



**FlexISH-
Tissue Implementation Kit**

REF	Z-2182-5		5
REF	Z-2182-20		20

Pro použití při fluorescenční in situ hybridizaci (FISH)

4250380N8486



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

1. Zamýšlené použití

Sada *FlexISH-Tissue Implementation Kit* je určena k použití v kombinaci se sondami *FlexISH* na vzorcích fixovaných formalínem a zalitých do parafínu 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 *FlexISH-Tissue Implementation Kit* je k dispozici ve dvou velikostech a skládá se z:

Kód	Komponenta	Množství		Kontejner
		20	5	
PT1	<u>Heat Pretreatment Solution Citric</u>	500 ml	150 ml	Láhev se šroubovacím uzávěrem (velká)
ES1	<u>Pepsin Solution</u>	4 ml	1 ml	Lahvička s kapátkem, bílá čepice
WB10	<u>5x FlexISH Wash Buffer</u>	500 ml	150 ml	Láhev se šroubovacím uzávěrem (velká)
MT7	<u>DAPI/DuraTect-Solution</u>	0.8	0.2	Reakční nádoba, modré víko
	Návod k použití	1	1	

Z-2182-5 (5 testů): Složky **ES1** a **MT7** postačují pro 5 reakcí. Složka **WB10** vystačí na 3x 3 barvicí nádoby po 70 ml. Složka **PT1** vystačí na 2 barvicí nádoby po 70 ml.

Z-2182-20 (20 testů): Složky **ES1** a **MT7** postačují pro 20 reakcí. Složka **WB10** vystačí na 11x 3 barvicí nádoby po 70 ml. Složka **PT1** vystačí na 7 barvicích sklenic po 70 ml.

4. Požadované, ale neposkytované materiály

- FlexISH probe
- Pozitivní a negativní kontrolní vzorky
- Mikroskopická sklíčka, kladně nabitá
- Vodní lázeň (37 °C, 98 °C)
- Horká deska nebo hybridizátor
- Vlhkostní komora + hybridizační pec nebo hybridizátor
- Nastavitelné pipety (10 µl, 30 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)
- Přýžový cement, např. Fixogum Rubber Cement (Prod. No. 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. 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 výrobci a při íslušnému 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 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 a WB10:

Složka určující nebezpečí je směsicí: 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 popsaných v návodu k použití při islušné 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

Krevní buňky přítomné ve vzorku mohou vykazovat autofluorescenci, která brání rozpoznání signálu.

Následující fixativa jsou s ISH neslučitelná:

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

9. Příprava vzorků

Doporučení:

- Fixace v 10% neutrálně pufovaném 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 zařízení

5x FlexISH Wash Buffer (WB10) je třeba předem upravit podle pokynů v bodě 11. "Postup testu". Všechna ostatní činidla soupravy jsou připravena k použití. Není nutná rekonstituce, míchání ani ředění.

11. Postup analýzy

11.1 Den1

Přípravné kroky

1. *Příprava dvou sérií ethanolu (70%, 90% a 100% roztok ethanolu):* Zředte 100% ethanol deionizovanou nebo destilovanou vodou. Tyto roztoky lze uchovávat ve vhodných nádobách a lze je opakovaně použít až pro 160 sklíček.
2. *Heat Pretreatment Solution Citric (PT1):* Naplňte barvicí nádobu a zahřejte ji na 98 °C.
3. *FlexISH Probe:* Chraňte před světlem. Před otevřením lahvičky promíchejte vortexováním a krátce roztočte.

Předúprava (odvoskování/proteolýza)

1. Inkubujte sklíčka 2x 5 minut v xyleny.
2. Inkubujte ve 100%, 100%, 90% a 70% ethanolu, vždy po dobu 2 min.
3. Promývejte 2x 2 minuty v deionizované nebo destilované vodě.
4. Inkubujte 20 minut v předehřátém Heat Pretreatment Solution Citric (PT1) při 98°C.

Doporučujeme nepoužívat více než osm sklíček na jednu barvicí nádobku. Po ponoření sklíček zkontrolujte teplotu Heat Pretreatment Solution Citric uvnitř nádoby a začněte časovat, jakmile teplota roztoku dosáhne alespoň 95 °C

5. Sklíčka ihned přeneste do deionizované nebo destilované vody, promývejte 2x 2 minuty a vodu slijte nebo odmažte.
6. 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.

