



**ZytoLight**

## FISH-Cytology Implementation Kit

REF Z-2099-20

Σ 20

Fluoreszcens *in situ* hibridizációs (FISH) eljárásokban való felhasználásra

4250380N727X



*In vitro* diagnosztikai orvosi eszköz

IVDR (EU) 2017/746 szerint

### 1. Javasolt alkalmazás

A **ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit** a **ZytoLight FISH** próbákkal kombinálva, fluoreszcens *in situ* hibridizációval (FISH) történő citológiai mintákon történő felhasználásra szolgál.

A termék kizárólag professzionális használatra készült. A termékkel végzett valamennyi vizsgálatot minősített, engedéllyel rendelkező anatómiai patológiai laboratóriumban, patológus/humángenetikus felügyelete mellett, szakképzett személyzetnek kell elvégeznie.

### 2. A vizsgálat elve

A fluoreszcens *in situ* hibridizációs (FISH) technika lehetővé teszi specifikus nukleinsav-szekvenciák kimutatását és vizualizálását sejtkezítményekben. A fluoreszcensen jelölt DNS-törödékek, az úgynevezett FISH-szondák és a preparátumokban lévő komplementer cél-DNS-szálak együttesen denaturálódnak, majd a hibridizáció során hagyják, hogy a DNS-törödékek egymáshoz kapcsolódjanak. Ezt követően a nem specifikus és nem kötött szondafragmentumokat szigorú mosási lépésekkel távolítják el. A DNS DAPI-val történő ellenfestése után a hibridizált szondafragmentumokat fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizualizáljuk, amely olyan gerjesztő és emissziós szűrőkkel van felszerelve, amelyek specifikusak azokra a fluorokrómokra, amelyekkel a FISH-szondafragmentumokat közvetlenül jelölték.

### 3. Rendelkezésre bocsátott reagensek

A **ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit** egy méretben kapható, és a következőkből áll:

| Kód: | Komponens                                  | Mennyiség | Konténer                           |
|------|--------------------------------------------|-----------|------------------------------------|
|      |                                            | Σ 20      |                                    |
| ES2  | <u>Cytology Pepsin Solution</u>            | 4 ml      | Cseppentős üveg, átlátszó kupakkal |
| WB5  | <u>20x Wash Buffer TBS</u>                 | 50 ml     | Csavaros kupakos üveg              |
| PT4  | <u>10x MgCl<sub>2</sub></u>                | 50 ml     | Csavaros kupakos üveg              |
| PT5  | <u>10x PBS</u>                             | 50 ml     | Csavaros kupakos üveg              |
| WB7  | <u>Cytology Stringency Wash Buffer SSC</u> | 500 ml    | Csavaros kupakos üveg (nagy)       |
| WB8  | <u>Cytology Wash Buffer SSC</u>            | 500 ml    | Csavaros kupakos üveg (nagy)       |
| MT7  | <u>DAPI/DuraTect-Solution</u>              | 0.8 ml    | Reakcióedény, kék fedéllel         |
|      | Használati utasítás                        | 1         |                                    |

**Z-2099-20 (20 + vizsgálat):** Az **ES2** és **MT7** komponensek 20 reakcióhoz elegendőek. A **PT4**, **PT5**, **WB7** és **WB8** komponensek 7 darab, egyenként 70 ml-es festőedényhez elegendőek. A **WB5** komponens 14 darab, egyenként 70 ml-es festőedényhez elegendő.

### 4. Szükséges, de nem biztosított anyagok

- **ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit** (Prod. No. Z-2099-20)
- Pozitív és negatív kontrollminták
- Mikroszkópos tárgylemezek, bevonat nélküli
- Vízfürdő (70 °C)
- Hibridizáló vagy főzőlap
- Hibridizáló vagy páraakma a hibridizációs kemencében
- Állítható pipetták (10 µl, 25 µl)
- Festőedények vagy fürdők
- Időzítő
- Kalibrált hőmérő
- Etanol vagy reagens alkohol
- 37%-os formaldehid, savmentes, vagy 10%-os formalin, semlegesen puffereelve
- 2x sóoldat-nátrium-citrát (SSC), pl. 20x SSC Solution (Prod. No. WB-0003-50)
- Deionizált vagy desztillált víz
- fedőlemezek (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Gumicement, pl. Fixogum Rubber Cement (Prod. No.E-4005-50/-125) vagy hasonló.
- Megfelelően karbantartott fluoreszcens mikroszkóp (400-1000x)
- Fluoreszcens mikroszkópiához jóváhagyott merülőolaj
- Megfelelő szűrőkészletek

