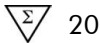




**ZytoLight**  
**FISH-Cytology Implementation Kit**

REF Z-2099-20



20

За използване при процедури за флуоресцентна *in situ* хибридизация (FISH)

4250380N727X



Ин витро диагностично медицинско устройство  
в съответствие с IVDR (ЕС) 2017/746

**1. Предвидена употреба**

*ZytoLight* FISH-Cytology Implementation Kit е предназначен да се използва в комбинация със сонди *ZytoLight* FISH върху цитологични проби чрез флуоресцентна *in situ* хибридизация (FISH).

Продуктът е предназначен само за професионална употреба. Всички тестове, при които се използва продуктът, трябва да се извършват в сертифицирана, лицензирана патологоанатомична лаборатория, под наблюдението на патолог/ генетик квалифициран за съответната дейност.

**2. Принцип на изпитване**

Техниката на флуоресцентната *in situ* хибридизация (FISH) позволява откриването и визуализирането на специфични последователности на нуклеинови киселини в клетъчни препарати. Флуоресцентно маркираните ДНК фрагменти, т.нар. сонди за FISH, и техните комплементарни целеви ДНК вериги в препаратите се ко-денатурират и впоследствие се оставят да се нагряват по време на хибридизацията. След това неспецифичните и несвързани фрагменти на сондата се отстраняват чрез стриктно измиване. След контраоцветяване на ДНК с DAPI хибридизираниите фрагменти на сондата се визуализират с помощта на флуоресцентен микроскоп, оборудван с възбуждащи и емисионни филтри, специфични за флуорохромите, с които са маркирани директно фрагментите на FISH сондата.

**3. Предоставени реактиви**

Комплектът *ZytoLight* FISH-Cytology Implementation Kit се предлага в един размер и се състои от:

Код	Компонент	Количество	Контейнер
		20	
ES2	<u>Cytology Pepsin Solution</u>	4 ml	Бутилка с капкомер, transparent cap
WB5	<u>20x Wash Buffer TBS</u>	50 ml	Бутилка с винтова капачка
PT4	<u>10x MgCl<sub>2</sub></u>	50 ml	Бутилка с винтова капачка
PT5	<u>10x PBS</u>	50 ml	Бутилка с винтова капачка
WB7	<u>Cytology Stringency Wash Buffer SSC</u>	500 ml	Бутилка с винтова капачка (голяма)
WB8	<u>Cytology Wash Buffer SSC</u>	500 ml	Бутилка с винтова капачка (голяма)
MT7	<u>DAPI/DuraTect-Solution</u>	0.8 ml	Съд за реакция, син капак
	Инструкции за употреба	1	

**Z-2099-20 (20 tests):** Компонентите **ES2** и **MT7** са достатъчни за 20 реакции. Компонентите **PT4**, **PT5**, **WB7** и **WB8** са достатъчни за 7 буркана за оцветяване от 70 ml всеки. Компонент **WB5** е достатъчен за 14 буркана за оцветяване от по 70 ml всеки.

**4. Необходими материали, които не са осигурени**

- *ZytoLight* FISH probe
- Положителни и отрицателни контролни образци
- Микроскопски стъкла, без покритие
- Водна баня (70°C)
- Хибридизатор или гореща плоча
- Хибридизатор или камера за влажност в пещта за хибридизация
- Регулируеми пипети (10 µl, 25 µl)
- Оцветяване на буркани или вани
- Таймер
- Калибриран термометър
- Етанол или реактивен алкохол
- 37% формалдехид, без киселини, или 10% формалин, неутрално буфериран
- 2 пъти физиологичен разтвор с натриев цитрат (SSC), напр. от 20x SSC Solution (Prod. No. WB-0003-50)
- Дейонизирана или дестилирана вода
- Покривни стъкла (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Каучуков цимент, напр Fixogum Rubber Cement (Prod. No. E-4005-50/-125) or similar
- Подходящо поддържан флуоресцентен микроскоп (400-1000x)
- Масло за потапяне, одобрено за флуоресцентна микроскопия

**5. Подходящи филтърни комплекти Съхранение и обработка**

Съхранявайте при температура 2-8 °C в изправено положение. Освен това DAPI/DuraTect-Solution (MT7) трябва да се съхранява на защитено от светлина място. Върнете условията на съхранение веднага след употреба. Не използвайте реагентите след изтичане на срока на годност, посочен на етикета. Продуктът е стабилен до датата на изтичане на срока на годност, посочена на етикета, когато се третира по подходящ начин.