V závislosti na více faktorech, např. na povaze a délce fixace, tloušťce řezů a povaze vzorků, může být vyžadována různá doba inkubace. Jako vodítko pro inkubaci doporučujeme inkubační dobu 2-30 min. Obecně doporučujeme zjistit optimální dobu pro proteolýzu v předběžných testech.

- 7. Promývejte 2x 2 minuty v deionizované nebo destilované vodě.
 - 8. Dehydratace: v 70%, 90% a 100% ethanolu, vždy po dobu 1 min.
 - 9. Vzduchem vysušené části.
- Před aplikací sondy se ujistěte, že jsou řezy zcela suché, protože zbytková vlhkost může snížit intenzitu signálu a/nebo ovlivnit morfologii vzorku.

Denaturace a hybridizace

- 1. Na každý předem ošetřený vzorek napipetujte 10 µl FlexISH 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).*
 - 3. Umístěte sklíčka na horkou desku nebo hybridizátor a denaturujte vzorky po dobu 10 minut při 75 °C.
 - 4. Proveďte hybridizaci po dobu 2 h až 16 h (tj. přes noc) při 37 °C přenesením sklíček do hybridizátoru nebo do vlhké komory a hybridizační pece.
- Je důležité, aby vzorky během hybridizace nevyschly.*

11.2 Den 1 nebo den 2

Přípravné kroky

- 1. Příprava 1x FlexISH Wash Buffer: 1 díl 5x FlexISH Wash Buffer (WB10) se 4 díly deionizované nebo destilované vody. Naplňte tři barvicí nádoby 1x FlexISH Wash Buffer, jednu nádobku předehejte na 72 °C a dvě nádoby uchovávejte při pokojové teplotě.
- 2. DAPI/DuraTect-Solution (MT7): Před použitím uveďte do pokojové teploty, chraňte před světlem.

Následná hybridizace a detekce

- 1. Opatrně odstraňte gumový tmel nebo lepidlo.
 - 2. Krycí sklíčka odstraňte ponořením do 1x FlexISH Wash Buffer při pokojové teplotě na 1-2 minuty. *Pro usnadnění odstranění krycího sklíčka lze tento krok alternativně provádět po dobu 2 minut při 37 °C.*
 - 3. Promývejte pomocí 1x FlexISH Wash Buffer po dobu 10 minut při 72°C. *1x FlexISH Wash Buffer by měl být předem zahřátý. V případě potřeby zkontrolujte teploměrem. Na jednu barvicí nádobku nepoužívejte více než osm sklíček*
 - 4. Promývejte pomocí 1x FlexISH Wash Buffer po dobu 3 minut při pokojové teplotě.
 - 5. Sklíčka inkubujte v 70%, 90% a 100% etanolu vždy po dobu 1 minuty.
 - 6. Vzorky sušte na vzduchu chráněné před světlem.
 - 7. Na sklíčka napipetujte 25 µl DAPI/DuraTect-Solution (MT7). Vzorky zakryjte krycím sklíčkem (24 mm x 60 mm), abyste se vyhnuli zachycení bublin. Inkubujte ve tmě po dobu 15 minut.
- Použití pipetovací špičky, která byla seřiznuta, aby se zvětšil otvor, může usnadnit pipetování. Vyhněte se dlouhému působení světla.
- 8. Sklíčka skladujte v temnu. Při delším skladování by se měly uchovávat při teplotě 2-8 °C.
 - 9. 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 nebyl řádně upevněn	Optimalizace doby fixace a fixačního prostředku
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. <i>Sady třípásmových filtrů poskytují méně světla ve srovnání se sadami jednopásmových nebo dvoupásmových filtrů. V důsledku toho se signály při použití těchto sad třípásmových filtrů mohou jevit slabší.</i>

Křížové hybridizační signály; rušivé pozadí

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

Zhoršená morfologie

Možná příčina	Akce
Vzorek nebyl řádně upevněn	Optimalizace doby fixace a fixačního prostředku
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 skříčky

Possible cause	Action
Příliš silná proteolytická předúprava	Zkrácení inkubační doby pepsinu

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 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 F/exlSH® jsou ochranné známky společnosti ZytoVision GmbH.