



ZytoFast
EBV Probe
(Digoxigenin-labeled)

REF T-1114-400

40 (0,4 ml)

Az emberi Epstein-Barr-vírus (EBV) EBER RNS-ének minőségi kimutatására kromogén *in situ* hibridizációval (CISH)

4250380P101QC



In vitro diagnosztikai orvostechikai eszköz
az IVDR (EU) 2017/746 szerint

1. Rendeltetésszerű cél

A ZytoFast EBV Probe (PF29) a humán Epstein-Barr-vírus (EBV) EBER RNS minőségi kimutatására szolgál formalinban rögzített, paraffinba ágyazott mintákban, például diffúz nagy B-sejtes limfómákban (DLBCL) vagy Hodgkin-limfómákban, kromogén *in situ* hibridizációval (CISH). A szondát a következőkkel együtt kell használni ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB (Prod. No. T-1063-40).

A termék kizárólag professzionális használatra készült. A termékkel végzett valamennyi vizsgálatot minősített, engedéllyel rendelkező anatómiai patológiai laboratóriumban, patológus/humángenetikus felügyelete mellett, szakképzett személyzetnek kell elvégeznie.

A próba a DLBCL vagy a Hodgkin-limfómák differenciáldiagnózisának segédeszközeként használható, és a terápiás intézkedések nem alapulhatnak kizárólag a teszteredményen.

2. A vizsgálat elve

A kromogén *in situ* hibridizációs (CISH) technika lehetővé teszi specifikus nukleinsav-szekvenciák kimutatását és vizualizálását sejtkezítményekben. Hapten-jelölt nukleotidfragmentumok, úgynevezett CISH-szondák és a preparátumokban lévő komplementer célszekvenciák együttesen denaturálódnak, majd a hibridizáció során horgják, hogy egymáshoz kapcsolódjanak. Ezt követően a nem specifikus és nem kötött szondafragmentumokat szigorú mosási lépésekkel távolítják el. A jelölt szonda duplexképződése elsődleges (nem jelölt) antitestekkel láthatóvá tehető, amelyeket másodlagos polimerizált enzimkonjugált antitestekkel detektálunk. Az enzimatis reakció kromogén szubsztrátokkal ezt követően színes csapadékok képződéséhez vezet. A sejtmag nukleáris festékekkel történő ellenfestése után a hibridizált szondafragmentumok fénymikroszkópiával láthatóvá válnak.

3. Rendelkezésre bocsátott reagensek

A ZytoFast EBV Probe a következőkből áll:

- Digoxigeninnel jelölt oligonukleotidok (~ 0,2 ng/μl), amelyek az EBER-1 és EBER-2 régiót kódoló mRNS-szekvenciákat célozzák meg.

A ZytoFast EBV Probe gy méretben kapható::

- T-1114-400: 0,4 ml (40 reakció, egyenként 10 μl)

4. Szükséges, de nem biztosított anyagok

- ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB (Prod. No. T-1063-40)
- Pozitív és negatív kontrollminták
- Mikroszkópos tárgylemezek, pozitív töltésű
- Vízfürdő (55 °C, 98 °C)
- Hibridizáló vagy főzőlap
- Hibridizáló vagy pára kamra a hibridizációs kemencében
- Állítható kalibrált pipetták (10 μl, 100 μl, 1000 μl)
- Festőedények vagy fürdők
- Időzítő
- Kalibrált hőmérő
- Etanol vagy reagens alkohol
- Xilol
- Metanol 100%
- Hidrogén-peroxid (H₂O₂) 30%
- Deionizált vagy desztillált víz
- fedőlemezek (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Gumicement, pl. Fixogum Rubber Cement (Prod. No. E-4005-50/-125) vagy hasonló.
- Megfelelően karbantartott fénymikroszkóp (100-200x)

5. Tárolás és kezelés

2-8 °C-on, függőleges helyzetben tárolja. Használat után azonnal állítsa vissza a tárolási körülmények közé. Ne használja fel a reagenseket a címkén feltüntetett lejárati időn túl. A termék a címkén feltüntetett lejárati dátumig stabil, ha megfelelően kezelik.

