



ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit

REF Z-2099-20

Σ 20

Pro použití při fluorescenční in situ hybridizaci (FISH)

4250380N727X



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

1. Zamýšlené použití

Sada ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit je určena k použití v kombinaci se sondami ZytoLight FISH na cytologických 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

ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit je k dispozici v jedné velikosti a skládá se z:

Kód	Komponenta	Množství	Kontejner
		Σ 20	
ES2	<u>Cytology Pepsin Solution</u>	4 ml	Lahvička s kapátkem, průhledný uzávěr
WB5	<u>20x Wash Buffer TBS</u>	50 ml	Láhev se šroubovacím uzávěrem
PT4	<u>10x MgCl₂</u>	50 ml	Láhev se šroubovacím uzávěrem
PT5	<u>10x PBS</u>	50 ml	Láhev se šroubovacím uzávěrem
WB7	<u>Cytology Stringency Wash Buffer SSC</u>	500 ml	Láhev se šroubovacím uzávěrem (velká)
WB8	<u>Cytology Wash Buffer SSC</u>	500 ml	Láhev se šroubovacím uzávěrem (velká)
MT7	<u>DAPI/DuraTect-Solution</u>	0.8 ml	Reakční nádoba, modré víko
	Návod k použití	1	

Z-2099-20 (20 testů): Složky **ES2** a **MT7** postačují pro 20 reakcí. Složky **PT4**, **PT5**, **WB7** a **WB8** vystačí na 7 barvicích sklenic po 70 ml. Složka **WB5** vystačí na 14 barvicích sklenic po 70 ml.

4. Požadované, ale neposkytované materiály

- ZytoLight FISH probe
- Pozitivní a negativní kontrolní vzorky
- Mikroskopická sklíčka, nepotažená
- Vodní lázeň (70 °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
- 37% formaldehyd, bez kyselin, nebo 10% formalín, neutrálně pufovaný
- 2x fyziologický citrát sodný (SSC), např. z 20x SSC Solution (Prod. No. WB-0003-50)
- Deionizovaná nebo destilovaná voda
- Krycí sklíčka (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Pryžový cement, např. Fixogum Rubber Cement (Prod. No. E-4005-50/-125) or similar
- 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. 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 ípravěk 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 výrobcí 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.
- 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 ES2:

EUH210	Na vyžádání je k dispozici bezpečnostní list. < 20 % směsi tvoří složka (složky) s neznámou akutní toxicitou (při vdechování)
--------	--

Standardní věty o nebezpečnosti a pokyny pro bezpečné zacházení pro PT4, PT5, WB5, WB7, a WB8:

Složka určující nebezpečí je směsí: 5-chlor-2-methylisothiazol-3(2H)-on [číslo ES 247-500-7] a 2-methylisothiazol-3(2H)-on [číslo ES 220-239-6] (3:1).



Varování

H317	Může vyvolat alergickou kožní reakci.
P261	Zamezte vdechování prachu/dýmu/plynu/mlhy/par/aerosolů.
P272	Kontaminovaný pracovní oděv neodnášejte z pracoviště.
P280	Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.
P302+P352	PŘI STYKU S KŮŽÍ: Omyjte velkým množstvím vody.
P333+P313	Při podráždění kůže nebo vyrážce: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.
P362+P364	Kontaminovaný oděv svlékněte a před opětovným použitím vyperte.

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 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 popsanych 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 popsáním v tomto návodu k použití v rozsahu určeného použití.

8. Rušivé látky

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

9. Příprava vzorků

Bezprostředně před proteolýzou pro stárnutí inkubujte preparáty 2 minuty v roztoku 2x SSC při 73 °C.

Alternativně lze stárnutí vzorků provést inkubací vzorků přes noc (12-16 h) při 37 °C.

10. Přípravné ošetření zařízení

20x Wash Buffer TBS (WB5), 10x MgCl₂ (PT4) a 10x PBS (PT5) je třeba předem upravit podle pokynů v bodě 11. "Postup testu". Složky (PT4) a (PT5) mohou při teplotě 2-8 °C tvořit sraženiny. V případě potřeby je před použitím zahřejte na 37 °C po dobu 10 minut, dokud se sraženiny zcela nerozpustí. Všechna ostatní činidla soupravy jsou připravena k použití. Není nutná rekonstituce, míchání ani ředění.

