Zyto*Fast*
EBV Probe
(Digoxigenin-labeled)

REF T-1114-400 Σ 40 (0,4 ml)

Pro kvalitativní detekci lidské RNA viru Epstein-Barrové (EBV) pomocí chromogenní *in situ* hybridizace (CISH)

4250380P101QC

CE 0124

IVD

Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro

podle IVDR (EU) 2017/746

1. Zamýšlený účel

Sonda Zyto*Fast* EBV Probe (**PF29**) je určena ke kvalitativní detekci RNA EBER lidského viru Epsteina-Barrové (EBV) ve formalínem fixovaných, do parafínu vložených vzorcích, jako jsou difuzní velkobuněčné B-lymfomy (DLBCL) nebo Hodgkinovy lymfomy, pomocí chromogenní in situ hybridizace (CISH). Sonda je určena k použití v kombinaci s Zyto*Fast* PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB (prod. č. T-1063-40).

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.

Sonda je určena jako pomůcka pro diferenciální diagnostiku DLBCL nebo Hodgkinových lymfomů a terapeutická opatření by neměla být založena pouze na výsledku testu.

2. Princip testu

Technika chromogenní *in situ* hybridizace (CISH) umožňuje detekci a vizualizaci specifických sekvencí nukleových kyselin v buněčných preparátech. Nukleotidové fragmenty značené haptenem, tzv. sondy CISH, a jejich komplementární cílové sekvence v preparátech jsou při hybridizaci společně denaturovány a následně se nechají annealizovat. Poté se nespecifické a nenavázané fragmenty sond odstraní pomocí promývacích kroků. Tvorbu duplexu značené sondy lze vizualizovat pomocí primárních (neznačených) protilátek, které jsou detekovány sekundárními polymerizovanými protilátkami konjugovanými s enzymem. Enzymatická reakce s chromogenními substráty následně vede k tvorbě barevných precipitátů. Po protibarvení jádra jaderným barvivem se hybridizované fragmenty sondy vizualizují světelnou mikroskopií.

3. Dodaná činidla

Zyto*Fast* EBV Probe se skládá z:

- Digoxigeninem značené oligonukleotidy (~ 0,2 ng/µl), které cílí na sekvence mRNA kódující oblasti EBER-1 a EBER-2.

Zyto*Fast* EBV Probe je k dispozici v jedné velikosti:

- T-1114-400: 0,4 ml (40 reakcí po 10 µl)

4. Požadované, ale neposkytované materiály

- Zyto*Fast* PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB (prod. č. T-1063-40)
- Pozitivní a negativní kontrolní vzorky
- Mikroskopická sklíčka, kladně nabitá
- Vodní lázeň (55 °C, 98 °C)
- Hybridizér nebo horká deska
- Hybridizátor nebo vlhkostní komora v hybridizační peci
- Nastavitelné kalibrované pipety (10 µl, 100 µl, 1000 µl)
- Barvící nádoby nebo lázně
- Časovač
- Kalibrovaný teploměr
- Etanol nebo reagenční alkohol
- Xylen
- Metanol 100%
- Peroxid vodíku (H_2O_2) 30 %.
- Deionizovaná nebo destilovaná voda
- Krycí sklíčka (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Gumový cement, např. Fixogum Rubber Cement (prod. č. E-4005-50/-125) nebo podobný.
- Vhodně udržovaný světelný mikroskop (100-200x)

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 přípravek 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 a potenciálně infekční. Vyvarujte se jakéhokoli přímého kontaktu s činidly. Přijměte vhodná ochranná opatření (používejte jednorázové rukavice, ochranné brýle a laboratorní oděv)!
- Jakoukoli závažnou událost, ke které došlo v souvislosti s výrobkem, nahlaste výrobci a příslušnému 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.

