



ZytoLight
FISH-Tissue Implementation Kit

REF Z-2028-5  5
REF Z-2028-20  20

Pro použití při fluorescenční in situ hybridizaci (FISH)

4250380N177P



Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro
podle IVDR (EU) 2017/746

1. Zamýšlené použití

Sada ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit je určena k použití v kombinaci se sondami ZytoLight FISH na formalínem fixovaných, do parafrínu vložených vzorcích pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH).

Výrobek je určen pouze pro profesionální použití. Všechny testy s použitím výrobku by měly být prováděny v certifikované, licencované laboratoři anatomické patologie pod dohledem patologa/humánního genetika kvalifikovaným personálem.

2. Princip testu

Technika fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) umožňuje detekci a vizualizaci specifických sekvencí nukleových kyselin v buněčných preparátech. Fluorescenčně značené fragmenty DNA, tzv. sondy FISH, a jejich komplementární cílové řetězce DNA v preparátech jsou při hybridizaci společně denaturovány a následně se nechají annealizovat. Poté se nespecifické a nenavázané fragmenty sond odstraní pomocí promývacích kroků. Po protibarvení DNA pomocí DAPI se hybridizované fragmenty sond vizualizují pomocí fluorescenčního mikroskopu vybaveného excitačními a emisními filtry specifickými pro fluorochromy, kterými byly fragmenty sond FISH přímo označeny.

3. Dodaná činidla

Sada ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit je k dispozici ve dvou velikostech a skládá se z:

Kód	Komponenta	Množství		Kontejner
		5	20	
PT1	<u>Heat Pretreatment Solution Citric</u>	150 ml	500 ml	Láhev se šroubovacím uzávěrem (velká)
ES1	<u>Pepsin Solution</u>	1 ml	4 ml	Lahvička s kapátkem, bílá čepice
WB1	<u>Wash Buffer SSC</u>	210 ml	560 ml	Láhev se šroubovacím uzávěrem (velká)
WB2	<u>25x Wash Buffer A</u>	50 ml	2x50 ml	Láhev se šroubovacím uzávěrem (střední)
MT7	<u>DAPI/DuraTect-Solution</u>	0.2 ml	0.8 ml	Reakční nádoba, modré víko
	Návod k použití	1	1	

Z-2028-5 (5 testů): Složky **ES1** a **MT7** postačují pro 5 reakcí. Složka **WB2** vystačí na 5x 3 barvicí nádoby po 70 ml. Složka **PT1** vystačí na 2 barvicí nádoby po 70 ml. Složka **WB1** vystačí na 3 barvicí sklenice po 70 ml.

Z-2028-20 (20 testů): Složky **ES1** a **MT7** postačují pro 20 reakcí. Složka **WB2** vystačí na 11x 3 barvicí nádoby po 70 ml. Složka **PT1** vystačí na 7 barvicí sklenic po 70 ml. Složka **WB1** vystačí na 8 barvicí sklenic po 70 ml.

4. Požadované, ale neposkytované materiály

- ZytoLight FISH probe
- Pozitivní a negativní kontrolní vzorky
- Mikroskopická sklíčka, nepořádaná
- Vodní lázeň (37°C, 98°C)
- Hybridizér nebo horká deska
- Hybridizátor nebo vlhkostní komora v hybridizační peci
- Nastavitelné pipety (10 µl, 25 µl)
- Barvicí nádoby nebo lázně
- Časovač
- Kalibrovaný teploměr
- Etanol nebo reagenční alkohol
- Xylen
- Deionizovaná nebo destilovaná voda
- Krycí sklíčka (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Pryžový cement, např. Fixogum Rubber Cement. (prod. č. E-4005-50/-125) nebo podobné.
- Vhodně udržovaný fluorescenční mikroskop (400-1000x)
- Ponorný olej schválený pro fluorescenční mikroskopii
- Vhodné sady filtrů

5. Skladování a manipulace

Skladujte při teplotě 2-8 °C ve svislé poloze. Roztok DAPI/DuraTect-Solution (MT7) musí být navíc skladován chráněný před světlem. Ihned po použití vraťte do skladovacích podmínek. Nepoužívejte činidla po uplynutí doby použitelnosti uvedené na štítku. Při odpovídajícím zacházení je při ipravek stabilní do data použitelnosti uvedeného na štítku.

