



ZytoLight CEN 8 Probe

REF Z-2004-50 ∇_{Σ} 5 (0.05 ml)

REF Z-2004-200 ∇_{Σ} 20 (0.2 ml)

Pro kvalitativní detekci lidských alfa satelitů chromozomu 8 pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)



IVD

Prostředek pro lékařskou in vitro diagnostiku
V souladu s EU nařízením 98/79/EC

1. Použití

ZytoLight CEN 8 Probe (PL7) je určena k použití pro kvalitativní detekci alfa satelitů chromozomu 8 v cytologických nebo formalínem fixovaných vzorků zalitých do parafinu, metodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Průběh je určená k použití v kombinaci s ZytoLight FISH Implementation Kits (Katalog.č. Z-2028-5/-20 nebo Z-2099-20).

Interpretace výsledků musí být prováděna kvalifikovaným patologem, v kontextu s klinickou historií pacienta a s ohledem na ostatní klinické a patologické nálezy.

2. Princip testu

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je technika, která umožní je detekci a vizualizaci specifických sekvencí nukleových kyselin v buněčných preparátech. Fluorescenčně označené úseky DNA, tzv. FISH próby, a jejich komplementární cílové úseky DNA v preparátech jsou společně denaturovány a následně je umožněno jejich spárování v průběhu hybridizace. Poté jsou nespecifické a nenavázané fragmenty práb odstraněny pomocí důkladných oplachovacích kroků. Po dobarvení DNA pomocí DAPI jsou hybridizované úseky DNA vizualizovány pomocí fluorescenčního mikroskopu vybaveného excitačními a emisními filtry specifickými pro fluorochromy, se kterými byly FISH próby označeny.

3. Potřebné reagensy

ZytoLight CEN 8 Probe se skládá z:

- ZyGreen (excitace 503 nm/ emise 528 nm) označené polynukleotidy (~4.5 ng/μl), s cílovými sekvencemi v 8p11.1-q11.1 specifický pro alfa satelit centromerického regionu D8Z2 chromozomu 8.
- Hybridizační pufr založený na formamidu

ZytoLight CEN 8 Probe dostupný ve dvou velikostech:

- Z-2004-50: 0.05 ml (5 reakcí po 10 μl každá)
- Z-2004-200: 0.2 ml (20 reakcí po 10 μl každá)

4. Vybavení, které je vyžadováno, ale není součástí dodávky

- Pozitivní a negativní kontroly vzorků
- Hybridizér nebo horká plotna
- Hybridizér nebo vlhká komora v hybridizační peci
- Stopky
- Barvicí nádoby nebo lázně
- Kalibrovaný teploměr
- Nastavitelné pipety (10 μl, 25 μl)
- Etanol nebo alkohol
- Deionizovaná nebo destilovaná voda
- Krycí skříčka (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Lepidlo, např. Fixogum Rubber Cement (Katalog.č. E-4005-50/-125) nebo podobné.
- Fluorescenční mikroskop s odpovídajícím vybavením (400-1000x)
- Imerzní olej určený pro fluorescenční mikroskop
- Odpovídající nastavení filtrů

Cytologické vzorky

- ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit (Katalog.č. Z-2099-20)
- Mikroskopická skříčka, nepotahovaná
- Vodní lázeň (70 °C)
- 37% formaldehyd, ne-kyselý nebo 10% formalín, pufrovaný na neutrální pH
- 2x Saline-Sodium Citrate (SSC), např. připravené z 20x SSC Solution (Katalog č. WB-0003-50)

FFPE vzorky

- ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Katalog.č. Z-2028-5/-20)
- Mikroskopická skříčka, pozitivně nabitá
- Vodní lázeň (37 °C, 98 °C)
- Xylén

5. Skladování a zacházení

Skladujte při teplotě 2-8 °C, ve vzpřímené pozici, chráněné před sluncem. Používejte chráněné před sluncem. Vraťte do skladovacích podmínek okamžitě po použití. Nepoužívejte reagensy po uplynutí doby expirace uvedené na štítku.

6. Varování a preventivní opatření

- Před použitím si přečtěte instrukce!
- Nepoužívejte reagensy po uplynutí doby expirace!
- Tento produkt obsahuje látky (v nízkých koncentracích a objemech), které jsou škodlivé pro zdraví a potenciálně infekční. Vyvarujte se přímého kontaktu s reagensy. Používejte přiměřené ochranné prostředky (jednorázové rukavice, ochranné brýle a laboratorní plášť).
- V případě kontaktu s kůží omyjte okamžitě velkými množstvím vody!
- Pro profesionální uživatele je na vyžádání dostupný bezpečnostní list.
- Nepoužívejte reagensy opakovaně.
- Vyvarujte se vzájemné kontaminace vzorů, neboť to může vést k chybným výsledkům.
- Průběh by neměla být po delší dobu vystavena světlu, speciálně ne silnému světlu, tzn., že všechny kroky by se měly provádět ve tmě a/nebo za použití tmavých, světlo nepropouštějících nádobek.

