhető el: Kreatech.Support@Leicabiosystems.com. Kérjük, vegye fel velünk a kapcsolatot, ha a termék használata során nem a kívánt eredményt kapja, vagy bármilyen rendellenesség jelentkezik.

A használati útmutató nyomtatott példánya kérhető e-mailben a következő címen: LBSAMS-IFU@leicabiosystems.com



Az elektronikus használati útmutató további nyelveken is elérhető, amelyek letölthetők a következő honlapról: www.leicabiosystems.com

10 Ügyfélszolgálat

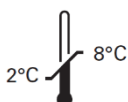
A Kreatech próbák megrendelhetők a Leica ügyfélszolgálatán keresztül (+31 20 6919181) vagy megrendelhetők e-mailben: purchase.orders@leica-microsystems.com.

11 Dokumentumtörténet

Használati útmutató verziója	Kiadás dátuma	Változtatások
2,4	2016-SEP-27	A „The pathology Company” szlogen törlése.
3,0	2022. április	Frissítés az IVD-előírásoknak megfelelően

Kit di digestione dei tessuti II**REF****KBI-60004**

Contiene un volume sufficiente per un massimo di 25 o 5x5 test



Kreatech Biotechnology B.V.
Vlierweg 20
1032 LG Amsterdam
Paesi Bassi
www.LeicaBiosystems.com

**1 Uso previsto/scopo**

L'ibridazione fluorescente in situ (FISH) identifica o etichetta sequenze genomiche target in modo che la loro posizione possa essere studiata. Le sequenze di DNA da sonde specifiche per cromosomi appropriati sono prima marcate con molecole reporter. La sonda di DNA marcata viene poi ibridata ai cromosomi in metafase o ai nuclei in interfase su un vetrino. Dopo il lavaggio, il campione viene esaminato per le molecole reporter mediante microscopia a fluorescenza.

Questo kit di pretrattamento è stato specificamente sviluppato per ottenere risultati ottimali su tessuti fortemente reticolati o difficili fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE) (es. fissazione più lunga o conservazione prolungata).

Il presente prodotto è destinato all'uso diagnostico in vitro.

2 Descrizione del prodotto

Questo kit di pretrattamento è per ibridazioni FISH non automatizzate, specificamente sviluppato per il pretrattamento e la digestione enzimatica di FFPE prima della procedura di ibridazione FISH di DNA. Questo kit di pretrattamento è stato specificamente sviluppato per ottenere risultati ottimali su tessuti fortemente reticolati o difficili fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE). L'uso del kit invertirà i legami incrociati nel tessuto, permeabilizzerà la membrana cellulare e digerirà le proteine cellulari per facilitare il legame delle sonde FISH con il DNA cellulare specifico.

3 Istruzioni per l'uso**3.1 Campioni**

Questo kit di pretrattamento è stato specificamente sviluppato per ottenere risultati ottimali su tessuti fortemente reticolati o difficili fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE) (es. fissazione più lunga o conservazione prolungata).

Pre-analisi dei campioni: Per ottenere una FISH di successo, le pre-analisi giocano un ruolo importante. Il campione dovrebbe essere correttamente fissato e incorporato in cera di paraffina secondo un protocollo ben stabilito. Una fissazione eccessiva o insufficiente può causare il fallimento della procedura FISH o almeno una bassa riproducibilità/intensità del segnale. Le sonde FISH Kreatech™ sono state testate su sezioni di tessuto FFPE tagliate a 3-6 µm. I blocchi di tessuto e i vetrini tagliati devono essere conservati secondo le condizioni di conservazione e manipolazione raccomandate per ottenere risultati ottimali, vedere il sito web Leica. La cottura può essere fatta sia sul BOND usando il protocollo *Bake and Dewax o separatamente in un forno o in un'incubatrice. La temperatura e il tempo di cottura raccomandati sono fino a 16 ore a 56 °C, o 60 - 120 minuti a 80 °C.

3.2 Pretrattamento

Montare sezioni di tessuto incluso in paraffina da 3 - 6 µm su vetrini a carica positiva (ad es. aminoalchilsilano). Il protocollo sottostante è per l'uso di 5 vetrini in un vaso Coplin verticale di 50 ml.

1. Cuocere i vetrini montati per 2 ore a 80 °C o 16 ore a 56 °C.
2. De-paraffinizzare i vetrini caldi immergendoli in xilene o sostituto di xilene per due volte 10 minuti (min).
3. Reidratarli immergendoli in etanolo al 100%, all'85% e al 70% per 3 minuti ciascuno.
4. Lavare con dH2O per 3 minuti a temperatura ambiente (RT).

5. Pretrattare con 50 ml di HCl 0,2 M (LK-099B) per 20 minuti a temperatura ambiente, quindi lavare in dH₂O per 3 minuti a temperatura ambiente.
6. Porre i vetrini in 50 ml di soluzione di pretrattamento B (8% tiocianato di sodio) (LK-100B) a 80 °C per 30 minuti.
7. Sciacquare in 50 ml 2 x SSC (LK-104B) per 3 min a temperatura ambiente.
8. Coprire la sezione di paraffina con circa 200 µl di Soluzione di pepsina (LK-101B) e incubare a RT per 5 - 50 min (il tempo dipende dalla fissazione del tessuto e dal tipo di tessuto. Es. la maggior parte del tessuto del cancro al seno ha bisogno di 5 - 15 min di digestione; il tessuto del colon 20 - 30 min).
9. Lavare in dH₂O per 1 min.
10. Lavare in 50 ml 2 x SSC (LK-104B) per 5 min a temperatura ambiente.
11. Disidratare i vetrini immergendoli in etanolo al 70%, all'85% e al 100% per 1 minuto ogni volta. Asciugare all'aria. Procedere con la **Preparazione della sonda**.

3.3 Preparazione della sonda:

Le sonde FISH Kreatech™ per tessuto incluso in paraffina sono fornite pronte all'uso (RtU), salvo diversa indicazione nella documentazione del prodotto. Consultare l'etichetta sul flaconcino e l'inserito specifico della confezione della sonda per le specifiche di diluizione.

3.4 Co-denaturazione

Applicare 10 µl di sonda per campo di 22 x 22 mm. Coprire con un vetrino di copertura e sigillare con Fixogum o cemento gommato. Denaturare il campione e la sonda su un ThermoBrite (TS-01/02) a 80 ±1 °C per 5 minuti. Continuare con l'**Ibridazione**.

3.5 Ibridazione:

Incubare durante la notte a 37 ±1 °C in un ThermoBrite (TS-01/02) o in una camera umidificata.

3.6 Lavaggio post-ibridazione:

1. Preriscaldare 50 ml di tampone di lavaggio I (0,4 x SSC / 0,3% Igepal) (LK-102) a 72 °C
2. Rimuovere il cemento gommato.
3. Porre i vetrini in 50 ml di tampone di lavaggio II (2 x SSC / 0,1% Igepal) (LK-103), incubare per 2 minuti a temperatura ambiente. Togliere il vetrino coprioggetto. Riutilizzare il tampone di lavaggio solo una volta per un totale di 10 vetrini.
4. Porre i vetrini in 50 ml di tampone di lavaggio I preriscaldato (0,4 x SSC / 0,3% Igepal) (LK-102), incubare per 2 minuti a 72 °C (+/- 1 °C) senza agitazione. Riutilizzare il tampone di lavaggio solo una volta per un totale di 10 vetrini.
5. Mettere i vetrini in 50 ml di tampone di lavaggio II fresco (2 x SSC / 0,1% Igepal) (LK-103), incubare per 1 min. a temperatura ambiente senza agitazione. Riutilizzare il tampone di lavaggio solo una volta per un totale di 10 vetrini.
6. Disidratare in etanolo fresco al 70%, all'85% e al 100%, incubare per 1 minuto ciascuno a temperatura ambiente. Asciugare all'aria a temperatura ambiente e procedere alla **Controcolorazione**.

3.7 Controcolorazione:

Applicare 15 µl di controcolorante DAPI (DAPI/Anti-sbiadimento 1 µg/ml) (LK-096B) o una diluizione di questo usando il diluente per controcoloranti (LK097B) e applicare il vetrino di copertura. Procedere con la microscopia.

3.8 Raccomandazioni procedurali:

Controllare la digestione delle proteine e il pretrattamento applicando 15 µl di controcolorante DAPI e valutare i vetrini utilizzando un microscopio a fluorescenza dotato di un filtro DAPI. Se il campione non è sufficientemente digerito: rimuovere il vetrino di copertura e immergere il tessuto in 2 x SSC (LK-104B) per 2 minuti e prolungare la digestione delle proteine. Se il campione è troppo digerito usare un campione fresco e ridurre il tempo di digestione delle proteine.

La temperatura e la concentrazione del tampone (stringenza) dell'ibridazione e del lavaggio sono importanti, poiché una bassa stringenza può provocare un legame non specifico della sonda ad altre sequenze, mentre una stringenza più alta può provocare una mancanza di segnale. La denaturazione incompleta del DNA bersaglio può portare alla mancanza di segnale.

3.9 Raccomandazioni per la microscopia a fluorescenza

Per una visualizzazione ottimale, utilizzare un microscopio ben mantenuto e regolarmente calibrato, dotato di una lampada a mercurio da 100 W o di un'altra fonte di luce appropriata (ad es. lampadina a ioduri metallici (120W X-cite) o fonti di luce basate su LED) e un obiettivo a fluorescenza 63x o 100x. I filtri passa-banda tripli (DAPI/FITC/Cy3 o DAPI/FITC/TRITC) sono utilizzati per visualizzare più colori, i filtri passa-banda singoli sono utilizzati per la visualizzazione dei singoli colori. Vedere il sito web Leica per le raccomandazioni sui filtri appropriati per ogni marca di microscopio: <http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/kreatech-fish-probes/>

Gamma di eccitazione ed emissione adatta per i fluorofori Kreatech™:

Fluorofori	Eccitazione	Emissione
DAPI	360 ±20 nm	460 ±30 nm
PlatinumBright™ 415	429 ±15 nm	470 ±15 nm
PlatinumBright™ 495	495 ±10 nm	517 ±10 nm
PlatinumBright™ 550	550 ±10 nm	580 ±10 nm

La larghezza di banda indicata corrisponde all'80% della massima eccitazione/emissione del fluoroforo)

4 Prestazioni analitiche

Le prestazioni del Kit di digestione dei tessuti II sono state stabilite utilizzando le procedure descritte in queste istruzioni per l'uso. Modifiche a queste procedure possono alterare le prestazioni del saggio. Qualsiasi deviazione dai protocolli deve essere convalidata dall'utente. Gli utenti che modificano le procedure raccomandate devono assumersi la responsabilità dell'interpretazione dei risultati relativi ai pazienti in tali circostanze. I tempi indicati nel protocollo possono variare in base al diverso tipo di fissazione ed elaborazione.. Inoltre, il tempo di incubazione della pepsina può richiedere un'ottimizzazione a seconda della lavorazione e delle condizioni di fissazione.

5 Materiali richiesti e forniti con il prodotto

Codice n.	Descrizione	Volume
LK-096B	DAPI/Anti-sbiadimento 1 µg/ml (Controcolorante DAPI)	0,5 ml
LK-097B	Anti-sbiadimento (Diluente controcolorante)	0,5 ml
LK-099B	0,2 M HCl	250 ml
LK-100B	8% tiocianato di sodio (Soluzione di pretrattamento B)	250 ml
LK-101B	Soluzione di pepsina	5 ml
LK-102B*	0,4 x SSC / 0,3% Igepal (Tampone di lavaggio I)	250 ml
LK-103B*	2 x SSC / 0,1% Igepal (Tampone di lavaggio II)	2 x 250 ml
LK-104B	2 x SSC	2 x 250 ml

*Si prega di notare che i prodotti LK-102 e LK-103 che contengono lo stesso numero ma lettere diverse sono identici tranne che per il volume. A= 100 ml, B=250 ml

6 Materiali richiesti e non forniti con il prodotto

- Xilene
- Etanolo 100%, 85% e 70%
- Fixogum (LK-071A) o cemento gommatto
- Piastra calda con controllo accurato della temperatura fino a 80 °C o ThermoBrite™ (TS01/TS02)
- Incubatore con range di temperatura accurato di 37 - 56 °C
- Bagno termostatico con range di temperatura accurato di 37 - 80 °C
- Vasi di Coplin in plastica e vetro
- Micropipette variabili (1 µl - 200 µl)
- Microscopio a fluorescenza dotato di filtri adeguati (vedere raccomandazioni per la microscopia a fluorescenza).

7 Avvertenze e precauzioni

- Qualsiasi incidente grave verificatosi in relazione al dispositivo deve essere segnalato al fabbricante e all'autorità competente dello Stato membro in cui risiede l'utilizzatore e/o il paziente.
- Per uso diagnostico in vitro. Solo per uso professionale in laboratorio. In caso di emergenza controllare le schede SDS per informazioni sulla sicurezza.
- Il kit è destinato ad essere utilizzato solo prima e dopo il FISH di DNA su tessuto FFPE. Questo prodotto non è destinato all'uso per i tessuti congelati.
- Solo per il pretrattamento e l'ibridazione FISH non automatizzati.
- Tutti i materiali devono essere smaltiti secondo le linee guida dell'istituto per lo smaltimento dei rifiuti ospedalieri.
- L'uso del Kit di digestione dei tessuti I KBI-60007 è raccomandato per l'uso con campioni FFPE convenzionali.
- Per le cellule in metafase e interfase o altri campioni citologici si raccomanda di utilizzare il kit di pretrattamento KBI-60005 o KBI-60006.

Etichettatura secondo il Regolamento (CE) n. 1272/2008

Codice n.	Descrizione	Parola di avviso	Icona	Indicazioni di pericolo:
LK-096B	DAPI/Anti-sbiadimento 1 µg/ml (Controcolorante DAPI)	Avvertenza		H315, H319, H335
LK-097B	Anti-sbiadimento (Diluente controcolorante)	Avvertenza		H315, H319, H335
LK-099B	0,2 M HCl	N.D.	N.D.	N.D.
LK-100B	8% tiocianato di sodio (Soluzione di pretrattamento B)	N.D.	N.D.	N.D.
LK-101B	Soluzione di pepsina	N.D.	N.D.	N.D.
LK-102B	0,4 x SSC / 0,3% Igepal (Tampone di lavaggio I)	N.D.	N.D.	N.D.
LK-103B	2 x SSC / 0,1% Igepal (Tampone di lavaggio II)	N.D.	N.D.	N.D.
LK-104B	2 x SSC	N.D.	N.D.	N.D.

Indicazione/i di pericolo

H315 – Causa irritazione cutanea.

H319 – Causa grave irritazione oculare.

H335 – Può causare irritazione dell'apparato respiratorio

Consiglio/i di prudenza Prevenzione

P271 – Usare solo all'aperto o in luogo ben ventilato.

P261 – Evitare l'inalazione di nebbie/vapori/spray.

P264 - Lavare accuratamente tutte le aree esterne del corpo esposte dopo l'uso.

P280 – Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.

Consiglio/i di prudenza Risposta

P305+P351+P338 – IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: Sciacquare attentamente con acqua per diversi minuti. Togliere le lenti a contatto, se indossate e se l'operazione risulta semplice. Continuare a risciacquare.

P312 – Chiamare un CENTRO VELENI/dottore/medico/primo soccorso/se ci si sente male.

P337+P313 – Se l'irritazione agli occhi persiste: Consultare un medico o farsi visitare immediatamente.

P302+P352 – IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: Lavare abbondantemente con acqua e sapone.

P304+P340 – IN CASO DI INALAZIONE: Trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione.

P332+P313 – In caso di irritazione della pelle: Consultare un medico o farsi visitare immediatamente.

P362+P364 – Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

Indicazioni di pericolo supplementari: nessuna
Unicamente ad uso di laboratori professionali.

Legenda

	Contiene sostanze pericolose
	Paese di produzione
	Non utilizzare se la confezione è danneggiata
	Consultare le IPU elettroniche (eIPU)

8 Conservazione e manipolazione del reagente

Proteggere DAPI/Anti-sbiadimento dalla luce forte e diretta. Conservare a 2 - 8 °C. In queste condizioni, il prodotto si mantiene stabile fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta del contenitore.

Riportare i reagenti non diluiti e diluiti a 2 - 8 °C immediatamente dopo l'uso.

Dopo l'apertura i prodotti sono stabili fino a 18 mesi, ma mai oltre la data di scadenza di ogni singolo prodotto. Dopo questo periodo di tempo l'uso delle soluzioni può portare a risultati non ottimali.

9 Assistenza tecnica

Il supporto tecnico è disponibile su www.leicabiosystems.com o via e-mail: Kreatech.Support@Leicabiosystems.com. Si prega di contattarci se non si ottengono i risultati desiderati o se appaiono delle anomalie durante l'utilizzo di questo prodotto.

Una copia cartacea stampata delle IPU può essere richiesta via e-mail contattando: LBSAMS-IFU@leicabiosystems.com



Le eIPU sono disponibili in altre lingue che possono essere scaricate da: www.leicabiosystems.com

10 Assistenza clienti

Le sonde Kreatech possono essere ordinate tramite il Servizio clienti Leica +31 20 6919181 o tramite e-mail: purchase.orders@leica-microsystems.com.

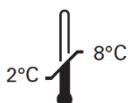
11 Storia

Versione IPU	Data di pubblicazione	Modifiche
2.4	27-SETT-2016	Rimuovere la tagline "The pathology Company".
3.0	Aprile 2022	Aggiornamento secondo i regolamenti IVD

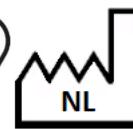
組織消化キットII

REF KBI-60004

最大25または5x5のテストに十分な容積を収容可能



Kreatech Biotechnology B.V.
Vlierweg 20
1032 LG Amsterdam
オランダ
www.LeicaBiosystems.com



1 本来の用途・目的

蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH) は、標的ゲノム配列を同定または標識し、その位置を調査することができる。染色体特異的プローブのDNA配列は、まずレポーター分子で標識される。標識されたDNAプローブは、次にスライド上のメタフェース染色体または間期核にハイブリダイズされる。洗浄後、試料は蛍光顕微鏡でレポーター分子を確認する。

この前処理キットは、重度に架橋された組織や困難なホルマリン固定パラフィン包埋組織 (FFPE) (例: 長時間の固定や長期保存) に対して最適な結果を得るために特別に開発されたものである。

本製品は体外診断用として使用される。

2 製品名

本キットは、DNA FISH ハイブリダイゼーションの前に、FFPEの前処理と酵素消化を行うために開発された非自動FISHハイブリダイゼーション用の前処理キットである。本キットは、重度に架橋された組織や困難なFFPE組織に対して最適な結果を得るために特別に開発された。本キットを使用することにより、組織内の架橋を反転させ、細胞膜を透過させ、細胞タンパク質を消化して、FISHプローブと特定の細胞DNAとの結合を容易にすることができる。

3 使用説明書

3.1 標本

この前処理キットは、重度に架橋された組織や困難なホルマリン固定パラフィン包埋組織 (FFPE) (例: 長時間の固定や長期保存) に対して最適な結果を得るために特別に開発されたものである。

標本の事前分析FISHを成功させるためには、事前分析が重要な役割を果たす。標本は、確立されたプロトコルに従って、正しく固定し、パラフィンワックスに包埋する必要がある。過度の固定や過少固定は、FISH法の失敗や、少なくとも再現性・信号強度の低下の原因となることがある。Kreatech™ FISHプローブは、3~6 µm に切断されたFFPE組織切片でテストされている。組織ブロックやカットスライドは、最適な結果を得るために推奨される保管・取り扱い条件に従って保管する必要がある。ベーキングは、BOND上で*ベーキング&脱パラフィンプロトコルを使用するか、オーブンまたはインキュベータで個別に行うことができる。推奨されるベーキング温度と時間は、56℃で最大16時間、または80℃で60~120分である。

3.2 処理

3~6 µm のホルマリン固定パラフィン包埋組織切片を正帯電性スライド (アミノアルキルシランなど) にマウントする。以下のプロトコルは、50mlの直立コプリンジャーにスライドを5枚使用した場合のものである。

1. マウントしたスライドを80℃で2時間、または56℃で16時間ベークする。
2. 温めたスライドをキシレンまたはキシレン代用液に10分間 (2回) 浸して脱パラフィン化する。
3. 100%、85%、70%エタノールにそれぞれ3分間浸し、再水和させる。
4. dH2Oで室温 (RT) で3分間洗浄する。
5. 50 ml の 0.2 M HCl (LK-099B) で 20 分間 RT で前処理し、dH2O で 3 分間 RT で洗浄する。
6. スライドを50mlの前処理液B (8%チオシアン酸ナトリウム) (LK-100B) に入れ、80℃で30分間加熱する。

7. 50 mlの2 x SSC (LK-104B)で3分間、常温で水洗する。
8. パラフィン切片を約200 μ lのペプシン溶液 (LK-101B) で覆い、常温で5~50分間インキュベートする (時間は組織の固定と組織の種類によって異なる)。例: 乳癌組織では5~15分、結腸組織では20~30分)。
9. dH2Oで1分間洗浄する。
10. 50 mlの2 x SSC (LK-104B)で5分間、常温で洗浄する。
11. 70%、85%、100%エタノールを各1分間浸し、スライドを脱水する。自然-乾燥させてください。プローブの準備に進む。

3.3 プローブの準備:

パラフィン包埋組織用 Kreatech™ FISH プローブは、製品に別段の記載がない限り Ready to Use (RtU) で提供される。希釈倍率については、バイアル瓶のラベルおよび各プローブパックの添付文書を参照してください。

3.4 共変性

22×22mmフィールドあたり10 μ lのプローブを塗布する。ガラスカバースリップで覆い、フィクソガムまたはラバーセメントで密封する。サンプルとプローブを Thermo Brite (TS-01/02) 上で80±1℃、5分間変性させる。ハイブリダイゼーションを続ける。

3.5 ハイブリダイゼーション:

Thermo Brite (TS-01/02) または加湿器中、37±1℃で一晩インキュベートする。

3.6 ハイブリダイゼーション後の洗浄:

1. 50ml of 洗浄緩衝液 I (0.4 x SSC / 0.3% Igepal) (LK-102) を72℃に予熱しておく。
2. ラバーセメントを除去する。
3. スライドを 50 ml の Wash Buffer II (2 x SSC / 0.1% Igepal) (LK-103) に入れ、室温で2分間インキュベートする。カバースリップをスライドさせて外す。洗浄緩衝液は1回のみ再使用し、合計10枚のスライドを使用する。
4. スライドを50 mlの予め温めておいた洗浄緩衝液 I (0.4 x SSC / 0.3% Igepal) (LK-102) に入れ、攪拌せずに72℃ (+1℃) で2分間インキュベートする。洗浄緩衝液は1回のみ再使用し、合計10枚のスライドを使用する。
5. スライドを50 mlの新しい洗浄緩衝液II (2 x SSC / 0.1% Igepal) (LK-103) に入れ、攪拌せずに常温で1分間インキュベートする。洗浄緩衝液は1回のみ再使用し、合計10枚のスライドを使用する。
6. 新しい 70%、85%、100%エタノールで脱水し、常温で各 1 分間インキュベートする。常温で風乾させ、対比染色に進む。

3.7 対比染色:

DAPI対比染色 (DAPI/Antifade 1 μ g/ml) (LK-096B) または対比染色希釈液 (LK097B) による希釈液を15 μ l 塗布し、ガラスカバースリップを貼付する。顕微鏡検査に進みます。

3.8 手順に関する推奨事項:

DAPI対比染色を15 μ l塗布し、DAPIフィルター付きの蛍光顕微鏡でスライドを評価することにより、タンパク質の消化と前処理をチェックする。サンプルの消化が不十分な場合: カバースリップを取り外し、組織を2 x SSC (LK-104B) に2分間浸し、タンパク質の消化を促進させる。サンプルの消化が過剰な場合、新しいサンプルを使用し、タンパク質の消化時間を短縮する。

ハイブリダイゼーションと洗浄の温度とバッファの濃度 (ストリンジェンシー) は重要である。ストリンジェンシーが低いとプローブが他の配列と非特異的に結合し、高すぎるとシグナルが出なくなることがある。標的DNAの変性が不完全だと、シグナルが出なくなることがある。

3.9 蛍光顕微鏡観察のための推奨事項

最適な可視化のためには、100W水銀灯またはその他の適切な光源 (例: メタルハライドランプ (120W X-cite)) またはLEDベースの光源) および63倍または100倍の蛍光対物レンズを備えた、よく整備され定期的にキャリブレーションされた顕微鏡を使用してください。複数色の観察にはトリプルバンドパスフィルター (DAPI/FITC/Cy3またはDAPI/FITC/TRITC) を、個々の色の視覚化にはシングルバンドパスフィルターを使用す

る。各顕微鏡ブランドに適した推奨フィルターについては、ライカのウェブサイトをご覧ください：
<http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/kreatech-fish-probes/>

Kreatech™フルオロフォアに適した励起・発光範囲である。

蛍光体	励起	放射
DAPI	360 ± 20 nm	460 ± 30 nm
PlatinumBright™ 415	429 ± 15 nm	470 ± 15 nm
PlatinumBright™ 495	495 ± 10 nm	517 ± 10 nm
PlatinumBright™ 550	550 ± 10 nm	580 ± 10 nm

表示されている帯域幅は、蛍光体の最大励起/発光の80%に相当する最大励起/発光の80%に相当する)

4 分析性能

組織消化キットIIの性能は、この使用説明書に記載されている手順で確立されている。これらの手順を変更すると、アッセイの性能が変化することがある。指示されたプロトコールからの逸脱は、ユーザーによるバリデーションが必要である。推奨された試験手順から外れた場合、その状況下での患者の結果の解釈については、ユーザーが責任を負う必要がある。プロトコールにかかる時間は、固定および処理のばらつきにより異なる場合がある。また、ペプシンのインキュベーション時間は、処理・固定条件により最適化が必要な場合がある。

5 製品に必要な材料と付属品

コード番号	内容	容量
LK-096B	DAPI/Antifade 1 μg/ml (DAPI対比染色)	0.5 ml
LK-097B	Antifade (対比染色希釈液)	0.5 ml
LK-099B	0.2 M HCl	250 ml
LK-100B	8%チオシアン酸ナトリウム (前処理液B)	250 ml
LK-101B	ペプシン溶液	5 ml
LK-102B*	0.4 x SSC / 0.3% Igepal (洗浄緩衝液 I)	250 ml
LK-103B*	2 x SSC / 0.1% Igepal (洗浄緩衝液 II)	2 x 250 ml
LK-104B	2 x SSC	2 x 250 ml

*LK-102とLK-103は、同じ番号で文字が異なる場合、
 容量以外は同じになるのでご注意ください。
 ください。 A= 100 ml, B=250 ml

6 必要な材料で、製品に付属していないもの

- ・ キシレン
- ・ エタノール100%、85%、70
- ・ フィクソガム (LK-071A) またはラバーセメント
- ・ 80℃まで正確に温度調節できるホットプレート、またはThermoBrite™ (TS01/TS02)
- ・ インキュベーター、温度範囲: 37 - 56 ° C
- ・ ウォーターバス、温度範囲: 37~80℃
- ・ プラスチックおよびガラス製コプリンジャー
- ・ 可変式マイクロピペット (1 μl~200 μl)
- ・ 適切なフィルターを装備した蛍光顕微鏡 (蛍光顕微鏡の推奨事項を参照)。

7 警告と注意事項

- ・ 装置に関連して発生した重大な事故は、製造者及び使用者及び / 又は患者の居住する加盟国の所轄庁に報告しなければならない。
- ・ in vitro診断用です。実験室の専門家のみ使用可能である。緊急の場合は、SDSシートで安全に関する情報を確認してください。

- 本キットは、FFPE 組織への DNA FISH の前後にのみ使用することを意図している。本製品は凍結組織には使用できません。
- 非自動 FISH 前処理およびハイブリダイゼーションにのみ使用する。
- 本製品を使用した後は、各施設の廃棄物処理に関するガイドラインに従って廃液処理してください。
- 従来のFFPEサンプルには、KBI-60007 組織消化キット Iのご使用をお勧めします。
- メタフェース、インターフェースの細胞やその他の細胞学的試料には、前処理キット KBI-60005 または KBI-60006 を使用することを推奨する。

規則(EC) No 1272/2008に基づくラベリング

コード番号	内容	注意喚起語	Pictogram	危険有害性情報
LK-096B	DAPI/Antifade 1 μ g/ml (DAPI対比染色)	警告		H315、 H319、 H335
LK-097B	Antifade (対比染色希釈液)	警告		H315、 H319、 H335
LK-099B	0.2 M HCl	なし	なし	なし
LK-100B	8%チオシアン酸ナトリウム (前処理液B)	なし	なし	なし
LK-101B	ペプシン溶液	なし	なし	なし
LK-102B	0.4 x SSC / 0.3% Igepal (洗浄緩衝液 I)	なし	なし	なし
LK-103B	2 x SSC / 0.1% Igepal (洗浄緩衝液 II)	なし	なし	なし
LK-104B	2 x SSC	なし	なし	なし

危険有害性情報

H315 - 皮膚刺激性。

H319 - 眼に対する重篤な損傷性 / 眼刺激性。

H335 - 呼吸器に刺激を生じるおそれがあります

注意書き（予防措置注意喚起文） 予防

P271 - 屋外または換気の良い場所でのみ使用すること。

P261 - 霧、蒸気、スプレーを吸い込まないようにすること。

P264 - 取り扱い後は、身体の一部をよく洗うこと。

P280 - 保護手袋 / 保護衣 / 保護眼鏡 / 保護面を着用すること。

注意書き（予防措置注意喚起文） 対処

P305+P351+P338 - 眼に入った場合。水で数分間注意深く水洗すること。コンタクトレンズを着用していて容易に外せる場合は、外すこと。その後も洗浄を続けること。

P312 - 気分が悪い時は、毒物センター/医師/救急隊員/に連絡すること。

P337+P313 - 目の痛みが続く場合：医療機関で診察および治療を受けること。

P302+P352 - 皮膚に付着した場合：十分な石鹸と流水で洗浄すること。

P304+P340 - 吸入した場合：空気の新鮮な場所に移し、呼吸しやすい姿勢で休息させること。

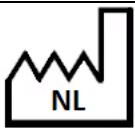
P332+P313 - 皮膚刺激が生じた場合：医療機関で診察および治療を受けること。

P362+P364 - 汚染された衣類を脱ぎ、再使用する場合には洗濯すること。

危険有害性情報の要約: なし

実験室の専門家ユーザーに制限される

記号の説明

	有害物質を含む
	製造国
	パッケージが破損している場合は使用しないでください
	電子版使用説明書（elfU）に相談する

8 試薬の保管と取り扱い

DAPI/Antifade は、強い光や直射日光から保護してください。2～8℃で保存してください。未開封の製品は、バイアルラベルに記載されている有効期限まで、この条件下で安定である。

原液および希釈した試薬は、使用後すぐに2～8℃に戻してください。

開封後の製品は、最長18ヶ月間安定であるが、各製品の有効期限を超えることはない。この期間を過ぎると、最適な結果を得られない可能性がある。

9 Technical Support（テクニカルサポート）

テクニカルサポートは www.leicabiosystems.com または電子メールで受け付けている。

Kreatech.Support@Leicabiosystems.com. 本製品をご使用の際、期待する結果が得られない場合や、何らかの異常が発生した場合には、当社までご連絡ください。

印刷された紙媒体のIfUは、電子メールでお問い合わせください。 LBSAMS-IFU@leicabiosystems.com までご連絡ください。



elfUは、次のサイトからダウンロードできる追加言語で利用可能である：

www.leicabiosystems.com

10 お客様窓口

Kreatechプロンプトのご注文は、ライカカスタマーサービス +31 20 6919181 またはEメールにて承ります。

purchase.orders@leica-microsystems.com

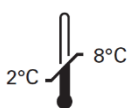
11 履歴

使用説明 書バージョン	発行日	変更点
2.4	2016-SEP-27	「The Pathology Company」のキャッチフレーズを削除する。
3.0	2022-4月	IVD規制に沿ったアップデート

„Tissue Digestion Kit II“

REF KBI-60004

Kiekio pakanka 25 arba 5x5 tyrimams



Kreatech Biotechnology B.V.
Vlierweg 20
1032 LG Amsterdam
The Netherlands (Nyderlandai)
www.LeicaBiosystems.com



1 Paskirtis

Fluorescencinė in situ hibridizacija (FISH) nustato arba pažymi genomines sekas, kad galima būtų tirti jų vietą. DNR sekos iš atitinkamų specifinių chromosomų zondų pirmiausia pažymimos reporterinėmis molekulėmis. Tuomet pažymėtas DNR zondas hibridizuojamas su metafazės chromosomomis arba interfazės branduoliais, esančiais ant objekcinio stiklelio. Nuplovus fluorescencinės mikroskopijos būdu tikrinama, ar mėginyje yra reporterinių molekulių.