6. Upozornění a bezpečnostní opatření

- Před použitím si přečtěte návod k použití!
- Nepoužívejte činidla po uplynutí doby použitelnosti!
- Tento výrobek obsahuje látky (v nízkých koncentracích a objemech), které jsou zdraví škodlivé. Vyvarujte se jakéhokoli přímého kontaktu s činidly. Při ijměte vhodná ochranná opatření (používejte jednorázové rukavice, ochranné brýle a laboratorní oděv)!
- Jakoukoli závažnou událost, ke které došlo v souvislosti s výrobkem, nahláste výrobci a příslušnému úřadu v souladu s místními předpisy!
- Pokud se činidla dostanou do kontaktu s kůží, okamžitě ji opláchněte velkým množstvím vody!

- Pro profesionální uživatele je na vyžádání k dispozici bezpečnostní list materiálu.
- Reagencie nepoužívejte opakovaně, pokud není opakované použití výslovně povoleno!
- Vyvarujte se křížové kontaminace vzorků, protože to může vést k chybným výsledkům.
- Během hybridizace a promývání se vzorky nesmí nechat zaschnout.
- Roztok DAPI/DuraTect-Solution (MT7) by neměl být delší dobu vystaven světlu, zejména silnému světlu, tj. všechny kroky by měly být prováděny pokud možno ve tmě a/nebo za použití světluvzdorných nádob!

Zvláštní značení u ES1:

- EUH208 Obsahuje pepsin A. Může vyvolat alergickou reakci.
EUH210 Na vyžádání je k dispozici bezpečnostní list.

Standardní věty o nebezpečnosti a pokyny pro bezpečné zacházení pro PT1, WB1 a WB2:

Složkou určující nebezpečnost je imidazol; reakční hmotnost: (3:1): 5-chlor-2-methyl-4-isothiazolin-3-on [č. ES 247-500-7] a 2-methyl-2H-isothiazol-3-on [č. ES 220-239-6].



Varování

- H317 Může vyvolat alergickou kožní reakci.
P261 Může poškodit plod v těle matky.
P272 Před použitím si obstarejte speciální instrukce.
P280 Zamezte vdechování prachu/dýmu/plynu/mlhy/par/aerosolů.
P302+P352 Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.
P333+P313 PŘI STYKU S KŮŽÍ: Omyjte velkým množstvím vody.
P362+P364 PŘI expozici nebo podezření na ni: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.

Standardní věty o nebezpečnosti a pokyny pro bezpečné zacházení pro MT7:

Směs není klasifikována jako nebezpečná podle nařízení (ES) č. 1272/2008.

7. Omezení

- Pro diagnostické použití *in vitro*.
- Pouze pro profesionální použití.
- Pouze pro neautomatizované použití.
- Klinická interpretace jakéhokoli pozitivního barvení nebo jeho nepřítomnosti musí být provedena v kontextu klinické anamnézy, morfologie, dalších histopatologických kritérií a také dalších diagnostických testů. Je odpovědností kvalifikovaného patologa/humánního genetika, aby znal sondy ISH, činidla, diagnostické panely a metody používané k výrobě barveného preparátu. Barvení musí být prováděno v certifikované licencované laboratoři i pod dohledem patologa/humánního genetika, který je odpovědný za revizi obarvených preparátů a zajištění adekvátnosti pozitivních a negativních kontrol.
- Barvení vzorků, zejména intenzita signálu a barvení pozadí, závisí na manipulaci se vzorkem a jeho zpracování před barvením. Nesprávná fixace, zmrazení, rozmrazení, mytí, sušení, zahřívání, řezání nebo kontaminace jinými vzorky či tekutinami může vést k artefaktům nebo falešným výsledkům. Nekonzistentní výsledky mohou být důsledkem rozdílů v metodách fixace a vkládání, jakož i vrozených nepravidelností ve vzorku.
- Výkon byl ověřen pomocí postupů popsaných v návodu k použití příslušné sondy ZytoVision a implementační sady. Úpravy těchto postupů mohou změnit výkonnost a musí být ověřeny uživatelem. Tento IVD je certifikován jako CE pouze v případě, že je používán způsobem popsaným v tomto návodu k použití v rozsahu určeného použití.

