



FlexISH- Tissue Implementation Kit

REF Z-2182-5 Σ 5

REF Z-2182-20 Σ 20

použitie pri fluorescenčnej *in situ* hybridizácii (FISH)

4250380N8486



Diagnostická zdravotnícka pomôcka in vitro

podľa IVDR (EÚ) 2017/746

1. Zamýšľané použitie

Súprava FlexISH-Tissue Implementation Kit je určená na použitie v kombinácii so sondami FlexISH na vzorkách fixovaných formalínom a vložených do parafrínu 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 filtrami špecifickými pre fluorochrómy, ktorými boli fragmenty sond FISH priamo označené.

3. Poskytnuté činidlá

FlexISH-Tissue Implementation Kit je k dispozícii v dvoch veľkostiach a skladá sa z:

Kód	Komponent	Množstvo		Kontajner
		20	Σ 5	
PT1	<u>Heat Pretreatment Solution Citric</u>	500 ml	150 ml	Fľaša so skrutkovacím uzáverom (veľká)
ES1	<u>Pepsin Solution</u>	4 ml	1 ml	Fľaštička s kvapkadlom, biela čiapka
WB10	<u>5x FlexISH Wash Buffer</u>	500 ml	150 ml	Fľaša so skrutkovacím uzáverom (veľká)
MT7	<u>DAPI/DuraTect-Solution</u>	0,8	0,2	akčná nádoba, modré veko
	Návod na použitie	1	1	

Z-2182-5 (5 testov): Komponenty **ES1** a **MT7** postačujú na 5 reakcií. Komponent **WB10** vystačí na 3x 3 nádoby na farbenie o 70 ml. Zložka **PT1** vystačí na 2 farbiace nádoby po 70 ml.

Z-2182-20 (20 testov): Komponenty **ES1** a **MT7** postačujú na 20 reakcií. Komponent **WB10** vystačí na 11x 3 nádoby na farbenie po 70 ml. Zložka **PT1** vystačí na 7 farbiace nádoby po 70 ml.

4. Požadované, ale neposkytované materiály

- FlexISH probe
- Pozitívne a negatívne kontrolné vzorky
- Mikroskopické sklíčka, kladne nabité
- Vodný kúpeľ (37 °C, 98 °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
- Xylén
- 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!

- Vyhnite 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 ES1:

EUH208	Obsahuje pepsin A. Môže vyvolať alergickú reakciu.
EUH210	Na požiadanie možno poskytnúť kartu bezpečnostných údajov.

Výstražné a bezpečnostné upozornenia pre PT1 a WB10:

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, reagenty, 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 nepravidelností 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.

Nasledujúce fixatíva sú nekompatibilné s FISH:

- Bouinovo fixačné činidlo
- Fixačné činidlo B5
- Kyslé fixačné prostriedky (napr. kyselina pikrová)
- Zenkerov fixatív
- Alkoholy (ak sa používajú samostatne)
- Chlorid ortuťnatý
- Formaldehydové/zinkové fixačné činidlo
- Hollandova fixácia
- Formálín bez pufru

9. Príprava vzoriek

Odporúčania:

- Fixácia v 10% neutrálne pufovanom formalíne počas 24 hodín pri izbovej teplote (18-25 °C).
- Veľkosť vzorky ≤ 0,5 cm³.
- Používajte parafín prvotriednej kvality.
- Vkladanie by sa malo vykonávať pri teplotách nižších ako 65 °C.
- Pripravte 2-4 µm rezy mikrotomom.
- Používajte kladne nabitú mikroskopickú sklíčka.
- Fixujte 2-16 h pri 50-60 °C.

10. Prípravné ošetrenie zariadenia

5x FlexISH Wash Buffer (WB10) sa má predpripraviť podľa pokynov v časti 11. "Postup analýzy". Všetky ostatné reagenty súpravy sú pripravené na použitie. Nie je potrebná rekonštitúcia, miešanie ani riedenie.

11. Postup analýzy

11.1 Deň 1

Preparatory steps

1. *Príprava dvoch sérií etanolu (70 %, 90 % a 100 % roztok etanolu):* Zriedte 100% etanol deionizovanou alebo destilovanou vodou. Tieto roztoky sa môžu uchovávať vo vhodných nádobách a môžu sa opakovane použiť až na 160 preparátov.
2. *Heat Pretreatment Solution Citric (PT1):* Naplňte nádobu na farbenie a zahrejte na 98 °C.
3. *FlexISH Probe:* Pred použitím ju uveďte do izbovej teploty, chráňte pred svetlom. Pred otvorením injekčnej liekovky premiešajte vortexovaním a krátko roztočte.

Predúprava (odvoskovanie/proteolýza)

1. Inkubujte sklíčka 2x 5 minút v xyléne..
2. Inkubujte v 100 %, 100 %, 90 % a 70 % etanole, vždy 2 minúty.
3. Premývajte 2x 2 min v deionizovanej alebo destilovanej vode.
4. Inkubujte 20 minút vo vopred zohriatom Heat Pretreatment Solution Citric (PT1) pri 98 °C.

Odporúčame nepoužívať viac ako osem sklíčok na jednu nádobu na farbenie. Po ponorení sklíčok skontrolujte teplotu roztoku na tepelnú predúpravu citrónu v nádobe a začnite časovať hneď, ako teplota roztoku dosiahne aspoň 95 °C.

5. Sklíčka ihneď preneste do deionizovanej alebo destilovanej vody, premývajte 2x 2 minúty a vodu nechajte odtiecť alebo zmyte.
6. Na vzorky naneste (po kvapkách) Pepsin Solution (ES1) a inkubujte 15 minút pri 37 °C vo vlhkej komore.



ES1 môže tvoriť zrazeniny, ktoré nemajú vplyv na kvalitu.