Šis parengiamojo apdorojimo rinkinys skirtas gauti optimalius stipraus skersinio ryšio arba sudėtingų formalinu fiksuotų, parafinuotų (FFPE) (pvz., ilgesnė fiksacija arba ilgas laikymas) audinių rezultatus.

Šis produktas skirtas in vitro diagnostikai.

2 Produkto aprašymas

Šis parengiamojo apdorojimo rinkinys yra skirtas neautomatinėms FISH hibridizacijoms ir specialiai sukurtas naudoti FFPE parengiamajam apdorojimui ir fermentų skaidymui prieš atliekant DNR FISH hibridizacijos procedūrą. Šis rinkinys skirtas gauti optimalius stipraus skersinio ryšio arba sudėtingų FFPE audinių rezultatus. Šis rinkinys padeda keisti skersinius ryšius audinyje, permeabilizuoti ląstelių membraną ir skaidyti ląstelių baltymus, kad sušvelnintų FISH zondų susiejimą su specifinės ląstelės DNR.

3 Naudojimo instrukcija

3.1 Mėginiai

Šis parengiamojo apdorojimo rinkinys skirtas gauti optimalius stipraus skersinio ryšio arba sudėtingų formalinu fiksuotų, parafinuotų (FFPE) (pvz., ilgesnė fiksacija arba ilgas laikymas) audinių rezultatus.

Priešanalitiniai mėginių etapai: norint gauti sėkmingą FISH, labai svarbūs priešanalitiniai etapai. Mėginys turi būti tinkamai fiksuotas ir įterptas į parafino vašką pagal gerai parengtą protokolą. Per didelė arba per maža fiksacija gali lemti nesėkmingą FISH procedūrą arba mažą atkuriamumą / signalo intensyvumą. „Kreatech™“ FISH zondai išbandyti su 3–6 µm dydžio FFPE audinių pjūviais. Audinių blokai ir objekciniai stikleliai turi būti laikomi pagal rekomenduojamas laikymo ir tvarkymo sąlygas, kad būtų gauti optimalūs rezultatai. Žr. „Leica“ svetainę. Kepinimas gali būti atliekamas BOND naudojant * kepinimo ir devaškavimo protokolą arba atskirai krosnelėje ar inkubatoriuje. Rekomenduojama kepinimo trukmė ir temperatūra yra iki 16 val. 56 °C arba 60–120 min. 80 °C.

3.2 Parengiamasis apdorojimas

Uždėkite 3–6 µm dydžio formalinu fiksuotus, parafinuotus audinių pjūvius ant teigiamai įkrautų objektnių stiklelių (pvz., aminoalkilsilano). Žemiau pateiktas protokolas yra skirtas 5 objektniams stikleliams, sudedamiems vertikaliai į 50 ml stiklainį.

1. Pakepinkite sudėtus objektnius stiklelius 2 val. 80 °C arba 16 val. 56 °C.
2. Deparafinuokite šiltus objektnius stiklelius du kartus 10 minučių (min.) pamerkdami juos į ksileną arba ksileno pakaitalą.
3. Rehidratuokite kiekvieną stiklį 3 min. pamerkdami į 100 %, 85 % ir 70 % etanolį.
4. Plaukite su dH₂O 3 min. kambario temperatūroje (KT).
5. Atlikite parengiamąjį apdorojimą su 50 ml 0,2 M HCl (LK-099B) 20 min. KT, tuomet plaukite dH₂O 3 min. KT.
6. Įdėkite objektnius stiklelius į 50 ml „Pretreatment Solution B“ (8 % natrio tiocianato) (LK-100B) esant 80 °C temperatūrai ir palaikykite 30 min.

7. Skalaukite 50 ml 2 x SSC (LK-104B) 3 min. KT.
8. Padenkite parafino pjūvį maždaug 200 µl pepsino tirpalo (LK-101B) ir inkubuokite KT 5–50 min. (Trukmė priklauso nuo audinio fiksacijos ir audinio rūšies. Pvz., daugumos krūties vėžio audinių skaidymo trukmė 5–15 min.; storosios žarnos audinių – 20–30 min.).
9. Plaukite su dH₂O 1 min.
10. Plaukite 50 ml 2 x SSC (LK-104B) 5 min. KT.
11. Išdžiovinkite kiekvieną objektinį stiklį 1 min. pamerkdami į 70 %, 85 % ir 100 % etanolį. Džiovinkite ore. Toliau **paruoškite zondą**.

3.3 Zondo paruošimas

„Kreatech™“ FISH zondai, skirti parafinuotiems audiniams, tiekiami paruošti naudoti (RTU), nebent nurodyta kitaip produkto dokumentacijoje. Skiedimo specifikacijų ieškokite ant buteliuko etiketės ir pasirinkto zondo pakuotės.

3.4 Bendras denatūravimas

Užpilkite 10 µl zondo ant 22 x 22 mm srities. Uždenkite dengiamuoju stikleliu ir užsandarinkite „Fixogum“ arba gumos klizais. Denatūruokite ėminį ir zondą su „ThermoBrite“ (TS-01/02) 80 ±1 °C temperatūroje 5 min. Toliau atlikite **hibridizaciją**.

3.5 Hibridizacija

Inkubuokite per naktį 37 ±1 °C temperatūroje „ThermoBrite“ (TS-01/02) sistemoje arba drėkinimo kameroje.

3.6 Plovimas po hibridizacijos

1. Pašildykite 50 ml buferinio plovimo tirpalo „Wash Buffer I“ (0,4 x SSC / 0,3 % Igepal) (LK-102) iki 72 °C temperatūros.
2. Pašalinkite gumos klizus.
3. Sudėkite objektinius stiklelius į 50 ml buferinio plovimo tirpalo „Wash Buffer II“ (2 x SSC / 0,1 % „Igepal“) (LK-103), inkubuokite 2 min. KT. Nustumkite dengiamuosius stiklelius. 10 objektinių stiklelių buferinį plovimo tirpalą pakartotinai naudokite tik kartą.
4. Sudėkite objektinius stiklelius į 50 ml pašildyto buferinio plovimo tirpalo „Wash Buffer I“ (0,4 x SSC / 0,3 % „Igepal“) (LK-102), inkubuokite 2 min. 72 °C (+ 1 °C) temperatūroje nemaišydami. 10 objektinių stiklelių buferinį plovimo tirpalą pakartotinai naudokite tik kartą.
5. Sudėkite objektinius stiklelius į 50 ml šviežio buferinį plovimo tirpalą II (2 x SSC / 0,1 % „Igepal“) (LK-103), inkubuokite 1 min. KT nemaišydami. 10 objektinių stiklelių buferinį plovimo tirpalą pakartotinai naudokite tik kartą.
6. Išdžiovinkite šviežiame 70 %, 85 % ir 100 % etanolyje, kiekvieną stiklį inkubuokite 1 min. KT. Džiovinkite ore KT ir toliau atlikite **papildomą dažymą**.

3.7 Papildomas dažymas

Uždėkite 15 µl DAPI kontrastinių dažų (DAPI / „Antifade“ 1 µg/ml) (LK-096B) arba dažų, atskiestų kontrastinių dažų skiedikliu (LK097B), ir uždėkite dengiamąjį stiklį. Toliau atlikite mikroskopiją.

3.8 Procedūrinės rekomendacijos

Patikrinkite baltymų skaidymą ir parengiamąjį apdorojimą uždėdami 15 µl DAPI kontrastinių dažų ir įvertinkite objektinius stiklelius naudodami fluorescencinį mikroskopą su DAPI filtru. Jei ėminys nėra pakankamai suskaidytas: nuimkite dengiamąjį stiklį ir 2 min. pamerkite audinį į 2 x SSC (LK-104B), kad pratęstumėte baltymų skaidymą. Jei ėminys suskaidomas per daug, naudokite šviežią ėminį ir sumažinkite baltymų skaidymo trukmę.

Labai svarbi hibridizacijos ir plovimo temperatūra bei buferio koncentracija (tikslumas), kadangi mažesnis tikslumas gali lemti nespecifinį zondo susiejimą su kitomis sekomis, o didesnis tikslumas gali lemti signalo nebuvimą. Nebaigtas tiriamosios DNR denatūravimas gali lemti signalo trūkumą.

3.9 Rekomendacijos dėl fluorescencinės mikroskopijos

Optimaliai vizualizacijai naudokite gerai prižiūrimą ir reguliariai kalibruojamą mikroskopą su 100 W gyvsidabrio lempa arba kitu atitinkamu šviesos šaltiniu (pvz., metalo halogeno lempa (120 W „X-cite“) arba LED šviesos šaltiniu) ir 63x arba 100x fluorescencijos objektyvu. Trijų juostų filtrai (DAPI/FITC/Cy3 arba DAPI/FITC/TRITC) naudojami peržiūrėti kelias spalvas, o vienos juostos filtrai naudojami vienos spalvos vizualizavimui. Žiūrėkite

„Leica“ svetainę, kurioje rasite rekomendacijų dėl kiekvienam mikroskopo prekės ženklui tinkančių filtrų:
<http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/kreatech-fish-probes/>

„Kreatech™“ fluoroforams tinkamas sužadinimo ir spinduliavimo diapazonas:

Fluoroforas	Sužadinimas	Spinduliavimas
DAPI	360 ±20 nm	460 ±30 nm
„PlatinumBright™ 415“	429 ±15 nm	470 ±15 nm
„PlatinumBright™ 495“	495 ±10 nm	517 ±10 nm
„PlatinumBright™ 550“	550 ±10 nm	580 ±10 nm

Nurodytas dažnių juostos plotis atitinka 80 % didžiausio fluoroforo sužadinimo / spinduliuotės.

4 Analitinis veiksmingumas

„Tissue Digestion Kit II“ veiksmingumas nustatytas naudojant šiose naudojimo instrukcijose aprašytas procedūras. Šių procedūrų modifikavimas gali pakeisti tyrimo veiksmingumą. Bet kokius nukrypimus nuo nurodytų protokolų turi patvirtinti naudotojas. Rekomenduojamų bandymo procedūrų nesilaikantys naudotojai privalo prisiimti atsakomybę už paciento rezultatų aiškinimą tokiomis aplinkybėmis. Protokolo trukmė gali skirtis priklausomai nuo fiksacijos ir apdorojimo. Be to, priklausomai nuo apdorojimo ir fiksacijos sąlygų, gali prireikti optimizuoti pepsino inkubacijos trukmę.

5 Reikalingos ir su produktu pateikiamos medžiagos

Kodas Nr.	Aprašymas	Tūris
LK-096B	DAPI / „Antifade“ 1 µg/ml („DAPI Counterstain“)	0,5 ml
LK-097B	„Antifade“ (kontrastinių dažų skiediklis)	0,5 ml
LK-099B	0,2 M HCl	250 ml
LK-100B	8 % natrio tiocianato („Pretreatment Solution B“)	250 ml
LK-101B	Pepsino tirpalas	5 ml
LK-102B*	0,4 x SSC / 0,3 % „Igepal“ (Buferinis plovimo tirpalas I)	250 ml
LK-103B*	2 x SSC / 0,1 % „Igepal“ (Buferinis plovimo tirpalas II)	2 x 250 ml
LK-104B	2 x SSC	2 x 250 ml

* Įsidėmėkite, kad LK-102 ir LK-103 produktai su tokiu pačiu numeriu, tačiau skirtingomis raidėmis yra vienodi, išskyrus tūrį. A= 100 ml, B=250 ml

6 Reikalingos ir su produktu nepateikiamos medžiagos

- Ksilenas
- Etanolis 100 %, 85 % ir 70 %
- „Fixogum“ (LK-071A) arba gumos klijai
- Viryklė su tikslu temperatūros valdymu iki 80 °C arba „ThermoBrite™“ (TS01/TS02)
- Inkubatorius su tikslu 37–56 °C temperatūros diapazonu
- Vandens vonelė su tikslu 37–80 °C temperatūros diapazonu
- Plastikiniai ir stikliniai stiklainiai
- Įvairios mikropipetės (1–200 µl)
- Fluorescenciniai mikroskopai su tinkamais filtrais (žr. rekomendacijas fluorescencinei mikroskopijai)

7 Įspėjimai ir atsargumo priemonės

- Apie bet kokią rimtą incidentą, susijusį su įrenginiu, reikia pranešti gamintojui ir kompetetingai valstybės narės, kurioje įsikūręs naudotojas ir (arba) pacientas, institucijai.
- Tik in vitro diagnostikai. Tik profesionaliems naudotojams laboratorijose. Ištikus nelaimei, saugos informacijos ieškokite SDL.
- Rinkinys skirtas naudoti tik prieš ir po DNR FISH FFPE audiniui. Šis produktas nėra skirtas naudoti sušaldytam audiniui.
- Tik neautomatiniam FISH parengiamajam apdorojimui ir hibridizacijai.

- Visas medžiagas reikia šalinti laikantis jūsų institucijos nurodymų dėl ligoninės atliekų šalinimo.
- Rekomenduojama KBI-60007 „Tissue Digestion Kit I“ naudoti su įprastais FFPE ėminiais.
- Metafazės ir interfazės ląstelėms arba kitiems citologiniams ėminiams rekomenduojama naudoti pakartotinio apdorojimo rinkinį KBI-60005 arba KBI-60006.

Ženklimas pagal reglamentą (EB) Nr. 1272/2008

Kodas Nr.	Aprašymas	Signalinis žodis	Piktograma	Pavojingumo frazės
LK-096B	DAPI / „Antifade“ 1 µg/ml („DAPI Counterstain“)	Įspėjimas		H315, H319, H335
LK-097B	„Antifade“ (kontrastinių dažų skiediklis)	Įspėjimas		H315, H319, H335
LK-099B	0,2 M HCl	Nėra	Nėra	Nėra
LK-100B	8 % natrio tiocianato („Pretreatment Solution B“)	Nėra	Nėra	Nėra
LK-101B	Pepsino tirpalas	Nėra	Nėra	Nėra
LK-102B	0,4 x SSC / 0,3 % „Igepal“ (Buferinis plovimo tirpalas I)	Nėra	Nėra	Nėra
LK-103B	2 x SSC / 0,1 % „Igepal“ (Buferinis plovimo tirpalas II)	Nėra	Nėra	Nėra
LK-104B	2 x SSC	Nėra	Nėra	Nėra

Pavojingumo frazė (-ės)

H315 Dirgina odą.

H319 Sukelia smarkų akių dirginimą.

H335 Gali dirginti kvėpavimo takus.

Atsargumo frazė (-ės), prevencija

P271 Naudoti tik lauke arba gerai vėdinamoje patalpoje.

P261 Stengtis neįkvėpti rūko / garų / aerozolio.

P264 Po naudojimo kruopščiai nuplauti visas paveiktas išorines kūno dalis.

P280 Mūvėti apsaugines pirštines, dėvėti apsauginius drabužius, naudoti akių (veido) apsaugos priemonės.

Atsargumo frazė (-ės), reakcija

P305+P351+P338 PATEKUS Į AKIS: atsargiai plauti vandeniu kelias minutes. Išimti kontaktinius lęšius, jeigu jie yra ir jeigu lengvai galima tai padaryti. Toliau plauti akis.

P312 Pasijutęs blogai, skambinti į APSINUODIJIMŲ KONTROLĖS IR INFORMACIJOS BIURĄ arba kreiptis į gydytoją.

P337+P313 Jei akių dirginimas nepraeina: kreiptis į gydytoją.

P302+P352 PATEKUS ANT ODOS: plauti dideliu vandens kiekiu ir muilu.

P304+P340 ĮKVĖPUS: Išveskite žmogų į gryną orą ir užtikrinkite, kad jam būtų patogų kvėpuoti.

P332+P313 Jei sudirginama oda: kreiptis į gydytoją.

P362+P364 Nusivilkti užterštus drabužius ir išskalbti prieš vėl juos apsivelkant.

Papildomos pavojingumo frazės: nėra.

Skirta tik profesionaliems naudotojams laboratorijoje.

Simbolių paaiškinimas

	Sudėtyje yra pavojingų medžiagų
	Gamintojo šalis
	Nenaudoti, jei pakuotė pažeista
	Žr. elektronines naudojimo instrukcijas (eIFU)

8 Reagento laikymas ir naudojimas

Saugokite DAPI / „Antifade“ nuo stiprios ir tiesioginės šviesos. Laikykite 2–8 °C temperatūroje. Tokiomis sąlygomis neatidarytas produktas yra stabilus iki tinkamumo termino, nurodyto ant buteliuko etiketės.

Iškart po naudojimo grąžinkite neatskiestus ir atskiestus reagentus į 2–8 °C temperatūrą.

Atidaryti produktai yra stabilūs iki 18 mėnesių, tačiau ne ilgiau nei iki tinkamumo termino pabaigos. Pasibaigus šiam laikotarpiui tirpalai gali lemti suboptimalius rezultatus.

9 Techninė pagalba

Techninė pagalba pasiekama svetainėje www.leicabiosystems.com arba el. paštu: Kreatech.Support@Leicabiosystems.com. Susisieki su mumis, jei naudodami produktą negavote pageidautinų rezultatų arba kilo anomalijų.

Popierinę naudojimo instrukcijos (IFU) kopiją galima gauti el. paštu susisiekus su: LBSAMS-IFU@leicabiosystems.com



Naudojimo instrukciją (eIFU) papildomomis kalbomis galima atsisiųsti iš: www.leicabiosystems.com

10 Klientų aptarnavimas

„Kreatech“ zondus galima užsisakyti susisiekus su „Leica“ klientų aptarnavimo tarnyba telefono numeriu +31 20 6919181 arba el. paštu: purchase.orders@leica-microsystems.com.

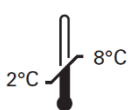
11 Istorija

Naudojimo instrukcijos (IFU) versija	Išleidimo data	Pakeitimai
2,4	2016-SEP-27	Pašalinti šūkį „Patologijų įmonė“.
3.0	2022 Balandis	Atnaujinti pagal IVD reglamentus

Audu hidrolīzes komplekts II

REF KBI-60004

Ar pietiekamu tilpumu līdz 25 vai 5x5 testiem


 Kreatech Biotechnology B.V.
 Vlierweg 20
 1032 LG Amsterdam
 Nederlande
www.LeicaBiosystems.com


1 Paredzētais lietojums/mērķis

Luminiscentā in situ hibridizācija (FISH) identificē vai apzīmē mērķa genoma sekvences, lai varētu izpētīt to atrašanās vietu. DNS sekvences no attiecīgām hromosomu specifiskām zondēm vispirms iezīmē ar ziņotājmolekulām. Pēc tam iezīmēto DNS zondi uz stikliņa hibridizē ar metafāzes hromosomām vai interfāzes kodoliem. Pēc mazgāšanas paraugu luminiscences mikroskopā pārbauda, vai tajā nav ziņotājmolekulu.

Šis iepriekšējas apstrādes komplekts ir īpaši izstrādāts, lai iegūtu optimālus rezultātus stipri saistītiem vai ar formalīnu fiksētiem parafinā ieguldītiem audiem (FFPE) (piemēram, ilgāka fiksācija vai ilgāka glabāšana).

Šis produkts ir paredzēts in vitro diagnostiskajai lietošanai.

2 Produkta apraksts

Šis iepriekšējas apstrādes komplekts ir paredzēts neautomātiskai FISH hibridizācijai, kas īpaši izstrādāta FFPE iepriekšējai apstrādei un fermentu hidrolizācijai pirms DNS FISH hibridizācijas procedūras. Šis komplekts ir īpaši izstrādāts, lai iegūtu optimālus rezultātus stipri saistītiem vai grūti apstrādājamiem FFPE audiem. Komplekta izmantošana apvērsīs audu krusteniskās saites, permeabilizēs šūnu membrānu un sagremos šūnu proteīnus, lai atvieglotu FISH zondes saistīšanos ar specifisko šūnu DNS.

3 Lietošanas norādījumi

3.1 Paraugi

Šis iepriekšējas apstrādes komplekts ir īpaši izstrādāts, lai iegūtu optimālus rezultātus stipri saistītiem vai ar formalīnu fiksētiem parafinā ieguldītiem audiem (FFPE) (piemēram, ilgāka fiksācija vai ilgāka glabāšana). Paraugi pirms analīzes: lai iegūtu veiksmīgu FISH, liela nozīme ir pirmsanalīzei. Paraugs ir pareizi jāfiksē un jāiegulda parafīna vaskā saskaņā ar vispārārstītu protokolu. Pārmērīga vai nepietiekama fiksācija var izraisīt FISH procedūras kļūmi vai vismaz zemu reproducējamību/signāla intensitāti. Kreatech™ FISH zondes ir pārbaudītas FFPE audu griezumos, kas tika griezti 3–6 µm izmērā. Audu bloki un griešanas stikliņi jāuzglabā atbilstoši ieteicamajiem uzglabāšanas un apstrādes apstākļiem, lai iegūtu optimālus rezultātus, skatīt Leica tīmekļa vietni. Karsēšanu var veikt vai nu uz BOND, izmantojot *Karsēšanas un vaska noņemšanas protokolu, vai atsevišķi krāsnī vai inkubatorā. Ieteicamā karsēšanas temperatūra un laiks ir līdz 16 stundām 56 °C temperatūrā vai 60–120 min 80 °C temperatūrā.

3.2 Iepriekšēja apstrāde

Uz pozitīvi lādētiem stikliņiem (piemēram, aminalkilsilāna) piestiprina 3–6 µm ar formalīnu fiksētu parafinā ieguldītu audu sekcijas. Zemāk esošais protokols ir paredzēts 5 stikliņu lietošanai 50 ml vertikālā traukā ar koplīnu.

1. Karsē uz stikliņiem 2 stundas 80 °C temperatūrā vai 16 stundas 56 °C temperatūrā.
2. Atbrīvojiet no parafīna siltos stikliņus, mērcējot ksilolā vai ksilola aizstājējā divas reizes 10 minūtes (min).
3. Atkārtoti hidratējiet, iemērcot 100 %, 85 % un 70 % etanolā 3 minūtes.
4. Mazgāt ar dH2O 3 minūtes telpas temperatūrā (RT).
5. Iepriekš apstrādājiet ar 50 ml 0,2 M HCl (LK-099B) 20 min telpas temperatūrā un pēc tam mazgājiet ar dH2O 3 min telpas temperatūrā.
6. Stikliņus uz 30 minūtēm ievieto 50 ml B iepriekšējas apstrādes šķīduma (8 % nātrija tiocianāts) (LK-100B) 80 °C temperatūrā.
7. Skalo ar 50 ml 2 x SSC (LK-104B) 3 min telpas temperatūrā.

8. Pārklājiet parafīna sekciju ar aptuveni 200 µl pepsīna šķīduma (LK-101B) un inkubējiet telpas temperatūrā 5–50 minūtes (laiks atkarīgs no audu fiksācijas un audu veida. Piemēram, lielākajai daļai krūts vēža audu nepieciešama 5–15 min hidrolīze; resnās zarnas audiem – 20–30 min).
9. Mazgāt dH₂O 1 min.
10. Mazgāt ar 50 ml 2 x SSC (LK-104B) 5 min telpas temperatūrā.
11. Atūdeņojiet stikļus, katru reizi mērcējot 70 %, 85 % un 100 % etanolā 1 minūti. Nožāvējiet. Turpiniet ar **zondes sagatavošanu**.

3.3 Zondes sagatavošana

Kreatech™ FISH zondes parafīnā ieguldītajiem audiem tiek piegādātas gatavas lietošanai (Ready to Use – RtU), ja vien produkta dokumentācijā nav norādīts citādi. Informāciju par atšķaidīšanas specifiku skatiet uzlīmē uz flakona un konkrētās zondes iepakojuma ieliktņā.

3.4 Līdzdenaturācija

Uzklājiet 10 µl zondes uz 22 x 22 mm lauka. Pārklājiet ar stikla pārsegu un ar Fixogum vai gumijas cementu. Denaturējiet paraugu un zondi uz ThermoBrite (TS-01/02) 80 ± 1 °C temperatūrā 5 minūtes. Turpiniet ar **hibridizāciju**.

3.5 Hibridizācija

Inkubējiet pa nakti 37 ± 1 °C temperatūrā ThermoBrite (TS-01/02) vai mitrā kamerā.

3.6 Pēchibridizācijas mazgāšana

1. Iepriekš uzsildiet 50 ml mazgāšanas bufera I (0,4 x SSC / 0,3% Igepal) (LK-102) līdz 72 °C
2. Noņemiet gumijas cementu.
3. Ievietojiet stikļus 50 ml Wash Buffer II (2 x SSC / 0,1% Igepal) (LK-103), inkubējiet 2 minūtes telpas temperatūrā. Noslidiniet vāka skavas. Atkārtoti izmantojiet mazgāšanas buferšķīdumu tikai vienu reizi kopā 10 stikļiem.
4. Ievietojiet stikļus 50 ml iepriekš uzsildīta Wash Buffer I (0,4 x SSC / 0,3% Igepal) (LK-102), 2 minūtes inkubējiet 72 °C (+/- 1 °C) temperatūrā bez kratīšanas. Atkārtoti izmantojiet mazgāšanas buferšķīdumu tikai vienu reizi kopā 10 stikļiem.
5. Ievietojiet stikļus 50 ml svaiga Wash Buffer II (2 x SSC / 0,1% Igepal) (LK-103), inkubējiet 1 min istabas temperatūrā bez kratīšanas. Atkārtoti izmantojiet mazgāšanas buferšķīdumu tikai vienu reizi kopā 10 stikļiem.
6. Dehidrējiet svaigā 70 %, 85 % un 100 % etanolā, inkubējiet 1 minūti istabas temperatūrā. Žāvējiet telpas temperatūrā un turpiniet ar procedūru **Pretkrāsošana**.

3.7 Pretkrāsošana

Uzklājiet 15 µl DAPI pretkrāsošanas (DAPI/Antifade 1 µg/ml) (LK-096B) vai atšķaidiet ar šo šķīdumu, izmantojot pretkrāsošanas šķīdinātāju (LK097B), un uzlieciet stikla vāciņu. Turpiniet ar mikroskopiju.

3.8 Procedūras ieteikumi

Pārbaudiet olbaltumvielu sadalīšanos un iepriekšēju apstrādi, izmantojot 15 µl DAPI pretkrāsošanas, un novērtējiet stikļus, izmantojot luminiscences mikroskopu, kas aprīkots ar DAPI filtru. Ja paraugs nav pietiekami sadalīts: noņemiet pārsegu un mērcējiet audus 2 x SSC (LK-104B) 2 minūtes un papildiniet olbaltumvielu šķelšanu. Ja paraugs ir pārāk sadalīts, izmantojiet jaunu paraugu un samaziniet olbaltumvielu šķelšanas laiku.

Hibridizācijas un mazgāšanas temperatūra un bufera koncentrācija (stingrība) ir svarīga, jo zemāka stingrība var izraisīt nespecifisku zondes saistīšanos ar citām sekvencēm, bet augstāka stingrība var izraisīt signāla trūkumu. Nepilnīga mērķa DNS denaturācija var izraisīt signāla trūkumu.

3.9 Ieteikumi luminiscences mikroskopijai

Optimālai vizualizācijai izmantojiet labi uzturētu un regulāri kalibrētu mikroskopu, kas aprīkots ar 100 W dzīvsudraba lampu vai citu piemērotu gaismas avotu (piemēram, metāla halogēna spuldzi (120 W X-cite) vai LED gaismas avotiem) un 63x vai 100x luminiscences mērķi. Trīs joslu filtri (DAPI/FITC/Cy3 vai DAPI/FITC/Tritc) tiek izmantoti vairāku krāsu skatīšanai, vienas joslas filtri tiek izmantoti atsevišķu krāsu vizualizācijai. Ieteikumus par katram mikroskopa zīmolam piemērotiem filtriem skatiet Leica tīmekļa vietnē: <http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/kreatech-fish-probes/>

Piemērots ierosmes un emisijas diapazons Kreatech™ fluoroforiem:

Fluorofors	Ierosme	Emisija
DAPI	360 ±20 nm	460 ±30 nm
PlatinumBright™ 415	429 ±15 nm	470 ±15 nm
PlatinumBright™ 495	495 ±10 nm	517 ±10 nm
PlatinumBright™ 550	550 ±10 nm	580 ±10 nm

Parādītais joslas platums atbilst 80 % no maksimālās fluorofora ierosmes/emisijas)

4 Analītiskā veikspēja

Audu hidrolīzes komplekta II veikspēja ir noteikta, izmantojot šajā lietošanas instrukcijā aprakstītās procedūras. Šo procedūru modifikācijas var mainīt analīzes veikspēju. Jebkuras novirzes no norādītajiem protokoliem lietotājam ir jāapstiprina. Lietotāji, kuri pilnībā neievēro ieteiktās pārbaudes procedūras, šādos gadījumos uzņemas atbildību par pacienta rezultātu skaidrojumu. Protokola laiks var atšķirties atkarībā no fiksācijas un apstrādes metodes. Turklāt pepsīnu inkubācijas laiku var būt nepieciešams optimizēt atkarībā no apstrādes metodes un fiksācijas apstākļiem.

5 Produktam nepieciešamie un komplektā iekļautie materiāli

Kods nr.	Apraksts	Daudzums
LK-096B	DAPI/antifade 1 µg/ml (DAPI Counterstain)	0,5 ml
LK-097B	Antifade (Counterstain šķīdinātājs)	0,5 ml
LK-099B	0,2 M HCl	250 ml
LK-100B	8 % nātrija tiocianāts (Iepriekšējās apstrādes šķīdums B)	250 ml
LK-101B	Pepsīna šķīdums	5 ml
LK-102B*	0,4 x SSC / 0,3% Igepal (Wash Buffer I)	250 ml
LK-103B*	2 x SSC / 0,1% Igepal (Wash Buffer II)	2 x 250 ml
LK-104B	2 x SSC	2 x 250 ml

*Lūdzu, ņemiet vērā, ka LK-102 un LK-103 produkti, kas satur vienu un to pašu skaitli, bet dažādus burtus, ir identiski, izņemot daudzumu. A= 100 ml, B=250 ml

6 Produktam nepieciešamie un komplektā neiekļautie materiāli

- Ksilols
- Etanols 100 %, 85 % un 70 %
- Fixogum (LK-071A) vai gumijas cements
- Karstā plate ar precīzu temperatūras kontroli līdz 80 °C vai ThermoBrite™ (TS01/TS02)
- Inkubators ar precīzu temperatūras diapazonu 37–56 °C
- Ūdens vanna ar precīzu temperatūras diapazonu 37–80 °C
- Plastmasas un stikla burkas ar koplīnu
- Maināmas mikropipetes (1 µl–200 µl)
- Luminiscences mikroskops, kas aprīkots ar piemērotiem filtriem (skatīt ieteikumus luminiscences mikroskopijai).

7 Brīdinājumi un piesardzības pasākumi

- Par visiem nopietniem starpgadījumiem, kas notikuši saistībā ar ierīci, ziņojiet ražotājam un tās dalībvalsts kompetentajai iestādei, kurā lietotājs un/vai pacients veic uzņēmējdarbību.
- Lietošanai in vitro diagnostikā. Tikai profesionālai lietošanai laboratorijā. Ārkārtas situācijās drošības informāciju skatiet drošības datu lapās.
- Komplekts ir paredzēts lietošanai tikai pirms un pēc DNS FISH uz FFPE audiem. Šis produkts nav paredzēts lietošanai saldētiem audiem.
- Tikai neautomātiskai FISH iepriekšējai apstrādei un hibridizācijai.
- Visi materiāli jāiznīcina saskaņā ar jūsu iestādes norādījumiem par slimnīcas atkritumu likvidēšanu.

- KBI-60007 audu hodrolīzes komplektu II ieteicams izmantot ar parastajiem FFPE paraugiem.
- Metafāžu un starpfāžu šūnām vai citiem citoloģiskiem paraugiem ieteicams izmantot iepriekšējās apstrādes komplektu KBI-60005 vai KBI-60006.

