

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

REF T-1140-400

40 (0.4 ml)

Für den qualitativen Nachweis von humaner Papilloma-
Virus (HPV) Typ
16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/66/68/82
DNA mittels chromogener *in-situ*-Hybridisierung (CISH)

4250380P172R3



0483



In-vitro-Diagnostikum
gemäß IVDR (EU) 2017/746

1. Verwendungszweck

Die ZytoFast HPV High-Risk (HR) Types Probe (PF46) ist für den qualitativen Nachweis von humaner Papillomavirus (HPV)-Typ 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/66/68/82-DNA in Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Geweben, wie z. B. Gebärmutterhalskrebs und Plattenepithelkarzinom des Oropharynx (OSCC), mittels chromogener *in-situ*-Hybridisierung (CISH) bestimmt. Die Sonde ist für die Verwendung in Kombination mit dem ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB (Prod. Nr. T-1063-40) vorgesehen.

Das Produkt ist nur für den professionellen Gebrauch bestimmt. Alle Tests, bei denen das Produkt verwendet wird, sollten in einem zertifizierten, zugelassenen anatomisch-pathologischen Labor unter der Aufsicht eines Pathologen/Humangenetikern von qualifiziertem Personal durchgeführt werden.

Die Sonde ist als Hilfsmittel für die Differenzialdiagnose von Gebärmutterhalskrebs und OSCC vorgesehen, und therapeutische Maßnahmen sollten nicht allein auf der Grundlage des Testergebnisses eingeleitet werden.

2. Prinzip der Methode

Die chromogene *in-situ*-Hybridisierung (CISH) erlaubt den Nachweis und die Visualisierung von spezifischen Nukleinsäuresequenzen in Zellpräparationen. Haptenmarkierte Nukleotid-Fragmente, sogenannte CISH-Sonden, und deren komplementäre Zielsequenzen in den Präparationen werden co-denaturiert und können anschließend während der Hybridisierung binden. Danach werden unspezifische und ungebundene Sondenfragmente durch Stringenzwaschschritte entfernt. Die Duplex-Bildung der markierten Sonde wird mittels primärer (nicht markierter) Antikörper sichtbar gemacht, welche von sekundären polymerisierten Enzym-konjugierten Antikörpern detektiert werden. Die enzymatische Reaktion mit den chromogenen Substraten führt zur Bildung von Farbpräzipitaten. Nach der Gegenfärbung des Zellkerns mit einer Zellkern-Färbung können die hybridisierten Sondenfragmente mit einem Lichtmikroskop visualisiert werden.

3. Enthaltene Reagenzien

Die ZytoFast HPV High-Risk (HR) Types Probe besteht aus:

- HPV-Typ 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/66/68/82 spezifischen Digoxigenin-markierten Oligonukleotiden (~ 2,2 ng/μl), die gegen DNA-Sequenzen gerichtet sind, welche die HPV 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/66/68/82 Proteine E6, E7 und/oder L1 codieren.

Diese Sonde ist ebenfalls gegen die entsprechenden RNA-Sequenzen von E6-, E7- und/oder L1-Proteinen gerichtet, die während einiger Phasen der Infektion exprimiert werden.

- Hybridisierungsbuffer auf Basis von Formamid

Die ZytoFast HPV High-Risk (HR) Types Probe ist verfügbar in einer Größe:

- T-1140-40: 0.4 ml (40 Reaktionen von je 10 μl)

4. Benötigte, aber nicht bereitgestellte Materialien

- ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB (Prod. Nr. T-1063-40)
- Positive und negative Kontrollproben
- Objektträger, positiv geladen
- Wasserbad (55 °C, 98 °C)
- Hybridizer oder Wärmeplatte
- Hybridizer oder Feuchtekkammer im Hybridisierungssofen
- Verstellbare Pipetten (10 μl, 100 μl, 1000 μl)
- Küvetten oder Färbeträge
- Stoppuhr
- Kalibriertes Thermometer
- Ethanol oder denaturierter Alkohol
- Xylol
- Methanol 100%
- Wasserstoffperoxid (H₂O₂) 30%
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser
- Deckgläser (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Naturkautschuk-Klebstoff, z.B. Fixogum Rubber Cement (Prod. Nr. E-4005-50/-125) oder Ähnliches
- Regelmäßig gewartetes Lichtmikroskop (100-200x)

5. Lagerung und Handhabung

Bei 2-8°C in aufrechter Position lagern. Unmittelbar nach Gebrauch wieder unter Lagerbedingungen aufbewahren. Keine Reagenzien nach Ablauf des auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatums verwenden. Das Produkt ist bei sachgemäßer Handhabung bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil.

6. Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Gebrauchsanweisung vor der Verwendung lesen!
- Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden!
- Dieses Produkt enthält Substanzen (in geringen Konzentrationen und Volumina), welche gesundheitsschädlich und potentiell infektiös sind. Jeder direkte Kontakt mit den Reagenzien muss vermieden werden. Entsprechende Schutzmaßnahmen (Verwendung von Einmalhandschuhen, Schutzbrille und Laborbekleidung) sind zu ergreifen!
- Schwerwiegende Vorfälle, die im Zusammenhang mit dem Produkt aufgetreten sind, in Übereinstimmung mit den örtlichen Vorschriften dem Hersteller sowie den zuständigen Behörden melden!
- Sollten Reagenzien mit der Haut in Kontakt kommen, die betroffenen Stellen sofort mit viel Wasser abspülen!
- Ein Sicherheitsdatenblatt ist auf Anfrage für den professionellen Anwender verfügbar.
- Reagenzien nicht wiederverwenden, außer die Wiederverwendung ist ausdrücklich erlaubt!
- Kreuzkontaminationen der Präparate vermeiden, da diese zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
- Die Präparate dürfen während der Hybridisierungs- und Waschschritte nicht austrocknen!

Gefahren- und Sicherheitshinweise:

Die gefahrbestimmende Komponente ist Formamid.

**Gefahr**

H351	Kann vermutlich Krebs erzeugen.
H360FD	Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
H373	Kann die Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition.
P201	Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
P202	Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.
P260	Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen.
P280	Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
P308+P313	BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P405	Unter Verschluss aufbewahren.

7. Einschränkungen

- Für die Verwendung als In-vitro-Diagnostikum.
- Nur für die professionelle Anwendung.
- Nur für den nicht-automatischen Gebrauch.
- Die klinische Interpretation jeglicher positiven Färbung bzw. deren Abwesenheit muss im Kontext mit der klinischen Anamnese, Morphologie, anderer histopathologischer Kriterien sowie weiterer diagnostischer Tests erfolgen. Es obliegt der Verantwortung eines qualifizierten Pathologen, mit CISH Sonden, Reagenzien, Diagnose-Panels und den zur Erstellung von gefärbten Präparaten verwendeten Methoden vertraut zu sein. Die Färbung ist in einem zertifizierten, lizenzierten Labor unter Aufsicht eines Pathologen durchzuführen, der für die Auswertung der Färbepreparate und für die Sicherstellung der Eignung von positiven und negativen Kontrollen verantwortlich ist.
- Die Färbung der Präparate, insbesondere die Signalintensität und die Hintergrundfärbung, ist abhängig von der Behandlung und Prozessierung der Präparate vor der Färbung. Unsachgemäßes Fixieren, Einfrieren, Auftauen, Waschen, Trocknen, Erhitzen, Schneiden oder Kontamination mit anderen Präparaten oder Flüssigkeiten können Artefakte oder falsche Ergebnisse verursachen. Inkonsistente Ergebnisse können von Variationen bei Fixierungs- und Einbettungsverfahren sowie von inhärenten Unregelmäßigkeiten innerhalb des Präparates resultieren.
- Die Sonde ist nur für den Nachweis der Loci, die in Kapitel 3 „Enthaltene Reagenzien“ beschrieben werden, zu verwenden.
- Die Leistung wurde unter Verwendung der in dieser Gebrauchsanweisung beschriebenen Verfahren validiert. Abweichungen von diesen Verfahren können die Leistung beeinflussen und müssen vom Anwender validiert werden. Dieses IVD ist nur dann CE-zertifiziert, wenn es wie in dieser Gebrauchsanweisung beschrieben im Rahmen der bestimmungsgemäßen Verwendung eingesetzt wird.

8. Störsubstanzen

Folgende Fixierungen sind nicht kompatibel mit ISH:

- Bouin Fixierung
- B5 Fixierung
- Saure Fixiermittel (z.B. Pikrinsäure)
- Zenker Fixierung
- Alkohole (bei alleiniger Verwendung)
- Quecksilberchlorid
- Formaldehyd/Zink Fixiermittel
- Hollande Fixierung
- Ungepuffertes Formalin

9. Vorbereitung der Präparate

Die Präparatevorbehandlung ist wie in der Gebrauchsanweisung des ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB beschrieben durchzuführen.

10. Vorbereitung der Reagenzien

Das Produkt ist gebrauchsfertig. Kein Rekonstituieren, Mischen oder Verdünnen ist notwendig. Die Sonde vor der Anwendung auf Hybridisierungstemperatur (37°C) bringen und kurz mischen.

11. Testverfahren**Vorbehandlung der Präparate**

Die Präparatevorbehandlung (wie Entparaffinierung, Proteolyse) ist wie in den Gebrauchsanweisungen der ZytoFast CISH Implementation Kit beschrieben durchzuführen.