6. Figyelmeztetések és óvintézkedések

- Használat előtt olvassa el a használati utasítást!
- Ne használja fel a reagenseket a lejárati idő lejártá után!
- Ez a termék (kis koncentrációban és mennyiségben) egészségre káros és potenciálisan fertőző anyagokat tartalmaz. Kerülje a reagensekkel való közvetlen érintkezést. Tegyen megfelelő védőintézkedéseket (használgon eldobható kesztyűt, védőszemüveget és laboratóriumi ruházatot)!
- A termékkel kapcsolatban bekövetkezett minden súlyos eseményt jelentsen a gyártónak és a helyi előírásoknak megfelelően az illetékes hatóságoknak!
- Ha a reagensek bőrrel érintkeznek, azonnal öblítse le a bőrt bőseges mennyiségű vízzel!
- A professzionális felhasználók számára kérésre biztonsági adatlap áll rendelkezésre.
- Ne használja újra a reagenseket, kivéve, ha az újrafelhasználás kifejezetten engedélyezett!
- Kerülje a minták keresztszennyeződését, mivel ez hibás eredményekhez vezethet.
- A minták nem száradhatnak meg a hibridizációs és mosási lépések alatt.

Veszélyre és óvintézkedésekre vonatkozó nyilatkozatok:

Ez a próba az 1272/2008/EK rendelet szerint nem minősül veszélyesnek.

7. Korlátozások

- *In vitro* diagnosztikai felhasználásra.
- Kizárólag professzionális használatra.
- Kizárólag nem automatizált használatra.
- A pozitív festődés klinikai értelmezését vagy annak hiányát a klinikai anamnézis, a morfológia, más szövettani kritériumok és más diagnosztikai vizsgálatok összefüggésében kell elvégezni. A szakképzett patológus/humángenetikus felelőssége, hogy ismerje a CISH-szondákat, a reagenseket, a diagnosztikai paneleket és a festett preparátum előállításához használt módszereket. A festést minősített, engedélyezett laboratóriumban kell elvégezni, patológus/humángenetikus felügyelete mellett, aki felelős a festett tárgylemezek felülvizsgálatáért és a pozitív és negatív kontrollok megfelelőségének biztosításáért.
- A minták festése, különösen a jelintenzitás és a háttérfestés, függ a minta festést megelőző kezelésétől és feldolgozásától. A nem megfelelő fixálás, fagyasztás, felolvasztás, mosás, szárítás, melegítés, szeletelés vagy más mintákkal vagy folyadékokkal való szennyeződés artefaktumokat vagy hamis eredményeket eredményezhet. Az inkonzisztens eredmények a fixálási és beágyazási módszerek eltéréseiből, valamint a mintában rejlő szabálytalanságokból adódhatnak.
- A szonda csak a 3. fejezetben leírt szekvencia kimutatására használható. "Reagensek".
- A teljesítményt a jelen használati utasításban leírt eljárásokkal validálták. Ezen eljárások módosítása megváltoztathatja a teljesítményt, és azt a felhasználónak kell hitelesítenie. Ez az IVD csak akkor rendelkezik CE tanúsítvánnyal, ha az ebben a használati utasításban leírtak szerint, a rendeltetészerű használat körében használják.

8. Zavaró anyagok

A következő fixálószer nem kompatibilisek az ISH-val:

- Bouin-fixáló
- B5 fixáló
- savas fixálók (pl. pikrinsav)
- Zenker-fixáló
- Alkoholok (önmagukban használva)
- Higany-klorid
- Formaldehid/cink fixálószer
- Hollande fixálója
- Nem puffert formalin

9. A minták előkészítése

Készítse elő a mintákat a készülék használati utasításában leírtak szerint. ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB.

10. A készülék előkészítő kezelése

A termék használatra kész. Nincs szükség feloldásra, keverésre vagy hígításra. Használat előtt a szondát hibridizációs hőmérsékletre (55 °C) kell hozni, és alaposan össze kell keverni.

11. Vizsgálati eljárás

Minta előkezelés

Végezze el a minta előkezelését (pl. viaszmentesítés, proteolízis) a megfelelő ZytoFast CISH Implementation Kit használati utasítása szerint.

Denaturáció és hibridizáció

1. Pipettázzon 10 µl szondát minden előkezelt mintára.
 2. Fedje le a mintákat egy 22 mm x 22 mm-es fedőlappal (kerülje el a beszorult buborékokat), és zárja le a fedőlapot.
- A tömítéshez gumicement (pl. Fixogum) használatát javasoljuk.*
3. Helyezze a tárgylemezeket forró lemezre vagy hibridizátorra, és denaturálja a mintákat 5 percig 75 °C-on.
 4. Helyezze át a tárgylemezeket egy pára kamrába, és hibridizáljon 1 órán át 55 °C-on (pl. hibridizációs kemencében).