Marķējums saskaņā ar Regulu (EK) Nr. 1272/2008

Kods nr.	Apraksts	Signālvārds	Piktogramma	Bīstamības apzīmējumi
LK-096B	DAPI/antifade 1 µg/ml (DAPI Counterstain)	Brīdinājums		H315, H319, H335
LK-097B	Antifade (Counterstain šķīdinātājs)	Brīdinājums		H315, H319, H335
LK-099B	0,2 M HCl	N.P.	N.P.	N.P.
LK-100B	8 % nātrija tiocianāts (Iepriekšējās apstrādes šķīdums B)	N.P.	N.P.	N.P.
LK-101B	Pepsīna šķīdums	N.P.	N.P.	N.P.
LK-102B	0,4 x SSC / 0,3% Igepal (Wash Buffer I)	N.P.	N.P.	N.P.
LK-103B	2 x SSC / 0,1% Igepal (Wash Buffer II)	N.P.	N.P.	N.P.
LK-104B	2 x SSC	N.P.	N.P.	N.P.

Bīstamības apzīmējumi

H315 – Kairina ādu.

H319 – Izraisa nopietnu acu kairinājumu.

H335 – Var izraisīt elpceļu kairinājumu.

Drošības prasību apzīmējums(-i), profilakse

P271 – Izmantot tikai ārā vai labi vēdināmās telpās.

P261 – Izvairīties ieelpot putekļus/tvaikus/gāzi/dūmus/izgarojumus/smīdinājumu.

P264 – Pēc izmantošanas visas atklātās ārējās ķermeņa zonas kārtīgi nomazgāt.

P280 – Izmantot aizsargcimdus/ aizsargdrēbes/ acu aizsargus/ sejas aizsargus.

Drošības prasību apzīmējums(-i), reakcija

P305+P351+P338 – SASKARĒ AR ACĪM: Uzmanīgi skalot ar ūdeni vairākas minūtes. Izņemiet kontaktlēcas, ja tās ir ievietotas un to ir viegli izdarīt. Turpiniet skalot.

P312 – Sazinieties ar SAINDĒŠANĀS INFORMĀCIJAS CENTRU/ārstu/pirmās palīdzības sniedzēju, ja jums ir slikta pašsajūta.

P337+P313 – Ja acu iekaisums nepāriet: Lūdziet palīdzību mediķiem.

P302+P352 – SASKARĒ AR ĀDU: Nomazgāt ar lielu ūdens un ziepju daudzumu.

P304+P340 – IEELPOJOT: Nogādāt cietušo svaigā gaisā un nodrošināt netraucētu elpošanu.

P332+P313 – Ja rodas ādas iekaisums: Lūdziet palīdzību mediķiem.

P362+P364 – Novilkt piesārņoto apģērbu un pirms atkārtotas lietošanas izmazgāt.

Papildu bīstamības apzīmējumi: nav

Paredzēts tikai laboratoriju profesionāliem lietotājiem

Simbolu skaidrojums

	Satur bīstamas vielas
	Ražotājvalsts
	Nelietot, ja iepakojums ir bojāts
	Skatīt elektronisko LI (elfU)

8 Reaģentu glabāšana un lietošana

Aizsargājiet DAPI/Antifa no spēcīgas un tiešas gaismas. Uzglabājiet 2–8 °C temperatūrā. Produkts ir stabils šajos apstākļos līdz derīguma termiņa beigu datumam, kas ir norādīts uz flakona uzlīmes.

Pēc izmantošanas neatšķaidītos un atšķaidītos reaģentu nekavējoties novietojiet atpakaļ 2–8 °C temperatūrā.

Pēc atvēršanas produkti ir stabili līdz 18 mēnešiem, bet ne ilgāk par katra produkta derīguma termiņa beigu datumu. Pēc šī laika posma šķīdumu lietošana var dot neoptimālus rezultātus.

9 Tehniskais atbalsts

Tehniskais atbalsts ir pieejams vietnē www.leicabiosystems.com vai pa e-pastu: Kreatech.Support@Leicabiosystems.com. Lūdzu, sazinieties ar mums, ja, izmantojot šo produktu, netiek iegūti vēlamie rezultāti vai parādās kādas novirzes no normas.

Drukātu LI eksemplāru var pieprasīt pa e-pastu: LBSAMS-IFU@leicabiosystems.com



elfU ir pieejama papildu valodās, kuras var lejupielādēt no: www.leicabiosystems.com

10 Klientu apkalpošana

Kreatech zondes var pasūtīt, izmantojot Leica klientu apkalpošanas dienestu +31 20 6919181 vai pasūtot pa e-pastu: purchase.orders@leica-microsystems.com.

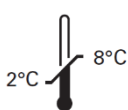
11 Vēsture

LI versija	Izdošanas datums	Izmaiņas
2,4	2016-SEP-27	Noņemiet atzīmes joslu "The pathology Company" (Uzņēmuma patoloģija)
3,0	2022. Aprīlis	Atjaunināt atbilstoši IVD noteikumiem

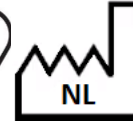
Tissue Digestion Kit II

REF KBI-60004

Bevat voldoende volume voor maximaal 25 of 5 x 5 tests



Kreatech Biotechnology B.V.
Vlierweg 20
1032 LG Amsterdam
Nederland
www.LeicaBiosystems.com



1 Beoogd gebruik of doel

In situ fluorescentiehybridisatie (FISH) dient voor het identificeren of labelen van een doelgensequentie, zodat de locatie hiervan kan worden onderzocht. Dna-sequenties van de te gebruiken chromosoomspecifieke probes worden eerst met reportermoleculen gelabeld. De gelabelde dna-probe wordt vervolgens aan de chromosomen in de metafase of kernen in de interfase op een dekglasje gehybridiseerd. Na het wassend wordt het monster met behulp van fluorescentiemicroscopie gescreend op de reportermoleculen.

Deze voorbehandelingsset is speciaal bedoeld voor het verkrijgen van optimale resultaten op in formaline gefixeerde, in paraffine ingebedde monsters die lastig zijn of met veel kruisverbanden (bijv. een langere fixatie of langdurige opslag).

Dit product is bedoeld voor gebruik bij diagnose in vitro.

2 Productbeschrijving

Deze voorbehandelingsset dient voor niet-geautomatiseerde FISH-hybridisatie, speciaal bedoeld voor gebruik voor de voorbehandeling en enzymvertering van in formaline gefixeerd, in paraffine ingebed weefsel, voorafgaand aan de FISH-hybridisatieprocedure van het dna. Deze set is speciaal bedoeld voor het verkrijgen van optimale resultaten op in formaline gefixeerd, in paraffine ingebed weefsel dat lastig is of met veel kruisverbanden. Het gebruik van de set zorgt ervoor dat de kruisverbanden in het weefsel worden omgekeerd, het celmembraan permeabel wordt gemaakt en celeiwitten worden verteerd, zodat de binding van de FISH-probes met het specifieke cel-dna wordt vergemakkelijkt.

3 Gebruiksaanwijzing

3.1 Monsters

Deze voorbehandelingsset is speciaal bedoeld voor het verkrijgen van optimale resultaten op in formaline gefixeerde, in paraffine ingebedde monsters die lastig zijn of met veel kruisverbanden (bijv. een langere fixatie of langdurige opslag).

Pre-analyse van de monsters: Voor het verkrijgen van een succesvolle FISH speelt pre-analyse een belangrijke rol. Het monster moet op de juiste manier worden gefixeerd en in paraffinewas worden ingebed, volgens een gangbaar protocol. Een te sterke of een te zwakke fixering kan ervoor zorgen dat de FISH-procedure mislukt, of minstens zorgen voor een lage reproduceerbaarheid of lage intensiteit van het signaal. De FISH-probes van Kreatech™ zijn getest op in formaline gefixeerd, in paraffine ingebedde weefselcoupes die op een dikte van 3-6 µm zijn gesneden. Weefselblokken en de objectglasjes met coupes moeten worden opgeslagen volgens de aanbevolen opslag- en hanteringsomstandigheden voor optimale resultaten. Raadpleeg de website van Leica. Het bakken kan op de BOND worden uitgevoerd met het *Bak- en ontwassingsprotocol of afzonderlijk in een oven of incubator. De aanbevolen baktemperatuur en -tijd is tot 16 uur bij 56 °C, of 60-120 min. bij 80 °C.

3.2 Voorbehandeling

Breng in formaline gefixeerde, in paraffine ingebedde weefselcoupes van 3-6 µm aan op positief geladen objectglasjes (bijv. aminoalkylsilaan). Het onderstaande protocol dient voor het gebruik van 5 objectglasjes in een rechtopstaand Coplin-kleurpotje van 50 ml.

1. Bak de aldus vastgezette objectglasjes gedurende 2 uur bij een temperatuur van 80 °C, of gedurende 16 uur bij een temperatuur van 56 °C.

2. Ontdoe de warme objectglaasjes van paraffine door ze twee keer 10 minuten (minimaal) in xyleen of een xyleenvervanger te laten staan.
3. Ze kunnen weer worden gehydrateerd door ze elk gedurende 3 minuten in 100%, 85% en 70% ethanol te laten staan.
4. Was gedurende 3 minuten met dH₂O op kamertemperatuur.
5. Voorbehandelen met 50 ml 0,2 M HCl (LK-099B) gedurende 20 min op kamertemperatuur en vervolgens wassen in dH₂O gedurende 3 minuten op kamertemperatuur.
6. Plaats de objectglaasje in 50 ml Pretreatment Solution B (8% natriumthiocyanaat) (LK-100B) bij een temperatuur van 80 °C gedurende 30 minuten.
7. Spoelen in 50 ml 2 x SSC (LK-104B) gedurende 3 minuten op kamertemperatuur.
8. Bedek de paraffinecoupes met ongeveer 200 µl Pepsin Solution (LK-101B) en laat op kamertemperatuur gedurende 5-50 minuten incuberen (De tijd is afhankelijk van de mate van fixatie van het weefsel en het soort weefsel. Bijvoorbeeld: voor de meeste borstkankerweefsels is 5-15 minuten vertering nodig; voor colonweefsel is 20-30 minuten nodig).
9. Was gedurende 1 minuut in dH₂O.
10. Was in 50 ml 2 x SSC (LK-104B) gedurende 5 minuten op kamertemperatuur.
11. De objectglaasjes kunnen worden gedehydrateerd door ze elk gedurende 1 minuut in 70%, 85% en 100% ethanol te laten staan. Aan de lucht laten drogen. Ga verder naar **Klaarmaken van de probe**.

3.3 Klaarmaken van de probe:

FISH-probes van Kreatech™ voor in paraffine ingebed weefsel worden gebruiksklaar geleverd, tenzij dit anders in de productdocumentatie anders is aangegeven. Raadpleeg het etiket op de flacon en de folder bij de probeverpakking voor informatie over de verdunning.

3.4 Co-denaturatie

Breng 10 µl van de probe aan per veld van 22 x 22 mm. Bedek met dekglasjes en dicht af met Fixogum of rubbercement. Denatureer het monster en de probe op een ThermoBrite (TS-01/02) bij een temperatuur van 80 ±1 °C gedurende 5 min. Ga verder naar **Hybridisatie**.

3.5 Hybridisatie:

Gedurende de nacht incuberen bij een temperatuur van 37 ±1 °C in een ThermoBrite (TS-01/02) of in een vochtige kamer.

3.6 Wassen na de hybridisatie:

1. U kunt 50 ml Wash Buffer I (0,4 x SSC / 0,3% Igepal) (LK-102) voorverwarmen tot 72 °C.
2. Verwijder het rubbercement.
3. Plaats de objectglaasjes in 50 ml Wash Buffer II (2 x SSC / 0,1% Igepal) (LK-103) en laat deze gedurende 2 minuten op kamertemperatuur incuberen. Schuif de dekglasjes eraf. U kunt dezelfde wasbuffer hergebruiken voor in totaal 10 objectglaasjes.
4. Plaats de objectglaasjes in 50 ml voorverwarmd Wash Buffer I (0,4 x SSC / 0,3% Igepal) (LK-102) en laat deze gedurende 2 minuten bij een temperatuur van 72 °C (+ 1 °C) incuberen, zonder doorroeren. U kunt dezelfde wasbuffer hergebruiken voor in totaal 10 objectglaasjes.
5. Plaats de objectglaasjes in 50 ml vers Wash Buffer II (2 x SSC / 0,1% Igepal) (LK-103) en laat deze gedurende 1 minuut op kamertemperatuur incuberen, zonder doorroeren. U kunt dezelfde wasbuffer hergebruiken voor in totaal 10 objectglaasjes.
6. De objectglaasjes kunnen worden gedehydrateerd door ze elk gedurende 1 minuut in vers 70%, 85% en 100% ethanol op kamertemperatuur te laten staan. Op kamertemperatuur aan de lucht laten drogen en verder gaan naar **Tegenkleuring**.

3.7 Tegenkleuring:

Breng 15 µl DAPI-tegenkleuring (DAPI/Antifade 1 µg/ml) (LK-096B) aan, of een verdunning hiervan, met behulp van tegenkleuringverdunningsmiddel (LK097B) en breng een dekglasje aan. Ga verder naar microscopie.

3.8 Procedurele aanbevelingen:

Controleer de eiwitvertering en de voorbehandeling, door het aanbrengen van 15 µl DAPI-tegenkleuring, en bekijk de objectglaasjes met behulp van een fluorescentiemicroscop, uitgerust met een DAPI-filter. Indien het monster onvoldoende is verteerd, kunt u het dekglasje verwijderen en het weefsel gedurende 2 minuten in 2 x SSC (LK-

104B) laten staan en de eiwitvertering op deze manier verlengen. Indien het monster teveel is verteerd, kunt u een vers monster gebruiken en de tijd voor de eiwitvertering verminderen.

De temperatuur en bufferconcentratie (de zogenaamde stringentie) van de hybridisatie en het wassen zijn belangrijk, omdat een lagere stringentie kan leiden tot niet-specifieke binding van de probe aan andere sequenties, en een hogere stringentie kan leiden tot een onvoldoende signaal. Een onvolledige denaturatie van doel-dna kan leiden tot een onvoldoende signaal.

3.9 Aanbevelingen voor fluorescentiemicroscopie

Voor een optimale visualisering kunt u gebruikmaken van een goed onderhouden en regelmatig geijkte microscoop, voorzien van een kwiklamp van 100 W, of een andere lichtbron (bijv. een metaalhalidelamp (120 W X-cite) of een led-lamp) en een fluorescentie-objectief van 63x of 100x. Drieband-doorlaatfilters (DAPI/FITC/Cy3 of DAPI/FITC/TRITC) worden gebruikt om meerdere kleuren te bekijken; enkelband-doorlaatfilters worden gebruikt voor afzonderlijke kleurvisualisatie. Zie de website van Leica voor aanbevelingen over de geschikte filters voor elke microscoopband: <http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/kreatech-fish-probes/>

Geschikt excitatie- en emissiebereik voor fluoroforen van Kreatech™:

Fluoroforen	Excitatie	Emissie
DAPI	360 ±20 nm	460 ±30 nm
PlatinumBright™ 415	429 ±15 nm	470 ±15 nm
PlatinumBright™ 495	495 ±10 nm	517 ±10 nm
PlatinumBright™ 550	550 ±10 nm	580 ±10 nm

De weergegeven bandbreedte komt overeen met 80% van de maximale excitatie of emissie van de fluorofoor)

4 Analytische prestaties

De prestaties van de Tissue Digestion Kit II zijn bepaald met behulp van de procedures die in deze gebruiksaanwijzing zijn beschreven. Aanpassingen aan deze procedures kunnen de prestaties van de assay beïnvloeden. Afwijkingen van de voorgeschreven protocollen moeten door de gebruiker worden gevalideerd. Gebruikers die afwijken van de aanbevolen testprocedures moeten de verantwoordelijkheid aanvaarden voor de interpretatie van patiëntenresultaten verkregen onder deze omstandigheden. De protocoeltijden kunnen variëren wegens de fixatie en de verwerking. Bovendien kan optimalisatie van de incubatietijd van pepsine nodig zijn, afhankelijk van de verwerking en de fixatiecondities.

5 Benodigde materialen die bij het product worden meegeleverd

Code nr.	Beschrijving	Volume
LK-096B	DAPI/Antifade 1 µg/ml (DAPI Counterstain)	0,5 ml
LK-097B	Antifade (Counterstain verdunningsmiddel)	0,5 ml
LK-099B	0,2 M HCl	250 ml
LK-100B	8% natriumthiocyanaat (Pretreatment Solution B)	250 ml
LK-101B	Pepsin Solution	5 ml
LK-102B*	0,4 x SSC / 0,3% Igepal (Wash Buffer I)	250 ml
LK-103B*	2 x SSC / 0,1% Igepal (Wash Buffer II)	2 x 250 ml
LK-104B	2 x SSC	2 x 250 ml

**Merk op dat de producten LK-102 en LK-103 met hetzelfde nummer, maar een andere letter, identiek zijn, behalve het volume. A = 100 ml, B = 250 ml*

6 Benodigde materialen die niet bij het product worden meegeleverd

- Xyleen
- Ethanol 100%, 85% en 70%
- Fixogum (LK-071A) of rubbercement

- Verwarmingsplaat met nauwkeurige temperatuurregeling tot maximaal 80 °C of ThermoBrite™ (TS01/TS02)
- Incubator met een nauwkeurig temperatuurbereik van 37-56 °C
- Waterbad met een nauwkeurig temperatuurbereik van 37-80 °C
- Kunststoffen en glazen Coplin-kleurpotjes
- Micropipetten van verschillende grootte (1-200 µl)
- Fluorescentiemicroscoop voorzien van passende filters (zie de aanbevelingen voor fluorescentiemicroscopie).

7 Waarschuwing en voorzorgsmaatregelen

- Alle ernstige incidenten die zijn opgetreden ten aanzien van het hulpmiddel, dienen te worden gemeld aan de fabrikant en de bevoegde autoriteiten in de lidstaat waarin de gebruiker en/of de patiënt is gevestigd.
- Voor gebruik bij diagnose in vitro. Uitsluitend voor professioneel gebruik in laboratoria. Raadpleeg in noodgevallen het veiligheidsinformatieblad voor informatie ten aanzien van de veiligheid.
- De set is uitsluitend bedoeld voor gebruik voorafgaand aan en na afloop van dna-FISH op in formaline gefixeerd, in paraffine ingebed weefsel. Dit product is niet bedoeld voor gebruik op bevroren weefsel.
- Uitsluitend voor niet-geautomatiseerde FISH-behandeling en -hybridisering.
- Alle materialen dienen te worden afgevoerd in overeenstemming met de richtlijnen ten aanzien van de afvoer van ziekenhuisafval van uw instelling.
- Het gebruik van de KBI-60007 Tissue Digestion Kit I wordt aanbevolen voor gebruik met conventionele in formaline gefixeerde, in paraffine ingebedde monsters.
- Voor cellen in de metafase en interfase, of andere cytologische monsters wordt het gebruik van voorbehandelingsset KBI-60005 of KBI-60006 aanbevolen.

Etikettering in overeenstemming met Verordening (EC) nr. 1272/2008

Code nr.	Beschrijving	Signaalwoord	Pictogram	Gevarenaanduidingen
LK-096B	DAPI/Antifade 1 µg/ml (DAPI Counterstain)	Waarschuwing		H315, H319, H335
LK-097B	Antifade (Counterstain verdunningsmiddel)	Waarschuwing		H315, H319, H335
LK-099B	0,2 M HCl	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.
LK-100B	8% natriumthiocyanaat (Pretreatment Solution B)	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.
LK-101B	Pepsin Solution	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.
LK-102B	0,4 x SSC / 0,3% Igepal (Wash Buffer I)	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.
LK-103B	2 x SSC / 0,1% Igepal (Wash Buffer II)	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.
LK-104B	2 x SSC	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.

Gevarenaanduiding(en)

H315 – Veroorzaakt huidirritatie.

H319 – Veroorzaakt ernstige oogirritatie.

H335 – Kan irritatie van de luchtwegen veroorzaken.

Voorzorgsaanduiding(en) Preventie

P271 – Alleen buiten of in een goed geventileerde ruimte gebruiken.

P261 – Inademing van stof/rook/gas/nevel/damp/spuitnevel vermijden.

P264 – Na het werken met het product alle blootgestelde externe delen van het lichaam grondig wassen.

P280 – Beschermende handschoenen/beschermende kleding/oogbescherming/gelaatsbescherming dragen.

Voorzorgsaanduiding(en) Respons

P305 + P351 + P338 - INDIEN IN OGEN: Voorzichtig afspoelen met water gedurende een aantal minuten. contactlenzen verwijderen, indien mogelijk. Blijven spoelen.

P312 – Bel onmiddellijk een ANTIGIFCENTRUM of raadpleeg een arts of EHBO-medewerker indien u zich niet goed voelt.

P337 + P313 – Bij aanhoudende oogirritatie: Zoek medische hulp/advies.

P302 + P352 – BIJ CONTACT MET DE HUID: Wassen met ruime hoeveelheid water en zeep.

P304 + P340 – BIJ INADEMING: De persoon in de frisse lucht brengen en ervoor zorgen dat deze gemakkelijk kan ademen.

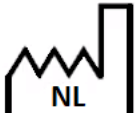
P332 + P313 – Bij huidirritatie: Zoek medische hulp/advies.

P362 + P364 – Verontreinigde kleding uittrekken en wassen alvorens deze opnieuw te gebruiken.

Aanvullende gevarenaanduidingen: geen

Voorbehouden aan professionele gebruikers in laboratoria

Verklaring van symbolen

	Bevat gevaarlijke stoffen
	Land waarin de fabrikant is gevestigd
	Niet gebruiken als de verpakking beschadigd is
	Raadpleeg de elektronische gebruiksaanwijzing

8 Opslag en hantering van het reagens

Bescherm DAPI/Antifade tegen sterk en rechtstreeks licht. Bewaar bij 2-8 °C. Onder deze omstandigheden is het product stabiel tot de vervaldatum die op het etiket van de flacon is vermeld.

Breng onverdunde en verdunde reagentia na gebruik onmiddellijk terug tot 2-8 °C.

Na het openen zijn producten stabiel tot een periode van maximaal 18 maanden, maar nooit later dan de houdbaarheidsdatum van elk afzonderlijk product. Na deze periode kan het gebruik van de oplossingen leiden tot suboptimale resultaten.

9 Technische ondersteuning

Technische ondersteuning is te vinden op www.leicabiosystems.com of via e-mail: Kreatech.Support@Leicabiosystems.com. Indien de gewenste resultaten niet worden bereikt of er bij het gebruik van dit product onregelmatigheden optreden, kunt u contact met ons opnemen.

U kunt een papieren versie van de gebruiksaanwijzing aanvragen via e-mail, door contact op te nemen met: LBSAMS-IFU@leicabiosystems.com



De elektronische gebruiksaanwijzing is beschikbaar in extra talen, die u kunt downloaden op www.leicabiosystems.com

10 Klantenservice

De probes van Kreatech kunnen worden besteld via de Klantenservice van Leica, telefoonnummer +31 20 6919181, of u kunt deze via e-mail bestellen: purchase.orders@leica-microsystems.com.

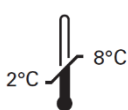
11 Geschiedenis

Versie gebruiksaanwijzing	Datum uitgave	Wijzigingen
2.4	2016-SEP-27	Verwijderen van de slogan 'The pathology Company'
3.0	2022 april	Update volgens IVD-voorschriften

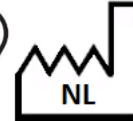
Tissue Digestion Kit II

REF KBI-60004

Som inneholder tilstrekkelig volum for opptil 25 eller 5 x 5 tester



Kreatech Biotechnology B.V.
Vlierweg 20
1032 LG Amsterdam
Nederland
www.LeicaBiosystems.com



1 Tiltentkt bruk / formål

Fluorescerende in situ-hybridisering (FISH) identifiserer eller merker genomiske målsekvenser slik at plasseringen deres kan studeres. DNA-sekvenser fra passende kromosomspesifikke prober merkes først med reportertermolekyler. Den merkede DNA-proben hybridiseres deretter til metafasekromosomene eller interfasekjernene på et objektglass. Etter vask blir prøvematerialet screenet for reportertermolekylene ved fluorescensmikroskopi.

Dette forbehandlingssettet er spesielt utviklet for å oppnå optimale resultater på sterkt tverrbundet eller vanskelig formalinfiksert parafininnstøpt vev (FFPE) (f.eks. lengre fiksering eller langvarig oppbevaring).

Dette produktet er beregnet for in vitro-diagnostisk bruk.

2 Produktbeskrivelse

Dette forbehandlingssettet er for ikke-automatiserte FISH-hybridiseringer spesielt utviklet for bruk for forbehandling og enzymnedbrytning av FFPE før DNA FISH-hybridiseringsprosedyre. Dette settet er spesielt utviklet for å oppnå optimale resultater på sterkt tverrbundet eller vanskelig FFPE-vev. Bruk av settet vil reversere tverrbindingene i vevet, permeabilisere cellemembranen og bryte ned celleproteiner for å lette bindingen av FISH probes til det spesifikke celle-DNA-et.

3 Bruksanvisning

3.1 Prøvematerialer

Dette forbehandlingssettet er spesielt utviklet for å oppnå optimale resultater på sterkt tverrbundet eller vanskelig formalinfiksert parafininnstøpt vev (FFPE) (f.eks. lengre fiksering eller langvarig oppbevaring).

Prøvematerialenes foranalyse: Foranalysen spiller en stor rolle for å oppnå en vellykket FISH. Prøvematerialet skal fikseres på riktig måte og støpes inn i parafinvoks i henhold til en veletablert protokoll. Overfiksering eller underfiksering kan forårsake svikt i FISH-prosedyren eller i det minste lav reproducerbarhet/signalintensitet. Kreatech™ FISH probes er testet på FFPE-vevssnitt som ble kuttet ved 3–6 µm. Vevsblokker og kuttete objektglass bør oppbevares i henhold til anbefalte oppbevarings- og håndteringsforhold for optimale resultater, se Leicas nettside. Baking kan gjøres enten på BOND ved å bruke *Bake and Dewax-protokollen eller separat i en ovn eller inkubator. Anbefalt baketemperatur og -tid er opptil 16 timer ved 56 °C, eller 60–120 minutter ved 80 °C.

3.2 Forbehandling

Monter 3–6 µm formalinfikserte parafininnstøpte vevssnitt på positivt ladede objektglass (f.eks. aminoalkylsilan). Protokollen nedenfor er for bruk av 5 objektglass i en oppreist Coplin-krukke på 50 ml.

1. Bak monterte objektglass i 2 timer ved 80 °C eller 16 timer ved 56 °C.
2. Fjern parafinen fra varme objektglass ved å bløtlegge dem i xylen eller xylenerstating i to ganger 10 minutter (min).
3. Rehydrerer ved å bløtlegge i 100 %, 85 % og 70 % etanol i 3 minutter hver.
4. Vask med dH₂O i 3 min ved romtemperatur (RT).
5. Forbehandle med 50 ml 0,2 M HCl (LK-099B) i 20 minutter ved RT, og vask deretter i dH₂O i 3 minutter ved RT.
6. Plasser objektglass i 50 ml Pretreatment Solution B (8 % natriumtiocyanat) (LK-100B) ved 80 °C i 30 minutter.
7. Skyll i 50 ml 2 x SSC (LK-104B) i 3 minutter ved RT.

8. Dekk parafinsnittet med ca. 200 µl Pepsin Solution (LK-101B) og inkuber ved RT i 5–50 min (tid avhengig av vevsfiksering og vevstype. F.eks. trenger det meste av brystkreftvev 5–15 min med nedbrytning, tykktarmsvev 20–30 min).
9. Vask i dH₂O i 1 min.
10. Vask i 50 ml med 2 x SSC (LK-104B) i 5 minutter ved RT.
11. Dehydrer objektglass ved bløtlegging i 70 %, 85 % og 100 % etanol i 1 min hver. Lufttørk. Fortsett med **klargjøring av probe**.

3.3 Klargjøring av probe:

Kreatech™ FISH probes for parafininnstøpt vev leveres klare til bruk (RtU) med mindre annet er spesifisert i produktokumentasjonen. Se etiketten på hetteglasset og pakningsvedlegget for den spesifikke proben for spesifikasjoner om fortynningsmiddel.

3.4 Samdenaturering

Bruk 10 µl probe per 22 x 22 mm felt. Dekk til med dekkglass og forsegl med Fixogum eller gummisement. Denaturer prøve og probe på en ThermoBrite (TS-01/02) ved 80 ± 1 °C i 5 min. Fortsett med **hybridisering**.

3.5 Hybridisering:

Inkuber over natten ved 37 ± 1 °C i en ThermoBrite (TS-01/02) eller i et fuktet kammer.

3.6 Etterhybridiseringsvask:

1. Forvarm 50 ml med Wash Buffer I (0,4 x SSC / 0,3 % Igepal) (LK-102) til 72 °C
2. Fjern gummisement.
3. Plasser objektglass i 50 ml Wash Buffer II (2 x SSC / 0,1 % Igepal) (LK-103), inkuber i 2 min. ved RT. Skyv av dekket. Gjenbruk vaskebufferen bare én gang for totalt 10 objektglass.
4. Plasser objektglassene i 50 ml forvarmet Wash Buffer I (0,4 x SSC / 0,3 % Igepal) (LK-102), inkuber i 2 minutter ved 72 °C (+ 1 °C) uten omrøring. Gjenbruk vaskebufferen bare én gang for totalt 10 objektglass.
5. Plasser objektglass i 50 ml fersk Wash Buffer II (2 x SSC / 0,1 % Igepal) (LK-103), inkuber i 1 min. ved RT uten omrøring. Gjenbruk vaskebufferen bare én gang for totalt 10 objektglass.
6. Dehydrer i fersk 70 %, 85 % og 100 % etanol, inkuber i 1 minutt hver ved RT. Lufttørk ved RT og fortsett til **kontrastfarging**.

3.7 Kontrastfarging:

Bruk 15 µl DAPI counterstain (DAPI/Antifade 1 µg/ml) (LK-096B) eller en fortynning av denne ved hjelp av fortynningsmiddel for kontrastfarge (LK097B) og bruk dekkglass. Fortsett med mikroskopi.

3.8 Prosedyreanbefalinger:

Sjekk proteinnedbrytningen og forbehandlingen ved å påføre 15 µl DAPI counterstain og evaluer objektglass ved hjelp av et fluorescensmikroskop utstyrt med et DAPI-filter. Hvis prøven ikke er tilstrekkelig nedbrutt: fjern dekkglasset og bløtlegg vevet i 2 x SSC (LK-104B) i 2 minutter og forleng proteinnedbrytningen. Bruk en fersk prøve og reduser proteinnedbrytningstiden hvis prøven er for mye nedbrutt.

Temperatur og bufferkonsentrasjon (stringens) ved hybridisering og vask er viktig, da lavere stringens kan føre til uspesifikk binding av proben til andre sekvenser, og høyere stringens kan føre til mangel på signal. Ufullstendig denaturering av mål-DNA kan føre til mangel på signal.

3.9 Anbefalinger for fluorescensmikroskopi

Bruk et godt vedlikeholdt og regelmessig kalibrert mikroskop utstyrt med en 100W kvikksølvlampe eller annen passende lyskilde for optimal visualisering (f.eks. Metal Halide Bulb (120W X-cite) eller LED-baserte lyskilder) og et 63x eller 100x fluorescensobjektiv. Trippelbåndpassfiltre (DAPI/FITC/Cy3 eller DAPI/FITC/TRITC) brukes til å vise flere farger, enkeltbåndpassfiltre brukes for individuell fargevisualisering. Se Leicas nettsted for anbefalinger om passende filtre for hvert mikroskopmerke: <http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/kreatech-fish-probes/>

Egnet eksiterings- og strålingsrekkevidde for Kreatech™-fluoroforer:

Fluorofor	Eksitering	Stråling
DAPI	360 ±20 nm	460 ±30 nm
PlatinumBright™ 415	429 ±15 nm	470 ±15 nm
PlatinumBright™ 495	495 ±10 nm	517 ±10 nm
PlatinumBright™ 550	550 ±10 nm	580 ±10 nm

Den viste båndbredden tilsvarer 80 % av maksimum eksitering/stråling av fluorofor)

4 Analysens ytelse

Ytelsen til ssue Digestion Kit II er etablert ved å bruke prosedyrene beskrevet i denne bruksanvisningen. Endringer i disse prosedyrene kan endre ytelsen til analysen. Eventuelle avvik fra de instruerte protokollene må valideres av brukeren. Brukere som avviker fra de anbefalte testprosedyrene, må ta ansvaret for tolkningen av pasientresultatene under disse forholdene. Protokolltidene kan variere på grunn av variasjon i fiksering og behandling. I tillegg kan inkuberingstiden for pepsin kreve optimalisering avhengig av behandling og fikseringsforhold.