Standardní věty o nebezpečnosti a pokyny pro bezpečné zacházení:

Tato sonda 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. Za znalost sond CISH, reagencií, diagnostických panelů a metod používaných k výrobě barveného preparátu odpovídá kvalifikovaný patolog/humánní genetik. 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.
- Sonda by se měla používat pouze pro detekci sekvence popsané v kapitole 3. "Dodávané reagencie".
- Výkon byl ověřen pomocí postupů popsaných v tomto návodu k použití. Úpravy těchto postupů mohou změnit výkon a musí být ověřeny uživatelem. Tento IVD je certifikován jako CE, pouze pokud je používán způsobem popsaným v tomto návodu k použití v rozsahu určeného použití.

8. Rušivé látky

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

Vzorky připravte podle návodu k použití přístroje Zyto*Fast* PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB.

10. Přípravné ošetření zařízení

Výrobek je připraven k použití. Není třeba rekonstituce, míchání ani ředění. Před použitím sondu uveďte do hybridizační teploty (55 °C) a důkladně promíchejte.

11. Postup analýzy

Předúprava vzorků
Proveďte předběžnou úpravu vzorku (např. odvoskování, proteolýzu) podle návodu k použití příslušné sady *ZytoFast* CISH Implementation Kit.

Denaturace a hybridizace

1. Na každý předem ošetřený vzorek napipetujte 10 µl sondy.
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 5 minut při teplotě 75 °C.
4. Přeneste sklíčka do vlhké komory a hybridizujte 1 h při 55 °C (např. v hybridizační peci).

Je důležité, aby vzorky během hybridizace nevyschly.

Po hybridizaci
Zpracování po hybridizaci (promytí, detekce, protibarvení, montáž, mikroskopie) proveďte podle návodu k použití příslušné sady *ZytoFast* CISH Implementation Kit.

12. Interpretace výsledků

Při použití *ZytoFast* PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB se hybridizované oligonukleotidy značené digoxigeninem při detekci křenovou peroxidázou (HRP) a DAB zobrazí jako hnědý vzor.

Pozitivní reaktivita na EBER RNA viru Epsteina-Barrové (EBV) v cílových buňkách je indikována zřetelně zbarveným jádrem.

Upozornění:

- Vizualizace signálů by měla být prováděna při nejméně stonásobném zvětšení, což vede ke snadno viditelným signálům.
- Nehodnoťte oblasti nekrózy, překrývající se jádra, nadměrně strávená jádra a jádra se slabou intenzitou signálu.
- Negativní nebo nespecifický výsledek může být způsoben více faktory (viz kapitola 16 "Řešení problémů").
- Pro správnou interpretaci výsledků musí uživatel tento výrobek před použitím v diagnostických postupech validovat v souladu s národními a/nebo mezinárodními pokyny.

13. Doporučené postupy kontroly kvality

Aby bylo možné sledovat správnou funkčnost zpracovávaných vzorků a testovacích činidel, měla by být každá analýza doplněna interními a externími kontrolami. Pokud interní a/nebo externí kontroly neprokáží odpovídající zbarvení, je třeba výsledky se vzorky pacientů považovat za neplatné.

Vnitřní kontrola: V nejasných případech by měly být pro další objasnění použity kontrolní sondy RNA.

Externí ovládání: Ověřené pozitivní a negativní kontrolní vzorky.

14. Výkonnostní charakteristiky

14.1 Analytický výkon

Výkon byl hodnocen podle návodu k použití sady Zyto*Fast* PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB.

Analytická citlivost:	100% (95% CI 99.7 – 100.0)
Analytická specifičnost:	100% (95% CI 99.8 – 100.0)

Byla testována denní reprodukovatelnost, přičemž se porovnávaly výsledky získané od jednoho zkoušejícího v 10 různých dnech a hodnotila se shoda.

	Procentuální shoda
negativní vzorek	100%
pozitivní vzorek	100%
pozitivní vzorek	100%

Repeatability was tested comparing the replicated results obtained from one examiner on 10 different days and evaluating the agreement.