Rizika:

Složka určující riziko je formamid

**Nebezpečí**

| | |
|-----------|--|
| H351 | Podezření na vyvolání rakoviny. |
| H360FD | Může poškodit reprodukční schopnost. Může poškodit plod v těle matky. |
| H373 | Může způsobit poškození orgánů při prodloužené nebo opakované expozici |
| P201 | Před použitím si obstarejte speciální instrukce. |
| P202 | Nepoužívejte, dokud jste si nepřečetli všechny bezpečnostní pokyny a neporozuměli jim. |
| P260 | Nevdechujte prach/dým/plyn/mlhu/páry/aerosoly. |
| P280 | Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít. |
| P308+P313 | Při expozici nebo podezření na ni: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření. |
| P405 | Skladujte uzamčené. |

7. Omezení

- Pouze pro *in vitro* diagnostiku.
- Pouze pro profesionální uživatele.
- Klinická interpretace jakéhokoliv pozitivního barvení nebo jeho chybění musí být hodnocena v kontextu klinické historie, morfolgie, ostatních histopatologických kritérií a stejně tak i ostatních diagnostických testů. Je odpovědností kvalifikovaného patologa být obeznámený s FISH próbami, reagensii, diagnostickými panely a metodami používanými k barvení preparátů. Barvení musí být prováděno v certifikované, licencované laboratoři pod dozorem patologa, který je odpovědný za prohlížení obarvených sklů a vyhodnocení odpovídajících pozitivních a negativních kontrol.
- Barvení preparátu, obzvláště intenzita a barvení pozadí závisí na zacházení se vzorkem před barvením. Neodpovídající fixace, mražení, tání, oplachování a sušení, var, krájení nebo kontaminace jinými vzorky nebo tekutinami může vést k artefaktům nebo falešným výsledkům. Nekonzistentní výsledky mohou být výsledkem variací ve fixaci a prosycovacích metodách, stejně tak jako nepravidelnostmi uvnitř vzorku.
- Próba má být používána pouze pro detekci lokusů popsaných v odstavci 3.
- Barvení bylo validováno za použití metod popsaných v těchto instrukcích pro použití. Obměny těchto procedur mohou vést ke změnám barvení a mají být validovány uživatelem.

8. Interferující látky

Pokud jsou ve vzorku přítomny červené krvinky, mohou jevit autofluorescenci, která ztěžuje detekci hledaných signálů

Následující fixační tekutiny jsou nekompatibilní (nevhodné) pro FISH:

- Bouinův roztok
- B5 fixace
- Kyselá fixativa (např. kys. pikrová)
- Zenkerova fixační tekutina
- Alkoholy (pokud jsou používány samostatně)
- Chlorid rtuť
- Formaldehyd/zinkové fixativum
- Hollando fixativum
- Nepufrovaný formalin

9. Příprava vzorků**Cytologické vzorky**

Připravte vzorek podle instrukcí uvedených u [ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit](#).

FFPE vzorky

- Fixace v 10% neutrálním pufrovaném formalínu po dobu 24h při pokojové teplotě (18-25°C).
- Připravte tkáňové vzorky $\leq 0,5 \text{ m}^3$.
- Používejte parafin nejvyšší (prémiové) kvality.
- Prosycení by mělo být prováděno při teplotě nižší než 65°C.
- Připravte řezy o tloušťce 2-4 μm .
- Používejte pozitivně nabitá skla.
- Fixujte po dobu 2-16h při teplotě 50-60°C.

10. Příprava před použitím

Produkt je ready-to-use, tedy připraven k přímému použití. Není vyžadována žádná obnova, mísení nebo ředění. Před použitím přineste průbu do pokojové teploty (18-25 °C), chraňte před světlem. Před otevřením nádoby promíchejte krátce ve vortexu a stočte.

11. Pracovní postup**Cytologické vzorky****Příprava vzorku**

Připravte vzorek podle instrukcí uvedených u [ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit](#).

Denaturace a hybridizace

1. Napípepujte 10 μl próby na každý předpřipravený vzorek.
 2. Přikryjte vzorky krycím sklíčkem 22 mm x 22 mm (vyvarujte se vytvoření bublin) a zalepte krycí sklíčko.
- Doporučujeme použít speciální lepidlo např. Fixogum.*
3. Umístěte skla na horkou ploténku nebo do hybridizéru a denaturujte vzorky 5 min při 72°C.
 4. Přeneste skla do vlhké komůrky nebo hybridizujte přes noc při 37 °C (např. v hybridizační troubě).