5 Materialer som kreves og leveres med produktet

Kode #	Beskrivelse	Volum
LK-096B	DAPI/Antifade 1 µg/ml (DAPI Counterstain)	0,5 ml
LK-097B	Antifade (Fortynningsmiddel til kontrastfarge)	0,5 ml
LK-099B	0,2 M HCl	250 ml
LK-100B	8 % natriumtiocyanat (Pretreatment Solution B)	250 ml
LK-101B	Pepsin Solution	5 ml
LK-102B*	0,4 x SSC / 0,3 % Igepal (Wash Buffer I)	250 ml
LK-103B*	2 x SSC / 0,1 % Igepal (Wash Buffer II)	2 x 250 ml
LK-104B	2 x SSC	2 x 250 ml

*Vær oppmerksom på at LK-102- og LK-103-produkter som inneholder samme nummer, men forskjellige bokstaver er identiske bortsett fra volum. A = 100 ml, B = 250 ml

6 Materialer som kreves og ikke leveres med produktet

- Xylen
- Etanol 100 %, 85 % og 70 %
- Fixogum (LK-071A) eller gummisement
- Varmeplate med nøyaktig temperaturkontroll opp til 80 °C eller ThermoBrite™ (TS01/TS02)
- Inkubator med nøyaktig temperaturområde på 37–56 °C
- Vannbad med nøyaktig temperaturområde på 37–80 °C
- Coplin-krukker i plast og glass
- Variable mikropipetter (1 µl – 200 µl)
- Fluorescensmikroskop utstyrt med egnede filtre (se anbefalinger for fluorescensmikroskopi).

7 ADVARSEL OG FORHOLDSREGLER

- Enhver alvorlig hendelse som har oppstått i forbindelse med enheten, skal rapporteres til produsenten og pågjøldende myndighet i landet der brukeren og / eller pasienten har fast tilholdssted.
- Til in vitro-diagnostisk bruk. Kun til profesjonell bruk på laboratorier. I nødstilfeller: sjekk SDS-arkene for sikkerhetsinformasjon.
- Settet er ment å kun brukes før og etter DNA FISH på FFPE-vev. Dette produktet er ikke ment for bruk for frosset vev.
- Kun for ikke-automatisert FISH-forbehandling og -hybridisering.
- Alt materiale skal avhendes i henhold til institusjonens retningslinjer for avfallshåndtering på sykehus.
- Bruk av KBI-60007 Tissue Digestion Kit I anbefales for bruk med konvensjonelle FFPE-prøver.
- For metafase- og interfaseceller eller andre cytologiske prøver anbefales det å bruke KBI-60005- eller KBI-60006-forbehandlingssett.

Merking med skilt i henhold til forordning (EF) nr. 1272/2008

Kode #	Beskrivelse	Signalord	Piktogram	Faresetninger
LK-096B	DAPI/Antifade 1 µg/ml (DAPI Counterstain)	ADVARSEL		H315, H319, H335
LK-097B	Antifade (Fortynningsmiddel til kontrastfarge)	ADVARSEL		H315, H319, H335
LK-099B	0,2 M HCl	N.A.	N.A.	N.A.
LK-100B	8 % natriumtiocyanat (Pretreatment Solution B)	N.A.	N.A.	N.A.
LK-101B	Pepsin Solution	N.A.	N.A.	N.A.
LK-102B	0,4 x SSC / 0,3 % Igepal (Wash Buffer I)	N.A.	N.A.	N.A.
LK-103B	2 x SSC / 0,1 % Igepal (Wash Buffer II)	N.A.	N.A.	N.A.
LK-104B	2 x SSC	N.A.	N.A.	N.A.

Faresetning(er)

H315 – Irriterer huden.

H319 – Gir alvorlig øyeirritasjon.

H335 – Kan forårsake irritasjon av luftveiene

Sikkerhetssetning(er), forebygging

P271 – Skal kun brukes utendørs eller i et godt ventilert område.

P261 – Unngå å puste inn tåke / damp / spray.

P264 – Vask alle eksponerte utvendige områder på kroppen grundig etter håndtering.

P280 – Bruk beskyttende hansker, verneklær, øyebeskyttelse og ansiktsbeskyttelse.

Sikkerhetssetning(er), respons

P305+P351+P338 – VED KONTAKT MED ØYNENE: Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser dersom dette enkelt lar seg gjøre. Fortsett skyllingen.

P312 – Kontakt GIFTINFORMASJONEN / lege / førstehjelp / hvis du kjenner deg uvel.

P337+P313 – Ved vedvarende øyeirritasjon: Søk legehjelp.

P302+P352 – VED HUDKONTAKT: Vask med rikelig med vann og såpe.

P304+P340 – VED INNÅNDING: Flytt personen til frisk luft og sørg for at vedkommende har en stilling som letter åndedrettet.

P332+P313 – Hvis det oppstår hudirritasjon: Søk legehjelp.

P362+P364 – Tilsølte klær må fjernes og vaskes før de brukes på nytt.

Supplerende faresetninger: ingen

Begrenset til profesjonelle laboratoriebrukere

Forklaring av symboler

	Inneholder farlige stoffer
	Produksjonsland
	Må ikke brukes hvis pakningen er skadet
	Se elektronisk bruksanvisning (eIFU)

8 Oppbevaring og håndtering av reagens

Beskytt DAPI/Antifade mot sterkt og direkte lys. Oppbevares ved 2–8 °C. Det uåpnede produktet er stabilt under disse forholdene frem til utløpsdatoen som er angitt på hetteglassets etikett.

Sett ufortynnede og fortynnede reagenser tilbake i 2–8 °C umiddelbart etter bruk.

Etter åpning er produktene stabile i opptil 18 måneder, men aldri lenger enn utløpsdatoen for hvert enkelt produkt. Etter denne tidsperioden kan bruk av løsningene gi suboptimale resultater.

9 Teknisk støtte

Teknisk støtte er tilgjengelig på www.leicabiosystems.com eller via e-post: Kreatech.Support@Leicabiosystems.com. Kontakt oss hvis ønskede resultater ikke oppnås eller det oppstår uregelmessigheter ved bruk av dette produktet.

En papirutskrevet kopi av bruksanvisningen kan etterspørres via e-post ved å kontakte: LBSAMS-IFU@leicabiosystems.com



Den elektroniske bruksanvisningen (eIFU) er tilgjengelig på flere språk, og kan lastes ned fra: www.leicabiosystems.com

10 Kundeservice

Kreatech probes kan bestilles gjennom Leicas kundeservice +31 20 6919181 eller bestilles via e-post: purchase.orders@leica-microsystems.com.

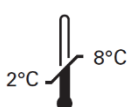
11 Historikk

Versjon av bruksanvisning	Uttstedelsesdato	Endringer
2.4	2016-SEP-27	Fjern overskriften "The pathology Company" (Patologiselskapet)
3.0	April 2022	Oppdater i henhold til IVD-forskrifter

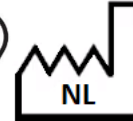
Zestaw do trawienia tkanek II

REF KBI-60004

Zawierający objętość wystarczającą do wykonania 25 lub 5 x 5 testów



Kreatech Biotechnology B.V.
Vlierweg 20
1032 LG Amsterdam
Holandia
www.LeicaBiosystems.com



1 Przeznaczenie/zamierzony cel

Fluorescencyjna hybrydyzacja in situ (FISH) umożliwia identyfikację lub znakowanie docelowych sekwencji genomowych, dzięki czemu można zbadać ich lokalizację. Sekwencje DNA z odpowiednich sond specyficznych dla chromosomów są najpierw znakowane za pomocą cząsteczek reportera. Oznakowana sonda DNA jest następnie hybrydyzowana do chromosomów metafazowych lub jąder interfazowych na preparacie. Po przemyciu próbka jest badana pod mikroskopem fluorescencyjnym w poszukiwaniu cząsteczek reportera.

Zestaw do obróbki wstępnej został opracowany specjalnie do uzyskania optymalnych wyników w przypadku silnie usieciowanych lub trudnych do utrwalenia w formalinie tkanek zatopionych w parafinie (FFPE) (np. dłużej utrwalanych lub dłużej przechowywanych).

Produkt służy do stosowania w diagnostyce in vitro.

2 Opis produktu

Zestaw do obróbki wstępnej jest przeznaczony do nieautomatycznej hybrydyzacji FISH i został opracowany specjalnie do wstępnej obróbki i trawienia enzymatycznego FFPE przed procedurą hybrydyzacji DNA FISH. Zestaw pozwala na uzyskanie optymalnych wyników w przypadku silnie usieciowanych lub trudnych tkanek FFPE. Na skutek zastosowania zestawu dochodzi do odwrócenia wiązań krzyżowych w tkance, permeabilizacji błony komórkowej i trawienia białek komórkowych, co ułatwia wiązanie sond FISH ze specyficznym DNA komórkowym.

3 Instrukcja stosowania

3.1 Próbkki

Zestaw do obróbki wstępnej został opracowany specjalnie do uzyskania optymalnych wyników w przypadku silnie usieciowanych lub trudnych do utrwalenia w formalinie tkanek zatopionych w parafinie (FFPE) (np. dłużej utrwalanych lub dłużej przechowywanych).

Analizy wstępne próbek: Ważną rolę w prawidłowym przeprowadzeniu FISH odgrywają analizy wstępne. Próbka powinna zostać prawidłowo utrwalona i zatopiona w parafinie zgodnie z ustalonym protokołem. Nadmierne lub niedostateczne utrwalenie może doprowadzić do niepowodzenia procedury FISH lub w najlepszym przypadku do niskiej odtwarzalności/intensywności sygnału. Sondy FISH Kreatech™ zostały przetestowane na skrawkach tkanek FFPE przyciętych do grubości 3-6 µm. Aby uzyskać optymalne wyniki, bloki tkanek i pocięte preparaty należy przechowywać zgodnie z zalecanymi warunkami przechowywania i przetwarzania. Patrz strona internetowa firmy Leica. Wyrzewanie może odbywać się zarówno w urządzeniu BOND z wykorzystaniem protokołu *Wyrzewanie i odparafinowywanie, jak i osobno w piekarniku lub inkubatorze. Zalecana temperatura i czas wyrzewania wynosi do 16 godzin w temperaturze 56°C lub 60-120 min. w temperaturze 80°C.

3.2 Obróbka wstępna

Na dodatkowo naładowanych szkiełkach (np. aminoalkilosilanowych) należy umieścić utrwalone w formalinie, zatopione w parafinie skrawki tkanek o grubości 3-6 µm. Poniższy protokół dotyczy użycia 5 preparatów w barwiaczu pionowym Coplina o pojemności 50 ml.

1. Wyrzewać zamknięte preparaty przez 2 godziny w temperaturze 80°C lub 16 godzin w temperaturze 56°C.
2. Odparafinować ciepłe preparaty przez dwukrotne 10-minutowe zanurzenie w ksylenu lub jego zamienniku.
3. Ponownie nawodnić przez zanurzenie po kolei w 100%, 85% i 70% etanolu na 3 min.

4. Przemyć w dH₂O przez 3 min. w temperaturze pokojowej.
5. Poddać obróbce wstępnej z użyciem 50 ml 0,2 M HCl (LK-099B) przez 20 min. w temperaturze pokojowej, a następnie przemyć w dH₂O przez 3 min. w temperaturze pokojowej.
6. Umieścić preparaty w 50 ml roztworu do obróbki wstępnej B (8% tiocyjanian sodu) (LK-100B) w temperaturze 80°C na 30 min.
7. Płukać w 50 ml 2 x SSC (LK-104B) przez 3 min. w temperaturze pokojowej.
8. Pokryć skrawek parafinowy około 200 µl roztworu pepsyny (LK-101B) i inkubować w temperaturze pokojowej przez 5 - 50 min. (czas zależy od sposobu utrwalania tkanki i jej rodzaju. Np. większość tkanek raka piersi wymaga trawienia przez 5-15 min.; tkanka okrężnicy 20-30 min.).
9. Przemyć w dH₂O przez 1 min.
10. Przemyć w 50 ml 2 x SSC (LK-104B) przez 5 min. w temperaturze pokojowej.
11. Odwodnić preparaty, nasączając je 70%, 85% i 100% etanolem przez 1 min. za każdym razem. Wysuszyć na powietrzu. Następnie przystąpić do **przygotowywania sondy**.

3.3 Przygotowywanie sondy:

Sondy FISH Kretech™ do tkanek zatopionych w parafinie są dostarczane w postaci gotowej do użycia, chyba że w dokumentacji produktu podano inaczej. Szczegółowe informacje na temat rozcieńczania można znaleźć na etykiecie na fiolce i we wkładce do opakowania konkretnej sondy.

3.4 Jednoczesna denaturacja

Nanieść 10 µl sondy na pole o wymiarach 22 x 22 mm. Przykryć szkiełkiem nakrywkowym i uszczelnić za pomocą Fixogum lub kleju kauczukowego. Denaturować próbkę i sondę w urządzeniu ThermoBrite (TS-01/02) w temp. 80 ±1°C przez 5 min. Następnie przeprowadzić **hybrydyzację**.

3.5 Hybrydyzacja:

Inkubować przez noc w temperaturze 37 ±1°C w urządzeniu ThermoBrite (TS-01/02) lub w nawilżanej komorze.

3.6 Przemycanie po hybrydyzacji:

1. Podgrzać 50 ml buforu do przemycania I (0,4 x SSC / 0,3% Igelpal) (LK-102) do temp. 72 °C.
2. Usunąć klej kauczukowy.
3. Umieścić preparaty w 50 ml buforu do przemycania II (2 x SSC / 0,1% Igelpal) (LK-103), inkubować przez 2 min. w temperaturze pokojowej. Zsunąć szkiełka nakrywkowe. Buforu do przemycania można używać raz w sumie do obróbki 10 preparatów.
4. Umieścić preparaty w 50 ml podgrzanego wcześniej buforu do przemycania I (0,4 x SSC / 0,3% Igelpal) (LK-102), inkubować przez 2 min. w temp. 72°C (+- 1°C) bez mieszania. Buforu do przemycania można używać raz w sumie do obróbki 10 preparatów.
5. Umieścić preparaty w 50 ml świeżego buforu do przemycania II (2 x SSC / 0,1% Igelpal) (LK-103), inkubować przez 1 min. w temperaturze pokojowej bez mieszania. Buforu do przemycania można używać raz w sumie do obróbki 10 preparatów.
6. Odwodnić w świeżym 70%, 85% i 100% etanolu, inkubować przez 1 min. w temperaturze pokojowej. Wysuszyć na powietrzu w temperaturze pokojowej i przystąpić do **barwienia kontrastowego**.

3.7 Barwienie kontrastowe:

Nanieść 15 µl barwnika kontrastowego DAPI (DAPI/Antifade 1 µg/ml) (LK-096B) lub jego rozcieńczenia otrzymanego przy użyciu rozcieńczalnika do barwników kontrastowych (LK097B) i nałożyć szkiełko nakrywkowe. Przystąpić do badania pod mikroskopem.

3.8 Zalecenia dotyczące procedury:

Należy sprawdzić trawienie białek i obróbkę wstępną, nakładając 15 µl barwnika kontrastowego DAPI i ocenić preparaty pod mikroskopem fluorescencyjnym wyposażonym w filtr DAPI. Jeśli próbka nie jest dostatecznie wytrawiona: usunąć szkiełko nakrywkowe i namoczyć tkankę w 2 x SSC (LK-104B) przez 2 min., aby przedłużyć trawienie białka. Jeśli próbka jest nadmiernie wytrawiona, należy użyć świeżej próbki i skrócić czas trawienia białek.

Temperatura i stężenie buforu (rygorystyczność) hybrydyzacji i przemycania mają znaczenie, ponieważ niższa rygorystyczność może powodować niespecyficzne wiązanie sondy z innymi sekwencjami, a wyższa rygorystyczność może skutkować brakiem sygnału. Niepełna denaturacja docelowego DNA może skutkować brakiem sygnału.

3.9 Zalecenia dotyczące mikroskopii fluorescencyjnej

W celu uzyskania optymalnej wizualizacji należy używać dobrze utrzymanego i regularnie kalibrowanego mikroskopu wyposażonego w lampę rtęciową 100 W lub inne odpowiednie źródło światła (np. żarówkę metalohalogenkową (120 W X-cite) lub źródła światła opartego na diodach LED) oraz obiektyw fluorescencyjny 63x lub 100x. Filtry trójpasmowe (DAPI/FITC/Cy3 lub DAPI/FITC/TRITC) służą do wizualizacji wielu kolorów, a filtry jednopasmowe do wizualizacji pojedynczych kolorów. Zalecenia dotyczące odpowiednich filtrów dla poszczególnych marek mikroskopów można znaleźć na stronie internetowej firmy Leica: <http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/kreatech-fish-probes/>

Odpowiedni zakres wzbudzenia i emisji dla fluoroforów Kreatech™:

Fluorofor	Wzbudzenie	Emisja
DAPI	360 ±20 nm	460 ±30 nm
PlatinumBright™ 415	429 ±15 nm	470 ±15 nm
PlatinumBright™ 495	495 ±10 nm	517 ±10 nm
PlatinumBright™ 550	550 ±10 nm	580 ±10 nm

Przedstawiona szerokość pasma odpowiada 80% maksymalnego wzbudzenia/emisji fluoroforu)

4 Wydajność analityczna

Wydajność zestawu do trawienia tkanek II została określona przy użyciu procedur opisanych w niniejszej instrukcji użytkowania. Modyfikacje tych procedur mogą wpłynąć na wyniki badania. Wszelkie odstępstwa od zalecanych protokołów muszą zostać poddane walidacji przez użytkownika. W tych okolicznościach użytkownicy, którzy postępują niezgodnie z zalecanymi procedurami testowymi muszą wziąć odpowiedzialność za interpretację wyników chorego. Czasy protokołów mogą się różnić ze względu na różnice w utrwalaniu i obróbce. Ponadto czas inkubacji pepsyny może wymagać optymalizacji w zależności od rodzaju warunków obróbki i utrwalania.

5 Materiały wymagane i znajdujące się w zestawie

Kod #	Opis	Objętość
LK-096B	DAPI/Antifade 1 µg/ml (Barwnik kontrastowy DAPI)	0,5 ml
LK-097B	Antifade (Rozcieńczalnik do barwników kontrastowych)	0,5 ml
LK-099B	0,2 M HCl	250 ml
LK-100B	8% tiocyjanian sodu (Roztwór do obróbki wstępnej B)	250 ml
LK-101B	Roztwór pepsyny	5 ml
LK-102B*	0,4 x SSC / 0,3% Igepal (Bufor do przemywania I)	250 ml
LK-103B*	2 x SSC / 0,1% Igepal (Bufor do przemywania II)	2 x 250 ml
LK-104B	2 x SSC	2 x 250 ml

*Należy pamiętać, że produkty LK-102 i LK-103 mające ten sam numer, ale różne litery, są identyczne z wyjątkiem objętości. A= 100 ml, B=250 ml

6 Materiały wymagane, które nie znajdują się w zestawie

- Ksylen
- Etanol 100%, 85% i 70%.
- Fixogum (LK-071A) lub klej kauczukowy
- Płyta grzejna z dokładną kontrolą temperatury do 80°C lub ThermoBrite™ (TS01/TS02)
- Inkubator z dokładnym zakresem temperatur 37 - 56°C
- Łaźnia wodna z dokładnym zakresem temperatur 37 - 80°C
- Plastikowe i szklane barwiacze Coplina
- Mikropipety o różnej pojemności (1 µl - 200 µl)
- Mikroskop fluorescencyjny wyposażony w odpowiednie filtry (patrz zalecenia dotyczące mikroskopii fluorescencyjnej).

7 Ostrzeżenia i środki ostrożności

- Wszelkie poważne incydenty związane z wyrobem należy zgłaszać producentowi i właściwemu organowi państwa członkowskiego, w którym ma siedzibę użytkownik i/lub pacjent.
- Do diagnostyki in vitro. Tylko do profesjonalnego użytku laboratoryjnego. W nagłych przypadkach należy sprawdzić karty charakterystyki substancji niebezpiecznej w celu uzyskania informacji na temat zagrożenia.
- Zestaw służy do stosowania wyłącznie przed i po wykonaniu hybrydyzacji FISH DNA na tkance FFPE. Produktu nie należy używać w przypadku tkanki zamrożonej.
- Wyłącznie do nieautomatycznej obróbki wstępnej i hybrydyzacji FISH.
- Wszystkie materiały należy utylizować zgodnie z wytycznymi dotyczącymi utylizacji odpadów szpitalnych obowiązującymi w danej instytucji.
- Zestaw do trawienia tkanek I KBI-60007 należy stosować z konwencjonalnymi próbkami FFPE.
- W przypadku komórek metafazowych i interfazowych lub innych próbek cytologicznych zaleca się użycie zestawu do obróbki wstępnej KBI-60005 lub KBI-60006.

Oznakowanie zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 1272/2008

Kod #	Opis	Słowa sygnalizujące	Piktogram	Zwroty określające zagrożenie
LK-096B	DAPI/Antifade 1 µg/ml (Barwnik kontrastowy DAPI)	Ostrzeżenie		H315, H319, H335
LK-097B	Antifade (Rozcieńczalnik do barwników kontrastowych)	Ostrzeżenie		H315, H319, H335
LK-099B	0,2 M HCl	nie dotyczy	nie dotyczy	nie dotyczy
LK-100B	8% tiocyjanian sodu (Roztwór do obróbki wstępnej B)	nie dotyczy	nie dotyczy	nie dotyczy
LK-101B	Roztwór pepsyny	nie dotyczy	nie dotyczy	nie dotyczy
LK-102B	0,4 x SSC / 0,3% Igepal (Bufor do przemywania I)	nie dotyczy	nie dotyczy	nie dotyczy
LK-103B	2 x SSC / 0,1% Igepal (Bufor do przemywania II)	nie dotyczy	nie dotyczy	nie dotyczy
LK-104B	2 x SSC	nie dotyczy	nie dotyczy	nie dotyczy

Zwrot(y) określający(-e) zagrożenie

H315 – Działa drażniąco na skórę.

H319 – Działa drażniąco na oczy.

H335 – Może powodować podrażnienie dróg oddechowych

Zwrot(y) wskazujący(-e) środki ostrożności Zapobieganie

P271 – Stosować wyłącznie na zewnątrz lub w dobrze wentylowanym pomieszczeniu

P261 – Unikać wdychania mgły/par/rozpylonej cieczy.

P264 – Po użyciu dokładnie umyć wszystkie narażone zewnętrzne części ciała.

P280 – Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu i ochronę twarzy.

Zwrot(y) wskazujący(-e) środki ostrożności Odpowiedź

P305 + P351 + P338 – W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut.

Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.

P312 – W przypadku złego samopoczucia skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ/lekarzem/osobą udzielającą pierwszej pomocy.

P337+P313 – W przypadku utrzymywania się działania drażniącego na oczy: Zasięgnąć porady lekarza.

P302 + P352 – W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKÓRĄ: Przemyć dużą ilością wody z mydłem.

P304 + P340 – W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO DRÓG ODDECHOWYCH: Wyprowadzić lub wynieść osobę poszkodowaną na świeże powietrze i umieścić w pozycji umożliwiającej swobodne oddychanie.
P332+P313 – W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry: Zasięgnąć porady lekarza.
P362+P364 – Zanieczyszczoną odzież zdjąć i wyprać przed ponownym użyciem.

Uzupełniające zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia: brak
Wyłącznie do profesjonalnego użytku laboratoryjnego.

Objaśnienie symboli

	Zawiera substancje niebezpieczne
	Kraj produkcji
	Nie używać, jeśli opakowanie jest uszkodzone
	Należy sprawdzić w elektronicznej instrukcji użytkowania (elfU).

8 Przechowywanie i postępowanie z odczynnikiem

Chronić DAPI/Antifade przed silnym i bezpośrednim światłem. Przechowywać w temperaturze 2- 8°C. Nieotwarty produkt jest stabilny w tych warunkach do upływu daty ważności podanej na etykiecie fiolki.
Niezwłocznie po użyciu nierozcieńczone i rozcieńczone odczynniki należy ponownie umieścić w temperaturze 2- 8°C.

Po otwarciu produkty zachowują stabilność przez okres do 18 miesięcy, ale nigdy dłużej niż do upływu daty ważności każdego pojedynczego produktu. Po upływie tego okresu stosowanie roztworów może prowadzić do uzyskania nieoptymalnych wyników.

9 Wsparcie techniczne

Wsparcie techniczne jest dostępne na stronie www.leicabiosystems.com lub pod adresem e-mail: Kreatech.Support@Leicabiosystems.com. Prosimy o kontakt w przypadku braku pożądanych rezultatów lub pojawienia się jakichkolwiek nieprawidłowości podczas stosowania produktu.

Aby otrzymać papierowy egzemplarz instrukcji użytkowania, należy wysłać e-mail na adres: LBSAMS-IFU@leicabiosystems.com



Instrukcja użytkowania jest dostępna w dodatkowych wersjach językowych, które można pobrać ze strony: www.leicabiosystems.com

10 Obsługa klienta

Sondy Kreatech można zamawiać za pośrednictwem Działu Obsługi Klienta Leica +31 20 6919181 lub pisząc na adres: purchase.orders@leica-microsystems.com.

11 Historia

Wersja instrukcji użytkowania	Data publikacji	Zmiany
-------------------------------	-----------------	--------

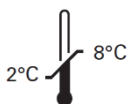
2.4	2016-SEP-27	Usunięcie sloganu „Firma zajmująca się badaniem zmian patologicznych”.
3.0	Kwiecień 2022	Aktualizacja zgodnie z przepisami dotyczącymi IVD

PT

Kit de digestão de tecido II

REF KBI-60004

Contém volume suficiente até 25 ou 5x5 testes



Kreatech Biotechnology B.V.
Vlierweg 20
1032 LG Amsterdão
Países Baixos
www.LeicaBiosystems.com



1 Finalidade/utilização prevista

A hibridação fluorescente in situ (FISH) identifica ou marca sequências genômicas alvo para que a sua localização possa ser estudada. As sequências de ADN de sondas cromossômicas específicas apropriadas são marcadas em primeiro lugar com moléculas repórter. A sonda de ADN marcada é depois hibridizada para os cromossomos em metáfase ou núcleos em interfase numa lâmina. Após a lavagem, o espécime é rastreado para as moléculas repórter por microscopia de fluorescência.

Este kit de pré-tratamento foi especificamente desenvolvido para obter resultados ótimos em tecidos fixados em formalina e impregnados em parafina (FFPE) fortemente ligados ou difíceis (por exemplo, de fixação mais longa ou armazenamento prolongado).

Este produto destina-se à utilização em diagnóstico in vitro.

2 Descrição do produto

Este kit de pré-tratamento é para hibridações FISH não-automatizadas, desenvolvidas especificamente para utilização no pré-tratamento e digestão enzimática de FFPE antes do procedimento de hibridação FISH de ADN. Este kit foi especificamente desenvolvido para obter resultados ótimos em tecidos FFPE fortemente ligados ou difíceis. A utilização do kit irá inverter as ligações cruzadas no tecido, permeabilizar a membrana celular e digerir as proteínas celulares para facilitar a ligação das sondas FISH ao ADN específico da célula.

3 Instruções de utilização

3.1 Espécimes

Este kit de pré-tratamento foi especificamente desenvolvido para obter resultados ótimos em tecidos fixados em formalina e impregnados em parafina (FFPE) fortemente ligados ou difíceis (por exemplo, de fixação mais longa ou armazenamento prolongado).

Pré-análise de espécimes: Para obter um FISH realizado com êxito, a pré-análise desempenha um papel importante. O espécime deve ser corretamente fixado e impregnado em cera de parafina, de acordo com um protocolo devidamente estabelecido. A fixação em excesso ou fixação insuficiente pode causar a falha do procedimento FISH ou pelo menos a baixa reprodutibilidade/intensidade do sinal. As sondas Kreatech™ FISH foram testadas em secções de tecidos FFPE que foram cortadas a 3-6 µm. Os blocos de tecido e as lâminas cortadas devem ser armazenados de acordo com as condições de armazenamento e manuseamento recomendadas para obter resultados ótimos; consulte o website da Leica. A cozedura pode ser feita no BOND, utilizando o protocolo *Bake and Dewax, ou em separado num forno ou incubadora. A temperatura e tempo de cozedura recomendados são até 16 horas a 56 °C, ou 60 - 120 minutos a 80 °C.

3.2 Pré-tratamento

Montar 3 - 6 µm de secções de tecido fixado em formalina e impregnadas em parafina em lâminas com carga positiva (por exemplo, aminoalquilsilano). O protocolo abaixo é para a utilização de 5 lâminas numa jarra de Coplin vertical de 50 ml.

1. Cozer lâminas montadas durante 2 horas a 80 °C ou 16 horas a 56 °C.
2. Remover a parafina as lâminas quentes por imersão em xileno ou substituto de xileno durante duas vezes 10 minutos (mín.).
3. Hidratar novamente por imersão em etanol a 100%, 85% e 70% durante 3 minutos cada.
4. Lavar com dH₂O durante 3 minutos à temperatura ambiente (RT).
5. Pré-tratar com 50 ml de HCl 0,2 M (LK-099B) durante 20 minutos à RT e depois lavar em dH₂O durante 3 minutos à RT.
6. Colocar lâminas em 50 ml de solução de pré-tratamento B (8% de tiocianato de sódio) (LK-100B) a 80 °C durante 30 minutos.
7. Enxaguar em 50 ml de 2 x SSC (LK-104B) durante 3 minutos à RT.
8. Cobrir a secção de parafina com aproximadamente 200 µl de solução de pepsina (LK-101B) e incubar à RT durante 5 - 50 minutos (o tempo depende da fixação do tecido e do tipo de tecido. Por exemplo, a maioria dos tecidos do cancro da mama necessita de 5 - 15 minutos de digestão; os tecidos do cólon necessitam de 20 - 30 minutos).
9. Lavar em dH₂O durante 1 minuto.
10. Lavar em 50 ml de 2 x SSC (LK-104B) durante 5 minutos à RT.
11. Desidratar as lâminas por imersão em etanol a 70%, 85% e 100% durante 1 minuto cada. Secar ao ar. Prosseguir com a **preparação da sonda**.

3.3 Preparação da sonda:

As sondas FISH Kreatech™ para tecidos impregnados em parafina são fornecidas prontas a utilizar (RtU), salvo especificação em contrário na documentação do produto. Consultar o rótulo do frasco e o folheto específico do pacote de sondas para especificações da diluição.

3.4 Co-desnaturação

Aplicar 10 µl de sonda por campo de 22 x 22 mm. Tapar com lamela de vidro e vedar com Fixogum ou cimento de borracha. Desnaturar amostra e sonda num ThermoBrite (TS-01/02) a 80 ± 1 °C durante 5 minutos. Continuar com a **hibridação**.

3.5 Hibridação:

Incubar durante a noite a 37 ± 1 °C num ThermoBrite (TS-01/02) ou numa câmara humidificada.

3.6 Lavagem pós-hibridação:

1. Pré-aquecer 50 ml do tampão de lavagem I (0,4 x SSC/0,3% Igepal) (LK-102) a 72 °C
2. Retirar o cimento de borracha.
3. Colocar lâminas no tampão de lavagem II de 50 ml (2 x SSC/0,1% Igepal) (LK-103); incubar durante 2 minutos à RT. Fazer deslizar as lamelas. Reutilizar o tampão de lavagem apenas uma vez para um total de 10 lâminas.
4. Colocar lâminas no tampão de lavagem I de 50 ml pré-aquecido (0,4 x SSC/0,3% Igepal) (LK-102); incubar durante 2 minutos a 72 °C (± 1 °C) sem agitar. Reutilizar o tampão de lavagem apenas uma vez para um total de 10 lâminas.
5. Colocar lâminas no tampão de lavagem II de 50 ml recente (2 x SSC/0,1% Igepal) (LK-103); incubar durante 1 minuto à RT sem agitar. Reutilizar o tampão de lavagem apenas uma vez para um total de 10 lâminas.
6. Desidratar em etanol recente a 70%, 85% e 100% durante 1 minuto cada à RT. Secar ao ar à RT e prosseguir para a **coloração de contraste**.

