



**ZytoFast**

## **HPV High-Risk (HR) Types Probe** (Digoxigenin-labeled)

**REF** T-1140-400  40 (0,4 ml)

За качествено откриване на ДНК на човешки папиломен вирус (HPV) тип 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/66/68/82 чрез хромогенна *in situ* хибридизация (CISH)

4250380P172R3



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

### 1. Предвидена употреба

Сондата **ZytoFast HPV High-Risk (HR) Types Probe (PF46)** е предназначена да се използва за качествено откриване на човешки папиломен вирус (HPV) тип 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/66/68/82 ДНК във формалин фиксирани, включени в парафин проби, като карцином на маточната шийка и орофарингеален плоскоклетъчен рак (OSCC), чрез хромогенна *in situ* хибридизация (CISH). Сондата е предназначена да се използва в комбинация с **ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB** (Prod. No. T-1063-40).

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.

Сондата е предназначена да се използва като помощно средство при диференциалната диагноза на карцином на маточната шийка и OSCC и не трябва да се предприемат терапевтични мерки само въз основа на резултата от теста.

### 2. Принцип на изпитване

Техниката на хромогенната *in situ* хибридизация (CISH) позволява откриването и визуализирането на специфични последователности от нуклеинови киселини в клетъчни препарати. Маркираните с хаптен нуклеотидни фрагменти, т.нар. сонди CISH, и техните комплементарни целеви последователности в препаратите се ко-денатурират и впоследствие се оставят да се отгряват по време на хибридизацията. След това неспецифичните и несвързани сондови фрагменти се отстраняват чрез стриктно измиване. Дуплексното образуване на маркираната сонда може да се визуализира с помощта на първични (немаркирани) антитела, които се откриват с вторични полимеризирани ензимно конюгирани антитела. Ензимната реакция с хромогенни субстрати впоследствие води до образуване на цветни утайки. След контраоцветяване на ядрото с ядрено багрило хибридизирани фрагменти на сондата се визуализират чрез светлинна микроскопия.

### 3. Предоставени реактиви

**ZytoFast ZytoFast HPV High-Risk (HR) Types Probe** се състои от:

- Маркирани с дигоксигенин полинуклеотиди (~2,2 ng/μl), специфични за HPV тип 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/66/68/82, които са насочени към ДНК последователности, кодиращи HPV 6/11 протеини E6, E7 и/или L1.

Сондата е насочена и към съответните РНК последователности на белтъците E6, E7 и/или L1, които се експресират по време на някои етапи на инфекцията..

- Хибридизационен буфер на базата на формамид

**ZytoFast ZytoFast HPV High-Risk (HR) Types Probe** се предлага в един размер:

- T-1140-40: 0,4 ml (40 реакции от по 10 μl всяка)

### 4. Необходими материали, които не са осигурени

- ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB** (Prod. No. T-1063-40)
- Положителни и отрицателни контролни образци
- Микроскопски стъкла, положително заредени
- Водна баня (55 °C, 98 °C)
- Хибридизатор или гореща плоча
- Хибридизатор или камера за влажност в пещта за хибридизация
- Регулируеми калибрирани пипети (10 μl, 100 μl, 1000 μl)
- Оцветяване на буркани или вани
- Таймер
- Калибриран термометър
- Етанол или реактивен алкохол
- Ксилол
- Метанол 100%
- Водороден пероксид (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30%
- Дейонизирана или дестилирана вода
- Покривни стъкла (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Каучуков цимент, например **Fixogum Rubber Cement** (Prod. No. E-4005-50/-125) или подобен
- Подходящо поддържан светлинен микроскоп (100-200x)

### 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, посочена 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 и потенциално инфекциозни. Избягвайте всякакъв пряк контакт с реактивите. 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.

## Предупреждения за опасност и предпазни мерки:

Компонентът, определящ опасността, е формамид.



Опасно

H351	Предполага се, че причинява рак..
H360FD	Може да увреди оплодителната способност. Може да увреди плода.
H373	Може да причини увреждане на органите при продължителна или повтаряща се експозиция.
P201	Преди употреба се снабдете със специални инструкции.
P202	Не използвайте преди да сте прочели и разбрали всички предпазни мерки за безопасност.
P260	Не вдишвайте прах/пушек/газ/дим/ изпарения/ аерозоли.
P280	Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице/предпазни средства за защита на слуха.
P308+P313	ПРИ явна или предполагаема експозиция: Потърсете медицински съвет/помощ.
P405	Да се съхранява под ключ.