**6. Предупреждения и предпазни мерки**

- Прочетете инструкциите за употреба преди да ги използвате!
- Не използвайте реагентите след изтичане на срока на годност!
- Този продукт съдържа вещества (в ниски концентрации и обеми), които са вредни за здравето. Избягвайте всякакъв пряк контакт с реагентите. Вземете подходящи мерки за защита (използвайте ръкавици за еднократна употреба, защитни очила и лабораторно облекло)!

- Докладвайте за всеки сериозен инцидент, възникнал във връзка с продукта, на производителя и на компетентния орган съгласно местните разпоредби!
- Ако реагентите попаднат върху кожата, незабавно я изплакнете с голямо количество вода!
- При поискване за професионалния потребител се предоставя информационен лист за безопасност на материала.
- Не използвайте повторно реагентите, освен ако повторната употреба не е изрично разрешена!
- Избягвайте кръстосано замърсяване на пробите, тъй като това може да доведе до грешни резултати.
- Не трябва да се допуска изсъхване на образците по време на хибридизацията и промиването.
- DAPI/DuraTect-Solution (MT7) не трябва да се излага на светлина, особено на силна светлина, за по-дълъг период от време, т.е. всички стъпки трябва да се извършват, когато е възможно, на тъмно и/или като се използват светлоустойчиви контейнери!

#### Специално етикетиране на ES2:

EUN210	Информационен лист за безопасност ще бъде представен при поискване. < 20 % от сместа се състои от съставка(и) с неизвестна остра токсичност (при вдишване).
--------	--

#### Предупреждения за опасност и предпазни мерки за PT4, PT5, WB5, WB7, и WB8:

Компонентът, определящ опасността, е смес от: 5-хлоро-2-метил-4-изотиазолин-3-он [EC № 247-500-7] и 2-метил-2Н-изотиазол-3-он [EC № 220-239-6] (3:1).



#### Предупреждение

H317	Може да причини алергична кожна реакция.
P261	Избягвайте вдишване на прах/пушек/газ/дим/изпарения/аерозоли
P272	Да не се изнася замърсено работно облекло извън работното помещение.
P280	Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице.
P302+P352	ПРИ КОНТАКТ С КОЖАТА: Измийте обилно с вода/...
P333+P313	При поява на кожно дразнене или обрив на кожата: Потърсете медицински съвет/помощ.
P362+P364	Свалете замърсеното облекло и го изперете преди повторна употреба.

#### Предупреждения за опасност и предпазни мерки за MT7:

Тази сонда не е класифицирана като опасна в съответствие с Регламент (ЕО) № 1272/2008.

#### 7. Ограничения

- За *in vitro* диагностична употреба.
- Само за професионална употреба.
- Само за неавтоматизирана употреба.
- Клиничната интерпретация на всяко положително оцветяване или липсата на такова трябва да се направи в контекста на клиничната анамнеза, морфологията, други хистопатологични критерии, както и други диагностични тестове. Отговорност на квалифицирания патолог/човешки генетик квалифициран за съответната дейност.е да познава ISH сондите, реагентите, диагностичните панели и методите, използвани за получаване на оцветения препарат. Оцветяването трябва да се извършва в сертифицирана, лицензирана лаборатория под надзора на патолог/ генетик квалифициран за съответната дейност., който отговаря за прегледа на оцветените

препарати и за осигуряване на адекватността на положителните и отрицателните контроли.

- Оцветяването на образеца, особено интензивността на сигнала и фоновото оцветяване, зависи от обработката на образеца преди оцветяването. Неправилното фиксиране, замразяване, размразяване, измиване, сушене, нагряване, рязане или замърсяване с други проби или течности може да доведе до артефакти или фалшиви резултати. Несъответстващите резултати могат да се дължат на разлики в методите на фиксиране и вграждане, както и на присъщи на образеца нередности.
- Изпълнението беше валидирано, като бяха използвани процедурите, описани в инструкцията за употреба на съответната сонда ZytoVision и комплекта за изпълнение. Модификациите на тези процедури могат да променят ефективността и трябва да бъдат потвърдени от потребителя. Този IVD е сертифициран като CE само когато се използва, както е описано в тази инструкция за употреба в рамките на предвидената употреба.

#### 8. Пречищи вещества

Присъстващите в пробата червени кръвни клетки могат да проявят автофлуоресценция, която пречи на разпознаването на сигнала.

#### 9. Подготовка на образци

Инкубирайте предметите за 2 минути в разтвор 2x SSC при 73°C непосредствено преди протеолизата за стареене.

Алтернативно, стареенето на образците може да се осъществи чрез инкубиране на образците за една нощ (12-16 часа) при 37°C.