V závislosti od viacerých faktorov, napr. od povahy a trvania fixácie, hrúbky rezov a povahy vzoriek, môže byť potrebný rôzny čas inkubácie. Ako usmernenie pre inkubáciu odporúčame inkubačný čas 2 - 30 min. Vo všeobecnosti odporúčame zistiť optimálny čas pre proteolýzu v predbežných testoch.

- Premývajte 2x 2 min v deionizovanej alebo destilovanej vode.
- Dehydratácia: v 70%, 90% a 100% etanole, vždy po dobu 1 min.
- Vzduchom vysušte časti.

Pred aplikáciou sondy sa uistite, že rezy sú úplne suché, pretože zvyšková vlhkosť môže znížiť intenzitu signálu a/alebo ovplyvniť morfológiu vzorky.

Denaturácia a hybridizácia

- Pipetujte 10 µl FlexISH Probe na každú vopred upravenú vzorku. Zabráňte dlhému vystaveniu sondy svetlu.
 - 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).
- Umiestnite sklíčka na horúcu platňu alebo hybridizátor a vzorky denaturujte 10 minút pri teplote 75 °C.
 - Hybridizáciu vykonávajte 2 h až 16 h (t. j. cez noc) pri teplote 37 °C prenesením preparátov do hybridizátora alebo do komory s vlhkosťou a hybridizačnej pece.
- Je dôležité, aby vzorky počas hybridizácie nevyschli.

11.2 Deň 1 alebo deň 2

Prípravné kroky

- Príprava 1x FlexISH Wash Buffer: Zriedte 1 diel 5x FlexISH Wash Buffer (WB10) farbiace nádoby 1x FlexISH Wash Buffer, jednu nádobku predhrejte na 72 °C a dve nádoby udržiavajte pri izbovej teplote..
- DAPI/DuraTect-Solution (MT7): Pred použitím ho uveďte do izbovej teploty, chráňte pred svetlom.

Posthybridizácia a detekcia

- Opatrne odstráňte gumový cement alebo lepidlo.
 - Odstráňte krycie sklíčka ponorením do 1x FlexISH Wash Buffer pri izbovej teplote na 1-2 minúty.
- Na uľahčenie odstránenia krycieho sklíčka sa tento krok môže alternatívne vykonať počas 2 minút pri 37 °C.
- Premývajte pomocou 1x FlexISH Wash Buffer 10 min pri 72 °C.
- Premývací tlmivý 1x FlexISH Wash Buffer by mal byť vopred ohriaty. V prípade potreby skontrolujte teplomerom. Na jednu nádobu na farbenie nepoužívajte viac ako osem sklíčok.
- Premývajte pomocou 1x FlexISH Wash Buffer počas 3 minút pri izbovej teplote.
 - Sklíčka inkubujte v 70 %, 90 % a 100 % etanole, vždy na 1 min.
 - Vzorky sušte na vzduchu chránené pred svetlom.
 - Na sklíčka napipetujte 25 µl DAPI/DuraTect-Solution (MT7)). Vzorky zakryte krycím sklíčkom (24 mm x 60 mm), aby ste sa vyhli zachyteným bublinkám. Inkubujte v tme 15 minút.
- Použitie odrezanej špičky pipety na zväčšenie otvoru môže uľahčiť proces pipetovania. Vyhnite sa dlhému pôsobeniu svetla.
- Sklíčka skladujte v tme. Pri dlhšom skladovaní by sa mali skladovať pri teplote 2 - 8 °C.
 - Hodnotenie materiálu vzorky sa vykonáva pomocou fluorescenčnej mikroskopie. Potrebné 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 objavajú 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

Akokoľvek 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.

Slabý signál alebo žiadny signál

Možná příčina	Akcia
Vzorka nebola správne upevnená	Optimalizácia času fixácie a fixačného prostriedku
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 utesnené, 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 jedнопásmovou alebo dvojпásmovou priepustnosťou. V dôsledku toho sa signály pri použití týchto trojpásmových filtračných súprav môžu javiť slabšie.

Křížové hybridizačné signály; zašumené pozadie

Možná příčina	Akcia
Neúplné odparafínovanie	Používajte čerstvé roztoky; skontrolujte trvanie odparafínovania
Príliš silná proteolytická predúprava	Skrátiť čas inkubácie pepsínu
Sklíčka pred hybridizáciou ochladené na izbovú teplotu	Sklíčka rýchlo presuňte na teplotu 37 °C

Zhoršená morfológia

Možná příčina	Akcia
Vzorka nebola správne upevnená	Optimalizácia času fixácie a fixačného prostriedku

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

Prekrývajúce sa jadrá

Možná príčina	Akcia
Nevhodná hrúbka tkanivových rezov	Pripravte 2-4 μm rezy mikrotomom

Vzorka vypláva zo sklíčka

Možná príčina	Akcia
Príliš silná proteolytická predúprava	Skrátenie inkubačného času pepsínu

Slabá protifarbivá

Možná príčina	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

Najnovší návod na použitie, ako aj návod na použitie v rôznych jazykoch nájdete na stránke www.zytovision.com.

Naši odborníci sú pripravení odpovedať na vaše otázky. Obráťte sa na help@zytovision.com



ZytoVision GmbH

Fischkai 1

27572 Bremerhaven/ Nemecko

Telef Hodnotenie materiálu vzorky sa vykonáva pomocou fluorescenčnej mikroskopie. Potrebne sú sady filtrov pre nasledujúce rozsahy vlnových dĺžok ón: +49 471 4832-300

Fax: +49 471 4832-509

www.zytovision.com

E-mail: info@zytovision.com

Ochranné známky:

ZytoVision® a F/exlSH® sú ochranné známky spoločnosti ZytoVision GmbH.