8. Rušivé látky

Červené krvinky přítomné ve vzorku mohou vykazovat autofluorescenci, která brání rozpoznání signálu.

Následující fixativa jsou s FISH neslučitelná:

- Bouinovo fixační činidlo
- fixační prostředek B5
- Kyselé fixační prostředky (např. kyselina pikrová)
- Zenkerovo fixační činidlo
- Alkoholy (při samostatném použití)
- Chlorid rtuťnatý
- Formaldehydové/zinkové fixační činidlo
- Hollandův fixativ
- Formalin bez pufru.

9. Příprava vzorků

Doporučení:

- Fixace v 10% neutrálně pufrovaném formalínu po dobu 24 hodin při pokojové teplotě (18-25 °C).
- Velikost vzorku ≤ 0,5 cm³.
- Používejte parafín prvotřídní kvality.
- Vkládání by se mělo provádět při teplotách nižších než 65 °C.
- Připravte 2-4 μm řezy mikrotomem.
- Používejte kladně nabitá mikroskopická sklíčka.
- Fixujte 2-16 h při 50-60 °C.

10. Přípravné ošetření zařazení

25x Wash Buffer A (WB2) je třeba předupravit podle pokynů v bodě 11.2 "Postup testu - Den 2". Všechna ostatní činidla soupravy jsou připravena k použití. Není nutná rekonstituce, míchání ani ředění.

11. Postup analýzy

11.1 Den 1

Přípravné kroky

1. Připravte dvě série ethanolu (70%, 90% a 100% roztok ethanolu): Zřeďte 100% ethanol deionizovanou nebo destilovanou vodou. Tyto roztoky lze uchovávat ve vhodných nádobách a lze je opakovaně použít.
2. Heat Pretreatment Solution Citric (PT1): Zahřejte na 98°C.
3. Wash Buffer SSC (WB1): Uveďte do pokojové teploty (RT). WB1 může při teplotě 2-8 °C tvořit sraženiny, které nemají vliv na kvalitu a měly by se při zahřátí rozpustit.
4. Sonda ZytoLight FISH: Před použitím uveďte do teploty RT, chraňte před světlem.

Nepovinné, pokud se provádí krok po fixaci:

(důrazně doporučeno, pokud fixace tkáně není optimální)

Připravte 1% roztok formaldehydu pomocí sady Formaldehyde Dilution Buffer Set (PT-0006-100)

Předúprava (odvoskování/proteolýza)

1. Sklíčka inkubujte 10 minut při 70 °C (např. na horké plotýnce).
2. Inkubujte sklíčka 2x 10 minut v xylenu.
3. Inkubujte ve 100%, 100%, 90% a 70% ethanolu, vždy po dobu 5 min.
4. Promývejte 2x 2 minuty v deionizované nebo destilované vodě.
1. Inkubujte 15 minut v přehřátém Heat Pretreatment Solution Citric (PT1) při 98 °C.

Doporučujeme nepoužívat více než osm sklíček na jednu barvicí nádobku.

2. Sklíčka ihned přeneste do deionizované nebo destilované vody, promývejte 2x 2 minuty a vodu slijte nebo odmažte.
3. Na vzorky naneste (po kapkách) Pepsin Solution (ES1) a inkubujte 15 minut při 37 °C ve vlhké komoře.

ES1 může tvořit sraženiny, které nemají vliv na kvalitu.

Depending on multiple factors, e.g. nature and duration of fixing, thickness V závislosti na více faktorech, např. na povaze a délce fixace, tloušťce řezu a povaze tkáně/buněk, může být vyžadována různá doba inkubace. Jako vodítko pro inkubaci doporučujeme dobu inkubace 2-30 min pro vzorky



tkání a 2-15 min pro vzorky buněk. Obecně doporučujeme zjistit optimální dobu pro proteolýzu v předběžných testech.

