



## ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit

REF Z-2099-20

Σ 20

Na použitie pri fluorescenčnej *in situ* hybridizácii (FISH)

4250380N727X



Diagnostická zdravotnícka pomôcka in vitro  
podľa IVDR (EÚ) 2017/746

### 1. Zamýšľané použitie

Súprava ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit je určená na použitie v kombinácii so sondami ZytoLight FISH na cytologických vzorkách pomocou fluorescenčnej *in situ* hybridizácie (FISH).

Výrobok je určený len na profesionálne použitie. Všetky testy s použitím výrobku by mal vykonávať kvalifikovaný personál v certifikovanom, licencovanom laboratóriu anatomickej patológie pod dohľadom patológa/humánneho genetika.

### 2. Princíp testu

Technika fluorescenčnej *in situ* hybridizácie (FISH) umožňuje detekciu a vizualizáciu špecifických sekvencií nukleových kyselín v bunkových preparátoch. Fluorescenčne označené fragmenty DNA, tzv. sondy FISH, a ich komplementárne cieľové reťazce DNA v preparátoch sa počas hybridizácie spoločne kodenaturujú a následne nechajú hybridizovať. Potom sa nešpecifické a nenaviazané fragmenty sond odstránia premytím. Po kontrastnom farbení DNA pomocou DAPI sa hybridizované fragmenty sond vizualizujú pomocou fluorescenčného mikroskopu vybaveného excitačnými a emisnými filtermi špecifickými pre fluorochrómy, ktorými boli fragmenty sond FISH priamo označené.

### 3. Poskytnuté činidlá

ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit je k dispozícii v jednej veľkosti a pozostáva z:

Kód	Komponent	Množstvo	Kontajner
		Σ 20	
ES2	<u>Cytology Pepsin Solution</u>	4 ml	Sklenená fľaša, priehľadný uzáver
WB5	<u>20x Wash Buffer TBS</u>	50 ml	Fľaša so skrutkovacím uzáverom
PT4	<u>10x MgCl<sub>2</sub></u>	50 ml	Fľaša so skrutkovacím uzáverom
PT5	<u>10x PBS</u>	50 ml	Fľaša so skrutkovacím uzáverom
WB7	<u>Cytology Stringency Wash Buffer SSC</u>	500 ml	Fľaša so skrutkovacím uzáverom (veľká)
WB8	<u>Cytology Wash Buffer SSC</u>	500 ml	Fľaša so skrutkovacím uzáverom (veľká)
MT7	<u>DAPI/DuraTect-Solution</u>	0,8 ml	Reakčná nádoba, modré veko
	Návod na použitie	1	

**Z-2099-20 (20 testov):** Komponenty **ES2** a **MT7** vystačia na 20 reakcií. Komponenty **PT4**, **PT5**, **WB7** a **WB8** vystačia na 7 farbiacich nádobiek po 70 ml. Komponent **WB5** vystačí na 14 farbiacich nádobiek po 70 ml.

### 4. Požadované, ale neposkytované materiály

- ZytoLight FISH probe
- Pozitívne a negatívne kontrolné vzorky
- Mikroskopické sklíčka, nepotiahnuté
- Vodný kúpeľ (70 °C)
- Hybridizér alebo horúca platňa
- Hybridizér alebo komora na udržiavanie vlhkosti v hybridizačnej peci
- Nastaviteľné pipety (10 µl, 25 µl)
- Farbiace nádoby alebo kúpele
- Časovač
- Kalibrovaný teplomer
- Etanol alebo reagenčný alkohol
- 37% formaldehyd, bez obsahu kyselín, alebo 10% formalín, neutrálne pufrovaný
- 2x fyziologický roztok citrátu sodného (SSC), napr. z 20x SSC Solution (č. WB-0003-50)
- Deionizovaná alebo destilovaná voda
- Krycie sklíčka (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Gumové lepidlo, napr. Fixogum Rubber Cement (č. E-4005-50/-125) alebo podobný
- Primerane udržiavaný fluorescenčný mikroskop (400-1000x)
- Imerzný olej schválený pre fluorescenčnú mikroskopiu
- Vhodné súpravy filtrov