3.7 Coloração de contraste:

Aplicar 15 µl de coloração de contraste DAPI (DAPI/Antifade 1 µg/ml) (LK-096B) ou uma diluição deste utilizando diluente de coloração de contraste (LK097B) e aplicar a lamela de vidro. Prosseguir com a microscopia.

3.8 Recomendações de processo:

Verificar a digestão e pré-tratamento de proteínas ao aplicar 15 µl de coloração de contraste DAPI e avaliar lâminas com um microscópio de fluorescência equipado com um filtro DAPI. Se a amostra não for suficientemente digerida: remover a lamela e imergir o tecido em 2 x SSC (LK-104B) durante 2 minutos e prolongar a digestão das proteínas. Se a amostra for digerida em excesso, utilizar uma amostra fresca e reduzir o tempo de digestão das proteínas.

A temperatura e concentração do tampão (estringência) de hibridação e lavagem são importantes, pois uma estringência mais baixa pode resultar numa ligação não específica da sonda a outras sequências e uma estringência mais alta pode resultar numa falta de sinal. A desnaturação incompleta do ADN alvo pode resultar na falta de sinal.

3.9 Recomendações para microscopia de fluorescência

Para uma visualização ótima, utilizar um microscópio bem conservado e regularmente calibrado, equipado com uma lâmpada de mercúrio de 100W ou outra fonte de luz apropriada (por exemplo, lâmpada de halogeneto metálico (120W de célula X) ou fontes de luz à base de LED) e uma objetiva de fluorescência de 63x ou 100x. Os filtros de passagem de banda triplos (DAPI/FITC/Cy3 ou DAPI/FITC/TRITC) são utilizados para ver várias cores; os filtros de passagem de banda simples são utilizados para uma visualização individual a cores. Consultar o website da Leica para obter recomendações sobre filtros apropriados para cada marca de microscópio: <http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/kreatech-fish-probes/>

Intervalo adequado de excitação e emissão para os fluoróforos Kreatech™:

Fluoróforo	Excitação	Emissão
DAPI	360 ± 20 nm	460 ± 30 nm
PlatinumBright™ 415	429 ± 15 nm	470 ± 15 nm
PlatinumBright™ 495	495 ± 10 nm	517 ± 10 nm
PlatinumBright™ 550	550 ± 10 nm	580 ± 10 nm

A banda larga mostrada corresponde a 80% do máximo de excitação/emissão do fluoróforo)

4 Desempenho analítico

O desempenho do kit de digestão de tecido II foi estabelecido utilizando os procedimentos descritos neste manual de instruções para utilização. As modificações a estes procedimentos podem alterar a realização do ensaio. Quaisquer desvios aos protocolos instruídos devem ser validados pelo utilizador. Os utilizadores que se desviem dos procedimentos de teste recomendados devem assumir a responsabilidade pela interpretação dos resultados do paciente nestas circunstâncias. Os tempos de protocolo podem variar devido à variação na fixação e processamento. Além disso, o tempo de incubação da pepsina pode requerer otimização, dependendo das condições de processamento e fixação.

5 Materiais necessários e fornecidos com o produto

Código n.º	Descrição	Volume
LK-096B	DAPI/Antifade 1 µg/ml (Coloração de contraste DAPI)	0,5 ml
LK-097B	Antifade (Diluyente de coloração de contraste)	0,5 ml
LK-099B	0,2 M HCl	250 ml
LK-100B	8% tiocianato de sódio (Solução de pré-tratamento B)	250 ml
LK-101B	Solução de pepsina	5 ml
LK-102B*	0,4 x SSC/0,3% Igepal (Tampão de lavagem I)	250 ml
LK-103B*	2 x SSC/0,1% Igepal (Tampão de lavagem II)	2 x 250 ml
LK-104B	2 x SSC	2 x 250 ml

*Tenha em conta que os produtos LK-102 e LK-103 que contêm o mesmo número, mas letras diferentes, são idênticos, exceto em relação ao volume. A=100 ml, B=250 ml

6 Materiais necessários e não fornecidos com o produto

- Xileno
- Etanol a 100%, 85% e 70%
- Fixogum (LK-071A) ou cimento de borracha
- Placa quente com controlo preciso da temperatura até 80 °C ou ThermoBrite™ (TS01/TS02)
- Incubadora com intervalo preciso de temperatura de 37 - 56 °C

- Banho-maria com intervalo preciso de temperatura de 37 - 80 °C
- Jarras de Coplin de plástico e vidro
- Micropipetas variáveis (1 µl - 200 µl)
- Microscópio de fluorescência equipado com filtros adequados (consultar recomendações sobre microscopia de fluorescência).

7 Advertências e precauções

- Qualquer incidente grave que tenha ocorrido em relação ao dispositivo deve ser comunicado ao fabricante e à autoridade competente do Estado-membro em que o utilizador e/ou o paciente reside.
- Para uso em diagnóstico in vitro. Apenas para utilização profissional em laboratório. Em caso de emergência, verificar as fichas FDS para obter informações de segurança.
- O kit destina-se a ser utilizado apenas antes e depois do procedimento FISH de ADN em tecidos FFPE. Este produto não se destina a ser utilizado para tecidos congelados.
- Apenas para pré-tratamento e hibridação FISH não automatizados.
- Todos os materiais devem ser eliminados de acordo com as diretrizes da sua instituição quanto à eliminação de resíduos hospitalares.
- A utilização do kit de digestão de tecido I KBI-60007 é recomendado para utilização com amostras de FFPE convencionais.
- Para células em metáfase e interfase ou outras amostras citológicas, recomenda-se a utilização dos kits de pré-tratamento KBI-60005 ou KBI-60006.

Etiquetagem de acordo com o Regulamento (CE) n.º 1272/2008

Código n.º	Descrição	Palavra-sinal	Pictograma	Advertências de perigo
LK-096B	DAPI/Antifade 1 µg/ml (Coloração de contraste DAPI)	Advertência		H315, H319, H335
LK-097B	Antifade (Diluyente de coloração de contraste)	Advertência		H315, H319, H335
LK-099B	0,2 M HCl	N.D.	N.D.	N.D.
LK-100B	8% tiocianato de sódio (Solução de pré-tratamento B)	N.D.	N.D.	N.D.
LK-101B	Solução de pepsina	N.D.	N.D.	N.D.
LK-102B	0,4 x SSC/0,3% Igepal (Tampão de lavagem I)	N.D.	N.D.	N.D.
LK-103B	2 x SSC/0,1% Igepal (Tampão de lavagem II)	N.D.	N.D.	N.D.
LK-104B	2 x SSC	N.D.	N.D.	N.D.

Advertência(s) de perigo

H315 – Provoca irritação cutânea.

H319 – Provoca irritação ocular grave.

H335 – Pode provocar irritação das vias respiratórias.

Prevenção de acordo com as recomendações de prudência

P271 – Utilizar apenas ao ar livre ou em locais bem ventilados.

P261 – Evitar respirar névoas/vapores/aerossóis.

P264 – Lavar cuidadosamente todas as áreas externas do corpo que foram expostas após o manuseamento.

P280 - Utilizar luvas de proteção, vestuário de proteção, proteção ocular e proteção facial.

Resposta de acordo com as recomendações de prudência

P305+P351+P338 – SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: Lavar cuidadosamente com água durante vários minutos. Retirar as lentes de contacto, se as usar e se for fácil. Continuar a passar os olhos por água.

P312 – Entrar em contacto com um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico/socorrista no caso de se sentir indisposto.

P337+P313 – Se a irritação ocular persistir: Consultar um médico.

P302+P352 – SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: Lavar abundantemente com água e sabão.

P304+P340 – EM CASO DE INALAÇÃO: Retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la numa posição que não dificulte a respiração.

P332+P313 – Em caso de irritação cutânea: Consultar um médico.

P362+P364 – Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a voltar a usar.

Advertências de perigo suplementares: nenhuma

Limitado a utilizadores profissionais em laboratório

Explicação dos símbolos

	Contém substâncias perigosas
	País de fabrico
	Não utilizar se a embalagem estiver danificada
	Consultar a IdU eletrónica (eldU)

8 Armazenamento e manuseamento de reagentes

Proteger a solução DAPI/Antifade da luz forte e direta. Armazenar a 2 - 8 °C. O produto não aberto mantém-se estável nestas condições até à data de validade indicada na etiqueta do frasco.

Voltar a colocar os reagentes não diluídos e diluídos a 2 - 8 °C imediatamente após a utilização.

Após a abertura, os produtos ficam estáveis até 18 meses, mas nunca além do prazo de validade de cada produto individual. Após este período, a utilização das soluções pode resultar em resultados de qualidade reduzida.

9 Apoio técnico

O apoio técnico está disponível em www.leicabiosystems.com ou através do e-mail: Kreatech.Support@Leicabiosystems.com. Contacte-nos caso não obtenha os resultados pretendidos ou se surgirem anomalias aquando da utilização deste produto.

Pode ser requerida uma cópia impressa em papel das IdU através de e-mail ao contactar: LBSAMS-IFU@leicabiosystems.com



As eldU estão disponíveis noutras línguas que podem ser transferidas a partir de: www.leicabiosystems.com

10 Serviço de apoio ao cliente

As sondas Kreatech podem ser encomendadas através do Serviço de apoio ao cliente da Leica, pelo número +31 20 6919181, ou encomendadas através do e-mail: purchase.orders@leica-microsystems.com.

11 Histórico

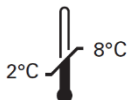
Versão de IdU	Data de emissão	Alterações
2,4	2016-SET-27	Remover o lema "The pathology Company"

RO

Tissue Digestion Kit II

REF KBI-60004

Conține volum suficient pentru până la 25 sau 5 x 5 teste



Kreatech Biotechnology B.V.
Vlierweg 20
1032 LG Amsterdam
Țările de Jos
www.LeicaBiosystems.com



1 Utilizare prevăzută/scop

Hibridizarea in situ a fluoresceinei (FISH) identifică sau etichetează secvențe genomice țintă, astfel încât locația acestora să poată fi studiată. Secvențele de ADN din probele corespunzătoare specifice cromozomilor sunt etichetate mai întâi cu molecule raportoare. Proba de ADN etichetată este apoi hibridizată la cromozomii metafazici sau la nucleeele interfazice de pe o lamelă. După spălare, specimenul este verificat pentru prezența moleculelor raportoare, prin microscopie de fluorescență.

Acest kit de pretratere este dezvoltat special pentru obținerea rezultatelor optime pe țesuturi încorporate în parafină (FFPE) puternic reticulate sau dificil de fixat în formalină (de exemplu, fixare mai îndelungată sau depozitare prelungită).

Acest produs este destinat utilizării pentru diagnosticare in vitro.

2 Descrierea produsului

Acest kit de pretratere este dezvoltat special pentru hibridizări FISH manuale, pentru utilizare în pretratere și digestia enzimatică a FFPE înaintea procedurii de hibridizare FISH a ADN-ului. Acest kit este dezvoltat special pentru obținerea unor rezultate optime pe țesuturile puternic reticulate sau FFPE dificile. Utilizarea kitului va inversa fibrele reticulare din țesut, va permeabiliza membrana celulară și va digera proteinele celulare pentru a facilita legarea probelor FISH cu ADN celular specific.

3 Instrucțiuni de utilizare

3.1 Specimenele

Acest kit de pretratere este dezvoltat special pentru obținerea rezultatelor optime pe țesuturi încorporate în parafină (FFPE) puternic reticulate sau dificil de fixat în formalină (de exemplu, fixare mai îndelungată sau depozitare prelungită).

Analiza preliminară a specimenelor: Analiza preliminară a specimenelor joacă un rol principal în obținerea unei proceduri FISH reușite. Specimenul trebuie fixat și încorporat corect în ceară de parafină, în conformitate cu un protocol bine stabilit. Fixarea excesivă sau insuficientă poate provoca eșecul procedurii FISH sau cel puțin reproductibilitate scăzută/intensitate scăzută a semnalului. Probele FISH Kreatech™ au fost testate pe secțiuni de țesut FFPE, care au fost tăiate la 3-6 μm. Pentru rezultate optime, blocurile de țesut și lamelele cu secțiuni tisulare trebuie depozitate în conformitate cu condițiile recomandate pentru depozitare și manipulare, consultați site-ul web Leica. Coacerea se poate face pe sistemul BOND utilizând protocolul *Bake and Dewax sau separat, într-un cuptor sau un incubator. Temperatura și timpul recomandate de coacere: până la 16 ore la 56 °C sau 60 - 120 min la 80 °C.

3.2 Pretraterea

Montați secțiuni de 3 - 6 μm de țesut încorporat în parafină fixat cu formalină pe lamele încărcate pozitiv (de exemplu, amino alchil silan). Protocolul următor este destinat utilizării a 5 lamele într-un borcan vertical Coplin de 50 ml.

1. Coaceți lamelele montate timp de 2 ore la 80 °C sau timp de 16 ore la 56 °C.
2. Deparafinați lamelele calde prin scufundare în xilen sau înlocuitor de xilen de două ori câte 10 minute (min).

3. Rehidratați prin scufundare în etanol 100 %, 85 % și 70 % timp de câte 3 min pentru fiecare concentrație.
4. Spălați cu dH₂O timp de 3 min la temperatura camerei (TC).
5. Pretratați cu 50 ml de 0,2 M HCl (LK-099B) timp de 20 min la TC, apoi spălați în dH₂O timp de 3 min la TC.
6. Amplasați lamelele în 50 ml de Pretreatment Solution B (8 % tiocianat de sodiu) (LK-100B) la 80 °C timp de 30 min.
7. Clătiți în 50 ml de 2 x SSC (LK-104B) timp de 3 min la TC.
8. Acoperiți secțiunea de parafină cu aproximativ 200 μl de Pepsin Solution (LK-101B) și incubați la TC timp de 5 - 50 min (timpul depinde de fixarea și de tipul țesutului. De exemplu, cele mai multe tipuri de țesut tumoral mamar au nevoie de o digestie de 5 - 15 min; țesutul de colon, 20 - 30 min).
9. Spălați în dH₂O timp de 1 min.
10. Spălați în 50 ml de 2 x SSC (LK-104B) timp de 5 min la TC.
11. Deshidratați lamelele prin scufundare în etanol 70 %, 85 % și 100 % timp de câte 1 min pentru fiecare concentrație. Uscați la aer. Treceți la **prepararea probelor**.

3.3 Prepararea probelor:

Probele FISH Kreatech™ pentru țesut încorporat în parafină sunt furnizate gata de utilizare (RtU), dacă nu se specifică altfel în documentația produsului. Consultați eticheta flaconului și prospectul probei respective pentru specificații privind diluțiile.

3.4 Codenaturarea

Aplicați câte 10 μl de probă per câmp de 22 x 22 mm. Acoperiți cu lamele de acoperire din sticlă și sigilați cu Fixogum sau ciment cauciucat. Denaturați proba și sonda pe un aparat ThermoBrite (TS-01/02) la 80 ± 1 °C timp de 5 min. Continuați cu **hibridizarea**.

3.5 Hibridizarea:

Incubați peste noapte la 37 ± 1 °C într-un aparat ThermoBrite (TS-01/02) sau într-o cameră umidificată.

3.6 Spălarea post-hibridizare:

1. Preîncălziți 50 ml de Wash Buffer I (0,4 x SSC/0,3% Igepal) (LK-102) la 72 °C
2. Înlăturați cimentul cauciucat.
3. Amplasați lamelele în 50 ml de Wash Buffer II (2 x SSC/0,1 % Igepal) (LK-103), incubați timp de 2 min la TC. Înlăturați lamelele de acoperire. Utilizați soluția tampon de spălare o singură dată pentru 10 lamele în total.
4. Amplasați lamelele în 50 ml de Wash Buffer I (0,4 x SSC/0,3 % Igepal) (LK-102) preîncălzită, incubați timp de 2 min la 72 °C (+ 1 °C) fără să agitați. Utilizați soluția tampon de spălare o singură dată pentru 10 lamele în total.
5. Amplasați lamelele în 50 ml de Wash Buffer II (2 x SSC/0,1 % Igepal) (LK-103) proaspătă, incubați timp de 1 min la TC, fără să agitați. Utilizați soluția tampon de spălare o singură dată pentru 10 lamele în total.
6. Deshidratați în etanol de 70 %, 85 % și 100 % proaspăt, incubați timp de câte 1 min la TC. Uscați la aer la TC și treceți la **contracolorație**.

3.7 Contracolorația:

Aplicați 15 μl DAPI counterstain (DAPI/Antifade 1 μg/ml) (LK-096B) sau o diluție a acestei substanțe, folosind Counterstain Diluent (LK097B) și aplicați lamela de acoperire din sticlă. Treceți la microscopie.

3.8 Recomandări procedurale:

Verificați digestia proteică și pretratarea prin aplicarea a 15 μl de DAPI Counterstain, apoi evaluați lamelele utilizând un microscop de fluorescență, echipat cu un filtru DAPI. Dacă proba nu este suficient de digerată: înlăturați lamela de acoperire și scufundați țesutul în 2 x SSC (LK-104B) timp de 2 min. Astfel prelungiți digestia proteică. Dacă proba este digerată excesiv, utilizați o probă proaspătă și reduceți timpul de digestie proteică.

Temperatura și concentrația soluției tampon (stringența) pentru hibridizare și spălare sunt importante, deoarece o stringență redusă poate avea drept rezultat legarea nespecifică a probei de alte secvențe, iar o stringență mai mare poate avea drept rezultat o lipsă a semnalului. Denaturarea incompletă a ADN-ului țintă poate avea drept rezultat lipsa semnalului.

3.9 Recomandări pentru microscopia de fluorescență

Pentru o vizualizare optimă utilizați un microscop bine întreținut și calibrat cu regularitate, echipat cu o lampă cu mercur de 100 W sau altă sursă de lumină corespunzătoare (de exemplu, bec cu halogenuri metalice (120W X-cite) sau surse de lumină pe bază de LED) și un obiectiv fluorescent de 63x sau 100x. Filtrele „trece-bandă” triple (DAPI/FITC/Cy3 sau DAPI/FITC/TRITC) sunt utilizate pentru vizualizarea mai multor culori, iar filtrele „trece-bandă” simple sunt utilizate pentru vizualizarea fiecărei culori în parte. Consultați site-ul web Leica pentru recomandări cu privire la filtrele adecvate pentru fiecare marcă de microscop: <http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/kreatech-fish-probes/>

Intervalul adecvat de excitație și emisii pentru fluoroforii Kreatech™:

Fluorofor	Excitație	Emisie
DAPI	360 ± 20 nm	460 ± 30 nm
PlatinumBright™ 415	429 ± 15 nm	470 ± 15 nm
PlatinumBright™ 495	495 ± 10 nm	517 ± 10 nm
PlatinumBright™ 550	550 ± 10 nm	580 ± 10 nm

Lățimea de bandă afișată corespunde unui procent de 80 % din excitația/emisia maximă a fluoroforului)

4 Performanța analitică

Performanța Tissue Digestion Kit II a fost stabilită prin utilizarea procedurilor descrise în această instrucțiune de utilizare. Modificările aduse acestor proceduri pot afecta performanța analizei. Orice abateri de la protocoalele prezentate în instrucțiuni trebuie să fie validate de utilizator. Utilizatorii care se abat de la procedurile de testare recomandate trebuie să accepte responsabilitatea pentru interpretarea rezultatelor pacientului în aceste circumstanțe. Duratele protocoalelor pot varia din cauza variațiilor procedurilor de fixare și procesare. În plus, timpul de incubare al pepsinei poate necesita optimizarea în funcție de condițiile de procesare și de fixare.

5 Materiale necesare și furnizate împreună cu produsul

Nr. cod	Descriere	Volum
LK-096B	DAPI/Antifade 1 µg/ml (DAPI Counterstain)	0,5 ml
LK-097B	Antifade (Counterstain Diluent)	0,5 ml
LK-099B	0,2 M HCl	250 ml
LK-100B	8 % tiocianat de sodiu (Pretreatment Solution B)	250 ml
LK-101B	Pepsin Solution	5 ml
LK-102B*	0,4 x SSC/0,3 % Igepal (Wash Buffer I)	250 ml
LK-103B*	2 x SSC/0,1 % Igepal (Wash Buffer II)	2 x 250 ml
LK-104B	2 x SSC	2 x 250 ml

*Rețineți că produsele LK-102 și LK-103 care conțin același număr, dar litere diferite, sunt identice, cu excepția volumului. A = 100 ml, B = 250 ml

6 Materiale necesare și nefurnizate împreună cu produsul

- Xilen
- Etanol 100 %, 85 % și 70 %
- Fixogum (LK-071A) sau ciment cauciucat
- Fierbător cu control de precizie al temperaturii de până la 80 °C sau ThermoBrite™ (TS01/TS02)
- Incubator cu interval de precizie al temperaturii, cuprins între 37 și 56 °C
- Baie de spălare cu interval de precizie al temperaturii, cuprins între 37 și 80 °C
- Borcane din plastic și sticlă Coplin
- Micropipete cu volum variabil (1 - 200 µl)
- Microscop de fluorescență echipat cu filtre adecvate (consultați recomandările pentru microscopia de fluorescență).

7 Avertismente și precauții

- Orice incident grav survenit în legătură cu dispozitivul trebuie raportat producătorului și autorității competente din statul membru în care utilizatorul și/sau pacientul își are domiciliul.
- Pentru diagnosticare in vitro. Numai pentru utilizare profesională în laborator. În situații de urgență, consultați fișele cu date de securitate (SDS) pentru informații de siguranță.
- Kitul este destinat utilizării exclusive înainte și după procedura FISH ADN pe țesut FFPE. Acest produs nu este destinat utilizării pentru țesut congelat.
- Exclusiv pentru proceduri manuale de pretratare și hibridizare FISH.
- Toate materialele trebuie eliminate la deșeuri, în conformitate cu instrucțiunile instituției dvs. privind eliminarea deșeurilor spitalicești.
- Utilizarea KBI-60007 Tissue Digestion Kit I este recomandată cu probe FFPE convenționale.
- Pentru celulele metafazice și interfazice sau pentru alte probe citologice, se recomandă utilizarea Pretreatment Kit KBI-60005 sau KBI-60006.

Etichetare în conformitate cu Regulamentul (CE) nr. 1272/2008

Nr. cod	Descriere	Cuvânt semnal	Pictogramă	Fraze de pericol
LK-096B	DAPI/Antifade 1 µg/ml (DAPI Counterstain)	Avertisment		H315, H319, H335
LK-097B	Antifade (Counterstain Diluent)	Avertisment		H315, H319, H335
LK-099B	0,2 M HCl	Nu se aplică.	Nu se aplică.	Nu se aplică.
LK-100B	8 % tiocianat de sodiu (Pretreatment Solution B)	Nu se aplică.	Nu se aplică.	Nu se aplică.
LK-101B	Pepsin Solution	Nu se aplică.	Nu se aplică.	Nu se aplică.
LK-102B	0,4 x SSC/0,3 % Igepal (Wash Buffer I)	Nu se aplică.	Nu se aplică.	Nu se aplică.
LK-103B	2 x SSC/0,1 % Igepal (Wash Buffer II)	Nu se aplică.	Nu se aplică.	Nu se aplică.
LK-104B	2 x SSC	Nu se aplică.	Nu se aplică.	Nu se aplică.

Frază(e) de pericol

H315 – Provoacă iritarea pielii.

H319 – Provoacă o iritare gravă a ochilor.

H335 – Poate provoca iritarea căilor respiratorii.

Frază(e) de precauție – prevenție

P271 – A se utiliza numai în aer liber sau în spații bine ventilate.

P261 – Evitați să inspirați ceața/vaporii/spray-ul.

P264 – Spălați-vă toate suprafețele exterioare expuse ale corpului bine după utilizare.

P280 – Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/echipament de protecție a ochilor/echipament de protecție a feței.

Frază(e) de precauție – reacție

P305+P351+P338 – ÎN CAZ DE CONTACT CU OCHII: Clătiți cu atenție cu apă, timp de mai multe minute.

Scoateți lentilele de contact, dacă este cazul și dacă acest lucru se poate face cu ușurință. Continuați să clătiți.

P312 – Sunați la un CENTRU DE INFORMARE TOXICOLOGICĂ/un medic/un prim respondent/dacă nu vă simțiți bine.

P337+P313 – Dacă iritarea ochilor persistă: Consultați medicul.

P302+P352 – ÎN CAZ DE CONTACT CU PIELEA: Spălați cu multă apă/săpun.

P304+P340 – ÎN CAZ DE INHALARE: Transportați victima la aer liber și mențineți-o în stare de repaus, într-o poziție confortabilă pentru respirație.

P332+P313 – În caz de iritare a pielii: Consultați medicul.

P362+P364 – Scoateți îmbrăcăminte contaminată și spălați-o înainte de reutilizare.

Fraze de pericol suplimentare: nu există
 Restricționat la utilizatori profesioniști din laborator

Explicarea simbolurilor

	Conține substanțe periculoase
	Țara de fabricație
	A nu se utiliza dacă ambalajul este deteriorat
	Consultați instrucțiunile de utilizare în format electronic (eIU)

8 Depozitarea și manipularea reactivilor

Protejați DAPI/Antifade împotriva luminii puternice și directe. A se depozita la 2–8 °C. Produsul nedeschis este stabil în aceste condiții până la data expirării indicată pe eticheta flaconului.

A se readuce reactivii nediluți și diluți la 2-8 °C imediat după utilizare.

După deschidere, produsele sunt stabile timp de maximum 18 luni, dar nu mai mult de data expirării fiecărui produs individual. După această perioadă, utilizarea soluțiilor poate genera rezultate sub nivelul optim.

9 Asistență tehnică

Asistența tehnică este disponibilă la www.leicabiosystems.com sau prin e-mail: Kreatech.Support@Leicabiosystems.com. Vă rugăm să ne contactați dacă nu obțineți rezultatele dorite sau dacă apar anomalii în utilizarea acestui produs.

Puteți solicita un exemplar tipărit pe hârtie al instrucțiunilor de utilizare, dacă trimiteți un e-mail la: LBSAMS-IFU@leicabiosystems.com



Instrucțiunile de utilizare în format electronic (eIU) sunt disponibile și în alte limbi, care pot fi descărcate la adresa: www.leicabiosystems.com

10 Serviciul pentru clienți

Probele Kreatech pot fi comandate prin intermediul Serviciului pentru clienți Leica, la +31 20 6919181 sau prin e-mail: purchase.orders@leica-microsystems.com.

11 Istoric

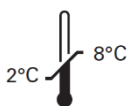
Versiune IU	Data publicării	Modificări
2,4	2016-SEP-27	A fost eliminat sloganul „The pathology Company”
3,0	Aprilie 2022	Actualizare în conformitate cu regulamentele IVD

Комплект реактивов «Tissue Digestion Kit II»

REF

KBI-60004

Содержит достаточный объем для проведения до 25 или 5x5 тестов



Kreatech Biotechnology B.V.
Vlierweg 20
1032 LG Amsterdam
Нидерланды
www.LeicaBiosystems.com



1 Предусмотренное применение/назначение

Флуоресцентная гибридизация in situ (FISH) идентифицирует или маркирует целевые геномные последовательности для обеспечения возможности изучения их местоположения. Репортерные молекулы сначала отмечают последовательности ДНК из соответствующих хромосом-специфичных зондов. Затем меченый ДНК-зонд гибридизуют с метафазными хромосомами или интерфазными ядрами на предметном стекле. После промывания образец подвергают скринингу на репортерные молекулы с помощью флуоресцентной микроскопии.

Данный комплект для предварительной обработки специально разработан для получения оптимальных результатов на прочно связанных или сложных тканях, фиксированных формалином и залитых в парафин (FFPE) (например, более длительная фиксация или длительное хранение).

Данный продукт предназначен для диагностики in vitro.

2 Описание продукта

Данный комплект для предварительной обработки предназначен для неавтоматической гибридизации FISH, специально разработанной для предварительной обработки и ферментативного расщепления FFPE перед процедурой гибридизации ДНК FISH. Данный комплект специально разработан для получения оптимальных результатов на прочно связанных или сложных тканях FFPE. Использование комплекта изменит межмолекулярные поперечные сшивки в тканях, проницаемость клеточной мембраны и расщепление клеточных белков для облегчения связывания FISH-зондов со специфической клеточной ДНК.

3 Инструкция по применению

3.1 Образцы

Данный комплект для предварительной обработки специально разработан для получения оптимальных результатов на прочно связанных или сложных тканях, фиксированных формалином и залитых в парафин (FFPE) (например, более длительная фиксация или длительное хранение).

Подготовка образцов к анализу: Для получения успешной процедуры FISH важную роль играет подготовка к анализу. Образец следует правильно зафиксировать и залить парафином в соответствии с установленным протоколом. Чрезмерная фиксация или недостаточная фиксация могут привести к ошибкам процедуры FISH или, как минимум, к низкой воспроизводимости/ интенсивности сигнала. Зонды FISH Kreatech™ были испытаны на срезах ткани FFPE, которые были вырезаны размером 3-6 мкм. Тканевые блоки и предметные стекла со срезами необходимо хранить в соответствии с рекомендуемыми условиями хранения и обращения для получения оптимальных результатов, см. веб-сайт Leica. Выпекание можно выполнять как на BOND с использованием протокола *Bake and Dewax, так и отдельно в печи или инкубаторе. Рекомендуемая температура и время выпекания до 16 часов при 56 °C или 60-120 минут при 80 °C.

3.2 Предварительная обработка

Нанесите 3-6 мкм зафиксированные в формалине и залитые в парафин срезы тканей на положительно заряженные предметные стекла (например, аминоалкилсилан). Приведенный ниже протокол предназначен для использования 5 предметных стекол в вертикальной емкости Коплина объемом 50 мл.

1. Выпекайте установленные предметные стекла в течение 2 часов при 80 °C или 16 часов при 56 °C.
2. Удалите парафин с теплых предметных стекол, замачивая их в ксилоле или заменителе ксилола два раза по 10 минут (мин).
3. Регидратируйте путем замачивания в 100 %, 85 % и 70 % этанол в течение 3 минут каждый.
4. Промойте dH₂O в течение 3 минут при комнатной температуре (КТ).
5. Предварительно обработайте 50 мл 0,2 М HCl (LK-099B) в течение 20 минут при комнатной температуре, а затем промойте в dH₂O в течение 3 минут при комнатной температуре.
6. Поместите предметные стекла в 50 мл раствора для предварительной обработки В (8 % тиоцианата натрия) (LK-100B) при 80 °C в течение 30 минут.
7. Промойте в 50 мл 2 x SSC (LK-104B) в течение 3 минут при комнатной температуре.
8. Покройте парафиновый срез примерно 200 мкл раствора пепсина (LK-101B) и инкубируйте при комнатной температуре в течение 5-50 минут (время зависит от фиксации ткани и типа ткани, напр., большинству тканей рака молочной железы для расщепления необходимо 5-15 минут; ткани толстой кишки 20-30 минут).
9. Промойте в dH₂O в течение 1 минуты.
10. Промойте в 50 мл 2 x SSC (LK-104B) в течение 5 минут при комнатной температуре.
11. Дегидратируйте предметные стекла путем замачивания в 70 %, 85 % и 100 % этанола в течение 1 минуты каждый. Высушите на воздухе. Перейдите к **подготовке зонда**.

3.3 Подготовка зонда:

Зонды FISH Kreatech™ для тканей, залитых в парафин, поставляются готовыми к применению (RtU), если иное не указано в документации на продукт. Подробная информация о разбавлении представлена на этикетке флакона и вкладыше в упаковке соответствующего зонда.

3.4 Совместная денатурация

Нанесите 10 мкл зонда на поле размером 22x22 мм. Накройте покровным стеклом и заклейте Fixogum или резиновым клеем. Выполните денатурацию образца и зонда на ThermoBrite (TS-01/02) при 80±1 °C в течение 5 минут. Перейдите к **гибридизации**.

3.5 Гибридизация:

Инкубируйте всю ночь при 37±1 °C в ThermoBrite (TS-01/02) или во влажной камере.