Je zcela zásadní, aby vzorky v průběhu hybridizačního kroku nevyschly.

Post-hybridizace

Posthybridizační kroky (oplach, dobarvení, fluorescenční mikroskopie) provádějte podle instrukcí uvedených v [ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit](#).

FFPE Vzorky**Příprava vzorku**

Připravte vzorek podle instrukcí uvedených u [ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit](#).

Denaturace a hybridizace

1. Napípepujte 10 μl próby na každý předpřipravený vzorek.
 2. Přikryjte vzorky krycím sklíčkem 22 mm x 22 mm (vyvarujte se vytvoření bublin) a zalepte krycí sklíčko.
- Doporučujeme použít speciální lepidlo např. Fixogum.*
3. Umístěte skla na horkou ploténku nebo do hybridizéru a denaturujte vzorky 10 min při 75°C.
 4. Přeneste skla do vlhké komůrky nebo hybridizujte přes noc při 37 °C (např. v hybridizační troubě).

Je zcela zásadní, aby vzorky v průběhu hybridizačního kroku nevyschly.

Post-hybridizace

Posthybridizační kroky (oplach, dobarvení, fluorescenční mikroskopie) provádějte podle instrukcí uvedených v [ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kits](#).

12. Doporučené postupy kontroly kvality

Za účelem zajištění správných postupů má být ke každému testu přiřazena vnitřní a vnější kontrola. Pokud tyto kontroly selžou při demonstraci správného barvení, výsledky vzorku pacienta musí být hodnoceny jako invalidní.

Vnitřní kontrola: Nenádorové buňky uvnitř vzorku, ve kterých je patrný normální vzor signálů.

Externí kontrola: Ověřené (validované) pozitivní a negativní kontrolní vzorky.

13. Výkonnostní charakteristiky

Cytologické vzorky

Barvení bylo hodnoceno s ohledem na instrukce uvedeny v [ZytoLight FISH Cytology Implementation Kit](#).

Přesnost: Místo hybridizace sondy bylo hodnoceno na metafázových spreadech karyotypově normálního samce. Ve všech testovaných vzorcích hybridizovala sonda pouze očekávané lokusy. Nebyly pozorovány žádné další signály nebo křížové hybridizace. Proto byla vypočítána přesnost na 100%.

Analytická citlivost: Pro analytické stanovení citlivosti byla sonda vyhodnocena na metafázových spreadech karyotypicky normálních samců. Všechna jádra ukázala očekávaný normální signál ve všech testovaných vzorcích. Analytická citlivost byla proto vypočtena na 100%.

Analytická specifita: Pro stanovení analytické specifity byla sonda vyhodnocena na metafázových spreadech karyotypicky normálních samců. Ve všech testovaných vzorcích hybridizovaly všechny signály pouze s očekávanými cílovými lokusy a žádnými jinými lokusy. Analytická specifita byla proto vypočtena na 100%.

FFPE vzorky

Barvení bylo hodnoceno s ohledem na instrukce uvedené v [ZytoLight FISH Tissue Implementation Kit](#).

Přesnost: Místo hybridizace sondy bylo hodnoceno na metafázových spreadech karyotypově normálního samce. Ve všech testovaných vzorcích hybridizovala sonda pouze očekávané lokusy. Nebyly pozorovány žádné další signály nebo křížové hybridizace. Proto byla vypočítána přesnost na 100%.

Analytická citlivost: Pro analytické stanovení citlivosti byla sonda vyhodnocena na metafázových spreadech karyotypicky normálních samců. Všechna jádra ukázala očekávaný normální signál ve všech testovaných vzorcích. Analytická citlivost byla proto vypočtena na 100%.

Analytická specifita: Pro stanovení analytické specifity byla sonda vyhodnocena na metafázových spreadech karyotypicky normálních samců. Ve všech testovaných vzorcích hybridizovaly všechny signály pouze s očekávanými cílovými lokusy a žádnými jinými lokusy. Analytická specifita byla proto vypočtena na 100%.

14. Likvidace odpadů

Likvidace reagentů musí být provedena v souladu s lokálními zákony.