### 5. Tárolás és kezelés

Tárolása 2-8 °C-on, függőleges helyzetben. Felhasználást követően azonnal a tárolási feltételek alkalmazandóak. Ne használja a reagenseket a címkén feltüntetett lejárati időn túl. A termék a címkén feltüntetett lejárati ideig őrzi meg stabilitását megfelelően kezelés mellett.

### 6. Figyelmeztetések és óvintézkedések

- Használat előtt olvassa el a használati utasítást!
- Ne használja a reagenseket a lejárati idő letelte után!
- Ez a termék olyan anyagokat tartalmaz (kis koncentrációban és térfogatban), amelyek az egészségre károsak és potenciálisan fertőzőek. Kerülje a közvetlen érintkezést a reagensekkel. Tegyen megfelelő védőintézkedéseket (használgon eldobható kesztyűt, védőszemüveget és laboratóriumi öltözetet)!

- Jelentsen a gyártónak és az illetékes hatóságnak a termékkel kapcsolatban minden súlyos eseményt a helyi előírásoknak megfelelően!
- Ha a reagens bőrrel érintkezik, azonnal öblítse le bő vízzel!
- Foglalkozásszerű felhasználók részére igény esetén anyagbiztonsági adatlapot biztosítunk.
- Ne használja fel újra a termékeket, kivéve, ha az újrafelhasználás kifejezetten engedélyezett!
- A minták keresztzennyeződését kerülni kell, mert ez hibás eredményhez vezethet.
- A hibridizáció és a mosás során a mintákat nem szabad kiszárítani.
- A DAPI/DuraTect-Solution (MT7) nem szabad hosszabb ideig fénynek, különösen erős fénynek kitenni, azaz minden lépést lehetőség szerint sötétben és/vagy fényálló edényben kell elvégezni!

#### Az ES1 speciális címkézése:

EUH210 Kérésre biztonsági adatlap kapható.  
A keverék < 20 %-a ismeretlen akut toxicitású (belélegezve) összetevő(ke)t tartalmaz.

#### Veszély- és óvintézkedési nyilatkozatok az PT1, WB1 és WB2 esetében:

A veszélyt meghatározó komponens a reakciótömeg: EK-szám: 247-500-7] és 2-metil-2H-izotiazol-3-on [EK-szám: 220-239-6] (3:1).



#### Figyelem

|           |                                                                                  |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------|
| H317      | Allergiás bőrreakciót válthat ki.                                                |
| P261      | Kerülje a por/füst/gáz/köd/gőzök/permet belélegzését.                            |
| P272      | Szennyezett munkaruhát tilos kivinni a munkahely területéről.                    |
| P280      | Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő/hallásvédelem/... használata kötelező.     |
| P302+P352 | HA BŐRRE KERÜL: Lemosás bő vízzel                                                |
| P333+P313 | Bőrirritáció vagy kiütések megjelenése esetén: orvosi ellátást kell kérni.       |
| P362+P364 | A szennyezett ruhadarabot le kell vetni és újbóli használat előtt ki kell mosni. |

#### Veszély- és óvintézkedési nyilatkozatok az MT7 esetében:

Ez a próba az 1272/2008/EK rendelet szerint nem minősül veszélyesnek.