3.6 Промывка после гибридизации:

1. Предварительно нагрейте 50 мл буферного раствора для промывки I (0,4 x SSC/0,3 % Igepal) (LK-102) до 72 °C
2. Удалите резиновый клей.
3. Поместите предметные стекла в 50 мл буферного раствора для промывки II (2 x SSC/0,1 % Igepal) (LK-103), инкубируйте в течение 2 минут при комнатной температуре. Сдвиньте зажимы. Повторно используйте буферный раствор для промывки только один раз, всего 10 предметных стекол.
4. Поместите предметные стекла в 50 мл предварительно нагретый буферный раствор для промывки I (0,4 x SSC/0,3 % Igepal) (LK-102), инкубируйте в течение 2 минут при 72 °C (+ 1 °C) без возбуждения. Повторно используйте буферный раствор для промывки только один раз, всего 10 предметных стекол.
5. Поместите предметные стекла в 50 мл свежеприготовленный буферного раствора для промывки II (2 x SSC/0,1 % Igepal) (LK-103), инкубируйте в течение 1 минуты при комнатной температуре без возбуждения. Повторно используйте буферный раствор для промывки только один раз, всего 10 предметных стекол.
6. Дегидратируйте в свежеприготовленном 70 %, 85 % и 100 % этаноле, инкубируйте по 1 минуте при комнатной температуре. Высушите на воздухе при комнатной температуре и перейдите к **контрастному окрашиванию**.

3.7 Контрастное окрашивание:

Нанесите 15 мкл контрастного красителя DAPI (DAPI/Antifade 1 мкг/мл) (LK-096B) или разбавьте его с помощью разбавителя для контрастного красителя (LK097B) и установите покровное стекло. Перейдите к микроскопии.

3.8 Рекомендации по проведению процедуры:

Проверьте расщепление белка и предварительную обработку, нанеся 15 мкл контрастного красителя DAPI и оцените предметные стекла с помощью флуоресцентного микроскопа, оснащенного фильтром DAPI. Если образец недостаточно расщеплен: снимите покровное стекло и замочите ткань в 2 x SSC (LK-104B) на 2 минуты и продлите расщепление белка. Если произошло чрезмерное расщепление образца, используйте свежий образец и сократите время расщепления белка.

Температура и концентрация буфера (жесткость) гибридизации и промывки важны, поскольку низкая жесткость может привести к неспецифическому связыванию зонда с другими последовательностями, а высокая жесткость может привести к отсутствию сигнала. Неполная денатурация ДНК-мишени может привести к отсутствию сигнала.

3.9 Рекомендации по флуоресцентной микроскопии

Для оптимальной визуализации используйте хорошо обслуживаемый и регулярно калибруемый микроскоп, оснащенный ртутной лампой мощностью 100 Вт или другим соответствующим источником света (например, металлогалогенной лампой (120 Вт X-cite) или источниками света на основе светодиодов) и флуоресцентным объективом с увеличением 63x или 100x. Тройные фильтры пропуска диапазона (DAPI/FITC/Cy3 или DAPI/FITC/TRITC) используют для просмотра нескольких цветов, одинарные фильтры пропуска диапазона используют для визуализации отдельных цветов. Для получения рекомендаций по соответствующим фильтрам для каждой марки микроскопа см. веб-сайт компании Leica: <http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/kreatech-fish-probes/>

Подходящий диапазон возбуждения и эмиссии для флуорофоров Kreatech™:

Флуорофор	Возбуждение	Эмиссия
DAPI	360±20 нм	460±30 нм
PlatinumBright™ 415	429±15 нм	470±15 нм
PlatinumBright™ 495	495±10 нм	517±10 нм
PlatinumBright™ 550	550±10 нм	580±10 нм

Показанная ширина зоны соответствует 80 % максимального возбуждения/ эмиссии флуорофора)

4 Аналитические характеристики

Эффективность комплекта реактивов «Tissue Digestion Kit II» была установлена с использованием процедур, описанных в данной инструкции по использованию. Модификации этих процедур могут повлиять на эффективность проведения анализа. Любые отклонения от указанных в инструкциях протоколов должны быть валидированы пользователем. Пользователи, отклоняющиеся от рекомендованных процедур анализа, должны брать на себя ответственность за интерпретацию результатов исследований пациентов, выполненных в таких условиях. Продолжительность выполнения протокола может варьировать ввиду разнообразия способов обработки и фиксации. Кроме того, время инкубации пепсина может потребовать оптимизации в зависимости от условий обработки и фиксации.

5 Необходимые материалы, поставляемые с продуктом

Код №	Описание	Объем
LK-096B	DAPI/Antifade 1 мкг/мл (Контрастный краситель DAPI)	0,5 мл
LK-097B	Antifade (Разбавитель для контрастного красителя)	0,5 мл
LK-099B	0,2 М HCl	250 мл
LK-100B	8 % натрия тиоцианата (Раствор для предварительной обработки B)	250 мл
LK-101B	Раствор пепсина	5 мл
LK-102B*	0,4 x SSC/0,3 % Igepal (Буферный раствор для промывки I)	250 мл
LK-103B*	2 x SSC/0,1 % Igepal (Буферный раствор для промывки II)	2 x 250 мл
LK-104B	2 x SSC	2 x 250 мл

*Обратите внимание, что продукты LK-102 и LK-103, содержащие один и тот же номер, но разные буквы, идентичны, за исключением объема. A=100 мл, B=250 мл

IfU Published: 2022 April

IfU Doc name: IfU-KBI-60004_version3.0

Confidential - Company Proprietary

6 Необходимые материалы, не поставляемые с продуктом

- Ксилол
- Этанол 100 %, 85 % и 70 %
- Fixogum (LK-071A) или резиновый клей
- Нагревательная плита с точным контролем температуры до 80 °C или ThermoBrite™ (TS01/TS02)
- Инкубатор с точным диапазоном температур 37-56 °C
- Водяная баня с точным диапазоном температур 37-80 °C
- Пластиковые и стеклянные емкости Коплина
- Различные микропипетки (1-200 мкл)
- Флуоресцентный микроскоп с соответствующими фильтрами (см. рекомендации по флуоресцентной микроскопии).

7 Предупреждения и меры предосторожности

- В случае какого-либо серьезного инцидента с устройством, пользователь должен сообщить об инциденте производителю и компетентному органу государства-члена ЕС, в котором зарегистрирован пользователь и/или пациент.
- Для диагностики in vitro. Только для профессионального использования в лаборатории. В случае возникновения чрезвычайных ситуаций см. паспорт безопасности материала (SDS) для получения информации о технике безопасности.
- Комплект предназначен для использования только до и после FISH ДНК на ткани FFPE. Этот продукт не предназначен для использования с замороженной тканью.
- Только для неавтоматической предварительной обработки и гибридизации FISH.
- Все материалы следует утилизировать в соответствии с инструкциями вашего учреждения по утилизации медицинских отходов.
- Комплект реактивов KBI-60007 «Tissue Digestion Kit I» рекомендуется использовать со стандартными образцами FFPE.
- Для метафазных и интерфазных клеток или других цитологических образцов рекомендуется использовать комплект для предварительной обработки KBI-60005 или KBI-60006.

Маркировка в соответствии с Регламентом (ЕС) № 1272/2008

Код №	Описание	Сигнальное слово	Пиктограмма	Характеристики опасностей
LK-096B	DAPI/Antifade 1 мкг/мл (Контрастный краситель DAPI)	осторожно!		H315, H319, H335
LK-097B	Antifade (Разбавитель для контрастного красителя)	осторожно!		H315, H319, H335
LK-099B	0,2 M HCl	н.д.	н.д.	н.д.
LK-100B	8 % натрия тиоцианата (Раствор для предварительной обработки В)	н.д.	н.д.	н.д.
LK-101B	Раствор пепсина	н.д.	н.д.	н.д.
LK-102B	0,4 x SSC/0,3 % Igepal (Буферный раствор для промывки I)	н.д.	н.д.	н.д.
LK-103B	2 x SSC/0,1 % Igepal (Буферный раствор для промывки II)	н.д.	н.д.	н.д.
LK-104B	2 x SSC	н.д.	н.д.	н.д.

Характеристики опасностей

H315 — Вызывает раздражение кожи.

H319 — Вызывает серьезное раздражение глаз.

H335 — Может вызывать раздражение дыхательных путей

Меры по предупреждению опасности:

P271 — Использовать только на открытом воздухе или в хорошо проветриваемом помещении.

P261 — Избегать вдыхания тумана/паров/аэрозоля.

P264 — После работы тщательно вымойте все открытые внешние участки тела.

P280 — Используйте защитные перчатки, защитную одежду, защиту глаз и лица.

Меры по предупреждению опасности:

P305+P351+P338 — ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: В течение нескольких минут тщательно промойте водой. Если вы носите контактные линзы, по возможности снимите их. Продолжайте промывать глаза водой.

P312 — При недомогании немедленно обратитесь в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР/к врачу/в службу скорой помощи за медицинской помощью.

P337+P313 — Если раздражение глаз не проходит: обратитесь за медицинской помощью.

P302+P352 — ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ: Промойте большим количеством воды с мылом.

P304+P340 — ПРИ ВДЫХАНИИ: Переместите пострадавшего на свежий воздух и обеспечьте комфортные условия для дыхания.

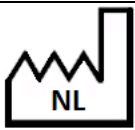
P332+P313 — В случае возникновения раздражения кожи: обратитесь за медицинской помощью.

P362-P364 — Снимите загрязненную одежду и выстирайте перед повторным использованием.

Дополнительные характеристики опасностей: нет

Только для профессиональных пользователей лаборатории

Объяснение символов

	Содержит опасные вещества
	Страна производства
	Не используйте, если упаковка повреждена
	См. электронный документ IfU (elfU)

8 Хранение реактивов и обращение с ними

Следует защищать DAPI/Antifade от яркого и прямого света. Хранить при температуре 2-8 °С. В этих условиях закрытая продукция остается стабильной до истечения срока годности, который указан на этикетке флакона.

Оставшиеся неразбавленные и разбавленные реактивы следует немедленно вернуть на хранение при температуре 2-8 °С.

После открытия продукты стабильны в течение до 18 месяцев, но не дольше срока годности каждого отдельного продукта. По истечении этого периода использование растворов может привести к не оптимальным результатам.

9 Техническая поддержка

Техническая поддержка доступна по адресу www.leicabiosystems.com или эл. почте: Kreatech.Support@Leicabiosystems.com. Свяжитесь с нами, если вы не получили желаемые результаты или вы столкнулись с какими-либо аномалиями при использовании этого продукта.

Печатную копию IfU можно запросить по электронной почте, обратившись по адресу: LBSAMS-IfU@leicabiosystems.com



Документ elfU доступен на дополнительных языках, его можно загрузить с: www.leicabiosystems.com

10 Служба работы с покупателями

Зонды Kreatech можно заказать через службу работы с покупателями компании Leica по телефону +31 20 6919181 или по эл. почте: purchase.orders@leica-microsystems.com.

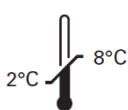
11 История изменений

Версия IfU	Дата выпуска	Изменения
2.4	2016-SEP-27	Удалить слоган «Поставщик решений для лабораторной диагностики»
3.0	апрель 2022 г.	Обновить в соответствии с требованиями к диагностике in-vitro

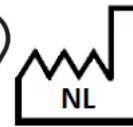
Súprava Tissue Digestion Kit II

REF KBI-60004

Obsah postačuje na 25 alebo 5 x 5 testov



Kreatech Biotechnology B.V.
Vlierweg 20
1032 LG Amsterdam
Holandsko
www.LeicaBiosystems.com



1 Zamýšľané použitie/účel

Fluorescenčná in situ hybridizácia (FISH) identifikuje alebo označuje cieľové genómové sekvencie, aby bolo možné skúmať ich umiestnenie. DNA sekvencie z príslušných chromozómov špecifických sond sa najprv označia reportérovými molekulami. Označená sonda DNA sa potom hybridizuje na metafázové chromozómy alebo interfázové jadrá na sklíčku. Po premytí sa pomocou fluorescenčnej mikroskopie skontroluje vo vzorke prítomnosť reportérových molekúl.

Táto súprava na predprípravu je špeciálne vyvinutá na dosiahnutie optimálnych výsledkov pri silne zosieťovaných alebo náročných tkanivách fixovaných formalínom a zaliatych do parafínu (FFPE) (napr. dlhšia fixácia alebo dlhšie skladovanie).

Tento produkt je určený na diagnostické použitie in vitro.

2 Opis produktu

Táto súprava na predprípravu pre neautomatizované FISH hybridizácie je špeciálne vyvinutá na použitie na predprípravu a enzýmové štiepenie FFPE pred postupom DNA FISH hybridizácie. Táto súprava je špeciálne vyvinutá na dosiahnutie optimálnych výsledkov zo silne zosieťovaných alebo náročných FFPE tkanív. Použitím súpravy sa zvrátia krížové väzby v tkanive, permeabilizuje sa bunková membrána a naštiepia sa bunkové proteíny, aby sa uľahčila väzba FISH sond so špecifickou bunkovou DNA.

3 Návod na použitie

3.1 Vzorky

Táto súprava na predprípravu je špeciálne vyvinutá na dosiahnutie optimálnych výsledkov pri silne zosieťovaných alebo náročných tkanivách fixovaných formalínom a zaliatych do parafínu (FFPE) (napr. dlhšia fixácia alebo dlhšie skladovanie).

Vzorky pred analýzou: Pre úspešnú FISH zohráva dôležitú úlohu príprava pred analýzou. Vzorka sa má podľa osvedčeného protokolu správne fixovať a zaliť do parafínu. Nadmerná fixácia alebo nedostatočná fixácia môže mať za následok neúspešný postup FISH alebo prinajmenšom nízku reprodukovateľnosť/intenzitu signálu. FISH sondy Kreatech™ sa testovali na rezoch FFPE tkaniva, ktoré boli narezané na hrúbku 3 – 6 µm. Na dosiahnutie optimálnych výsledkov sa majú tkanivové bloky a sklíčka s rezmi skladovať podľa odporúčaných podmienok skladovania a manipulácie – pozrite si webovú lokalitu spoločnosti Leica. Pečenie sa môže vykonávať buď na zariadení BOND pomocou protokolu *Bake and Dewax (Pečenie a odstránenie vosku), alebo samostatne v rúre alebo inkubátore. Odporúčaná teplota a čas pečenia je až 16 h pri 56 °C alebo 60 – 120 min pri 80 °C.

3.2 Predpríprava

Na kladne nabitú sklíčku (napr. aminoalkylsilánové) umiestnite 3 – 6 µm hrubé rezy tkaniva fixovaného formalínom a zaliateho do parafínu. Nižšie uvedený protokol sa vzťahuje na použitie 5 sklíčok vo vertikálnej sklenej nádobe typu Coplin s objemom 50 ml.

1. Sklíčka s rezmi pečte 2 hodiny pri 80 °C alebo 16 hodín pri 56 °C.
2. Teplú sklíčku deparafinizujte namáčaním v xyléne alebo náhrade xylénu dvakrát po 10 minútach (min).
3. Rehydratujte v 100 %, 85 % a 70 % etanole, zakaždým na 3 min.
4. Premývajte v dH₂O počas 3 min pri izbovej teplote (RT).
5. Predprípravte s 50 ml 0,2 M HCl (LK-099B) počas 20 min pri RT a potom premyte v dH₂O počas 3 min pri RT.

6. Sklíčka na 30 min umiestnite do 50 ml roztoku na predprípravu B (8 % tiokyanatan sodný) (LK-100B) pri teplote 80 °C.
7. Oplachujte 3 min v 50 ml 2 x SSC (LK-104B) pri RT.
8. Parafínový rez pokryte približne 200 µl roztoku pepsínu (LK-101B) a 5 – 50 min inkubujte pri RT. (Čas závisí od fixácie tkaniva a typu tkaniva. Napr. väčšina tkanív karcinómu prsníka potrebuje na štiepenie 5 – 15 min, tkanivo hrubého čreva 20 – 30 min.)
9. Premývajte 1 min v dH₂O.
10. Premývajte 5 min v 50 ml 2 x SSC (LK-104B) pri RT.
11. Sklíčka dehydratujte namočením do 70 %, 85 % a 100 % etanolu, zakaždým na 1 min. Vysušte na vzduchu. Prejdite na časť **Príprava sondy**.

3.3 Príprava sondy:

FISH sondy Kreotech™ pre tkanivo zaliate do parafínu sa dodávajú v stave pripravenom na použitie (RtU), pokiaľ nie je v dokumentácii k produktu uvedené inak. Špecifické informácie o riedení nájdete na štítku na fľaštičke a v príbalovom letáku konkrétnej sondy.

3.4 Spoločná denaturácia

Aplikujte 10 µl sondy na pole 22 x 22 mm. Zakryte skleneným krycím sklíčkom a utesnite prípravkom Fixogum alebo gumovým cementom. Vzorku a sondu denaturujte v zariadení ThermoBrite (TS-01/02) pri teplote 80 ±1 °C počas 5 min. Prejdite na časť **Hybridizácia**.

3.5 Hybridizácia:

Inkubujte cez noc pri teplote 37 ±1 °C v zariadení ThermoBrite (TS-01/02) alebo vo zvlhčenej komore.

3.6 Premývanie po hybridizácii:

1. Zohrejte 50 ml premývacieho pufru I (0,4 x SSC/0,3 % Igepal) (LK-102) na 72 °C.
2. Odstráňte gumový cement.
3. Vložte sklíčka do 50 ml premývacieho pufru II (2 x SSC/0,1 % Igepal) (LK-103) a 2 min inkubujte pri RT. Odstráňte krycie sklíčka. Premývací pufer použite opakovane len raz na celkovo 10 sklíčok.
4. Vložte sklíčka do 50 ml vopred zohriateho premývacieho pufru I (0,4 x SSC/0,3 % Igepal) (LK-102) a 2 min inkubujte pri 72 °C (+1 °C) bez miešania. Premývací pufer použite opakovane len raz na celkovo 10 sklíčok.
5. Vložte sklíčka do 50 ml čerstvého premývacieho pufru II (2 x SSC/0,1 % Igepal) (LK-103) a 1 min inkubujte pri RT bez miešania. Premývací pufer použite opakovane len raz na celkovo 10 sklíčok.
6. Dehydratujte v čerstvom 70 %, 85 % a 100 % etanole, zakaždým na 1 min pri RT. Vysušte na vzduchu pri RT a prejdite na časť **Kontrastné farbenie**.

3.7 Kontrastné farbenie:

Aplikujte 15 µl kontrastného farbiva DAPI (DAPI/Antifade 1 µg/ml) (LK-096B) alebo jeho roztoku zriedeného pomocou riediaceho roztoku kontrastného farbiva (LK097B) a priložte sklenené krycie sklíčko. Preparát vyšetrite pod mikroskopom.

3.8 Odporúčania týkajúce sa postupu:

Skontrolujte štiepenie proteínov a predprípravu použitím 15 µl kontrastného farbiva DAPI a vyhodnoťte sklíčka pomocou fluorescenčného mikroskopu vybaveného filtrom DAPI. Ak vzorka nie je dostatočne naštiepená: odstráňte krycie sklíčko a namočte tkanivo do 2 x SSC (LK-104B) na 2 min a predĺžte štiepenie proteínov. Ak je vzorka príliš naštiepená, použite čerstvú vzorku a skráťte čas štiepenia proteínov.

Dôležité sú teplota a koncentrácia pufru (stringentnosť) hybridizácie a premývania, pretože nižšia stringentnosť môže mať za následok nešpecifickú väzbu sondy na iné sekvencie a vyššia stringentnosť môže mať za následok nedostatočný signál. Neúplná denaturácia cieľovej DNA môže mať za následok nedostatočný signál.

3.9 Odporúčania týkajúce sa fluorescenčnej mikroskopie

Na optimálnu vizualizáciu použite dobre udržiavaný a pravidelne kalibrovaný mikroskop vybavený 100 W ortuťovou lampou alebo iným vhodným zdrojom svetla (napr. halogenidovou žiarovkou (120 W X-cite) alebo zdrojom svetla na báze LED) a fluorescenčným objektívom so 63x alebo 100x zväčšením. Na zobrazenie viacerých farieb sa používajú trojpásmové filtre (DAPI/FITC/Cy3 alebo DAPI/FITC/TRITC), na vizualizáciu

jednotlivých farieb sa používajú jednopásmové filtre. Odporúčania týkajúce sa vhodných filtrov pre jednotlivé značky mikroskopov nájdete na webovej lokalite spoločnosti Leica: <http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/kreatech-fish-probes/>.

Vhodný rozsah excitácie a emisie pre fluorofóry Kreatech™:

Fluorofór	Excitácia	Emisia
DAPI	360 ±20 nm	460 ±30 nm
PlatinumBright™ 415	429 ±15 nm	470 ±15 nm
PlatinumBright™ 495	495 ±10 nm	517 ±10 nm
PlatinumBright™ 550	550 ±10 nm	580 ±10 nm

Zobrazená šírka pásma zodpovedá 80 % maximálnej hodnoty excitácie/emisie fluorofóru)

4 Analytický výkon

Výkon súpravy Tissue Digestion Kit II sa stanovil pomocou postupov opísaných v tomto návode na použitie. Úpravy týchto postupov môžu zmeniť výkon testu. Akékoľvek odchýlky od uvedených postupov musí overiť používateľ. Používatelia, ktorí sa odchýlia od odporúčaných testovacích postupov, musia akceptovať zodpovednosť za interpretáciu výsledkov pacienta za týchto okolností. Časy podľa protokolov sa môžu líšiť z dôvodu odlišností vo fixácii a spracovaní. Okrem toho môže byť potrebné optimalizovať dobu inkubácie s pepsínom v závislosti od podmienok spracovania a fixácie.

5 Požadované materiály, ktoré sa dodávajú s produktom

Č. kódu:	Opis	Objem
LK-096B	DAPI/Antifade 1 µg/ml (kontrastné farbivo DAPI)	0,5 ml
LK-097B	Antifade (riediaci roztok kontrastného farbiva)	0,5 ml
LK-099B	0,2 M HCl	250 ml
LK-100B	8 % tiokyanatan sodný (roztok na predprípravu B)	250 ml
LK-101B	Roztok pepsínu	5 ml
LK-102B*	0,4 x SSC/0,3 % Igepal (premývací pufer I)	250 ml
LK-103B*	2 x SSC/0,1 % Igepal (premývací pufer II)	2 x 250 ml
LK-104B	2 x SSC	2 x 250 ml

*Upozorňujeme, že výrobky LK-102 a LK-103 obsahujúce rovnaké číslo, ale rôzne písmená, sú okrem objemu identické. A = 100 ml, B = 250 ml

6 Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú s produktom

- Xylén
- 100 %, 85 % a 70 % etanol
- Fixogum (LK-071A) alebo gumový cement
- Horúca platnička s presnou reguláciou teploty do 80 °C alebo zariadenie ThermoBrite™ (TS01/TS02)
- Inkubátor s presným rozsahom teploty 37 – 56 °C
- Vodný kúpeľ s presným rozsahom teploty 37 – 80 °C
- Plastové a sklenené nádoby typu Coplin
- Rôzne mikropipety (1 µl – 200 µl)
- Fluorescenčný mikroskop vybavený vhodnými filterami (pozrite si odporúčania týkajúce sa fluorescenčnej mikroskopie).

7 Varovania a bezpečnostné opatrenia

- Každá vážna nehoda, ktorá sa vyskytne v súvislosti s pomôckou, sa nahlási výrobcovi a príslušnému orgánu členského štátu, v ktorom používateľ a/alebo pacient sídli.
- Na diagnostické použitie in vitro. Len na profesionálne laboratórne použitie. V prípade mimoriadnych udalostí si pozrite bezpečnostné informácie v kartách bezpečnostných údajov.

- Súprava je určená na použitie len pred vykonaním a po vykonaní DNA FISH v FFPE tkanive. Tento produkt nie je určený na použitie so zmrazeným tkanivom.
- Len na neautomatizovanú FISH predprípravu a hybridizáciu.
- Všetky materiály sa majú likvidovať v súlade s pokynmi vašej inštitúcie na likvidáciu nemocničného odpadu.
- V prípade konvenčných FFPE vzoriek sa odporúča použiť súpravu KBI-60007 Tissue Digestion Kit I.
- V prípade metafázových a interfázových buniek alebo iných cytologických vzoriek sa odporúča použiť súpravu na predprípravu KBI-60005 alebo KBI-60006.

Označovanie podľa nariadenia (ES) č. 1272/2008

Č. kódu:	Opis	Signálne slovo	Piktogram	Výstražné upozornenia
LK-096B	DAPI/Antifade 1 µg/ml (kontrastné farbivo DAPI)	Varovanie		H315, H319 H335
LK-097B	Antifade (riediaci roztok kontrastného farbiva)	Varovanie		H315, H319 H335
LK-099B	0,2 M HCl	neuplatňuje sa	neuplatňuje sa	neuplatňuje sa
LK-100B	8 % tiokyanatan sodný (roztok na predprípravu B)	neuplatňuje sa	neuplatňuje sa	neuplatňuje sa
LK-101B	Roztok pepsínu	neuplatňuje sa	neuplatňuje sa	neuplatňuje sa
LK-102B	0,4 x SSC/0,3 % Igepal (premyvaci pufer I)	neuplatňuje sa	neuplatňuje sa	neuplatňuje sa
LK-103B	2 x SSC/0,1 % Igepal (premyvaci pufer II)	neuplatňuje sa	neuplatňuje sa	neuplatňuje sa
LK-104B	2 x SSC	neuplatňuje sa	neuplatňuje sa	neuplatňuje sa

Výstražné upozornenia

H315 – Dráždi kožu.

H319 – Spôsobuje vážne podráždenie očí.

H335 – Môže spôsobiť podráždenie dýchacích ciest.

Preventívne bezpečnostné upozornenia

P271 – Používajte iba na voľnom priestranstve alebo v dobre vetranom priestore.

P261 – Zabráňte vdychovaniu hmly/pár/aerosólov.

P264 – Po manipulácii starostlivo umyte všetky odkryté vonkajšie časti tela.

P280 – Noste ochranné rukavice, ochranný odev, ochranné okuliare a ochranu tváre.

Bezpečnostné upozornenia pri účinku

P305 + P351 + P338 – PO ZASIAHNUTÍ OČÍ: Opatrne niekoľko minút oplachujte vodou. Ak používate kontaktné šošovky a ak je to možné, odstráňte ich. Pokračujte vo vyplachovaní.

P312 – Pri zdravotných problémoch volajte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÉ CENTRUM/lekára/poskytovateľa prvej pomoci.

P337 + P313: Ak podráždenie očí pretrváva: Vyhľadajte lekársku pomoc/starostlivosť.

P302 + P352 – PRI KONTAKTE S POKOŽKOU: Umyte veľkým množstvom vody a mydla.

P304 + P340 – PRI VDÝCHNUTÍ: Presuňte osobu na čerstvý vzduch a umožnite jej pohodlne dýchať.

P332 + P313: Ak sa prejaví podráždenie pokožky: Vyhľadajte lekársku pomoc/starostlivosť.

P362 + P364 – Kontaminovaný odev vyzlečte a pred ďalším použitím vyperte.

Doplňkové výstražné upozornenia: žiadne

Určené iba pre laboratórnych odborníkov

Vysvetlenie symbolov

	Obsahuje nebezpečné látky
	Krajina výroby
	Nepoužívajte, ak je obal poškodený
	Preštudujte si elektronický návod na použitie (IfU)

8 Uskladnenie činidiel a manipulácia s nimi

Chráňte DAPI/Antifade pred silným a priamym svetlom. Skladujte pri teplote 2 – 8 °C. Za týchto podmienok nedôjde k významnej strate účinnosti neotvoreného produktu do dátumu expirácie, ktorý sa uvádza na štítku fľaštičky.

Okamžite po použití vráťte nezriedené a zriedené činidlá do teploty 2 – 8 °C.

Po otvorení sú produkty stabilné až 18 mesiacov, ale nikdy nie dlhšie ako do dátumu expirácie každého jednotlivého produktu. Po uplynutí tejto doby môže mať použitie roztokov za následok suboptimálne výsledky.

9 Technická pomoc

Technická pomoc je k dispozícii na stránke www.leicabiosystems.com alebo prostredníctvom e-mailu: Kreatech.Support@Leicabiosystems.com. Ak sa pri používaní tohto produktu nedosiahnu požadované výsledky alebo sa objavia akékoľvek anomálie, kontaktujte nás.

Papierovú vytlačenú kópiu IfU si môžete vyžiadať e-mailom na adrese: LBSAMS-IFU@leicabiosystems.com



Elektronická verzia IfU je k dispozícii v ďalších jazykoch a môžete si ju stiahnuť na stránke: www.leicabiosystems.com

10 Zákaznícky servis

Sondy Kreatech si môžete objednať prostredníctvom zákazníckeho servisu Leica +31 20 6919181 alebo e-mailom: purchase.orders@leica-microsystems.com.

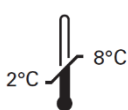
11 História

Verzia IfU	Dátum vydania	Zmeny
2,4	2016-SEP-27	Odstránenie sloganu „Patologická spoločnosť“
3,0	Apríla 2022	Aktualizácia v súlade s IVD nariadeniami

Tissue Digestion Kit II

REF KBI-60004

Vsebuje zadostno količino za do 25 oziroma 5x5 testov



Kreatech Biotechnology B.V.
Vlierweg 20
1032 LG Amsterdam
Nizozemska
www.LeicaBiosystems.com



1 Predvidena uporaba/namen

Fluorescenčna in situ hibridizacija (FISH) določa ali označuje ciljne genomske sekvence, da je možno proučevati njihovo lokacijo. Poročevalske molekule najprej označijo zaporedja DNK iz ustreznih sond, specifičnih za kromosome. Označena sonda z DNK je nato hibridizirana v metafazne kromosome ali interfazna jedra na preparatu. Po čiščenju se primerek preseja s fluorescenčno mikroskopijo za poročevalske molekule.

Komplet za predhodno obdelavo je posebej razvit za pridobivanje optimalnih rezultatov glede močno povezanih ali zahtevnih tkiv, fiksiranih s formalinom in vgrajenih v parafin (FFPE) (npr. daljša fiksacija ali daljše shranjevanje).

Ta izdelek je namenjen za diagnostično uporabo in vitro.

2 Opis izdelka

Ta komplet za predhodno obdelavo je namenjen neavtomatizirani hibridizaciji FISH, ki je posebej razvita za predhodno obdelavo razgradnje encimov FFPE pred postopkom hibridizacije DNK FISH. Ta komplet je posebej razvit za pridobivanje optimalnih rezultatov glede močno prečno povezanih tkiv, fiksiranih s formalinom in vgrajenih v parafin (FFPE). Uporaba kompleta bo obrnila prečne povezave v tkivu, membrana celice bo postala permeabilna in proteini v celicah se bodo razgradili in tako olajšali vezi sond FISH s specifičnimi celicami DNK.

3 Navodila za uporabo

3.1 Primerki

Komplet za predhodno obdelavo je posebej razvit za pridobivanje optimalnih rezultatov glede močno povezanih ali zahtevnih tkiv, fiksiranih s formalinom in vgrajenih v parafin (FFPE) (npr. daljša fiksacija ali daljše shranjevanje).

Predhodna analitika primerkov: Predhodna analitika ima pomembno vlogo pri uspešnem pridobivanju FISH. Primerki mora biti ustrezno pritrdjeni in vdeleni v parafinski vosek v skladu z dobro uveljavljenim protokolom. Prekomerno ali preslabo pritrdjevanje lahko povzroči napako pri postopku FISH ali vsaj nizko reproduktivnost/intenziteto signala. Sonde Kreatech™ FISH so testirane na delih tkiv FFPE, ki so rezani na 3-6 µm. Kocke s tkivom in rezani preparati morajo biti za optimalne rezultate shranjeni v skladu s priporočenimi pogoji glede hranjenja in ravnanja; oglejte si spletno stran Leica. Peka je možna tako z uporabo protokola za peko in odstranjevanje voska *Bake and Dewax na napravi BOND kot ločeno v pečici ali v inkubatorju. Priporočena temperatura za peko in čas sta do 16 ur pri 56 °C ali 60-120 min pri 80 °C.

3.2 Predhodna obdelava

Namestite 3 - 6 µm odseke tkiva, fiksiranega s formalinom in vgrajenega v parafin formalin na ploščice s pozitivnim nabojem (npr. amino alkil silan). Spodaj naveden protokol je namenjen uporabi 5 ploščic v 50 ml pokončni posodi coplin.