### 5. Skladovanie a manipulácia

Uchovávať pri teplote 2-8 °C vo zvislej polohe. DAPI/DuraTect-Solution (MT7) sa musí navyše skladovať chránený pred svetlom. Okamžite po použití vráťte do skladovacích podmienok. Nepoužívajte činidlá po dátume expirácie uvedenom na etikete. Produkt je stabilný do dátumu expirácie uvedeného na etikete, ak sa s ním zaobchádza primeraným spôsobom.

### 6. Upozornenia a bezpečnostné opatrenia

- Pred použitím si prečítajte návod na použitie!
- Nepoužívajte činidlá po uplynutí dátumu expirácie!
- Tento výrobok obsahuje látky (v nízkych koncentráciách a objemoch), ktoré sú zdraviu škodlivé. Vyhnite sa akémukoľvek priamemu kontaktu s činidlami. Prijmite vhodné ochranné opatrenia (používajte jednorazové rukavice, ochranné okuliare a laboratórny odev)!
- Každý závažný incident, ku ktorému došlo v súvislosti s výrobkom, nahláste výrobcovi a príslušnému orgánu podľa miestnych predpisov!

- Ak sa činidlá dostanú do kontaktu s pokožkou, okamžite ju opláchnite veľkým množstvom vody!
- Pre profesionálnych používateľov je na požiadanie k dispozícii karta bezpečnostných údajov.
- Reagencie nepoužívajte opakovane, pokiaľ nie je opakované použitie výslovne povolené!
- Vyhňte sa krížovej kontaminácii vzoriek, pretože to môže viesť k chybným výsledkom.
- Počas hybridizácie a premývania sa vzorky nesmú nechať vyschnúť.
- DAPI/DuraTect-Solution (MT7) by nemal byť dlhší čas vystavený svetlu, najmä silnému svetlu, t. j. všetky kroky by sa mali vykonávať, ak je to možné, v tme a/alebo s použitím nádob odolných voči svetlu!

### Špeciálne označenie ES2:

EUH210	Na požiadanie možno poskytnúť kartu bezpečnostných údajov. < 20 % zmesi tvoria zložky s neznámou akútnou toxicitou (inhalácia).
--------	--

### Výstražné a bezpečnostné upozornenia pre PT4, PT5, WB5, WB7, a WB8:

Zložka určujúca nebezpečenstvo je zmesou: 5-chlór-2-metyl-4-izotiazolín-3-ón [ES č. 247-500-7] a 2-metyl-2H-izotiazol-3-ón [ES č. 220-239-6] (3:1).



#### Pozor

H317	Môže vyvolať alergickú kožnú reakciu.
P261	Zabráňte vdychovaniu prachu/dymu/plynu/hmly/pár/aerosólov.
P272	Je zakázané vyniesť kontaminovaný pracovný odev z pracoviska.
P280	Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre.
P302+P352	PRI KONTAKTE S POKOŽKOU: umyte veľkým množstvom vody.
P333+P313	Ak sa prejaví podráždenie pokožky alebo sa vytvoria vyrážky: vyhľadajte lekársku pomoc/starostlivosť.
P362+P364	Kontaminovaný odev vyzlečte a pred ďalším použitím vyperte.

### Výstražné a bezpečnostné upozornenia pre MT7:

Zmes nie je klasifikovaná ako nebezpečná podľa nariadenia (ES) č. 1272/2008.

