



**FlexISH-
Tissue Implementation Kit**

REF	Z-2182-5	Σ 5
REF	Z-2182-20	Σ 20

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

4250380N8486



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

1. Предвидена употреба

FlexISH-Tissue Implementation Kit е предназначен да се използва в комбинация със сонди FlexISH върху фиксирани във формалин и вградени в парафин образци 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 хибридизираните 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 FlexISH-Tissue Implementation Kit се предлага в два размера и се състои от:

Код	Компонент	Количество		Контейнер
		20	5	
PT1	Heat Pretreatment Solution Citric	500 ml	150 ml	Бутилка с винтова капачка (голяма)
ES1	Pepsin Solution	4 ml	1 ml	Бутилка с капкомер, бяла капачка
WB10	5x FlexISH Wash Buffer	500 ml	150 ml	Бутилка с винтова капачка (голяма)
MT7	DAPI/DuraTect-Solution	0.8	0.2	Съд за реакция, син капак
	Инструкции за употреба	1	1	

Z-2182-5 (5 tests): Компонентите ES1 и MT7 са достатъчни за 5 реакции. Компонентът WB10 е достатъчен за 3x3 буркана за оцветяване от 70 ml всеки. Компонентът PT1 е достатъчен за 2 буркана за оцветяване от по 70 ml.

Z-2182-20 (20 tests): Компонентите ES1 и MT7 са достатъчни за 20 реакции. Компонентът WB10 е достатъчен за 11x3 буркана за оцветяване от 70 ml всеки each. Компонентът PT1 е достатъчен за 7 буркана за оцветяване от 70 ml всеки.

4. Необходими материали, които не са осигурени

- FlexISH probe
- Положителни и отрицателни контролни образци
- Микроскопски стъкла, положително заредени
- Водна баня (37 °C, 98 °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
- Ксилол
- 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) -или подобен
- Подходящо поддържан флуоресцентен микроскоп (400-1000x)
- Масло за потапяне, одобрено за флуоресцентна микроскопия
- Подходящи филтърни комплекти

5. Съхранение и обработка

Съхранявайте при температура 2-8 °C в изправено положение. Върнете при 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.
- Разтворът 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 с помощта на светлоустойчиви съдове!

Специално етикетиране на ES1:

EUN208	Съдържа Pepsin A. Може да предизвика алергична реакция.
EUN210	Информационен лист за безопасност ще бъде представен при поискване.

Предупреждения за опасност и предпазни мерки за PT1 и WB10:

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. Пречещи вещества

Кръвните клетки, намиращи се в пробата, могат да проявят автофлуоресценция, която пречи на разпознаването на сигнала.

Следните фиксатори са несъвместими с ISH:

- Фиксатив на Bouin
- Фиксатор B5
- Киселинни фиксатори (напр. пикринова киселина)
- Фиксатив на Zenker
- Алкохоли (когато се използват самостоятелно)
- Живачен хлорид
- Формалдехид/цинков фиксатор
- Фиксаторът на Оланд
- Небуферизиран формалин

9. Подготовка на образци

Препоръки:

- Фиксиране в 10% неутрално буферизиран формалин за 24 часа при стайна температура (18-25°C).
- Размер на извадката $\leq 0,5 \text{ cm}^3$.
- Използвайте висококачествен парафин.
- Вграждането трябва да се извършва при температури, по-ниски от 65°C.
- Подгответе 2-4 μm микротомни разрези.
- Използвайте положително заредени микроскопски стъкла.
- Фиксирайте за 2-16 часа при 50-60°C.

10. Подготвителна обработка на устройството

5x FlexISH Wash Buffer (WB10) трябва да се обработи предварително съгласно инструкциите в точка 11. "Процедура за анализ". 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 две серии етанол (70%, 90% и 100% разтвори на етанол): Разрежете 100% етанол с дейонизирана или дестилирана вода. Тези разтвори могат да се съхраняват в подходящи контейнери и могат да се използват повторно за до 160 предметни стъкла.
- Heat Pretreatment Solution Citric (PT1): Напълнете буркан за оцветяване и загрейте до 98°C.
- RexISH Probe: Доведете до стайна температура преди употреба, защитете от светлина. Преди да отворите флакона, разбъркайте с вортекс и завъртете за кратко



Предварителна обработка (обезпаразитяване/протеолиза)

- 1. Инкубирайте предметите за 2 пъти по 5 минути в ксилол.
- 2. Инкубирайте в 100 %, 100 %, 90 % и 70 % етанол, всеки за 2 мин.
- 3. Промийте 2 пъти по 2 минути в дейонизирана или дестилирана вода.
- 4. Инкубирайте за 20 минути в предварително затоплен Heat Pretreatment Solution Citric (PT1) при 98°C.