#### 7. Korlátozások

- *In vitro* diagnosztikai használatra.
- Csak szakképzett felhasználók részére.
- Csak nem-automatizált használatra.
- Bármely pozitív festődés vagy annak hiánya esetén, a klinikai interpretációt a klinikai anamnézis, a morfológia, az egyéb kórszövettani kritériumok, valamint az egyéb diagnosztikai tesztek összefüggésében kell elvégezni. A szakképzett patológus/humángenetikus felelőssége, hogy ismerje az ISH-próbákat, reagenseket, diagnosztikai paneleket és a festett készítmény előállításához használt módszereket. A festést minősített, engedéllyel rendelkező laboratóriumban kell elvégezni patológus/humángenetikus felügyelete mellett, aki a festett tárgylemezek áttekintéséért és a pozitív és negatív kontrollok biztosításáért is felelős.
- A minta festése, különösen a jelintenzitás és a háttérfestés erőssége a festést megelőző mintakezeléstől és feldolgozástól függ. A minta nem megfelelő fixálása, fagyasztása, felolvasztása, mosása, szárítása, melegítése, metszése vagy más mintákkal és folyadékokkal való keresztzennyezése műtermékek vagy hamis eredmények kialakulásához vezethet. Ellentmondó eredmények eredhetnek a minta rögzítési és beágyazási eltéréseiből, valamint magában a mintában rejlő egyenlőtlen feltételekből.

- A teljesítmény érvényesítése a jelen használati útmutatóban leírt eljárásokkal történt. Ezen eljárások módosítása megváltoztathatja a teljesítményt, és ezeket a felhasználónak ellenőriznie kell. Ez az IVD csak akkor rendelkezik CE-tanúsítvánnyal, ha az ebben az útmutatóban leírtak szerint használják, a rendeltetésszerű használat keretein belül.

#### 8. Interferenciát kiváltó anyagok

A mintában lévő vörösvértestek autofluoreszcenciát mutathatnak, ami akadályozza a jelfelismerést.

#### 9. A minták előkészítése

A tárgylemezeket közvetlenül a proteolízis előtt 2 percig inkubálja 2x SSC oldatban 73°C-on az öregítéshez.

*Alternatív megoldásként a minták öregítése elvégezhető a minták egy éjszakán át (12-16 óra) 37°C-on történő inkubálásával.*

#### 10. A reagens előkészítése

A 20x Wash Buffer TBS (WB5), 10x MgCl<sub>2</sub> (PT4), és 10x PBS (PT5) előkészítését a 11. pontban leírtak szerint kell elvégezni. „A vizsgálati eljárás” (Vizsgálati eljárás). A (PT4) és (PT5) komponensek 2-8 °C-on csapadékok képezhetnek. Szükség esetén a felhasználás előtt 10 percig melegítse 37°C-ra, amíg a csapadékok teljesen feloldódnak. Az összes többi reagens készlet felhasználásra kész. Nincs szükség rekonstitúcióra, keverésre vagy hígításra.

#### 11. Vizsgálati eljárás

##### 11.1 1. nap

##### Előkészítő lépések

- 1x Wash Buffer TBS elkészítése: Hígítsunk 1 részt 20x Wash Buffer TBS (WB5) 19 rész deionizált vagy desztillált vízzel.
- 1%-os formaldehid oldat készítése: 100 ml 1%-os formaldehid oldathoz keverjünk össze 2,7 ml 37%-os savmentes formaldehidet vagy 25 ml semlegesítő pufferelt formalin (4%-os formaldehid) 10 ml 10x MgCl<sub>2</sub> (PT4) és 10 ml 10x PBS (PT5) oldattal, és állítsuk be a térfogatot 100 ml-re deionizált vagy desztillált vízzel. Alaposan keverjük össze.
- Etanol-sorozat készítése (70%-os, 90%-os és 100%-os etanolos oldatok): Hígítsunk 7, 9 és 10 rész 100%-os etanolt 3, 1 és 0 rész ionmentesített vagy desztillált vízzel. Ezek az oldatok megfelelő tartályokban tárolhatók és újra felhasználhatók.