4. Promývejte 5 minut v Wash Buffer SSC (WB1)

Nepovinné, pokud se provádí krok po fixaci:

Inkubujte sklíčka 15 minut v 1% roztoku formaldehydu a následně je 5 minut promývejte v Wash Buffer SSC (WB1)

5. Promývejte 1 minutu v deionizované nebo destilované vodě.
6. Dehydratace: v 70%, 90% a 100% ethanolu, vždy po dobu 1 min.
5. Vzduchem vysušené části.

Poznámka: Před aplikací sondy se ujistěte, že jsou řezy zcela suché, protože zbytková vlhkost může snížit intenzitu signálu a/nebo ovlivnit morfologii tkáně.

Denaturace a hybridizace

1. Denaturace a hybridizace ZytoLight FISH Probe.

Vyvarujte se dlouhého vystavení sondy světlu.

2. Vzorky zakryjte krycím sklíčkem o rozměrech 22 x 22 mm (zamezte zachycení bublin) a krycí sklíčko utěsněte.

K utěsnění doporučujeme použít gumový cement (např. Fixogum Rubber Cement).

1. Umístěte sklíčka na horkou desku nebo hybridizátor a denaturujte vzorky po dobu 10 minut při 75 °C.
3. Přeneste sklíčka do vlhké komory a hybridizujte přes noc při 37 °C (např. v hybridizační peci).

Je důležité, aby vzorky tkání/buněk během hybridizace nevyschly.

11.2 Den 2

Přípravné kroky

1. *Příprava 1x Wash Buffer A: 1 díl 25x Wash Buffer A (WB2) zředte 24 díly deionizované nebo destilované vody. Naplňte tři barvicí nádoby 1x promývacím pufrem A a předehřejte jej na 37 °C.*

Zředěný 1x Wash Buffer A je stabilní po dobu jednoho týdne při skladování při teplotě 2-8 °C.

2. DAPI/DuraTect-Solution (MT7): Před použitím uveďte do pokojové teploty, chraňte před světlem.

Post-hybridizace a detekce

1. Opatrně odstraňte gumový tmel nebo lepidlo.
2. Odstraňte krycí sklíčko ponořením do 1x Wash Buffer A při 37 °C po dobu 1-3 min.
3. Promývání pomocí 1x Wash Buffer po dobu 2x 5 min při 37 °C.

1x Wash Buffer A by měl být předem zahřátý. V případě potřeby zkontrolujte teplotněrem.

4. Sklíčka inkubujte v 70%, 90% a 100% etanolu vždy po dobu 1 minuty
5. Vzorky sušte na vzduchu chráněné před světlem.
6. Na sklíčka napipetujte 25 µl DAPI/DuraTect-Solution (MT7). Vzorky zakryjte krycím sklíčkem (24 mm x 60 mm), abyste se vyhnuli zachyceným bublinkám. Inkubujte ve tmě po dobu 15 minut.

Použití pipetovací špičky, která byla seříznuta, aby se zvětšil otvor, může usnadnit pipetování. Vyhněte se dlouhému působení světla.

7. Sklíčko skladujte ve tmě. Při delším skladování by mělo být skladováno při teplotě 2-8 °C.
8. Hodnocení materiálu vzorku se provádí pomocí fluorescenční mikroskopie. Jsou zapotřebí sady filtrů pro následující rozsahy vlnových délek:

Fluorescenční barvivo	Excitation	Emise
ZyBlue	418 nm	467 nm
ZyGreen	503 nm	528 nm
ZyGreen 2.0	493 nm	518 nm
ZyGold	532 nm	553 nm
ZyOrange	547 nm	572 nm
ZyRed	580 nm	599 nm

12. Interpretace výsledků

Při použití vhodných sad filtrů v interfázích nebo metafázích normálních buněk nebo buněk bez aberací chromozomů se objeví dva signály na sondu/fluorescenční značku, s výjimkou sond zaměřených na chromozomy X a/nebo Y, což vede k žádnému až dvěma signálům na sondu/fluorescenční značku v závislosti na pohlaví. V buňkách s chromozomálními aberacemi může být v interfázích nebo metafázích patrný jiný vzor signálu. Další podrobnosti o interpretaci výsledků naleznete v příručce k příslušné sondě.