Препоръчваме да не се използват повече от осем предметни стъкла за един буркан за оцветяване. След потапянето на предметни стъкла проверете температурата на разтвора за термична предварителна обработка *Citric* в буркана и започнете работа веднага щом температурата на разтвора достигне поне 95°C.

- 5. Незабавно прехвърлете предметни стъкла в дейонизирана или дестилирана вода, промийте ги за 2 пъти по 2 минути и отцедете водата или я забършете.
- 6. Нанесете (на капки) Pepsin Solution (ES1) върху образците и ги инкубирайте за 15 минути при 37°C в камера с висока влажност.

ES1 може да образува утайки, които не влияят на качеството.

В зависимост от множество фактори, напр. естеството и продължителността на фиксиране, дебелината на разрезите и естеството на образците, може да се наложи различно време за инкубиране. Като насока за инкубация препоръчваме време за инкубация от 2 до 30 мин. Като общо правило препоръчваме да се установи оптималното време за протеолиза в предварителни тестове.

- 7. Промийте 2 пъти по 2 минути в дейонизирана или дестилирана вода.
- 8. Дехидратиране: в 70%, 90% и 100% етанол, всяка за 1 мин.
- 9. Изсушете участъците на въздух.

Уверете се, че участъците са напълно сухи преди прилагането на сондата, тъй като остатъчната влага може да намали интензитета на сигнала и/или да повлияе на морфологията на образеца.

Денатурация и хибридизация

- 1. Нанесете с пипета 10 µl от FlexISH 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 ви да използвате гумен цимент (напр. *Fixogum*) за уплътняване.

- 3. Поставете предметни стъкла върху гореща плоча или хибридизатор и денатурирайте образците за 10 минути при 75°C.
- 4. Извършете хибридизация за 2 часа до 16 часа (т.е. за една нощ) при 37°C, като прехвърлите предметите в хибридизатор или в камера за влажност и пещ за хибридизация.

Важно е образците да не изсъхват по време на хибридизацията.

11.2 Ден 1 или Ден 2

Подготвителни стъпки

- 1. Приготвяне на 1x FlexISH Wash Buffer: Разрежете 1 част 5x FlexISH Wash Buffer (WB10) с 4 части дейонизирана или дестилирана вода. Напълнете три буркана за оцветяване с 1x FlexISH Wash Buffer, предварително затоплете един буркан до 72 °C и дръжте два буркана на стайна температура.
- 2. DAPI/DuraTect-Solution (MT7): Доставете на стайна температура преди употреба, защитете от светлина.

Следхибридизация и откриване

- 1. Внимателно отстранете гумения цимент или лепилото.
- 2. Отстранете покривните стъкла, като ги потопите в 1x FlexISH Wash Buffer при стайна температура за 1-2 мин.

За да се улесни отстраняването на покривното стъкло, тази стъпка може да се извърши и за 2 минути при 37°C.

- 3. Измийте с помощта на 1x FlexISH Wash Buffer за 10 минути при 72°C.

1x FlexISH Wash Buffer трябва да е предварително затоплен. Проверете с термометър, ако е необходимо. Не използвайте повече от осем предметни стъкла за един буркан за оцветяване

- 4. Измийте с помощта на 1x FlexISH Wash Buffer за 3 минути при стайна температура.
- 5. Инкубирайте стъклата в 70%, 90% и 100% етанол, всяко за 1 мин.
- 6. Изсушете пробите на въздух, като ги предпазите от светлина.
- 7. Нанесете с пипета 25 µl DAPI/DuraTect-Solution (MT7) върху предметни стъкла. Избягвайте задържането на 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.

- 8. Съхранявайте диапозитивите на тъмно. За по-дълъг период на съхранение това трябва да става при 2-8°C.
- 9. 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 за повече информация.

Слаби сигнали или липса на такива

Възможна причина	Действие
Образецът не е правилно фиксиран	Оптимизиране на времето за фиксиране и фиксатора
Протеолитичната предварителна обработка не е извършена правилно	Оптимизирайте времето за инкубиране на пепсин, ако е необходимо, увеличете или намалете



Изпаряване на сондата	Когато използвате хибризатор, 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 Fixogum, 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 тройна лента 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
Непълно обезпаразитяване	Използвайте пресни разтвори; проверете продължителността на депарафинирането
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
Образецът не е правилно фиксиран	Оптимизиране на времето за фиксиране и фиксатора
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

Припокриващи се ядра

Възможна причина	Действие
Неподходяща дебелина на тъканните разрези	Подготвяне на 2-4 µm микротомни разрези

Образците се издигат извън предметно стъкло

Възможна причина	Действие
Твърде силна протеолитична предварителна обработка	Намаляване на времето за инкубиране на пепсин

Слабо контрастно оцветяване

Възможна причина	Действие
Нискоконцентриран 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

Моля, вижте 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



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

Търговски марки:
ZytoVision® и F/exlSH® са търговски марки на ZytoVision GmbH.