Nagyon fontos, hogy a minták ne száradjanak ki a hibridizációs lépés során.

Hibridizáció utáni

Végezze el a hibridizáció utáni feldolgozást (mosás, detektálás, ellenfestés, rögzítés, mikroszkópia) a megfelelő ZytoFast CISH Implementation Kit használati utasítása szerint.

12. Az eredmények értelmezése

Az eredmények értelmezése A ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB használatával a hibridizált Digoxigenin-jelölt oligonukleotidok barna mintázatot mutatnak, amikor tormaperoxidázzal (HRP) és DAB-mal detektálják őket.

Az Epstein-Barr-vírus (EBV) EBER RNS pozitív reaktivitását a célsejtekben a jól láthatóan festett sejtmag jelzi.

Kérjük, vegye figyelembe:

- A jelek vizualizálását legalább 100-szoros nagyítással kell elvégezni, ami könnyen látható jeleket eredményez.
- Ne értékelje a nekrotizált területeket, az átfedő magokat, a túlságosan megemésztett magokat és a gyenge jelintenzitású magokat.
- A negatív vagy nem specifikus eredményt több tényező is okozhatja (lásd a 16. fejezet "Hibaelhárítás" című részét).
- Az eredmények helyes értelmezése érdekében a felhasználónak a nemzeti és/vagy nemzetközi irányelveknek megfelelően validálnia kell a terméket a diagnosztikai eljárásokban való felhasználás előtt.

13. Ajánlott minőségellenőrzési eljárások

A feldolgozott minták és a vizsgálati reagensek megfelelő teljesítményének ellenőrzése érdekében minden egyes vizsgálathoz belső és külső kontrollokat kell rendelni. Ha a belső és/vagy külső kontrollok nem mutatnak megfelelő festődést, a betegmintákkal kapott eredményeket érvénytelennek kell tekinteni.

Belső ellenőrzés: Nem egyértelmű esetekben a további tisztázás érdekében RNS kontrollszondákat kell használni.

Külső vezérlés: Validált pozitív és negatív kontrollminták.

14. Teljesítményjellemzők

14.1 Analitikai teljesítmény

A teljesítményt a értékeltek ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB használati utasítása szerint.

Analitikai érzékenység:	100% (95% CI 99.7 – 100.0)
Analitikai specifikusság:	100% (95% CI 99.8 – 100.0)

A napról-napra való reprodukálhatóságot az egy vizsgáló által 10 különböző napon kapott eredmények összehasonlításával és az egyezés értékelésével vizsgálták.

	Megállapodás százalékos aránya
negatív minta	100%
pozitív minta	100%
pozitív minta	100%

A megismételhetőséget az egy vizsgáló által 10 különböző napon kapott ismételt eredmények összehasonlításával és az egyezés értékelésével vizsgálták.

	Megállapodás százalékos aránya
negative specimen	100%
positive specimen	100%
positive specimen	100%

14.2 Klinikai teljesítmény

Diagnosztikai specificitás:	DLBCL: 100% (95% CI 91.7 – 100.0) vs. IHC HL: 100% (95% CI 88.4 – 100.0) vs. PCR
Diagnosztikai specificitás:	DLBCL: 98.41% (95% CI 91.7 – 100.0) vs. IHC HL: 100% (95% CI 88.4 – 100.0) vs. PCR

15. Eltávolítás

A reagensek ártalmatlanítását a helyi előírásoknak megfelelően kell elvégezni.

16. Hibaelhárítás

A kezelési utasításoktól való bármilyen eltérés rosszabb festési eredményhez vagy egyáltalán nem festéshez vezethet. További információkért kérjük, olvassa el a www.zytovision.com/honlapot.