15. Řešení problémů

Jákaoliv odchylka od návodu k obsluze může vést k horším výsledkům barvení nebo k žádnému znečištění

Slabé nebo vůbec žádné signály

| Možná příčina | Řešení |
|---|--|
| Žádné dostupné cílové sekvence | Použijte vhodnou kontrolu. |
| Buňky nebo tkáň nebyly fixovány správně | Optimalizujte fixační čas nebo aplikujte postfixační kroky popsaných v kapitole 12 „Pracovní postup“ v návodu ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit |

| | |
|--|--|
| Nesprávná příprava teplem, natrávení, denaturace, hybridizace nebo teplota oplachu | Zkontrolujte teplotu u všech zařízení, u kterých je kalibrovaný teploměr |
| Buňky nebo tkáň nebyly dobře fixovány | Optimalizujte fixační dobu a fixativa nebo aplikujte post-fixační krok, jak je uvedeno v kapitole 12 „Postup zkoušky“ v návodu ZytoLight FISH-tissue implementation kit |
| Proteolytická předběžná úprava není řádně provedena | Optimalizujte inkubační dobu pepsinu, Zvyšte nebo snižte. |
| Odpařování sondy | Při použití hybridizéru, je nutné použít mokré proužky / nádrže naplněné vodou. Při použití hybridizační pece, vlhké komoty, by mělo být krycí sklíčko zcela uzavřené, například Fixogum, aby se zabránilo vysychání vzorků během hybridizace |
| Příliš nízká koncentrace promývacího pufru | Zkontrolujte koncentraci promývacího pufru |
| Staré odvodňovací roztoky | Připravte čerstvé odvodňovací roztoky. |
| Špatné nastavení fluorescenčního mikroskopu | Nastavte správně |
| Použití nesprávného setu filtrů | Použijte set filtrů, které jsou odpovídající fluochromům próby. <i>Trojité filtry poskytují méně světla v porovnání s jednoduchými nebo dvojitými filtry. Navíc signály se mohou při použití trojitého filtru jevit bledší.</i> |
| Poškození próby světlem | Hybridizační a promývací kroky provádějte ve tmě. |

Zkřížené hybridizační signály, šum na pozadí

| Možná příčina | Řešení |
|--|---|
| Neúplné odparafinování | Používejte čerstvé roztoky; zkontrolovat délku odparafinování |
| Příliš silné natrávení | Zkraťte inkubaci s pepsinem. |
| Příliš velký objem próby na plochu vzorku | Snižte objem próby na řez, rozmišťte ujte próbu po kapkách, abyste se vyhnuli příliš vysoké místní koncentraci. |
| Preparáty jsou vychladlé na pokojovou teplotu před hybridizací | Přenechte preparáty krátce do 37 °C |
| Příliš vysoká koncentrace promývacího pufru | Zkontrolujte koncentraci promývacího pufru. |
| Oplachovací teplota po hybridizaci je příliš nízká | Zkontrolujte teplotu a zvyšte ji, pokud je to nutné |
| Vysušení vzorků mezi jednotlivými kroky inkubace | Zabraňte vysušení pomocí přilepení krycího sklíčka a provádění inkubace ve vlhkém prostředí. |

Poškozená morfologie

| Možná příčina | Řešení |
|---|--|
| Buňky nebo tkáň nebyly fixovány správně | Optimalizujte fixační čas nebo aplikujte postfixační kroky popsaných v kapitole 12 „Pracovní postup“ v návodu ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit |

| | |
|--|---|
| Příprava natrávením není provedena správně | Optimalizujte dobu inkubace s pepsinem, zkrátte nebo prodlužte, je-li potřeba |
| Nedostatečné oschnutí preparátu na vzduchu před aplikací próby | Prodlužte osušení. |

Překrývající se jádra

| | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Možná příčina | Řešení |
| Nesprávná tloušťka tkáňových řezů | Připravujte řezy tloušťky 2-4 µm. |

Vzorek uplavaná ze sklíčka

| | |
|---------------------------|-------------------------------|
| Možná příčina | Řešení |
| Nevhodný povrch sklíčka | Použijte vhodné sklíčko. |
| Natrávení je příliš silné | Snižte inkubační dobu pepsinu |

Slabé barvení

| | |
|--------------------------------|--|
| Možná příčina | Řešení |
| Nízká koncentrace roztoku DAPI | Používejte DAPI/DuraTect-Solution (ultra) (Katalog.č. MT-0008-0.8) |
| Příliš krátká doba inkubace | Prodlužte dobu inkubace s DAPI. |

16. Literatura

- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Waye JS, Willard HF (1987) *Nucleic Acids Res* 15: 7549-69.
- Wilkinson DG: *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.

Naši experti jsou Vám k dispozici zodpovědět Vaše otázky. Prosím kontaktujte helptech@zytovision.com



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

Ochranná známka:

ZytoVision® a ZytoLight® jsou pod ochrannou známkou ZytoVision GmbH.