#### 10. Подготвителна обработка на устройството

20x Wash Buffer TBS (WB5), 10x MgCl<sub>2</sub> (PT4), и 10x PBS (PT5) трябва да бъдат предварително обработени съгласно инструкциите в точка 11. "Процедура за анализ". Компонентите (PT4) и (PT5) могат да образуват преципитати при 2-8°C. Ако е необходимо, преди да се използват, се затоплят до 37 °C за 10 минути, докато утайките се разтворят напълно. Всички останали реактиви от комплекта са готови за употреба. Не се изисква възстановяване, смесване или разреждане.

#### 11. Процедура за анализ

##### 11.1 Ден 1

##### Подготвителни стъпки

- Приготвяне на 1x Wash Buffer TBS: Разредете 1 част 20x Wash Buffer TBS (WB5) с 19 части дейонизирана или дестилирана вода..
- Приготвяне на 1% разтвор на формалдехид: За 100 ml 1% разтвор на формалдехид смесете 2,7 ml 37% безкиселинен формалдехид или 25 ml 10% неутрално буфериран формалин (4% формалдехид) с 10 ml of 10x MgCl<sub>2</sub> (PT4) и 10 ml of 10x PBS (PT5) и регулирайте обема до 100 ml с дейонизирана или дестилирана вода. Разбъркайте добре
- Приготвяне на серия от етанол (разтвори на 70%, 90% и 100% етанол): Разредете 7, 9 и 10 части от 100% етанол съответно с 3, 1 и 0 части дейонизирана или дестилирана вода. Тези разтвори могат да се съхраняват в подходящи съдове и да се използват повторно.
- ZytoLight FISH Probe: Приведете до RT преди употреба, защитете от светлина.

##### Предварителна обработка (протеолиза/постфиксация)

1. Нанесете (на капки) Cytology Pepsin Solution (ES2) върху цитологичната проба и инкубирайте за 10 минути при 37°C в камера с висока влажност.

**ES2 може да образува утайки, които не влияят на качеството.**

В зависимост от множество фактори, напр. естеството и продължителността на фиксирането, както и естеството на клетките, може да се наложи различно време за инкубиране. Препоръчваме време за инкубиране от 5-15 минути за цитологични проби. Като общо правило препоръчваме да се установи оптималното време за протеолиза в предварителни тестове.



- 2. Инкубирайте предметите за 5 минути в 1x Wash Buffer TBS.
- 3. Инкубирайте предметите за 5 минути в 1% Formaldehyde solution.
- 4. Инкубирайте предметите за 5 минути в 1x Wash Buffer TBS.
- 5. Дехидратиране: в 70%, 90% и 100% етанол, всяка за 1 мин.

Изсушете образците на въздух.

Денатурация и хибридизация

- 1. Нанесете с пипета 10 µl от ZytoLight FISH Probe върху всеки предварително обработен образец.

Избягвайте дългото излагане на сондата на светлина.

- 2. Покрийте образците с покривно стъкло с размери 22 mm x 22 mm (избягвайте образуването на мехурчета) и запечатайте покривното стъкло.

Препоръчваме да използвате гумен цимент (напр. *Fixogum Rubber Cement*) за уплътняване.

- 3. Поставете слайдовете върху гореща плоча или хибридизатор и денатурирайте образците за 5 минути при 72°C.
- 4. Преместете предметите в камера за влажност и хибридизирайте за една нощ при 37°C (напр. в пещ за хибридизация).

От съществено значение е цитологичните проби да не изсъхват по време на хибридизацията.

11.2 Ден 2

Подготвителни стъпки

- Cytology Stringency Wash Buffer SSC (WB7): Затопля се предварително до 70°C.
- Cytology Wash Buffer SSC (WB8): Доведете до стайна температура.
- DAPI/DuraTect-Solution (MT7): Доставка на стайна температура преди употреба, защитете от светлина.

Следхибридизация и откриване

- 1. Внимателно отстранете гумения цимент или лепилото.
- 2. Внимателно свалете покривалото.
- 3. Промийте с Cytology Stringency Wash Buffer SSC (WB7) за 2 минути при 70°C.

Cytology Stringency Wash Buffer SSC трябва да е предварително затоплен. Ако е необходимо, проверете с термометър.

Препоръчваме да се използват четири предметни стъкла в буркан за оцветяване. Когато е необходимо, използвайте празни предметни стъкла, за да намалите броя им до четири.

- 4. Измийте, като използвате Cytology Wash Buffer SSC (WB8) за 1 мин. при стайна температура.

Cytology Wash Buffer SSC трябва да е предварително затоплен. Ако е необходимо, проверете с термометър.