Denaturierung und Hybridisierung

1. 10 µl der Sonde auf jedes der vorbehandelten Präparate pipettieren.
2. Die Präparate mit 22 mm x 22 mm Deckgläsern abdecken (Einschluss von Luftbläschen vermeiden) und das Deckglas versiegeln.

Wir empfehlen die Verwendung von Naturkautschuk-Klebstoff (z.B. Fixogum) zum Versiegeln.

3. Die Objektträger auf einer Wärmeplatte oder in einem Hybridizer platzieren und die Proben für 5 min bei 75°C denaturieren.
4. Die Objektträger in eine Feuchtekammer überführen und für 1 h bei 37°C hybridisieren (z.B. in einem Hybridisierungsöfen).

Es ist essentiell, dass die Präparate während des Hybridisierungsschritts nicht austrocknen.

Post-Hybridisierung

Die Post-Hybridisierung (Waschen, Detektion, Gegenfärbung, Eindecken, Mikroskopie) gemäß der Gebrauchsanweisung des jeweiligen ZytoFast CISH Implementation Kit durchführen.

12. Interpretation der Ergebnisse

Bei Verwendung des ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB erscheinen die Hybridisierungssignale der Digoxigenin-markierten Polynukleotide beim Nachweis mit Meerrettichperoxidase (HRP) und DAB als braune Signale.

Im Fall von integrierter HPV-DNA kann das Signalmuster als ausgeprägte punktförmige Signale im Zellkern, oder im Fall von episomaler HPV-DNA als deutliche homogene Zellkernfärbung beobachtet werden. Eine zytoplasmatische Färbung kann beobachtet werden, wenn RNA-Sequenzen von HPV detektiert werden.

Bitte beachten:

- Die Signale sollten mindestens mit einer 200- bis 630fachen Vergrößerung visualisiert werden. Die Anwesenheit von episomalen Signalmustern kann üblicherweise mit einem Objektiv mit 200facher Vergrößerung detektiert werden, während der Nachweis von integrierten Mustern eine stärkere Vergrößerung, vorzugsweise 630fach, erfordert.
- Keine nekrotischen Bereiche, sich überlagernde Zellkerne, überverdauten Zellkerne oder Zellkerne mit schwacher Signalintensität auswerten.
- Ein negatives oder unspezifisches Ergebnis kann durch verschiedene Faktoren verursacht werden (siehe Kapitel 17 „Fehlerbehebung“).
- Um die Ergebnisse korrekt zu interpretieren, muss der Anwender das Produkt vor der Anwendung in diagnostischen Verfahren unter Berücksichtigung nationaler und/oder internationaler Richtlinien validieren.

13. Empfohlene Qualitätskontrollverfahren

Um die korrekte Funktionsweise der verwendeten Präparate und Testreagenzien zu überwachen, sollte jeder Test von internen und externen Kontrollen begleitet werden. Falls interne und/oder externe Kontrollen keine adäquate Färbung zeigen, müssen die Ergebnisse der Patientenproben als ungültig angesehen werden.

Interne Kontrolle: In unklaren Fällen sollten zur weiteren Klärung DNA-Kontrollsonden verwendet werden.

Externe Kontrolle: Validierte positive und negative Kontrollproben.

14. Leistungsmerkmale

14.1 Analytische Leistung

Die Leistung wurde gemäß der Gebrauchsanweisung des ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB evaluiert.

Analytische Sensitivität:	100% (95% CI 63.1 - 100)
Analytische Spezifität:	100% (95% CI 63.1 - 100)
Kreuzhybridisierungen:	HPV Typ 16, 26, 45, 52, 54, 58, 67, 68, 85, 97

14.2 Klinische Leistung

Diagnostische Sensitivität:	Gebärmutterhalskrebs: 100% (95% CI 88.4 – 100.0) vs. p16/ki67 dual staining O SCC: 93.33% (95% CI 76.9 – 97.3) vs. p16 IHC
Diagnostische Spezifität:	Gebärmutterhalskrebs: 100% (95% CI 88.4 – 100.0) vs. p16/ki67 dual staining O SCC: 81.82% (95% CI 76.9 – 97.3) vs. p16 IHC

15. Entsorgung

Die Entsorgung der Reagenzien muss in Übereinstimmung mit den örtlichen Vorschriften erfolgen.

16. Fehlerbehebung

Jede Abweichung von der Gebrauchsanweisung kann zu schwachen bis gar keinen Färbungen führen. Weitere Informationen erhalten Sie unter www.zytovision.com.