##### Előkezelés (proteolízis/utó-fixálás)

1. Vigyen fel (cseppenként) Cytology Pepsin Solution (ES2) a citológiai mintára, és inkubálja 10 percig 37°C-on, párakamrában.  
*Az ES2 csapadékok képezhet, amely nem befolyásolja a minőséget.*  
Több tényezőtől, pl. a rögzítés jellegétől és időtartamától, valamint a sejtek jellegétől függően különböző inkubációs időkre lehet szükség. A citológiai minták esetében 5-15 perces inkubációs időt ajánlunk. Általános szabályként javasoljuk, hogy a proteolízis optimális idejét előzetes vizsgálatok során állapítsa meg.
2. Inkubálja a tárgylemezeket 5 percig 1x Wash Buffer TBS-ben.
3. Inkubálja a tárgylemezeket 5 percig 1% Formaldehyde solution.
4. Inkubálja a tárgylemezeket 5 percig 1x Wash Buffer TBS-ben.
5. Dehidratálás: 70%-os, 90%-os és 100%-os etanolban, egyenként 1 percig.

Légszáraz minták.

##### Denaturáció és hibridizáció

1. Pipetázzon 10 µl ZytoLight FISH Probe-t minden előkezelt mintára.

Kerülje a szonda hosszú ideig tartó fényhatását.

2. Fedje le a mintákat egy 22 mm x 22 mm-es fedőlappal (kerülje el a beszorult buborékokat), és zárja le a fedőlapot.

A tömítéshez gumicement (pl. Fixogum Rubber Cement) használatát javasoljuk.

3. Helyezze a tárgylemezeket forró lemezre vagy hibridizátorra, és denaturálja a mintákat 5 percig 72°C-on.

4. Helyezze át a tárgylemezeket egy páraakarába, és hibridizáljon egy éjszakán át 37 °C-on (pl. hibridizációs kemencében).

Alapvető fontosságú, hogy a citológiai minták ne száradjanak ki a hibridizációs lépés során.

## 11.2 2. nap

### Előkészítő lépések

- Cytology Stringency Wash Buffer SSC (WB7): Előmelegítés 70°C-ra.
- Cytology Wash Buffer SSC (WB8): Hozza szobahőmérsékletre.
- DAPI/DuraTect-Solution (MT7): Használat előtt hozza szobahőmérsékletre, védje a fénytől.

### Hibridizálás és kimutatás

1. Óvatosan távolítsa el a gumibetétet vagy a ragasztót.
2. Óvatosan távolítsa el a fedőlapot.
3. Mossuk a Cytology Stringency Wash Buffer SSC (WB7) pufferrel 2 percig 70°C-on.

A Cytology Stringency Wash Buffer SSC elő kell melegíteni. Szükség esetén hőmérővel ellenőrizze.

Javasoljuk, hogy festőedényenként négy tárgylemezt használjon. Szükség esetén használjon üres tárgylemezeket, hogy a számot négyre állítsa be.

4. Mossuk a Cytology Wash Buffer SSC (WB8) 1 percig szobahőmérsékleten.

Az Cytology Wash Buffer SSC elő kell melegíteni szobahőmérsékletre. Szükség esetén hőmérővel ellenőrizze.

5. A mintákat fénytől védve szárítsa meg a levegőn.
6. Pipetázzon 25 µl DAPI/DuraTect-Solution (MT7) a tárgylemezekre. A beszorult buborékok elkerülése érdekében fedjük le a mintákat fedőlemezzel (24 mm x 60 mm). Inkubáljuk sötétben 15 percig.

A nyílás méretének növelése érdekében levágott pipettahegy használata megkönnyítheti a pipetázási folyamatot. Kerülje a hosszú fényhatást.

7. Tárolja a diát sötétben. Hosszabb tárolás esetén ezt 2-8 °C-on kell végezni.
8. A mintaanyag értékelése fluoreszcens mikroszkópiával történik. A következő hullámhossz-tartományokhoz szükséges szűrőkészletekre van szükség:

| Fluoreszkáló festék | Gerjesztés | Kibocsátás |
|---------------------|------------|------------|
| 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. Az eredmények kiértékelése

Megfelelő szűrőkészletek alkalmazásával normál sejtek vagy kromoszóma-rendellenességeket nem mutató sejtek interfázisaiban vagy metafázisaiban szondaként/fluoreszcens jelölésenként két jel jelenik meg, kivéve az X és/vagy Y kromoszómákat célzó szondákat, amelyek esetében nemtől függően szondaként/fluoreszcens jelölésenként egy-két jel nem jelenik meg. A kromoszóma-aberrációkkal rendelkező sejtekben az interfázisokban vagy metafázisokban eltérő jelmintázat látható. Az eredmények értelmezésével kapcsolatos további részletekért kérjük, olvassa el a megfelelő szonda kézikönyvét.