1. Nameščene ploščice pecite 2 uri pri 80 °C ali 16 ur pri 56 °C.
2. Odstranite parafin s toplih ploščic tako, da jih dvakrat po 10 minut (min) namočite v substitut ksilena.
3. Ponovno hidrirajte tako, da namočite v 100%, 85% in 70% etanol, in sicer 3 min v vsakega.
4. Spirajte z dH2O 3 min pri sobni temperaturi (ST).
5. Predhodno obdelajte s 50 ml 0,2 M HCl (LK-099B) 20 min pri ST in nato spirajte v dH2O 3 min pri ST.
6. Ploščice vstavite v 50 ml Pretreatment Solution B (8% natrijev tiocianat) (LK-100B) za 30 min pri 80 °C.
7. Spirajte v 50 ml 2 x SSC (LK-104B) 3 min pri ST.

8. Rezone v parafinu pokrijte s približno 200 µl raztopine Pepsin Solution (LK-101B) in inkubirajte pri ST 5-50 min (čas je odvisen od pritrditve tkiva in vrste tkiva). Npr. večina tkiva raka na prsih potrebuje razgradnjo 5-15 min; tkivo črevesa 20-30 min).
9. Umivajte 1 min v dH₂O.
10. Umivajte v 50 ml 2 x SSC (LK-104B) 5 min pri ST.
11. Ploščice dehidrirajte tako, da jih vsakič namočite v 70%, 85% in 100% etanol, in sicer 1 min v vsakega. Posušite na zraku. Nadaljujte s **Pripravo sond**.

3.3 Priprava sond:

Sonde Kreatech™ FISH za tkiva, vgrajena v parafin, dobavlja Ready to Use (RtU), če ni drugače navedeno v dokumentaciji o izdelku. Glede podrobnosti o redčenju si oglejte oznako na steklenički in specifične dodatke v paketu s sondami.

3.4 Ko-denaturacija

Uporabite 10 µl sonde na polje 22 x 22 mm. Pokrijte s krovnim steklom in zatesnite z izdelkom Fixogum ali s tekočim lepilom. Uporabite denaturacijo za vzorec in sondo na izdelku ThermoBrite (TS-01/02) pri 80 ±1 °C za 5 min. Nadaljujte s **Hibridizacijo**.

3.5 Hibridizacija:

Inkubirajte čez noč pri 37 ±1 °C v izdelku ThermoBrite (TS-01/02) ali v vlažni komori.

3.6 Pranje po hibridizaciji:

1. Vnaprej ogrejte 50 ml izdelka Wash Buffer I (0,4 x SSC / 0,3 % Igepal) (LK-102) na 72 °C
2. Odstranite tekoče lepilo.
3. Ploščice vstavite v 50 ml Wash Buffer II (2 x SSC / 0,1 % Igepal) (LK-103), inkubirajte 2 min pri ST. Odstranite krovna stekla. Samo enkrat ponovno uporabite pufer za čiščenje za skupno 10 predmetnih stekel.
4. Ploščice vstavite v 50 ml predhodno ogretega Wash Buffer II (0,4 x SSC / 0,3% Igepal) (LK-102), inkubirajte 2 min pri 72 °C (+ 1 °C) brez mešanja. Samo enkrat ponovno uporabite pufer za čiščenje za skupno 10 predmetnih stekel.
5. Ploščice vstavite v 50 ml svežega Wash Buffer II (2 x SSC / 0,1 % Igepal) (LK-103), inkubirajte 1 min pri ST brez mešanja. Samo enkrat ponovno uporabite pufer za čiščenje za skupno 10 predmetnih stekel.
6. Dehidrirajte v svežem 70%, 85% in 100% etanolu, inkubirajte 1 min v vsakem pri ST. Posušite na zraku pri ST in nadaljujte na **nasprotno barvanje (counterstaining)**.

3.7 Counterstaining

Nanesite 15 µl kontrastnega barvila DAPI (DAPI/Antifade 1 µg/ml) (LK-096B) ali razredčino tega z uporabo redčila za kontrastno barvilo (LK097B) ter namestite krovno steklo. Nadaljujte z mikroskopijo.

3.8 Priporočila za postopek:

Preverite razgradnjo proteina in predhodno pripravo z nanosom 15 µl kontrastnega barvila DAPI ter ocenite stekla s fluorescenčnim mikroskopom, ki ima nameščen filter DAPI. Če vzorec ni zadostno prebavljen: odstranite krovno steklo in namočite tkivo v 2 x SSC (LK-104B) za 2 min in podaljšajte prebavo encimov. Če je vzorec prekomerno prebavljen, uporabite svež vzorec in skrajšajte čas prebave proteinov.

Temperatura in koncentracija pufru (strogost) pri hibridizaciji in pranju sta pomembna, saj lahko slabša doslednost privede do nespecifičnih vezi sonde na druga zaporedja, višja strogost pa lahko privede do pomanjkanja signala. Nepopolna denaturacija ciljne DNK lahko privede do pomanjkanja signala.

3.9 Priporočila za fluorescenčno mikroskopijo

Za optimalno vizualizacijo uporabljajte dobro vzdrževan mikroskop, ki se redno nastavlja in je opremljen s 100W svetilko iz živega srebra ali drug ustrezen vir svetlobe (npr. metalhalogenidne žarnice (120 W X-cite) ali svetlobne vire na osnovi tehnologije LED) ter 63x ali 100x fluorescenčni objektiv. Trojni pasovno prepustni filtri (DAPI/FITC/Cy3 ali DAPI/FITC/TRITC) se uporabljajo za ogled več barv, enojni pasovno prepustni filtri se uporabljajo za vizualizacijo posameznih barv. Glede priporočil o ustreznih filtrih za vsako blagovno znamko mikroskopa si oglejte spletno stran Leica: <http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/kreatech-fish-probes/>

Ustrezen razpon vzbujanja in emisij za fluorofore Kreatech™:

Fluorofor	Vzbujanje	Emisija
DAPI	360 ± 20 nm	460 ± 30 nm
PlatinumBright™ 415	429 ± 15 nm	470 ± 15 nm
PlatinumBright™ 495	495 ± 10 nm	517 ± 10 nm
PlatinumBright™ 550	550 ± 10 nm	580 ± 10 nm

Prikazana pasovna širina ustreza 80 % največjega dovoljenega vzbujanja/emisij fluorofora)

4 Analitično delovanje

Delovanje izdelka Tissue Digestion Kit II je bilo določeno z uporabo postopkov, opisanih v teh Navodilih za uporabo. Spremembe teh postopkov lahko spremenijo delovanje preizkusa. Morebitne spremembe protokolov mora odobriti uporabnik. Uporabniki, ki odstopijo od priporočenih preizkusnih postopkov, morajo prevzeti odgovornost za razlago bolnikovih rezultatov pod temi pogoji. Trajanje protokola se lahko spremeni glede na fiksacijo in obdelavo. Poleg tega bo morda treba optimizirati čas inkubacije pepsina glede na vrsto tkiva, obdelavo in pogoje pri fiksaciji.

5 Potrebni materiali, ki so dobavljeni z izdelkom

Koda #	Opis	Količina
LK-096B	DAPI/Antifade 1 µg/ml (DAPI Counterstain)	0,5 ml
LK-097B	Antifade (Redčilo Counterstain)	0,5 ml
LK-099B	0,2 M HCl	250 ml
LK-100B	8 % natrijev tiocianat (Pretreatment Solution B)	250 ml
LK-101B	Pepsin Solution	5 ml
LK-102B*	0,4 x SSC / 0,3% Igepal (Wash Buffer I)	250 ml
LK-103B*	2 x SSC / 0,1% Igepal (Wash Buffer II)	2 x 250 ml
LK-104B	2 x SSC	2 x 250 ml

*Izdelka LK-102 in LK-103 imata isto številko, a drugačne črke, in sta identična z izjemo količine. A=100 ml, B=250 ml

6 Potrebni materiali, ki niso dobavljeni z izdelkom

- Ksilen
- Etanol 100 %, 85 % in 70 %
- Fixogum (LK-071A) ali tekoče lepilo
- Grelna plošča z natančnim nadzorom temperature do 80 °C ali ThermoBrite™ (TS01/TS02)
- Inkubator z natančnim razponom temperature med 37 in 56 °C
- Vodna kopel z natančnim razponom temperature med 37 in 80 °C
- Plastične in steklene posode coplin
- Variabilne mikropipete (1 µl - 200 µl)
- Fluorescenčni mikroskop s primernimi filtri (glejte priporočila za fluorescenčno mikroskopijo).

7 Opozorila in previdnostni ukrepi

- Vsak resen incident, ki se pripeti v zvezi z napravo, je treba sporočiti proizvajalcu in pristojnim organom države članice, v kateri deluje uporabnik in/ali pacient.
- Za diagnostično uporabo in vitro. Samo za profesionalno uporabo v laboratorijih. V nujnih primerih glede varnostnih informacij preverite dokumentacijo SDS.
- Ta komplet je namenjen uporabo samo pred in po DNK FISH na tkivih FFPE. Izdelek ni namenjen uporabi v na zamrznjenih tkivih.
- Samo za neavtomatizirano predhodno obdelavo in hibridizacijo FISH.
- Ves material je potrebno odstraniti v skladu s smernicami vaše ustanove glede odstranjevanje bolnišničnih odpadkov.
- Uporaba izdelka KBI-60007 Tissue Digestion Kit I je priporočena s konvencionalnimi vzorci FFPE.

- Za celice metafaze in interfaze oziroma druge citološke vzorce priporočamo uporabo kompleta za predhodno obdelavo KBI-60005 ali KBI-60006.

Označevanje v skladu z Uredbo (ES) št. 1272/2008

Koda #	Opis	Signalna beseda	Piktogram	Stavki o nevarnosti
LK-096B	DAPI/Antifade 1 µg/ml (DAPI Counterstain)	Opozorilo		H315, H319, H335
LK-097B	Antifade (Redčilo Counterstain)	Opozorilo		H315, H319, H335
LK-099B	0,2 M HCl	N.P.	N.P.	N.P.
LK-100B	8 % natrijev tiocianat (Pretreatment Solution B)	N.P.	N.P.	N.P.
LK-101B	Pepsin Solution	N.P.	N.P.	N.P.
LK-102B	0,4 x SSC / 0,3% Igepal (Wash Buffer I)	N.P.	N.P.	N.P.
LK-103B	2 x SSC / 0,1% Igepal (Wash Buffer II)	N.P.	N.P.	N.P.
LK-104B	2 x SSC	N.P.	N.P.	N.P.

Stavki o nevarnosti

H315 – Povzroča draženje kože.

H319 – Povzroča hudo draženje oči.

H335 – Lahko povzroča draženje dihal

Varnostne izjave Preventiva

P271 – Uporabljajte samo na odprtem ali v dobro prezračevanih prostorih.

P261 – Izogibajte se vdihavanju meglice/hlapov/aerosolu.

P264 – Po uporabi temeljito umijte vsa izpostavljena območja telesa.

P280 – Uporabite zaščitne rokavice, zaščitno obleko, zaščito za oči in zaščito za obraz.

Varnostne izjave Odziv

P305+P351+P338 – PRI STIKU Z OČMI: Previdno izpirati z vodo nekaj minut. Odstranite kontaktne leče, če jih imate in če to lahko storite brez težav. Nadaljujte z izpiranjem.

P312 – Ob slabem počutju pokličite CENTER ZA ZASTRUPITVE/zdravnika/reševalca.

P337+P313 – Če draženje oči ne preneha: Poiščite zdravniško pomoč/oskrbo.

P302+P352 – PRI STIKU S KOŽO: Umiti z veliko vode in mila.

P304+P340 – PRI VDIHAVANJU: Prenesti osebo na svež zrak in jo pustiti v udobnem položaju, ki olajša dihanje.

P332+P313 – Če se pojavi draženje kože: Poiščite zdravniško pomoč/oskrbo.

P362+P364 – Slecite kontaminirana oblačila in jih oprati pred ponovno uporabo.

Dodatni stavki o nevarnosti: brez

Omejeno na strokovne uporabnike v laboratorijih

Razlaga simbolov

	Vsebuje nevarne snovi
	Država proizvajalka
	Ne uporabljajte, če je paket poškodovan
	Preverite navodila za uporabo v elektronski obliki (elfU)

8 Shranjevanje in ravnanje z reagentom

Zaščitite DAPI/Antifade pred močno in neposredno svetlobo. Hranite pri temperaturi 2-8 °C. Neodprt izdelek je stabilen pod temi pogoji do datuma izteka roka uporabnosti, ki je naveden na oznaki stekleničke. Zalogo nerazredčenih in razredčenih reagentov takoj po uporabi ohladite na temperaturo 2–8 °C. Izdelki so po odprtju stabilni do 18 mesecev, a nikoli dlje od datuma izteka roka uporabnosti za vsak posamezni izdelek. Uporaba po tem roku lahko privede do suboptimalnih rezultatov.

9 Tehnična podpora

Tehnična podpora je na voljo na spletni strani www.leicabiosystems.com ali na e-poštnem naslovu: Kreatech.Support@Leicabiosystems.com. Obrnite se na nas, če ne morete doseči zelenih rezultatov oziroma pri pojavu anomalij pri uporabi tega izdelka.

Natisnjen izvod IfU lahko zahtevate tako, da pošljete e-poštno sporočilo na: LBSAMS-IFU@leicabiosystems.com



V dodatnih jezikih je elfU na voljo za prenos na: www.leicabiosystems.com

10 Služba za pomoč uporabnikom

Sonde Kreatech je možno naročiti prek Službe za pomoč uporabnikom na telefonski številki +31 20 6919181 ali preko e-pošte: purchase.orders@leica-microsystems.com.

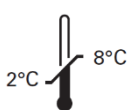
11 Zgodovina

Različica IfU	Datum izdaje	Spremembe
2,4	2016-SEP-27	Odstranite geslo »Podjetje za patologijo«
3,0	2022 aprila	Posodobite v skladu z uredbami IVD

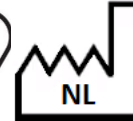
Vävnadsspjälkningskit II

REF KBI-60004

Innehåller tillräcklig volym för upp till 25 eller 5x5 tester



Kreatech Biotechnology B.V.
Vlierweg 20
1032 LG Amsterdam
Nederländerna
www.LeicaBiosystems.com



1 Avsedd användning/ändamål

Fluorescens in situ hybridisering (FISH) identifierar eller etiketterar målgenomsekvenser så att deras placering kan studeras. DNA-sekvenser från lämpliga kromosomspecifika sonder etiketteras först med reportermolekyler. Den märkta DNA-sonden hybridiseras sedan till kromosomerna i metafas eller kärnorna i interfase på ett objektglas. Efter tvättning undersöks provexemplet med hjälp av fluorescensmikroskopi för att hitta rapportermolekylerna.

Detta förbehandlingskit är särskilt utvecklat för att få optimala resultat på starkt tvärbundna eller svåra formalinfixerade paraffinbäddade vävnader (FFPE) (t.ex. längre fixering eller långvarig förvaring).

Produkten är avsedd för in vitro-diagnostik.

2 Produktbeskrivning

Detta förbehandlingskit är avsett för icke-automatiserade FISH-hybridiseringar och är särskilt utvecklat för att användas för förbehandling och enzymnedbrytning av FFPE före DNA FISH-hybridiseringsproceduren. Detta kit är särskilt utvecklat för att uppnå optimala resultat på starkt tvärbundna eller svåra FFPE-vävnader. Användningen av kitet kommer att omvända tvärbindingarna i vävnaden, permeabilisera cellmembranet och smälta cellproteiner för att underlätta bindningen av FISH-sonderna med det specifika cell-DNA:t.

3 Bruksanvisning

3.1 Provexempel

Detta förbehandlingskit är särskilt utvecklat för att få optimala resultat på starkt tvärbundna eller svåra formalinfixerade paraffinbäddade vävnader (FFPE) (t.ex. längre fixering eller långvarig förvaring).

Föranalys av provexempel: Föranalysen en viktig roll för att få en lyckad FISH. Provexemplet ska fixeras korrekt och bäddas in i paraffinax enligt ett väletablerat protokoll. Över- eller underfixering kan leda till att FISH-förfarandet misslyckas eller åtminstone till låg reproducerbarhet/signalintensitet. Kreatech™ FISH-sonder har testats på FFPE-vävnadssektioner som skurits på 3-6 µm. Vävnadsblock och skurna objektglas ska förvaras i enlighet med rekommenderade förvarings- och hanteringsförhållanden för optimala resultat, se Leicas hemsida. Värmning kan ske antingen på BOND med hjälp av *Värmnings- och avvaxningsprotokollet eller separat i ugn eller inkubator. Rekommenderad värmningstemperatur och värmningstid är upp till 16 timmar vid 56 °C eller 60–120 minuter vid 80 °C.

3.2 Förbehandling

Montera 3-6 µm formalinfixerade paraffinbäddade vävnadssektioner på positivt laddade objektglas (t.ex. aminoalkylsilan). Protokollet nedan avser 5 objektglas i en 50 ml stort stående Coplin-kärl.

1. Värm monterade objektglas i 2 timmar vid 80 °C eller 16 timmar vid 56 °C.
2. Avparaffinera varma objektglas genom att blötlägga dem i xylen eller xylenersättning i två gånger 10 minuter (min).
3. Återhydratisera genom att blötlägga i 100 %, 85 % och 70 % etanol i 3 minuter vardera.
4. Tvätta med dH₂O i 3 minuter i rumstemperatur (RT).
5. Förbehandla med 50 ml 0,2 M HCl (LK-099B) i 20 minuter vid RT och tvätta sedan i dH₂O i 3 minuter vid RT.
6. Placera objektglasen i 50 ml förbehandlingslösning B (8 % natriumtiocyanat) (LK-100B) vid 80 °C i 30 minuter.

7. Skölj i 50 ml 2 x SSC (LK-104B) i 3 minuter vid RT.
8. Täck paraffinsektionen med cirka 200 µl pepsinlösning (LK-101B) och inkubera vid RT i 5–50 minuter (tiden beror på vävnadsfixering och vävnadstyp). Exempelvis behöver de flesta bröstcancervävnader 5–15 minuter för att smältas, tjocktarmsvävnad 20–30 minuter).
9. Tvätta i dH₂O i 1 minut.
10. Tvätta i 50 ml 2 x SSC (LK-104B) i 5 minuter vid RT.
11. Dehydratisera objektglaset genom att blötlägga 70, 85 och 100 % etanol i 1 minut per gång. Lufttorkas. Fortsätt med **sondberedning**.

3.3 Sondberedning:

Kreatech™ FISH-sonder för paraffinbäddad vävnad levereras färdiga att använda (RtU) om inget annat anges i produktdokumentationen. Se etiketten på flaskan och den specifika sondförpackningen för specifika utspädningsuppgifter.

3.4 Samdenaturering

Applicera 10 µl sond per 22 x 22 mm stort fält. Täck över med en glasskyddsfolie och försegla med Fixogum eller gummiment. Denaturera prov och sond på en ThermoBrite (TS-01/02) vid 80 ±1 °C i 5 minuter. Fortsätt med **hybridisering**.

3.5 Hybridisering:

Inkubera över natten vid 37 ±1 °C i en ThermoBrite (TS-01/02) eller i en fuktig kammare.

3.6 Tvätt efter hybridisering:

1. Förvärm 50 ml tvättbuffert I (0,4 x SSC / 0,3 % Igepal) (LK-102) till 72 °C
2. Ta bort gummimentet.
3. Placera objektglaset i 50 ml tvättbuffert II (2 x SSC / 0,1 % Igepal) (LK-103), inkubera i 2 minuter vid RT. Skjut av täckglaset. Återanvänd tvättbufferten endast en gång för totalt 10 objektglas.
4. Placera objektglaset i 50 ml förvärmad tvättbuffert I (0,4 x SSC / 0,3 % Igepal) (LK-102), inkubera i 2 minuter vid 72 °C (+ 1 °C) utan att röra på sig. Återanvänd tvättbufferten endast en gång för totalt 10 objektglas.
5. Placera objektglaset i 50 ml färsk tvättbuffert II (2 x SSC / 0,1 % Igepal) (LK-103), inkubera i 1 minut vid RT utan omrörning. Återanvänd tvättbufferten endast en gång för totalt 10 objektglas.
6. Dehydratisera i färsk 70, 85 och 100 % etanol, inkubera i 1 minut vardera vid RT. Lufttorka vid RT och fortsätt med **motfärgning**.

3.7 Motfärgning:

Applicera 15 µl DAPI-motfärgning (DAPI/Antifade 1 µg/ml) (LK-096B) eller en utspädning av detta med hjälp av motfärgningsutspädningsmedel (LK097B) och applicera glasskydd. Fortsätt med mikroskopi.

3.8 Rekommendationer vid förfarandet:

Kontrollera proteindeslutningen och förbehandlingen genom att applicera 15 µl DAPI-medel och utvärdera objektglaset med hjälp av ett fluorescensmikroskop utrustat med ett DAPI-filter. Om provet inte är tillräckligt smält: ta bort täckglaset och blötlägg vävnaden i 2 x SSC (LK-104B) i 2 minuter för att förlänga proteinspjälkningen. Om provet är överdigiterat ska du använda ett nytt prov och förkorta proteinspjälkningstiden.

Temperatur och buffertkoncentration (stringens) vid hybridisering och tvättning är viktiga, eftersom lägre stringens kan leda till ospecifik bindning av sonden till andra sekvenser, och högre stringens kan leda till att signalen uteblir. Ofullständig denaturering av mål-DNA kan leda till att signalen uteblir.

3.9 Rekommendationer för fluorescensmikroskopi

För optimal visualisering ska du använda ett väl underhållet och regelbundet kalibrerat mikroskop utrustat med en 100 W kvicksilverlampa eller annan lämplig ljuskälla (t.ex. metallhalogenlampor (120 W X-cite) eller LED-baserade ljuskällor) och ett 63x eller 100x fluorescensobjektiv. Trippelbandpassfilter (DAPI/FITC/Cy3 eller DAPI/FITC/TRITC) används för att visa flera färger, medan enkelbandpassfilter används för visualisering av enskilda färger. Se Leicas webbplats för rekommendationer om lämpliga filter för varje mikroskopmärke: <http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/kreatech-fish-probes/>

Lämpligt excitation- och emissionsområde för Kreotech™-fluoroforer:

Fluorofor	Excitation	Utsläpp
DAPI	360 ±20 nm	460 ±30 nm
PlatinumBright™ 415	429 ±15 nm	470 ±15 nm
PlatinumBright™ 495	495 ±10 nm	517 ±10 nm
PlatinumBright™ 550	550 ±10 nm	580 ±10 nm

Den visade bandbredden motsvarar 80 % av den maximala fluoroforms excitation/emission)

4 Analytiska prestanda

Prestandan för Vävnadsspjälkningskit II har fastställts med hjälp av de förfaranden som beskrivs i denna bruksanvisning. Ändringar i procedurerna kan ändra analysens prestanda. Alla avvikelser från de anvisade protokollen måste godkännas av användaren. Användare som avviker från rekommenderade testprocedurer måste ta ansvar för tolkningen av patientens resultat under sådana omständigheter. Protokolltiderna kan variera på grund av variationer i fixering och bearbetning. Dessutom kan inkubationstiden för pepsin behöva optimeras beroende på behandlings- och fixeringsförhållanden.

5 Material som krävs och levereras med produkten

Kodnr	Beskrivning	Volym
LK-096B	DAPI/Antifade 1 µg/ml (DAPI-motfärgning)	0,5 ml
LK-097B	Antifade (Spädningsmedel för motfärgning)	0,5 ml
LK-099B	0,2 M HCl	250 ml
LK-100B	8 % natriumtiocyanat (Förbehandlingslösning B)	250 ml
LK-101B	Pepsinlösning	5 ml
LK-102B*	0,4 x SSC / 0,3 % Igepal (Tvättbuffert I)	250 ml
LK-103B*	2 x SSC / 0,1 % Igepal (Tvättbuffert II)	2 x 250 ml
LK-104B	2 x SSC	2 x 250 ml

*Observera att LK-102- och LK-103-produkter som innehåller samma nummer, men olika bokstäver är identiska med undantag för volym. A= 100 ml, B=250 ml

6 Material som krävs och som inte levereras med produkten

- Xylen
- Etanol 100 %, 85 % och 70 %
- Fixogum (LK-071A) eller gummiment
- Värmeplatta med noggrann temperaturkontroll upp till 80 °C eller ThermoBrite™ (TS01/TS02)
- Inkubator med ett exakt temperaturområde på 37–56 °C
- Vattenbad med ett exakt temperaturområde på 37–80 °C
- Coplin-kärl av plast och glas
- Variabla mikropipetter (1–200 µl)
- Fluorescensmikroskop utrustat med lämpliga filter (se rekommendationer för fluorescensmikroskopi).

7 Varningar och försiktighet

- Alla allvarliga incidenter som har inträffat i samband med produkten ska rapporteras till tillverkaren och den behöriga myndigheten i den medlemsstat där användaren och/eller patienten är etablerad.
- För in vitro-diagnostik. Endast för yrkesmässigt bruk i laboratorier. I nödsituationer kan du kontrollera SDS-bladen för säkerhetsinformation.
- Kitet är avsett att användas endast före och efter DNA FISH på FFPE-vävnad. Denna produkt är inte avsedd att användas för fryst vävnad.
- Endast för icke-automatiserad FISH-förbehandling och hybridisering.
- Alla material ska bortskaffas enligt din institutions riktlinjer för bortskaffande av sjukhusavfall.
- Användning av KBI-60007 Vävnadsspjälkningskit I rekommenderas för konventionella FFPE-prover.

- För metafase- och interfasceller eller andra cytologiska prover rekommenderas förbehandlingskit KBI-60005 eller KBI-60006.

Märkning enligt förordning (EG) nr 1272/2008

Kodnr	Beskrivning	Signalord	Piktogram	Faroangivelser
LK-096B	DAPI/Antifade 1 µg/ml (DAPI-motfärgning)	Varning		H315, H319, H335
LK-097B	Antifade (Spädningsmedel för motfärgning)	Varning		H315, H319, H335
LK-099B	0,2 M HCl	EJ TILLÄMPLIGT.	EJ TILLÄMPLIGT.	EJ TILLÄMPLIGT.
LK-100B	8 % natriumtiocyanat (Förbehandlingslösning B)	EJ TILLÄMPLIGT.	EJ TILLÄMPLIGT.	EJ TILLÄMPLIGT.
LK-101B	Pepsinlösning	EJ TILLÄMPLIGT.	EJ TILLÄMPLIGT.	EJ TILLÄMPLIGT.
LK-102B	0,4 x SSC / 0,3 % Igepal (Tvättbuffert I)	EJ TILLÄMPLIGT.	EJ TILLÄMPLIGT.	EJ TILLÄMPLIGT.
LK-103B	2 x SSC / 0,1 % Igepal (Tvättbuffert II)	EJ TILLÄMPLIGT.	EJ TILLÄMPLIGT.	EJ TILLÄMPLIGT.
LK-104B	2 x SSC	EJ TILLÄMPLIGT.	EJ TILLÄMPLIGT.	EJ TILLÄMPLIGT.

Faroangivelse(r)

H315 – Orsakar hudirritation.

H319 – Orsakar allvarlig ögonirritation.

H335 – Kan orsaka irritation i luftvägarna

Förebyggande försiktighetsförklaring(ar)

P271 – Används endast utomhus eller i väl ventilerade utrymmen.

P261 – Undvik att andas in dimmor/ångor/sprej.

P264 – Tvätta alla exponerade yttre områden på kroppen noggrant efter hantering.

P280 – Använd skyddshandskar, skyddskläder, ögonskydd och ansiktsskydd.

Svar på försiktighetsförklaring(ar)

P305+P351+P338 – VID ÖGONKONTAKT: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt att göra. Fortsätt att skölja.

P312 – Kontakta GIFTINFORMATIONSCENTRALEN/läkare/första hjälpen om du mår dåligt.

P337+P313 – Vid bestående ögonirritation: Sök medicinsk rådgivning/vård.

P302+P352 – VID HUDKONTAKT: Tvätta med mycket vatten och tvål.

P304+P340 – VID INANDNING: Flytta personen till frisk luft och se till att andningen underlättas.

P332+P313 – Vid hudirritation: Sök medicinsk rådgivning/vård.

P362+P364 – Ta av nedstänkta kläder och tvätta dem innan de används igen.

Kompletterande faroangivelser: inga

Begränsad till professionella laboratorieanvändare

Förklaring av symboler

	Innehåller farliga ämnen
	Tillverkningsland
	Får inte användas om förpackningen är skadad
	Se elektronisk bruksanvisning (elfU)

8 Förvaring och hantering av reagens

Skydda DAPI/Antifade från starkt och direkt ljus. Förvaras vid 2–8 °C. Den öppnade produkten är stabil under dessa förhållanden fram till det utgångsdatum som anges på flaskans etikett.

Återställ utspädda och utspädda reagenser till 2–8 °C omedelbart efter användning.

Efter öppning är produkterna stabila i upp till 18 månader, men aldrig längre än det datum som gäller för varje enskild produkt. Efter denna tidsperiod kan användningen av lösningarna leda till suboptimala resultat.

9 Teknisk support

Teknisk support finns tillgänglig på www.leicabiosystems.com eller via e-post: Kreatech.Support@Leicabiosystems.com. Kontakta oss om du inte uppnår önskat resultat eller om det uppstår några avvikelser när du använder den här produkten.

En papperskopia av bruksanvisningen kan beställas via e-post genom att kontakta: LBSAMS-IFU@leicabiosystems.com



Den elektroniska bruksanvisningen finns på ytterligare språk som kan laddas ner från: www.leicabiosystems.com

10 Kundtjänst

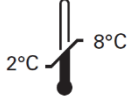
Kreatech-sonderna kan beställas via Leicas kundtjänst +31 20 6919181 eller via e-post: purchase.orders@leica-microsystems.com.

11 Historik

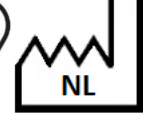
IFU-version	Utgivningsdatum	Ändringar
2,4	2016-SEP-27	Ta bort taglinen "The pathology Company"
3,0	2022 April	Uppdatering i enlighet med IVD-bestämmelserna

Doku Sindirim Kiti II**REF** KBI-60004

25 veya 5x5 teste kadar yeterli hacim içerir



Kreatech Biotechnology B.V.
Vlierweg 20
1032 LG Amsterdam
Hollanda
www.LeicaBiosystems.com

**1 Kullanım amacı**

Floresan in situ hibridizasyon (FISH), hedef genomik dizileri tanımlar veya etiketler, böylece dizilerin konumları incelenebilir. Uygun kromozom spesifik problemlerden DNA dizileri ilk olarak raportör moleküller ile etiketlenir. Etiketlenen DNA probu daha sonra bir lam üzerindeki metafaz kromozomlarına veya ara faz çekirdeklerine hibridize edilir. Örnek, yıkamadan sonra floresan mikroskopisi ile raportör molekülleri için taranır.

Bu ön işlem kiti, özellikle ağır çapraz bağlı veya zor formalinle fikse edilmiş parafine gömülmüş dokularda (FFPE) (örneğin daha uzun fiksasyon veya uzun süreli saklama) optimal sonuçlar elde etmek için geliştirilmiştir.

Bu ürün, İn Vitro Diagnostik Kullanım içindir.

2 Ürün Tanımı

Bu ön işlem kiti, DNA FISH hibridizasyon prosedüründen önce FFPE'nin ön işlem ve enzim sindirimi için kullanılmak üzere özel olarak geliştirilmiş otomatik olmayan FISH hibridizasyonları içindir. Bu kit özellikle ağır çapraz bağlı veya zor FFPE dokularda optimal sonuçlar elde etmek için geliştirilmiştir. Kitin kullanımı, FISH problemlerinin spesifik hücre DNA'sı ile bağlanmasını kolaylaştırmak için dokudaki çapraz bağlantıları tersine çevirecek, hücre zarını geçirgenleştirecek ve hücre proteinlerini sindirecektir.

3 Kullanım talimatları**3.1 Örnekler**

Bu ön işlem kiti, özellikle ağır çapraz bağlı veya zor formalinle fikse edilmiş parafine gömülmüş dokularda (FFPE) (örneğin daha uzun fiksasyon veya uzun süreli saklama) optimal sonuçlar elde etmek için geliştirilmiştir. Örneklerin ön analizleri: Başarılı bir FISH prosedürü elde edilmesinde ön analizler önemli bir rol oynar. Örnek doğru bir şekilde fikse edilmeli ve iyi belirlenmiş bir protokole göre parafin mumuna gömülmelidir. Aşırı fiksasyon veya yetersiz fiksasyon, FISH prosedürünün başarısız olmasına veya en azından düşük tekrarlanabilirliğe/sinyal yoğunluğuna neden olabilir. Kreatech™ FISH problemleri, 3-6 µm'de kesilen FFPE doku kesitleri üzerinde test edilmiştir. Doku blokları ve kesme lamları, optimum sonuçlar için önerilen saklama ve taşıma koşullarına göre saklanmalıdır, bkz. Leica web sitesi. Fırınlama işlemi BOND'da *Bake and Dewax protokolü kullanılarak veya bir fırında veya inkübatörde ayrı olarak yapılabilir. Önerilen fırınlama sıcaklığı ve süresi 56 °C'de 16 saate kadar veya 80 °C'de 60-120 dakikadır.