13. Doporučené postupy kontroly kvality

Viz návod k použití příslušné sondy ZytoVision.

14. Výkonnostní charakteristiky

Viz návod k použití příslušné sondy ZytoVision.

15. Likvidace

Likvidace činidel musí být prováděna v souladu s místními předpisy.

16. Řešení problémů

Jakákoli odchylka od návodu k obsluze může vést k horším výsledkům barvení nebo k tomu, že barvení nebude vůbec provedeno. Další informace naleznete na www.zytovision.com.

Slabý nebo žádný signál

Možná příčina	Akce
Vzorek buněk nebo tkáně není správně fixován	Optimalizujte dobu fixace a fixační činidlo nebo použijte postfixační krok, jak je popsáno v "postupu analýzy" v příručce k sadě <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</u> .
Nesprávně provedená proteolytická předúprava	Optimalizujte dobu inkubace pepsinu, v případě potřeby ji prodlužte nebo zkrátte.
Odpařování sondy	Při použití hybridizátoru je použití mokrých pruhů/nádrží naplněných vodou povinné. Při použití hybridizační pece je nutné použít vlhkou komoru. Kromě toho by měl být krycí list zcela uzavřen, např. pomocí Fixogumu, aby se zabránilo vysychání vzorku během hybridizace.
Použití nevhodných sad filtrů	Použijte sady filtrů vhodné pro fluochromy sondy. Sady třípásmových filtrů poskytují méně světla ve srovnání se sadami jednopásmových nebo dvoupásmových filtrů. V důsledku toho se mohou signály při použití těchto sad třípásmových filtrů jevit slabší.

Křížové hybridizační signály; rušivé pozadí

Možná příčina	Akce
Nedokonalé odparařování	Používejte čerstvé roztoky; zkontrolujte délku odparařování
Příliš silná proteolytická předúprava	Zkrácení inkubační doby pepsinu
Sklíčka se před hybridizací ochladí na pokojovou teplotu.	Sklíčka rychle přeneste na teplotu 37°C

Zhoršená morfologie

Možná příčina	Akce
Vzorek buněk nebo tkáň nebyl správně fixován	Optimalizujte dobu fixace a fixační činidlo nebo použijte postfixační krok, jak je popsáno v "postupu analýzy" v příručce k sadě <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</u> .
Nesprávně provedená proteolytická předúprava	Optimalizujte dobu inkubace pepsinu, v případě potřeby ji zkrátte.
Nedostatečné vysušení před aplikací sondy	Prodloužení sušení na vzduchu

Překrývající se jádra

Možná příčina	Akce
Nevhodná tloušťka tkáňových řezů	Příprava řezů o velikosti 2-4 μm z mikrotomu

Vzorek vyplave ze sklíčka

Možná příčina	Akce
Příliš silná proteolytická předúprava	Zkrácení inkubační doby pepsinu

Slabá protibarva

Možná příčina	Akce
Nízkokonzentrováný roztok DAPI	Místo toho použijte roztok <u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (prod. č. MT-0008-0.8).
Příliš krátká doba inkubace DAPI	Úprava doby inkubace DAPI

17. Literatura

- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* **53**: 134-6.
- Wilkinson DG: In Situ Hybridization, A Practical Approach, *Oxford University Press* (1992) ISBN 0 19 963327 4.

18. Revize

Revize	Popis změny
1.2.1	11. Postup analýzy ZyGreen 2.0 přidán


www.zytovision.com

Nejnovější návod k použití a návod k použití v různých jazycích naleznete na adrese www.zytovision.com.

Naši odborníci jsou připraveni zodpovědět vaše dotazy. Kontaktujte prosím helptech@zytovision.com



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

Ochranné známky:

ZytoVision® a ZytoLight® jsou ochranné známky společnosti ZytoVision GmbH.