## 13. Ajánlott minőségellenőrzési eljárások

Olvassa el a megfelelő ZytoVision próba használati utasítását.

## 14. Teljesítményjellemzők

Olvassa el a megfelelő ZytoVision próba használati utasítását.

## 15. Eltávolítás

A reagensek hulladékként történő elhelyezését az országos szabályozásokkal összhangban kell elvégezni.

## 16. Hibaelhárítás

A kezelési utasításoktól való bármilyen eltérés rosszabb festési eredményhez vagy egyáltalán nem festéshez vezethet. További információkért kérjük, olvassa el a [www.zytovision.com/honlapot](http://www.zytovision.com/honlapot).

### Gyenge jelek vagy egyáltalán nincs jel

| Lehetséges ok                                    | Javasolt teendő                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Nem megfelelően végzett proteolitikus előkezelés | Optimalizálja a pepszin inkubációs idejét, szükség esetén növelje vagy csökkentse azt.                                                                                                                                                                                                              |
| Próba párolgás                                   | A hibridizáló használata esetén a nedves csíkok/vízzel töltött tartályok használata kötelező. Hibridizáló kemence használata esetén a páraakára használata kötelező. Ezenkívül a fedőlemezt teljesen le kell zárni, pl. Fixogummal, hogy megakadályozzuk a minta kiszáradását a hibridizáció során. |
| Nem megfelelő szűrőkészletek használata          | Használjon a próba fluorokrómjainak megfelelő szűrőkészleteket. A háromszoros sávszűrő-készletek kevesebb fényt biztosítanak az egy- vagy kétsávszűrő-készletekhez képest. Következésképpen a jelek halványabbnak tűnhetnek e háromsávos szűrőkészletek használatával.                              |

### Kereszt hibridizációs jelek; zajos háttér

| Lehetséges ok                                                       | Javasolt teendő                                |
|---------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Túl erős proteolitikus előkezelés                                   | Csökkentse a pepszin inkubációs idejét         |
| A tárgylemezeket hibridizáció előtt szobahőmérsékletre kell hűteni. | A tárgylemezeket gyorsan helyezzük át 37 °C-ra |

### Morfológia romlott

| Lehetséges ok                                    | Javasolt teendő                                                           |
|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| Nem megfelelően végzett proteolitikus előkezelés | Optimalizálja a pepszin inkubációs idejét, szükség esetén csökkentse azt. |
| Elégtelen szárítás a próba felhelyezése előtt    | Lég szárítás meghosszabbítása                                             |

### Gyenge ellenfesték

| Lehetséges ok                      | Javasolt teendő                                                                    |
|------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Alacsony koncentrációjú DAPI-oldat | Használjon helyette <u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (Prod. No. MT-0008-0.8). |
| Túl rövid DAPI inkubációs idő      | A DAPI inkubációs idő beállítása                                                   |

## 17. Irodalom

- 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. Felülvizsgálat

| Felülvizsgálat | A változás leírása                              |
|----------------|-------------------------------------------------|
| 1.2.1          | 11. Vizsgálati eljárás<br>ZyGreen 2.0 hozzáadva |



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

Kérjük, látogasson el [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com) weboldalra a legfrissebb használati utasításokért, valamint a különböző nyelvű használati utasításokért.

Szakembereink készséggel válaszolnak kérdéseikre.  
Vegye fel velünk a kapcsolatot a [helptech@zytovision.com](mailto:helptech@zytovision.com) címen.



ZytoVision GmbH  
Fischkai 1  
27572 Bremerhaven/ Németország  
Phone: +49 471 4832-300  
Fax: +49 471 4832-509  
[www.zytovision.com](http://www.zytovision.com)  
Email: [info@zytovision.com](mailto:info@zytovision.com)

### Védjegy:

A ZytoVision® és a ZytoLight® a ZytoVision GmbH védjegyei.