Schwache oder keine Signale

Mögliche Ursache	Lösung
Proteolytische Vorbehandlung nicht optimal	Die Inkubationszeit mit Pepsin optimieren, falls notwendig erhöhen oder reduzieren
Verdunstung der Sonde	Bei der Nutzung eines Hybridizers ist die Verwendung von feuchten Vliesstreifen/Wassertanks erforderlich. Bei der Nutzung eines Hybridisierungsofens muss eine Feuchtekammer verwendet werden. Zusätzlich sollte das Deckglas, z.B. mit Fixogum, vollständig versiegelt werden, um ein Austrocknen der Präparat während der Hybridisierung zu verhindern.
Unzureichende Vorbereitung des chromogenen Substrats	Anstatt die Farbsubstrate durch Eintropfen vorzubereiten, verwenden Sie eine Pipette
Dauer der Gegenfärbung zu lang	Dunkle Gegenfärbungen vermeiden, da diese positive Signale verdecken könnten
Bläuen der Gegenfärbung nicht ausreichend durchgeführt	Für das Bläuen kaltes Leitungswasser verwenden; kein warmes bzw. heißes Wasser oder Bläuungsreagenzien verwenden

Signale verblassen oder verschmelzen

Mögliche Ursache	Lösung
Verwendung eines ungeeigneten Eindeckmediums	Verwenden Sie nur die mit dem Kit gelieferte oder in der Gebrauchsanweisung empfohlene Einbettungslösung. Verwenden Sie Lösungen, die frei von Verunreinigungen sind; verwenden Sie kein Deckglasband

Ungleichmäßige oder teils nur sehr leichte Färbung

Mögliche Ursache	Lösung
Unvollständiges Entparaffinieren	Frische Lösungen verwenden, Dauer des Entparaffinierens überprüfen
Volumen der Reagenzien zu gering	Sicherstellen, dass das Volumen der Reagenzien groß genug ist, um den Bereich des Gewebes zu bedecken

Inkonsistente Ergebnisse

Mögliche Ursache	Lösung
Unzureichende Trocknung vor Applikation der Sonde	Lufttrocknung verlängern
Zu viel Wasser/Waschpuffer auf dem Gewebe vor Applikation von Pepsin, Antikörpern und/oder Farbsubstraten	Überschüssige Flüssigkeit durch Abklopfen oder Abschütteln des Objektträgers von dem Gewebeschnitt entfernen. Kleinere Mengen an restlichem Wasser/Waschpuffer beeinträchtigen nicht den Test
Variierende Methoden der Gewebefixierung oder Einbettung	Methoden der Fixierung und Einbettung optimieren
Variierende Gewebedicke	Schneiden optimieren

Degradierete Morphologie

Mögliche Ursache	Lösung
Zell- oder Gewebeproben sind nicht optimal fixiert	Die Fixierzeit und das Fixiermittel optimieren
Proteolytische Vorbehandlung zu stark	Die Inkubationszeit mit Pepsin reduzieren

Hintergrundsignale

Mögliche Ursache	Lösung
Schnitte sind irgendwann während oder nach der Hybridisierung ausgetrocknet	Das Austrocknen der Schnitte vermeiden; Feuchtekammern verwenden; Deckglas sorgfältig abdichten
Verlängerte Inkubationszeit des Substrates	Inkubationszeit des Substrates verkürzen
Unvollständiges Entparaffinieren	Frische Lösungen verwenden, Dauer des Entparaffinierens überprüfen
Proteolytische Vorbehandlung zu stark	Inkubationszeit von Pepsin optimieren
Objektträger sind vor der Hybridisierung auf Raumtemperatur abgekühlt	Die Objektträger zügig auf Hybridisierungstemperatur überführen

Überlagernde Zellkerne

Mögliche Ursache	Lösung
Ungeeignete Dicke der Gewebeschnitte	3-5 µm dicke Mikrotomschnitte anfertigen

Präparat löst sich vom Objektträger

Mögliche Ursache	Lösung
Proteolytische Vorbehandlung ist zu stark	Inkubationszeit mit Pepsin reduzieren

17. Literatur

- 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. Revision

Revision	Beschreibung der Änderung
2.1.1	Änderung der Benanntestelle



www.zytovision.com

Die aktuellste Gebrauchsanweisung sowie Gebrauchsanweisungen in verschiedenen Sprachen finden Sie unter www.zytovision.com.

Unsere Experten stehen Ihnen für Ihre Fragen zur Verfügung.
Bitte kontaktieren Sie helptech@zytovision.com
Einen Kurzbericht über Sicherheit und Leistung finden Sie unter www.zytovision.com.



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

Warenzeichen:

ZytoVision® und ZytoFast® sind Warenzeichen der ZytoVision GmbH.