## 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. Патолог/генетик квалифициран за съответната дейност е длъжен да познава CISH 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.
- Сондата трябва да се използва само за откриване на последователността, описана в глава 3. "Предоставени реактиви".
- Изпълнението е валидирано с помощта на процедурите, описани в тези инструкции за употреба. Модификациите на тези процедури могат да променят характеристиките 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

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
- Небуфериран формалин

## 9. Подготовка на образци

Подгответе образците, както е описано в инструкциите за употреба на ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB.

## 10. Подготвителна обработка на устройството

Продуктът е готов за употреба. Не се изисква възстановяване, смесване или разреждане. Доведете сондата до температура на хибридизация (37 °C) и разбъркайте добре преди употреба.

## 11. Процедура за анализ

### Предварителна обработка на пробите

Извършете предварителна обработка на пробите (напр. обезпаразитяване, протеолиза) съгласно инструкциите за употреба на съответния ZytoFast CISH Implementation Kit.

### Денатурация и хибридизация

1. Нанесете с пилета 10 µl от сондата върху всеки предварително обработен образец.
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 5 min при 75 °C.
4. Преместете предметни стъкла в камера за влажност и хибридизирайте за 1 час при 37 °C (напр. в пещ за хибридизация).

Важно е образците да не изсъхват по време на хибридизацията.

### След хибридизацията

Извършете обработката след хибридизацията (измиване, откриване, контраоцветяване, монтиране, микроскопия) съгласно инструкциите за употреба на съответния ZytoFast CISH Implementation Kit.

## 12. Тълкуване на резултатите

При използване на ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB хибридизирани олигонуклеотиди, маркирани с дигоксигенин, се появяват като кафява шарка, когато се открият с пероксидаза от хрян (HRP) и DAB.

Моделът на оцветяване в ядрото може да се наблюдава като отделни точковидни сигнали в случай на интегриран HPV или като силно и хомогенно ядрено оцветяване в случай на епизомен HPV. Цитоплазмено оцветяване се наблюдава, когато се откриват РНК последователности на HPV.

### Моля, обърнете внимание:

- Визуализацията на сигналите трябва да се извърши с помощта на набор от обективи с поне 200-кратно до 630-кратно увеличение. Наличието на епизомен модел на оцветяване обикновено се открива ясно с обектив с 200-кратно увеличение, докато откриването на интегрирания модел изисква по-голямо увеличение, за предпочитане 630-кратно.
- Не оценявайте зони на некроза, припокриващи се ядра, прекалено разградени ядра и ядра със слаб интензитет на сигнала.
- Отрицателният или неспецифичен резултат може да се дължи на множество фактори (вж. глава 16 "Отстраняване на неизправности").
- За да се интерпретират правилно резултатите, потребителят трябва да валидира този продукт преди използването му в диагностични процедури в съответствие с националните и/или международните насоки.

## 13. Препоръчителни процедури за контрол на качеството

За да се следи за правилното функциониране на обработените проби и тестовите реактиви, всеки анализ трябва да се придружава от вътрешни и външни контроли. Ако вътрешните и/или външните контроли не демонстрират подходящо оцветяване, резултатите с проби от пациенти трябва да се считат за невалидни.

**Вътрешен контрол:** В неясни случаи трябва да се използват ДНК контролни сонди за допълнително изясняване.

**Външно управление:** Валидирани положителни и отрицателни контролни образци.

## 14. Работни характеристики

### 14.1 Аналитично представяне

Аналитична чувствителност:	100% (95% CI 63.1 - 100)
Аналитична специфичност:	100% (95% CI 63.1 - 100)
Кръстосани хибридации:	HPV types 16, 26, 45, 52, 54, 58, 67, 68, 85, 97

### 14.2 Клинично представяне

Диагностична чувствителност:	Рак на маточната шийка: 100% (95% CI 88.4 – 100.0) срещу двойно оцветяване p16/ki67 <b>OSCC:</b> 93.33% (95% CI 76.9 – 97.3) срещу p16 IHC
Диагностична специфичност:	Рак на маточната шийка: 100% (95% % CI 88.4 – 100.0) срещу двойно оцветяване p16/ki67 <b>OSCC:</b> 81.82% (95% CI 76.9 – 97.3) срещу p16 IHC

## 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-ниски резултати при оцветяването или до липса на оцветяване. Моля, вижте [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com) за повече информация.