	Procentuální shoda
negativní vzorek	100%
pozitivní vzorek	100%
pozitivní vzorek	100%

14.2 Klinický výkon

Diagnostická citlivost:	**DLBCL**: 100% (95% CI 91.7 – 100.0) vs. IHC **HL:** 100% (95% CI 88.4 – 100.0) vs.PCR
Diagnostická specifičnost:	**DLBCL**: 98.41% (95% CI 91.7 – 100.0) vs. IHC **HL:** 100% (95% CI 88.4 – 100.0) vs. PCR

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
Nesprávně provedená proteolytická předúprava	Optimalizujte dobu inkubace pepsinu, v případě potřeby ji prodlužte nebo zkraťte.
Odpařování sondy	Při použití hybridizátoru je použití mokrých 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.
Nedostatečná příprava chromogenního substrátu	Místo přípravy barevných substrátů kapáním použijte pipetu.
Příliš dlouhá doba proti barvení	Vyhněte se tmavému protibarvení, protože může zakrýt pozitivní signály barvení.
Nesprávně provedené modření protibarviva	K modření používejte studenou tekoucí vodu z vodovodu; nepoužívejte teplou nebo horkou vodu ani modřící činidla.

Signály slábnou nebo se slučují

Možná příčina	Akce
Bylo použito nevhodné montážní řešení	Používejte pouze montážní roztok dodaný se sadou nebo doporučený v návodu k použití. Používejte roztoky bez jakýchkoli nečistot; nepoužívejte krycí pásku.

Nerovnoměrné nebo v některých částech jen velmi lehké skvrny

Možná příčina	Akce
Nedokonalé odparafinování	Používejte čerstvé roztoky; zkontrolujte dobu trvání odparafinování.
Příliš malý objem činidla	Ujistěte se, že objem činidla je dostatečně velký, aby pokryl oblast tkáně.

Nekonzistentní výsledky

Možná příčina	Akce
Nedostatečné vysušení před aplikací sondy	Prodloužení sušení na vzduchu
Příliš velké množství vody/proplachovacího pufru na tkáni před aplikací pepsinu, protilátek a/nebo barevných substrátů.	Ujistěte se, že je přebytečná tekutina z tkáňového řezu odstraněna rozetřením nebo setřesením ze sklíčka. Malá množství zbytkové vody/mycího pufru neinterferují s testem.
Rozdíly v metodách fixace a vkládání tkání	Optimalizace metod fixace a vkládání
Změny v tloušťce tkáňového řezu	Optimalizace řezu

Zhoršená morfologie

Možná příčina	Akce
Vzorek buněk nebo tkáně nebyl řádně fixován	Optimalizace doby fixace a fixačního prostředku
Nesprávně provedená proteolytická předúprava	Optimalizace doby inkubace pepsinu

Hlučné pozadí

Možná příčina	Akce
Sekce vyschly kdykoli během hybridizace nebo po ní.	Zabraňte vysychání řezů; použijte komoru s vlhkostí; řádně utěsněte krycí sklíčko.
Prodloužená doba inkubace substrátu	Zkrácení doby inkubace substrátu
Nedokonalé odparafinování	Používejte čerstvé roztoky; zkontrolujte délku odparafinování
Nesprávně provedená proteolytická předúprava	Optimalizace doby inkubace pepsinu
Sklíčka se před hybridizací ochladí na pokojovou teplotu.	Rychle přeneste sklíčka na hybridizační teplotu

Překrývající se signály

Možná příčina	Akce
Nevhodná tloušťka tkáňových řezů	Připravte si řezy mikrotomem o velikosti 3-5 μm

Vzorek vyplave ze sklíčka

Možná příčina	Akce
Příliš silná proteolytická předúprava	Zkrácení inkubační doby pepsinu

17. Literatura

- Nonogaki S, et al. (2016) *J Bras Patol Med Lab*: 52 (6)
- Sharma MC, et al. (2016) *Indian J Med Res*. 2016 May;143(5):605-15.
- Wilkinson DG: In Situ Hybridization, A Practical Approach, *Oxford University Press* (1992), ISBN 0 19 963327 4.

18. Revize

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
Shrnutí bezpečnosti a výkonnosti naleznete na stránce www.zytovision.com.

ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/ Německo
Telefon: +49 471 4832-300
Fax: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
E-mail: info@zytovision.com

Ochranné známky:
ZytoVision® a Zyto*Fast*® jsou ochranné známky společnosti ZytoVision GmbH.