### 7. Obmedzenia

- Na diagnostické použitie *in vitro*.
- Len na profesionálne použitie.
- Len na neautomatizované použitie.
- Klinická interpretácia akéhokoľvek pozitívneho farbenia alebo jeho neprítomnosti sa musí vykonať v kontexte klinickej anamnézy, morfológie, iných histopatologických kritérií, ako aj iných diagnostických testov. Je zodpovednosťou kvalifikovaného patológa/humánneho genetika, aby poznal ISH sondy, reagencie, diagnostické panely a metódy použité na výrobu farbeného preparátu. Farbenie sa musí vykonávať v certifikovanom, licencovanom laboratóriu pod dohľadom patológa/ humánneho genetika, ktorý je zodpovedný za preskúmanie farbených preparátov a zabezpečenie primeranosti pozitívnych a negatívnych kontrol.
- Zafarbenie vzorky, najmä intenzita signálu a zafarbenie pozadia, závisí od manipulácie so vzorkou a jej spracovania pred zafarbením. Nesprávna fixácia, zmrazenie, rozmrazenie, umývanie, sušenie, zahrievanie, rezanie alebo kontaminácia inými vzorkami alebo tekutinami môže spôsobiť artefakty alebo falošné výsledky. Nekonzistentné výsledky môžu byť dôsledkom rozdielov v metódach fixácie a vkladania, ako aj vnútorných nepravidielností vo vzorke.

- Výkon bol overený pomocou postupov opísaných v návode na použitie príslušnej sondy ZytoVision a implementačnej súpravy. Úpravy týchto postupov môžu zmeniť výkon a musí ich overiť používateľ. Tento IVD je certifikovaný ako CE len v prípade, že sa používa tak, ako je opísané v tomto návode na použitie v rozsahu určeného použitia.

### 8. Rušivé látky

Červené krvinky prítomné vo vzorke môžu vykazovať autofluorescenciu, ktorá bráni rozpoznaniu signálu.

### 9. Príprava vzoriek

Bezprostredne pred proteolýzou na starnutie inkubujte preparáty 2 min v 2x SSC solution pri teplote 73 °C.

*Alternatívne sa starnutie vzoriek môže dosiahnuť inkubáciou vzoriek cez noc (12-16 h) pri 37 °C.*

### 10. Prípravné ošetrovanie zariadenia

20x Wash Buffer TBS (WB5), 10x MgCl<sub>2</sub> (PT4), a 10x PBS (PT5) sa majú vopred upraviť podľa pokynov v časti 11. "Postup analýzy". Komponenty (PT4) a (PT5) môžu pri teplote 2 - 8 °C tvoriť zrazeniny. V prípade potreby ich pred použitím zahrejte na 37 °C na 10 minút, kým sa zrazeniny úplne nerozpustia. Všetky ostatné činidlá súpravy sú pripravené na použitie. Nie je potrebná rekonštitúcia, miešanie ani riedenie.

### 11. Postup analýzy

#### 11.1 Deň 1

#### Prípravné kroky

- Príprava 1x Wash Buffer TBS: Zriedte 1 diel 20x Wash Buffer TBS (WB5) s 19 dielmi deionizovanej alebo destilovanej vody.
- Príprava 1% roztoku formaldehydu: Na prípravu 100 ml 1% roztoku formaldehydu zmiešajte 2,7 ml 37% formaldehydu bez obsahu kyselín alebo 25 ml neutrálne pufrovaného formalínu (4% formaldehyd) s 10 ml 10x MgCl<sub>2</sub> (PT4) a 10 ml 10x PBS (PT5) a upravte objem na 100 ml deionizovanou alebo destilovanou vodou. Dôkladne premiešajte.
- Príprava série etanolu (70 %, 90 % a 100 % roztoky etanolu): Zriedte 7, 9 a 10 dielov 100 % etanolu s 3, 1 a 0 dielmi deionizovanej alebo destilovanej vody. Tieto roztoky sa môžu uchovávať vo vhodných nádobách a môžu sa použiť opakovane.
- ZytoLight FISH Probe: Pred použitím upravte na izbovú teplotu, chráňte pred svetlom.