### Слаби сигнали или липса на такива

Възможна причина	Действие
Протеолитичната предварителна обработка не е извършена правилно	Оптимизирайте времето за инкубиране на пепсин, ако е необходимо, увеличете или намалете
Изпаряване на сондата	Когато използвате хибридизатор, използването на мокрите ленти/напълнените с вода резервоари е задължително. При използване на пещ за хибризация 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 хибризацията
Недостатъчна подготовка на хромогенния субстрат	Вместо да пригответе цветните субстрати чрез накапване, използвайте пипета
Твърде дълго време за оцветяване	Избягвайте тъмно контраоцветяване, защото може да затъмни положителните сигнали от оцветяването.
Синьото покритие на контраста не е извършено правилно	Използвайте студена течаща вода от чешмата за посиняване; не използвайте топла или гореща вода или реагенти за посиняване.

### Сигналите избледняват или се сливат

Възможна причина	Действие
Използвано е неподходящо решение за монтаж	Използвайте само монтажния разтвор, предоставен с комплекта или препоръчан в инструкциите за употреба. Използвайте разтвори, които не съдържат никакви примеси; не използвайте тиксо за покриване

### Неравномерни или само на някои места много леки петна

Възможна причина	Действие
Непълно обезпаразитяване	Използвайте пресни разтвори; проверете продължителността на обезпаразитяването
Твърде малък обем на реагента	Уверете се, че обемът на реактива е достатъчно голям, за да покрие тъканната област

### Непоследователни резултати

Възможна причина	Действие
Недостатъчно изсушаване преди нанасяне на сондата	Удължаване на сушенето на въздух
Твърде много вода/буфер за промиване върху тъканта преди нанасянето на пепсин, антитела и/или цветни субстрати	Уверете се, че излишната течност е отстранена от тъканния участък, като я забършете или изтръскате от предметно стъкло. Малки количества остатъчна вода/буфер за промиване не пречат на теста.
Вариации в методите за фиксиране и вграждане на тъкани	Оптимизиране на методите за фиксиране и вграждане
Вариации в дебелината на тъканния участък	Оптимизиране на разделянето

### Разрушена морфология

Възможна причина	Действие
Клетъчната или тъканната проба не е била правилно фиксирана	Оптимизиране на времето за фиксиране и фиксатора
Протеолитичната предварителна обработка не е извършена правилно	Оптимизиране на времето за инкубиране на пепсин

### Шумният фон

Възможна причина	Действие
Изсъхване на секциите по всяко време по време на или след хибризацията	Избягвайте изсушаването на секциите; използвайте камера за влажност; запечатайте правилно покривното стъкло
Удължено време за инкубиране на субстрата	Съкращаване на времето за инкубиране на субстрата
Непълно обезпаразитяване	Използвайте пресни разтвори; проверете продължителността на депарафинирането
Протеолитичната предварителна обработка не е извършена правилно	Оптимизиране на времето за инкубиране на пепсин
Слайдове, охладени до стайна температура преди хибризация	Прехвърлете бързо предметите за хибризация на температурата.

### Припокриващи се сигнали

Възможна причина	Действие
Неподходяща дебелина на тъканните разрези	Подготвяне на 3-5 µm микротомни разрези

**Образците се издигат извън предметно стъкло**

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

**17. Литература**

- Barodawala SM, et al. (2019) *Diagnostic cytopathology*.
- Kono T, et al. (2020) *Virology*.
- Wilkinson DG: In Situ Hybridization, A Practical Approach, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.

**18. Ревизия**
[www.zytovision.com](http://www.zytovision.com)

Моля, вижте [www.zytovision.com](http://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](mailto:helptech@zytovision.com)

За обобщение на безопасността и ефективността, моля, вижте [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com).



ZytoVision GmbH

Fischkai 1

27572 Bremerhaven/ Германия

Телефон: +49 471 4832-300

Факс: +49 471 4832-509

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

Имейл: [info@zytovision.com](mailto:info@zytovision.com)

**Търговски марки:**

ZytoVision® и ZytoFast® са търговски марки на ZytoVision GmbH.