11. Postup analýzy

11.1 Den 1

Přípravné kroky

- *Příprava 1x Wash Buffer TBS:* 1 díl 20x Wash Buffer TBS (WB5) 19 dílů deionizované nebo destilované vody.
- *Příprava 1% roztoku formaldehydu:* Pro 100 ml 1% roztoku formaldehydu smíchejte buď 2,7 ml 37% formaldehydu bez kyselin, nebo 25 ml 10% neutrálně pufovaného formalinu (4% formaldehyd) s 10 ml 10x MgCl₂ (PT4) a 10 ml 10x PBS (PT5) a upravte objem na 100 ml deionizovanou nebo destilovanou vodou. Důkladně promíchejte.
- *Příprava série ethanolu (70%, 90% a 100% roztoky ethanolu):* Zřeďte 7, 9 a 10 dílů 100% ethanolu s 3, 1 a 0 dílů deionizované nebo destilované vody. Tyto roztoky lze uchovávat ve vhodných nádobách a lze je opakovaně použít.
- *Sonda ZytoLight FISH:* Před použitím uveďte do teploty RT, chraňte před světlem.

Předúprava (odvoskování/proteolýza)

1. Na cytologický vzorek naneste (po kapkách) Cytology Pepsin Solution (ES2) a inkubujte 10 minut při 37 °C ve vlhké komoře.

ES2 může tvořit sraženiny, které nemají vliv na kvalitu.

V závislosti na více faktorech, např. na povaze a délce fixace a na povaze buněk, může být vyžadována různá doba inkubace. U cytologických vzorků doporučujeme inkubační dobu 5-15 minut. Obecně doporučujeme zjistit optimální dobu pro proteolýzu v předběžných testech.

2. Inkubujte sklíčka 5 minut v 1x Wash Buffer TBS.
3. Sklíčka inkubujte 5 minut v 1% Formaldehyde solution.
4. Inkubujte sklíčka 5 minut v 1x Wash Buffer TBS.
5. Dehydratace: v 70%, 90% a 100% ethanolu, vždy po dobu 1 min. Vzorky vysušte na vzduchu.

Denaturace a hybridizace

1. Na každý předem ošetřený vzorek napipetujte 10 µl 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).

- Umístěte sklíčka na horkou desku nebo hybridizátor a denaturujte vzorky po dobu 5 minut při 72 °C.
- Přeneste preparáty do vlhké komory a hybridizujte přes noc při 37 °C (např. v hybridizační peci).

Je důležité, aby cytologické vzorky během hybridizace nevyschly.

11.2 Den 2

Přípravné kroky

- Cytology Stringency Wash Buffer SSC (WB7): Předehřejte na 70°C.
- Cytology Wash Buffer SSC (WB8): Uvedte na pokojovou teplotu.
- DAPI/DuraTect-Solution (MT7): Před použitím uvedte do pokojové teploty, chraňte před světlem.

Následná hybridizace a detekce

- Opatrně odstraňte gumový tmel nebo lepidlo.
- Opatrně odstraňte krycí sklíčko.
- Promývejte pomocí Cytology Stringency Wash Buffer SSC (WB7) po dobu 2 minut při 70°C.

Cytology Stringency Wash Buffer SSC by měl být předem zahřátý. V případě potřeby zkontrolujte teploměrem..

Doporučujeme použít čtyři sklíčka na jednu barvicí nádobku. V případě potřeby použijte prázdná sklíčka, abyste počet upravili na čtyři.

- Promývejte pomocí Cytology Wash Buffer SSC (WB8) po dobu 1 minuty při pokojové teplotě..

Cytology Wash Buffer SSC by měl být předehřátý na pokojovou teplotu. V případě potřeby zkontrolujte teploměrem.

- Vzorky sušte na vzduchu chráněné před světlem.
- 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 seřízuta, aby se zvětšil otvor, může usnadnit pipetování. Vyhněte se dlouhému působení světla.

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

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

12. 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
Nesprávně provedená proteolytická předúprava	Optimalizujte dobu inkubace pepsinu, v případě potřeby ji prodlužte nebo zkratzte.
Odpařování sondy	Při použití hybridizátoru je použití mokřých 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 řířásmových filtrů poskytují méně světla ve srovnání se Sady řířásmových nebo dvoupásmových filtrů. V důsledku toho se mohou signály při použití těchto sad řířásmových filtrů jevit slabší.

Křířžové hybridizační signály; rušivé pozadí

Možná příčina	Akce
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
Nesprávně provedená proteolytická předúprava	Optimalizujte dobu inkubace pepsinu, v případě potřeby ji zkratzte.
Nedostatečné vysušení před aplikací sondy	Prodloužení sušení na vzduchu

Slabá protibarva

Possible cause	Action
Nízkokonzentrovaný roztok DAPI	Místo toho použijte roztok <u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (Prod. No. 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 help@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.