#### Predbežná úprava (proteolýza/postfixácia)

1. Na cytologickú vzorku naneste (po kvapkách) Cytology Pepsin Solution (ES2) a inkubujte 10 minút pri 37 °C vo vlhkej komore.

*ES2 môže tvoriť zrazeniny, ktoré nemajú vplyv na kvalitu.*

*V závislosti od viacerých faktorov, napr. od povahy a trvania fixácie, ako aj od povahy buniek, môže byť potrebný rôzny čas inkubácie. Pre cytologické vzorky odporúčame inkubačný čas 5-15 minút. Vo všeobecnosti odporúčame zistiť optimálny čas proteolýzy v predbežných testoch.*

2. Sklička inkubujte 5 minút v 1x Wash Buffer TBS.
3. Sklička inkubujte 5 minút v 1% roztoku formaldehydu.
4. Sklička inkubujte 5 minút v 1x Wash Buffer TBS.
5. Dehydratácia: v 70%, 90% a 100% etanole, vždy po dobu 1 min.

Vzorky vysušte na vzduchu.

#### Denaturácia a hybridizácia

1. Pipetujte 10 µl ZytoLight FISH Probe na každú vopred upravenú vzorku.

*Zabráňte dlhému vystaveniu sondy svetlu.*

2. Vzorky zakryte krycím sklíčkom s rozmermi 22 x 22 mm (zabráňte zachytávaniu bublín) a krycie sklíčko utesnite.

Na utesnenie odporúčame použiť gumový cement (napr. Fixogum Rubber Cement).

3. Umiestnite sklíčka na horúcu platňu alebo hybridizátor a vzorky denaturujte 5 minút pri teplote 72 °C.

4. Sklíčka preneste do komory s vlhkosťou a hybridizujte cez noc pri 37 °C (napr. v hybridizačnej peci).

Je dôležité, aby cytologické vzorky počas hybridizácie nevyschli.

## 11.2 Deň 2

### Prípravné kroky

- Cytology Stringency Wash Buffer SSC (WB7): Predhrejte na 70 °C.
- Cytology Wash Buffer SSC (WB8): Uvedte na izbovú teplotu.
- DAPI/DuraTect-Solution (MT7): Pred použitím ho uvedte do izbovej teploty, chráňte pred svetlom.

### Posthybridizácia a detekcia

1. Opatrne odstráňte gumový cement alebo lepidlo.
2. Opatrne odstráňte krycie sklo.
3. Premývajte pomocou Cytology Stringency Wash Buffer SSC (WB7) 2 minúty pri 70 °C.

Cytology Stringency Wash Buffer SSC by mal byť vopred ohriaty. V prípade potreby skontrolujte teplomerom.

Odporúčame použiť štyri sklíčka na jednu nádobu na farbenie. V prípade potreby použite prázdne sklíčka na úpravu počtu na štyri.

4. Premývajte pomocou Cytology Wash Buffer SSC (WB8) počas 1 min pri izbovej teplote.

Cytology Wash Buffer SSC by sa mal vopred zohriať na izbovú teplotu. V prípade potreby skontrolujte teplomerom.

5. Vzorky sušte na vzduchu chránené pred svetlom.
6. Na sklíčka napipetujte 25 µl DAPI/DuraTect-Solution (MT7). Vzorky zakryte krycím sklíčkom (24 mm x 60 mm), aby ste sa vyhlili zachyteným bublinkám. Inkubujte v tme 15 minút.

Použitie odrezanej špičky pipety na zväčšenie otvoru môže uľahčiť proces pipetovania. Vyhnite sa dlhému pôsobeniu svetla.