3.2 Ön işlem

Pozitif yüklü lamlar (örneğin aminoalkilsilan) üzerine 3-6 µm formalin ile fikse edilmiş parafine gömülmüş doku kesitlerini monte edin. Aşağıdaki protokol, 50 ml'lik dik bir coplin şalede 5 lam kullanılması için tasarlanmıştır.

1. Monte edilen lamları 80 °C'de 2 saat veya 56 °C'de 16 saat fırınlayın.
2. Isınan lamları ksilen veya ksilen ikamesine iki kez 10 dakika (dk.) batırarak parafinden arındırın.
3. Her birinde 3 dakika olmak üzere %100, %85 ve %70 etanol içinde ıslatarak rehidre edin.
4. Oda sıcaklığında (RT) 3 dk. boyunca dH2O ile yıkayın.
5. Oda sıcaklığında 20 dakika boyunca 50 ml 0,2 M HCl (LK-099B) ile ön işlem yapın ve daha sonra oda sıcaklığında 3 dakika boyunca dH2O içinde yıkayın.
6. Lamları 50 ml Ön İşlem Çözeltisi B (%8 sodyum tiyosiyanat) (LK-100B) içine yerleştirin ve 80 °C'de 30 dakika tutun.
7. Oda sıcaklığında 3 dk. boyunca 50 ml 2 x SSC (LK-104B) içinde durulayın.

8. Parafin bölümünü yaklaşık 200 µl Pepsin Çözeltisi (LK-101B) ile örtün ve oda sıcaklığında 5-50 dakika inkübe edin (Süre doku fiksasyonuna ve doku tipine bağlıdır. Örneğin, çoğu meme kanseri dokusu 5-15 dakika, kolon dokusu 20-30 dakika sindirime ihtiyaç duyar).
9. 1 dk. boyunca dH₂O içinde yıkayın.
10. Oda sıcaklığında 5 dk. boyunca 50 ml 2 x SSC (LK-104B) içinde yıkayın.
11. Her seferinde 1 dakika boyunca %70, %85 ve %100 etanol emdirerek lamları dehidrate edin. Havada kurutun. **Prob Hazırlığı** ile devam edin.

3.3 Prob hazırlığı:

Parafine gömülmüş doku için Kreatech™ FISH problemleri, ürün belgelerinde aksi belirtilmediği sürece Kullanıma Hazır (RtU) olarak temin edilir. Seyreltme özellikleri için şişenin üzerindeki etikete ve özel prob prospektüsüne bakın.

3.4 Ko-denatürasyon

22 x 22 mm alan başına 10 µl prob uygulayın. Cam lamel ile kapatın ve Fixogum veya lastik solüsyon ile mühürleyin. Numuneyi ve probu 80±1 °C'de 5 dakika boyunca bir TermoBrite (TS-01/02) üzerinde denatüre edin. **Hibridizasyon** ile devam edin.

3.5 Hibridizasyon:

37±1 °C'de bir TermoBrite (TS-01/02) veya nemlendirme haznesinde gece boyunca inkübe edin.

3.6 Hibridizasyon Sonrası Yıkama:

1. 50 ml Yıkama Tamponu I'i (0,4 x SSC /%0,3 Igepal) (LK-102) 72 °C'ye kadar önceden ısıtın.
2. Lastik solüsyonu çıkarın.
3. Lamları 50 ml Yıkama Tamponu II (2 x SSC /%0,1 Igepal) (LK-103) içine yerleştirin, oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edin. Lamelleri kaydırarak çıkarın. Yıkama tamponunu toplam 10 lam için yalnızca bir kez yeniden kullanın.
4. Lamları 50 ml önceden ısıtılmış Yıkama Tamponu I (0,4 x SSC /%0,3 Igepal) (LK-102) içine yerleştirin, karıştırmadan 72 °C'de (±1 °C) 2 dakika inkübe edin. Yıkama tamponunu toplam 10 lam için yalnızca bir kez yeniden kullanın.
5. Lamları 50 ml taze Yıkama Tamponu II (2 x SSC /%0,1 Igepal) (LK-103) içine yerleştirin, karıştırmadan oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edin. Yıkama tamponunu toplam 10 lam için yalnızca bir kez yeniden kullanın.
6. Taze %70, %85 ve %100 etanol içinde dehidrate edin, oda sıcaklığında birer dakika inkübe edin. Oda sıcaklığında havada kurutun ve **Karşıt Boyama** işlemi ile devam edin.

3.7 Karşıt boyama:

15 µl DAPI karşıt boyayı (DAPI/Antifade 1 µg/ml) (LK-096B) veya karşıt boya seyreltici (LK097B) ile seyreltilmiş halini uygulayın ve cam lamel uygulayın. Mikroskopiyi devam edin.

3.8 Prosedüre ilgili öneriler:

15 µl DAPI karşıt boya uygulayarak protein sindirimini ve ön işlemi kontrol edin ve DAPI filtresi ile donatılmış bir floresan mikroskop kullanarak lamları değerlendirin. Örnek yeterince sindirilmemişse: lameli çıkarın ve dokuyu 2 x SSC (LK-104B) içinde 2 dakika bekletin ve protein sindirimini uzatın. Numune fazla sindirilmişse, taze bir numune kullanın ve protein sindirim süresini azaltın.

Hibridizasyon ve yıkamanın sıcaklık ve tampon konsantrasyonu (sıklığı) önemlidir, çünkü daha düşük sıklık probun diğer dizilere spesifik olmayan bağlanmasına neden olabilir ve daha yüksek sıklık, sinyal eksikliğine neden olabilir. Hedef DNA'nın eksik denatürasyonu sinyal eksikliğine neden olabilir.

3.9 Floresan mikroskopisi için öneriler

Optimum görselleştirme için 100W cıva lambası veya diğer uygun ışık kaynağı (örneğin Metal Halide Ampul (120W X-cite) veya LED tabanlı ışık kaynakları) ve 63x veya 100x floresan objektif ile donatılmış iyi bakımlı ve düzenli olarak kalibre edilmiş bir mikroskop kullanın. Çoklu renkleri görüntülemek için üçlü bant geçiren filtreler (DAPI/FITC/Cy3 veya DAPI/FITC/TRITC), ayrı ayrı renk görselleştirmesi için tekli bant geçiren filtreler kullanılır. Her mikroskop markası için uygun filtrelerle ilgili öneriler için Leica web sitesine bakın: <http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/kreatech-fish-probes/>

Kreatech™ floroforları için uygun uyarım ve emisyon aralığı:

Florofor	Uyarım	Emisyon
DAPI	360±20 nm	460±30 nm
PlatinumBright™ 415	429±15 nm	470±15 nm
PlatinumBright™ 495	495±10 nm	517±10 nm
PlatinumBright™ 550	550±10 nm	580±10 nm

(Gösterilen bant genişliği floroforun maksimum uyarım/emisyonunun %80'ine karşılık gelir)

4 Analitik Performans

Doku Sindirim Kiti II'nin performansı, bu kullanım talimatlarında açıklanan prosedürler kullanılarak belirlenmiştir. Bu prosedürlerde yapılan değişiklikler miktar tayininin performansını değiştirebilir. Talimatta verilen protokollerden sapmalar kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır. Önerilen test prosedürlerinden sapan kullanıcılar bu şartlar altında hasta sonuçlarının yorumlanmasının sorumluluğunu almalıdır. Protokol süreleri, fiksasyon ve işleme aşamalarındaki farklılıklardan ötürü değişkenlik gösterebilir. Ayrıca, pepsin inkübasyon süresi işleme ve fiksasyon koşullarına bağlı olarak optimizasyon gerektirebilir.

5 Gerekli olan ve ürünle birlikte verilen malzemeler

Kod #	Tanım	Hacim
LK-096B	DAPI/Antifade 1 µg/ml (DAPI Karşıt boya)	0,5 ml
LK-097B	Antifade (Karşıt boya seyreltici)	0,5 ml
LK-099B	0,2 M HCl	250 ml
LK-100B	%8 sodyum tiyosiyanat (Ön İşlem Çözeltisi B)	250 ml
LK-101B	Pepsin Çözeltisi	5 ml
LK-102B*	0,4 x SSC/%0,3 Igepal (Yıkama Tamponu I)	250 ml
LK-103B*	2 x SSC/%0,1 Igepal (Yıkama Tamponu II)	2 x 250 ml
LK-104B	2 x SSC	2 x 250 ml

*LK-102 ve LK-103 ürünlerinin aynı numarayı içerdiğini ancak hacim hariç farklı harflerin aynı olduğunu lütfen unutmayın. A= 100 ml, B=250 ml

6 Gerekli olan ve ürünle birlikte verilmeyen malzemeler

- Ksilen
- Etanol %100, %85 ve %70
- Fixogum (LK-071A) veya lastik solüsyon
- 80 °C'ye kadar doğru sıcaklık kontrollü sıcak plaka veya ThermoBrite™ (TS01/TS02)
- 37-56 °C'lik doğru sıcaklık aralığına sahip inkübatör
- 37-80 °C'lik doğru sıcaklık aralığına sahip su banyosu
- Plastik ve cam coplin şaleleri
- Değişken mikropipetler (1 µl-200 µl)
- Uygun filtrelerle donatılmış floresan mikroskop (bkz. Floresan Mikroskopisi için öneriler).

7 Uyarılar ve önlemler

- Cihaz ile ilgili olarak meydana gelen tüm ciddi olaylar, üreticiye ve kullanıcının ve/veya hastanın bulunduğu Üye Devletin yetkili makamına rapor edilecektir.
- İn vitro diagnostik kullanım içindir. Sadece laboratuvarında profesyonel kullanım amaçlıdır. Acil durumlarda, güvenlik bilgileri için SDS formlarını kontrol edin.
- Kitin sadece FFPE dokusundaki DNA FISH prosedüründen önce ve sonra kullanılması amaçlanmıştır. Bu ürün, donmuş doku için kullanılmak üzere tasarlanmamıştır.
- Sadece otomatik olmayan FISH ön işlemi ve hibridizasyon için.
- Tüm malzemeler, kurumunuzun hastane atıklarının atılmasına yönelik yönergelerine göre atılmalıdır.

- KBI-60007 Doku Sindirim Kiti i'n kullanımı konvansiyonel FFPE numuneleri ile kullanım için önerilmektedir.
- Metafaz ve ara faz hücreleri veya diğer sitolojik numuneler için ön işlem kiti KBI-60005 veya KBI-60006 kullanılması önerilir.

Avrupa Komisyonu'nun 1272/2008 numaralı Yönetmeliğine göre etiketleme

Kod #	Tanım	İkaz İfadesi	Piktogram	Tehlike Bildirimleri
LK-096B	DAPI/Antifade 1 µg/ml (DAPI Karşıt boya)	Uyarı		H315, H319, H335
LK-097B	Antifade (Karşıt boya seyreltici)	Uyarı		H315, H319, H335
LK-099B	0,2 M HCl	Uygulanamaz	Uygulanamaz	Uygulanamaz
LK-100B	%8 sodyum tiyosiyanat (Ön İşlem Çözeltisi B)	Uygulanamaz	Uygulanamaz	Uygulanamaz
LK-101B	Pepsin Çözeltisi	Uygulanamaz	Uygulanamaz	Uygulanamaz
LK-102B	0,4 x SSC/%0,3 Igepal (Yıkama Tamponu I)	Uygulanamaz	Uygulanamaz	Uygulanamaz
LK-103B	2 x SSC/%0,1 Igepal (Yıkama Tamponu II)	Uygulanamaz	Uygulanamaz	Uygulanamaz
LK-104B	2 x SSC	Uygulanamaz	Uygulanamaz	Uygulanamaz

Tehlike Bildirimi/Bildirimleri

H315 – Cilt tahrişine neden olur.

H319 – Şiddetli göz tahrişine neden olur.

H335 – Solunum yolu tahrişine yol açabilir.

Önlem amaçlı bildirimler - Önleme

P271 – Sadece açık alanda veya iyi havalandırılmış bir alanda kullanın.

P261 – Tozunu/dumanını/gazını/sisini/buharını/spreyini solumaktan kaçının.

P264 – Kullandıktan sonra maruz kalan tüm dış vücut bölgelerini iyice yıkayın.

P280 – Koruyucu eldiven/koruyucu kıyafet/göz koruyucu/yüz koruyucu kullanın.

Önlem amaçlı bildirimler - Yanıt

P305+P351+P338 – GÖZLE TEMASI HALİNDE: Birkaç dakika boyunca dikkatli bir şekilde suyla yıkayın. Varsa ve çıkarması kolaysa, kontak lenslerinizi çıkarın. Yıkamaya devam edin.

P312 – Kendinizi iyi hissetmiyorsanız bir ZEHİR DANIŞMA MERKEZİNİ/doktoru/hekimi/ilk yardım görevlisini arayın.

P337+P313 – Göz tahrişi devam ederse: Tıbbi öneri/yardım alın.

P302+P352 – CİLDİN TEMASI HALİNDE: Bol sabun ve su ile yıkayın.

P304+P340 – SOLUNMASI HALİNDE: Kişiyi temiz havaya çıkarın ve nefes alması için rahat hale getirin.

P332+P313 – Cilt tahrişi oluşması halinde: Tıbbi öneri/yardım alın.

P362+P364 – Kirlenmiş giysilerinizi çıkarın ve yeniden kullanmadan önce yıkayın.

Ek Tehlike Bildirimleri: yok

Sadece profesyonel laboratuvar kullanıcıları tarafından kullanıma uygundur

Sembollerin açıklaması

	Tehlikeli maddeler içerir
	Üretildiği ülke
	Ambalaj hasarlıysa kullanmayın
	Elektronik IfU'ya başvurun (elfU)

8 Reaktifin Saklanması ve Taşınması

DAPI/Antifade'i güçlü ve doğrudan ışıktan koruyun. 2-8 °C'de saklayın. Açılmamış ürün, şişe etiketinde belirtilen son kullanma tarihine kadar bu koşullar altında stabildir.

Seyreltilmemiş ve seyreltilmiş reaktifleri kullandıktan hemen sonra 2-8 °C'deki ortama geri koyun.

Açıldıktan sonra ürünler 18 aya kadar stabildir ancak bu süre hiçbir zaman ürünün kendi son kullanma tarihinden uzun değildir. Bu süreden sonra solüsyonların kullanımı uygun olmayan sonuçlara neden olabilir.

9 Teknik Destek

Teknik desteğe www.leicabiosystems.com adresinden veya e-posta yoluyla ulaşılabilir: Kreatech.Support@Leicabiosystems.com. Bu ürünü kullanırken istenen sonuçlar alınmazsa veya herhangi bir anormallik ortaya çıkarsa lütfen bizimle iletişime geçin.

IfU'nun basılı bir kopyası e-posta yoluyla şu adresten talep edilebilir: LBSAMS-IFU@leicabiosystems.com



elfU ek dillerde mevcuttur ve şu adresten indirilebilir: www.leicabiosystems.com

10 Müşteri Hizmetleri

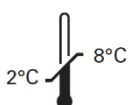
Kreatech problemleri, Leica Müşteri Hizmetleri +31 20 6919181 aracılığıyla veya e-posta yoluyla sipariş edilebilir: purchase.orders@leica-microsystems.com.

11 Geçmiş

IfU Sürümü	Yayınlama tarihi	Değişiklikler
2,4	2016-SEP-27	"Patoloji Şirketi" sloganı kaldırılmıştır
3,0	2022 Nisan	IVD düzenlemelerine göre güncellenmiştir

Tissue Digestion Kit II (Набір II для розщеплення тканин)

REF KBI-60004 Містить достатній обсяг для проведення до 25 або 5x5 тестів



Kreatech Biotechnology B.V.
Vlierweg 20
1032 LG Амстердам
Нідерланди
www.LeicaBiosystems.com



1 Призначення / мета

Флуоресцентна гібридизація in situ (FISH) ідентифікує або позначає цільові геномні послідовності, щоб можна було визначити їх розташування. Послідовності ДНК з відповідних хромосомно-специфічних зондів спочатку позначаються репортерними молекулами. Потім мічена зондом ДНК гібридується з метафазними хромосомами або інтерфазними ядрами на предметному склі. Після промивання зразок перевіряється на наявність репортерних молекул за допомогою флуоресцентної мікроскопії.

Цей набір для попередньої обробки спеціально розроблений для отримання оптимальних результатів під час роботи з сильно зшитими тканинами або для випадків проблемної формалінової фіксації парафінованих тканин (FFPE) (наприклад, більш тривалої фіксації або довгому зберіганні).

Даний продукт призначений для використання в екстракорпоральній діагностиці (in Vitro).

2 Опис продукту

Цей набір для попередньої неавтоматизованої FISH гібридизації, спеціально розроблений для попередньої обробки і ферментативного розщеплення FFPE тканин перед процедурою FISH гібридизації ДНК. Цей набір спеціально розроблений для отримання оптимальних результатів на сильно зшитих або складних FFPE-тканинах. Використання набору дозволяє зруйнувати поперечні зшивки в тканині, збільшити проникність клітинних мембран і розщепити клітинні білки для полегшення зв'язування FISH-зондів зі специфічною клітинною ДНК.

3 Інструкції по застосуванню

3.1 Зразки

Цей набір для попередньої обробки спеціально розроблений для отримання оптимальних результатів при роботі з сильно зшитими тканинами, або парафінованими тканинами, які важко піддаються формалінової фіксації (FFPE) (наприклад, при більш тривалій фіксації або тривалому зберіганні). Попередній аналіз зразків: Для отримання успішного FISH велику роль відіграє попередня підготовка. Зразок повинен бути правильно зафіксований і поміщений в парафін відповідно до встановленого протоколу. Надмірна або недостатня фіксація може призвести до невдачі процедури FISH або, принаймні, до низької відтворюваності/інтенсивності сигналу. Fish-зонди Kreatech™ були протестовані на зрізах тканин FFPE, розміром 3-6 мкм. Тканинні блоки і зрізи повинні зберігатися відповідно до рекомендованих умов зберігання і обробки для отримання оптимальних результатів, див.сайт Leica. Нагрівання можна проводити або на BOND за протоколом * Bake and Dewax ,або окремо в печі чи інкубаторі. Рекомендовані температура і час нагрівання - до 16 годин при 56 °C або 60-120 хвилин при 80 °C.

3.2 Попередня обробка

Встановіть фіксовані формаліном і занурені в парафін ділянки тканини розміром 3-6 мкм на позитивно заряджені предметні стекла (наприклад, аміноалкілсилан). Наведений нижче протокол розрахований на використання 5 предметних стекол у вертикальній банці Копліна об'ємом 50 мл.

1. Нагрівайте закріплені предметні стекла протягом 2 годин при 80 °C або 16 годин при 56 °C.
2. Депарафінізуйте теплі предметні стекла шляхом замочування в ксилолі або заміннику ксилолу дворазово по 10 хвилин за раз (хв.).
3. Здійсніть повторне зволоження, замочуючи в 100%, 85% і 70% етанолі по 3 хвилини в кожному.

4. Промийте в dH₂O протягом 3 хв. при кімнатній температурі (RT).
5. Проведіть попередню обробку 50 мл 0,2 М HCl (LK-099B) протягом 20 хв. при RT, а потім промийте dH₂O протягом 3 хв. при RT.
6. Помістіть предметне скло в 50 мл розчин В для попередньої обробки В (8% тіоціанат натрію) (LK-100B) при 80 °C на 30 хв..
7. Промийте 50 мл 2 x SSC (LK-104B) протягом 3 хв. при RT.
8. Нанесіть на парафіновий зріз приблизно 200 мкл розчину пепсину (LK-101b) і інкубуйте при кімнатній температурі протягом 5 - 50 хв. (час залежить від фіксації і типу тканини. Наприклад, для розщеплення більшості тканин раку молочної залози потрібно 5-15 хв.; для тканин товстої кишки - 20 - 30 хв.).
9. Промити в dH₂O протягом 1 хв.
10. Промийте 50 мл 2 x SSC (LK-104B) протягом 5 хв. при RT.
11. Зневодніть предметні стекла шляхом почергового замочування в 70%, 85% і 100% етанолі протягом 1 хв. в кожному розчині. Висушіть на повітрі. Приступайте до **підготовки зондів**.

3.3 Підготовка зондів:

Зонди Kreatech™ FISH для парафінованих тканин поставляються готовими до використання (RtU), якщо інше не зазначено в документації до продукту. Зверніться до етикетки на флаконі і вкладишу до упаковки з конкретним зондом для уточнення розведення.

3.4 Спільна денатурація

Нанесіть 10 мкл зонда на область розміром 22 x 22 мм. Накрийте скляним покривним склом і запечатайте Fixodent або гумовим клеєм. Денатуруйте зразок і зонд на гібридизаторі ThermoBrite (TS-01/02) при температурі 80 ± 1 °C протягом 5 хв.

3.5 Гібридизація:

Інкубуйте протягом ночі при 37 ± 1 °C в ThermoBrite (TS-01/02) або в зволоженій камері.

3.6 Промивання після гібридизації:

1. Попередньо підігрійте 50 мл буфера промивання I (0,4 x SSC / 0,3% Igepal) (LK-102) до 72 °C.
2. Видаліть гумовий цемент.
3. Помістіть предметні стекла в 50 мл промивного буфера II (2 x SSC / 0,1% Igepal) (L K-103), інкубуйте протягом 2 хв. при кімнатній температурі. Зніміть покривне скло. Повторно використовуйте промивний буфер тільки один раз для 10 предметних стекел.
4. Помістіть предметні стекла в 50 мл попередньо прогрітого промивного буфера I (0,4 x SSC / 0,3% Igepal) (LK-102), інкубуйте 2 хв. при 72 °C (± 1 °C) без перемішування. Повторно використовуйте промивний буфер тільки один раз для 10 предметних стекел.
5. Помістіть предметні стекла в 50 мл свіжого промивного буфера II (2 x SSC / 0,1% Igepal) (L K-103), інкубуйте протягом 1 хв. при RT без перемішування. Повторно використовуйте промивний буфер тільки один раз для 10 предметних стекел.
6. Дегідратуйте в свіжому 70%, 85% і 100% етанолі, інкубуйте по 1 хв. при RT в кожному розчині. Висушіть на повітрі при RT і перейдіть до контрастування.

3.7 Контрастування:

Нанесіть 15 мл контрасту DALI (DALI / Antifade 1 мкг / мл) (LK-096b) або розведеного за допомогою розріджувача (LK097B) контрасту і накладіть покривне скло. Приступайте до мікроскопії.

3.8 Рекомендації по процедурі:

Перевірте якість розщеплення білка і попередньої обробки, додавши 15 мл контрастної речовини DAPI і оцініть зразки, нанесені на предметні стекла, за допомогою флуоресцентного мікроскопа, оздобленого фільтром DAPI. Якщо зразок недостатньо розщеплений: зніміть покривне скло і замочіть тканину в 2 x SC (L K-104b) на 2 хв. і продовжуйте розщеплення білка. Якщо зразок повністю розщепився, використовуйте свіжий зразок і скоротіть час розщеплення білка.

Температура і концентрація буфера (точне дотримання) при гібридизації і промиванні дуже важливі, так як зниження точності дотримання умов може привести до неспецифічного зв'язування зонда з іншими послідовностями, а її підвищення - до відсутності сигналу. Неповна денатурація цільової ДНК може призвести до відсутності сигналу.

3.9 Рекомендації щодо флуоресцентної мікроскопії

Для оптимальної візуалізації використовуйте мікроскоп, який добре обслуговується і регулярно калібрується, оснащений ртутною лампою потужністю 100 Вт або іншим відповідним джерелом світла (наприклад, металогалогеновою лампою (120 Вт X-cite) або світлодіодними джерелами світла) і флуоресцентним об'єктивом 63x або 100x. Трисмугові фільтри (DAPI/FITC/Cy3 або DAPI/FITC/TRITC) використовуються для перегляду декількох кольорів, односмугові фільтри використовуються для візуалізації окремих кольорів. Рекомендації щодо відповідних фільтрів для кожної марки мікроскопа див. на сайті Leica: <http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/kreatech-fish-probes/>.

Відповідні діапазони збудження та емісії для флуорофорів Kreatech™:

Флуорофор	Збудження	Емісія
DAPI	360 ±20 нм	460 ±30 нм
PlatinumBright™ 415	429 ±15 нм	470 ±15 нм
PlatinumBright™ 495	495 ±10 нм	517 ±10 нм
PlatinumBright™ 550	550 ±10 нм	580 ±10 нм

Зазначена смуга пропускання відповідає 80% від максимуму збудження / емісії флуорофора)

4 Аналітичні характеристики

Придатність набору Tissue Digestion Kit II була встановлена з використанням процедур, описаних у цій інструкції із застосування. Внесення змін до цих процедур може призвести до зміни результатів аналізу. Будь-які відхилення від рекомендованих протоколів повинні бути підтверджені Користувачем. Користувачі, які відхиляються від рекомендованих процедур тестування, за таких обставин повинні взяти на себе відповідальність за інтерпретацію результатів тестування зразків, отриманих від пацієнтів. Час протоколу може змінюватись через відмінності в фіксації і обробці. Крім того, час інкубації з пепсином може бути оптимізований в залежності від умов обробки і фіксації зразків.

5 Необхідні матеріали, що поставляються з продуктом

Код	Опис	Обсяг
LK-096B	DAPI / Antifade 1 мкг / мл (DAPI барвник для контрастного фарбування)	0,5 мл
LK-097B	Antifade (Антифейд) (розріджувач для контрастування)	0,5 мл
LK-099B	0.2 М HCl	250 мл
LK-100B	8% тіоціанат натрію (Розчин В для попередньої обробки)	250 мл
LK-101B	Розчин пепсину	0,5 мл
LK-102B	0,4 x SSC / 0,3% Igepal (промивний буфер I)	250 мл
LK-103B	2 x SSC / 0,1% Igepal (промивний буфер II)	2 x 250 мл
LK-104B	2 x SSC	2 x 250 мл

** Зверніть увагу, що продукти LK-102 і L K-103, що мають однаковий номер, але різні букви, ідентичні, за винятком об'єму. A= 100 мл, B=250 мл

6 Необхідні матеріали, що не поставляються з продуктом

- Ксилол
- Етанол 100%, 85% і 70%
- Фіксогум (LK-071A) або гумовий цемент
- Лабораторна термоплита з точним контролем температури до 80 °C або гібридайзер ThermoBrite™ (TS01 / TS02)
- Інкубатор з точним температурним діапазоном 37-56 °C
- Водяна баня з точним діапазоном температур 37 - 80 °C
- Пластикові та скляні ємності Копліна для фарбування препаратів
- Мікропіпетки зі змінним об'ємом (1 мкл-200 мкл)

- Флуоресцентний мікроскоп, оснащений відповідними фільтрами(див. рекомендації щодо флуоресцентної мікроскопії).

7 Попередження та запобіжні заходи

- Про будь-який серйозний інцидент, що стався з приладом, необхідно повідомити виробнику і компетентному органу держави-члена ЄС, в якому мешкає користувач і/або пацієнт.
- Для використання в діагностиці in vitro. Тільки для професійного лабораторного використання. У разі виникнення надзвичайних ситуацій ознайомтеся з інформацією про безпеку в SDS листах.
- Набір призначений тільки для використання до і після проведення FISH ДНК на FFPE тканині. Даний продукт не призначений для аналізу заморожених тканин.
- Тільки для неавтоматизованої попередньої обробки і FISH гібридизації.
- Всі матеріали повинні бути утилізовані відповідно до правил вашої установи з утилізації лікарняних відходів.
- Набір KBI-60007 Tissue Digestion Kit I рекомендується використовувати для звичайних зразків FFPE.
- Для клітин в метафазі і інтерфазі або інших цитологічних зразків рекомендується використовувати лише набір для попередньої обробки KBI-60005 або KBI-60006.

Маркування відповідно до Постанови (ЄС) № 1272/2008

Код	Опис	Сигнальне слово	Піктограма	Повідомлення про небезпеку
LK-096B	DAPI / Antifade 1 мкг / мл (DAPI барвник для контрастного фарбування)	Попередження		H315 H319 H335
LK-097B	Antifade (Антифейд) (розріджувач для контрастування)	Попередження		H315, H319 H335
LK-099B	0.2 M HCl	не можна застосувати	не можна застосувати	не можна застосувати
LK-100B	8% тіоціанат натрію (Розчин В для попередньої обробки)	не можна застосувати	не можна застосувати	не можна застосувати
LK-101B	Розчин пепсину	не можна застосувати	не можна застосувати	не можна застосувати
LK-102B	0,4 x SSC / 0,3% Igepal (промивний буфер I)	не можна застосувати	не можна застосувати	не можна застосувати
LK-103B	2 x SSC / 0,1% Igepal (промивний буфер II)	не можна застосувати	не можна застосувати	не можна застосувати
LK-104B	2 x SSC	не можна застосувати	не можна застосувати	не можна застосувати

Повідомлення про небезпеку

H315-викликає подразнення шкіри.

H319-викликає серйозне подразнення очей.

H335 - може викликати подразнення дихальних шляхів

Попереджувальні повідомлення Профілактика

P271-використовувати тільки на відкритому повітрі або в добре провітрюваному приміщенні.

P261-уникати вдихання туману / парів / розпилення.

P264-ретельно вимити всі відкриті зовнішні ділянки тіла після роботи.

P280 - одягайте захисні рукавички, захисний одяг, засоби захисту очей та обличчя.

Попереджувальні повідомлення Реакція

P305 + P351 + P338 - ПРИ ПОПАДАННІ В ОЧІ: Обережно промити водою протягом декількох хвилин.

Зняти контактні лінзи, якщо вони є і легко знімаються. Продовжуйте Промивання.

R312 - якщо ви почуваєте себе погано, зателефонуйте до центру боротьби з отрутою / лікаря / медика / лікаря швидкої допомоги.

R337 + R313 - якщо подразнення очей не проходить: Отримайте медичну консультацію/допомогу.

R302 + R352 - ПРИ ПОПАДАННІ НА ШКІРУ: Промийте великою кількістю води з милом.

R304 + R340 - ПРИ ВДИХАННІ: Виведіть людину на свіже повітря і забезпечте комфортне дихання.

R332 + R313 - при виникненні подразнення шкіри: Отримайте медичну консультацію/допомогу.

R362 + R364-зняти забруднений одяг і випрати його перед повторним використанням.

Додаткові повідомлення про небезпеку: немає

Обмежено для професійних користувачів лабораторії

Пояснення до символів

	Містить небезпечні речовини
	Країна-виробник
	Не використовувати, якщо упаковка пошкоджена
	Проконсультуйтеся з електронним IfU (elfU)

8 Зберігання та поводження з реагентами

Захищайте DAPI/Antifa від сильного і прямого світла. Зберігати при температурі 2 - 8 °C. Нерозкритий продукт стабільний при цих умовах до закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці флакона. Нерозведені і розведені реагенти відразу після використання поверніть в 2 - 8 °C.

Після розтину продукти залишаються стабільними до 18 місяців, але не довше за термін придатності кожного окремого реагенту. Після закінчення цього терміну використання розчинів може привести до неоптимальних результатів.

9 Технічна підтримка

Технічна підтримка доступна за адресою www.leicabiosystems.com або електронною поштою: Kreatech.Support@Leicabiosystems.com. Зв'яжіться з нами, якщо бажані результати не отримані або з'явилися будь-які аномалії при використанні даного продукту.

Друковану копію IfU можна запросити електронною поштою, звернувшись за адресою: LBSAMS-IfU@leicabiosystems.com



Електронна версія IfU доступна на додаткових мовах, які можна завантажити за адресою: www.leicabiosystems.com

10 Обслуговування клієнтів

Зонди Kreatech можна замовити через службу підтримки клієнтів Leica +31 20 69181 або електронною поштою: purchase.orders@leica-microsystems.com.

11 Історія

Версія IfU	Дата випуску	Зміни
2,4	2016-SEP-27	Видаліть теглайн "The pathology Company "
3,0	Квітень 2022	Оновлення відповідно до правил IVD