- 5. Изсушете пробите на въздух, като ги предпазите от светлина.
- 6. Нанесете с пипета 25 µl DAPI/DuraTect-Solution (MT7) върху предметни стъкла. Избягвайки уловените мехурчета, покрийте пробите с покривно стъкло (24 mm x 60 mm). Инкубирайте на тъмно в продължение на 15 минути.

Използването на отрязан накрайник на пипета, за да се увеличи размерът на отвора, може да улесни процеса на пипетиране. Избягвайте дългото излагане на светлина.

- 7. Съхранявайте слайда на тъмно. За по-дълъг период на съхранение това трябва да става при 2-8°C.
- 8. Оценката на материала на пробата се извършва чрез флуоресцентна микроскопия. Необходими са комплекти филтри за следните диапазони на дължината на вълната:

Флуоресцентно багрило	Възбуждане	Емисии
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. Тълкуване на резултатите

С използването на подходящи филтърни комплекти в интерфази или метафази на нормални клетки или клетки без хромозомни аберации се появяват два сигнала на сонда/флуоресцентен етикет, с изключение на сондите, насочени към X и/или Y хромозомите, което води до липса на два сигнала на сонда/флуоресцентен етикет в зависимост от пола. В клетките с хромозомни аберации може да се види различен модел на сигнала в интерфазите или метафазите. За повече подробности относно интерпретацията на резултатите, моля, направете справка със съответното ръководство за сондата.

13. Препоръчителни процедури за контрол на качеството

Вижте инструкциите за употреба на съответната сонда *ZytoVision*.

14. Работни характеристики

Вижте инструкциите за употреба на съответната сонда *ZytoVision*.

15. Изхвърляне

Изхвърлянето на реагентите трябва да се извършва в съответствие с местните разпоредби.

16. Отстраняване на неизправности

Всяко отклонение от инструкциите за работа може да доведе до по-лоши резултати при оцветяването или до липса на оцветяване. Моля, вижте [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com) за повече информация.

Слаби сигнали или липса на такива

Възможна причина	Действие
Протеолитичната предварителна обработка не е извършена правилно	Оптимизирайте времето за инкубиране на пепсин, ако е необходимо, увеличете или намалете
Изпаряване на сондата	Когато използвате хибридизатор, използването на мокрите ленти/напълнените с вода резервоари е задължително. При използване на пещ за хибридизация е задължително използването на камера за влажност. Освен това покривното стъкло трябва да се запечата напълно, напр. с <i>Fixogum</i> , за да се предотврати изсъхването на пробата по време на хибридизацията
Използвани неподходящи филтърни комплекти	Използвайте филтърни комплекти, подходящи за флуохромите на сондата. <i>Комплектите филтри с тройни ленти осигуряват по-малко светлина в сравнение с комплектите филтри с една или две ленти. Следователно сигналите могат да изглеждат по-слаби, ако се използват тези комплекти от трилентови филтри</i>

Сигнали за кръстосана хибридизация; зашумен фон

Възможна причина	Действие
Твърде силна протеолитична предварителна обработка	Намаляване на времето за инкубиране на пепсин
Слайдове, охладени до стайна температура преди хибридизация	Преместете предметите бързо в 37°C

**Разрушена морфология**

Възможна причина	Действие
Протеолитичната предварителна обработка не е извършена правилно	Оптимизирайте времето за инкубиране на пепсин, ако е необходимо, намалете го
Недостатъчно изсушаване преди нанасяне на сондата	Удължаване на сушенето на въздух

**Слабо контрастно оцветяване**

Възможна причина	Действие
Нискоконтририран разтвор на DAPI	Вместо това използвайте <u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (Прод. № MT-0008-0.8)
Твърде кратко време за инкубиране на DAPI	Регулиране на времето за инкубиране на DAPI

**17. Литература**

- 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. Ревизия**

Ревизия	Описание на промяната
1.2.1	11. Процедура за анализ Добавяне на ZyGreen 2.0


[www.zytovision.com](http://www.zytovision.com)

Моля, вижте [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com) за най-новите инструкции за употреба, както и за инструкции за употреба на различни езици.

Нашите експерти са на разположение, за да отговорят на въпросите ви.

Моля, свържете се с [helptech@zytovision.com](mailto:helptech@zytovision.com)



ZytoVision GmbH  
Fischkai 1  
27572 Bremerhaven/ Германия  
Телефон: +49 471 4832-300  
Факс: +49 471 4832-509  
[www.zytovision.com](http://www.zytovision.com)  
Имейл: [info@zytovision.com](mailto:info@zytovision.com)

**Търговски марки:**

ZytoVision® и ZytoLight® са търговски марки на ZytoVision GmbH.