7. Sklíčko skladujte v tme. Pri dlhšom skladovaní by sa malo skladovať pri teplote 2 - 8 °C.
8. Hodnotenie materiálu vzorky sa vykonáva pomocou fluorescenčnej mikroskopie. Potrebne sú sady filtrov pre nasledujúce rozsahy vlnových dĺžok:

Fluorescenčné farbivo	Excitation	Emisie
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. Interpretácia výsledkov

Pri použití vhodných súprav filtrov v interfázach alebo metafázach normálnych buniek alebo buniek bez aberácií chromozómov sa objavujú dva signály na sondu/fluorescenčnú značku, s výnimkou sond zameraných na chromozómy X a/alebo Y, čo vedie k žiadnemu až dvom signálom na sondu/fluorescenčnú značku v závislosti od pohlavia. V bunkách s chromozómovými aberáciami môže byť v interfázach alebo metafázach viditeľný iný vzor signálu. Podrobnejšie informácie o interpretácii výsledkov nájdete v príručke k príslušnej sonde.

## 13. Odporúčané postupy kontroly kvality

Pozrite si návod na použitie príslušnej sondy ZytoVision.

## 14. Výkonnostné charakteristiky

Pozrite si návod na použitie príslušnej sondy ZytoVision.

## 15. Likvidácia

Likvidácia činidiel sa musí vykonávať v súlade s miestnymi predpismi.

## 16. Riešenie problémov

Akákoľvek odchýlka od návodu na obsluhu môže viesť k horším výsledkom farbenia alebo k tomu, že sa farbenie vôbec nevyskytne. Viac informácií nájdete na stránke [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com).

### Slabé signály alebo žiadne signály

Možná příčina	Akcia
Predbežná proteolytická úprava nebola vykonaná správne	Optimalizujte čas inkubácie pepsínu, v prípade potreby ho predĺžte alebo skráťte
Odparovanie sondy	Pri používaní hybridizéru je používanie vlhkých pásov/nádrží naplnených vodou povinné. Pri používaní hybridizačnej pece je potrebné používať vlhkú komoru. Okrem toho by malo byť krycie sklo úplne utesené, napr. pomocou Fixogumu, aby sa zabránilo vysychaniu vzorky počas hybridizácie.
Použitie nevhodných súprav filtrov	Použite sady filtrov vhodné pre fluochrómy sondy. Sady filtrov s trojpásmovou priepustnosťou poskytujú menej svetla v porovnaní so sadami filtrov s jednopásmovou alebo dvojpásmovou priepustnosťou. V dôsledku toho sa signály pri použití týchto trojpásmových filtračných súprav môžu javiť slabšie.

### Křížové hybridizačné signály; silné pozadie

Možná příčina	Akcia
Príliš silná proteolytická predúprava	Skrátenie inkubačného času pepsínu
Sklíčka pred hybridizáciou ochladené na izbovú teplotu	Sklíčka rýchlo presuňte na teplotu 37 °C

### Zhoršená morfológia

Možná příčina	Akcia
Predbežná proteolytická úprava nebola vykonaná správne	Optimalizujte čas inkubácie pepsínu, v prípade potreby ho skráťte
Nedostatočné vysušenie pred aplikáciou sondy	Predĺženie sušenia na vzduchu

### Slabé kontrastné farbenie

Možná příčina	Akcia
Nízko koncentrovaný roztok DAPI	Namiesto toho použite <u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (č. produktu MT-0008-0.8)
Príliš krátky čas inkubácie DAPI	Úprava času inkubácie DAPI

## 17. Literatúra

- 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. Revízia

Revízia	Opis zmeny
1.2.1	11. Postup analýzy Pridaná verzia ZyGreen 2.0



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

Najnovší návod na použitie, ako aj návod na použitie v rôznych jazykoch nájdete na stránke [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com).

Naši odborníci sú pripravení odpovedať na vaše otázky.  
Obráťte sa na [help@zytovision.com](mailto:help@zytovision.com)



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

**Ochranné známky:**

ZytoVision® a ZytoLight® sú ochranné známky spoločnosti ZytoVision GmbH.