Gyenge jelek vagy egyáltalán nincs jel

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Nem megfelelően végzett proteolitikus előkezelés	Optimalizálja a pepszin inkubációs idejét, szükség esetén növelje vagy csökkentse azt.
Szonda párolgás	A hibridizáló használata esetén a nedves csíkok/vízzel töltött tartályok használata kötelező. Hibridizáló kemence használata esetén a pára kamra használata kötelező. Ezenkívül a fedőlemezt teljesen le kell zárni, pl. Fixogummal, hogy megakadályozzuk a minta kiszáradását a hibridizáció során.
A kromogén szubsztrát nem megfelelő előkészítése	A helyett, hogy cseppentéssel készítené el a színes szubsztrátokat, használjon pipettát.
Túl hosszú az ellenfestési idő	Kerülje a sötét ellenfestést, mert az elfedheti a pozitív festési jeleket.
Az ellenfesték kékítése nem megfelelően történik	A kékítéshez hideg folyó csapvizet használjon; ne használjon meleg vagy forró vizet vagy kékítő reagenseket.

A jelek elhalványulnak vagy összeolvadnak

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Nem megfelelő szerelési megoldást használtak	Csak a készlethez mellékelt vagy a használati utasításban ajánlott szerelési megoldást használja. Használjon szennyeződésektől mentes oldatokat; ne használjon fedőszalagot.

Egyenetlen vagy egyes részekben csak nagyon enyhe foltosodás

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Nem teljes viaszmentesítés	Használjon friss oldatokat; ellenőrizze a viaszmentesítési idő tartamát.
Túl kicsi a reagens térfogata	Győződjön meg arról, hogy a reagens térfogata elég nagy ahhoz, hogy a szöveti területet lefedje.

Ellentmondásos eredmények

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Elégtelen szárítás a szonda felhelyezése előtt	Levegőn való szárítás idejének meghosszabbítása

Túl sok víz/mosópuffer a szöveten a pepszin, az antitestek és/vagy a színezékszubsztrátumok felvitele előtt.	Győződjön meg arról, hogy a felesleges folyadékot a szövetszelvényről a tárgylemezről való leitatással vagy lerázással eltávolítja. A kis mennyiségű maradék víz/mosópuffer nem zavarja a vizsgálatot.
A szövetek rögzítési és beágyazási módszereinek változatai	A rögzítési és beágyazási módszerek optimalizálása
A szövetszelvény vastagságának változása	Optimalizálja a szekcionálást

Morfológia romlott

Lehetséges ok	Javasolt teendő
A sejt- vagy szövetmintát nem rögzítették megfelelően	A rögzítési idő és a fixálószer optimalizálása
Nem megfelelően végzett proteolitikus előkezelés	A pepszin inkubációs idejének optimalizálása

Zajos háttér

Lehetséges ok	Javasolt teendő
A szelvények a hibridizáció során vagy után bármikor kiszáradhattak.	Kerülje a szelvények kiszáradását; használjon pára kamrát; zárja le megfelelően a fedőlapot.
Meghosszabbított szubsztrát inkubációs idő	A szubsztrát inkubációs idejének lerövidítése
Nem teljes viaszmentesítés	Használjon friss oldatokat; ellenőrizze a viaszmentesítés időtartamát.
Nem megfelelően végzett proteolitikus előkezelés	A pepszin inkubációs idejének optimalizálása
A tárgylemezeket hibridizáció előtt szobahőmérsékletre kell hűteni.	A tárgylemezeket gyorsan helyezze át hibridizációs hőmérsékletre

Átfedő jelek

Lehetséges ok	Javasolt teendő
A szöveti metszetek nem megfelelő vastagsága	Készítsünk 3-5 µm-es mikrotomos metszeteket

A minta lebeg a tárgylemezről

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Túl erős proteolitikus előkezelés	A pepszin inkubációs idő lerövidítése

17. Irodalom

- 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. Felülvizsgálat



www.zytovision.com

A legfrissebb használati utasításokat, valamint a különböző nyelvű használati utasításokat a www.zytovision.com oldalon találja.

Szakértőink készséggel válaszolnak kérdéseire.

Kérjük vegye fel velünk a kapcsolatot a helptech@zytovision.com címen.

A biztonságról és a teljesítményről szóló összefoglalóért kérjük, olvassa el a következőt www.zytovision.com.



ZytoVision GmbH

Fischkai 1

27572 Bremerhaven/ Németország

Telefon: +49 471 4832-300

Fax: +49 471 4832-509

www.zytovision.com

E-mail: info@zytovision.com

Védjegyek:

A ZytoVision® és a ZytoFast® a ZytoVision GmbH védjegyei.