



**ZytoFast**  
**EBV Probe**  
(Digoxigenin-labeled)

REF T-1114-400

40 (0,4 ml)

Kvalitatīvai cilvēka Epšteina-Barra vīrusa (EBV) EBER RNS  
noteikšanai ar hromogēno *in situ* hibridizāciju (CISH)

4250380P101QC



In vitro diagnostikas medicīnas ierīce

saskaņā ar IVDR (ES) 2017/746

## 1. Paredzētais mērķis

**ZytoFast EBV Probe (PF29)** ir paredzēta cilvēka Epšteina-Barra vīrusa (EBV) EBER RNS kvalitatīvai noteikšanai formālā fiksētā, parafinā iestrādātā paraugā, piemēram, difūzu lielo B šūnu limfomās (DLBCL) vai Hodžkina limfomās, izmantojot hromogēno *in situ* hibridizāciju (CISH). Zonde ir paredzēta izmantošanai kopā ar **PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB** (Produkta Nr T-1063-40).

Produkts ir paredzēts tikai profesionālai lietošanai. Visi testi, kuros izmanto šo produktu, jāveic sertificētā, licencētā anatomiskās patoloģijas laboratorijā, patologa/cilvēka ģenētiķa uzraudzībā, ko veic kvalificēts personāls.

Zondi paredzēts izmantot kā palīglīdzekli DLBCL vai Hodžkina limfomu diferenciāldiagnozei, un terapeitiskos pasākumus nevajadzētu balstīt tikai uz testa rezultātu.

## 2. Testa princips

Hromogēnās *in situ* hibridizācijas (CISH) metode ļauj noteikt un vizualizēt specifiskas nukleīnskābju sekvenču šūnu preparātos. Ar haptēniem marķēti nukleotīdu fragmenti, tā sauktās CISH zondes, un to komplementārās mērķa sekvenču preparātos tiek kopdenaturētas un pēc tam hibridizācijas laikā tiek atdalītas. Pēc tam nespecifiskos un nesaistītos zondes fragmentus noņem ar stingrām mazgāšanas darbībām. Marķētās zondes dubleksa veidošanās var vizualizēt, izmantojot primārās (nemarkētās) antivielas, ko nosaka ar sekundārajām polimerizētajām enzīmu konjugētajām antivielām. Pēc tam fermentu reakcijas ar hromogēniem substrātiem rezultātā veidojas krāsaini nogulsnes. Pēc kodola iekrāsošanas ar kodola krāsvielu hibridizētos zondes fragmentus vizualizē ar gaismas mikroskopu.

## 3. Sniegtie reaģenti

**ZytoFast EBV Probe** sastāv no:

- ar digoksigenīnu marķēti oligonukleotīdi (~ 0,2 ng/μl), kas ir mērķēti uz mRNS sekvencēm, kuras kodē EBER-1 un EBER-2 reģionus.

**ZytoFast EBV Probe** ir pieejama vienā izmērā:

- T-1114-400: 0,4 ml (40 reakcijas pa 10 μl katrā).

## 4. Nepieciešamie, bet nepiegādātie materiāli

- ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB** (Produkta Nr. T-1063-40)
- Pozitīvās un negatīvās kontroles paraugi
- Mikroskopa priekšmetstikliņi, pozitīvi lādēti
- Ūdens vanna (55 °C, 98 °C)
- Hibridizers vai karstā plate
- Hibridizators vai mitruma kamera hibridizācijas krāsnī
- Regulējamas kalibrētas pipetes (10 μl, 100 μl, 1000 μl)
- Burku vai vannu krāsošana
- Taimeris
- Kalibrēts termometrs
- Etanols vai reaģentu spirts
- Ksilols
- Metanols 100%
- Ūdeņraža peroksīds (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30%.
- Dejonizēts vai destilēts ūdens
- Pārklājumi (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- gumijas cementu, piemēram, **Fixogum Rubber Cement** (Produkta Nr. E-4005-50/-125) vai līdzīgu.
- Atbilstoši uzturēts gaismas mikroskops (100-200x)

## 5. Uzglabāšana un pārvietošana

Uzglabāt 2-8 °C temperatūrā vertikālā stāvoklī. Uzreiz pēc lietošanas atgriezt glabāšanas apstākļos. Nelietot reaģentus pēc derīguma termiņa beigām, kas norādīts uz etiķetes. Produkts ir stabils līdz marķējumā norādītajam derīguma termiņam, ja ar to rīkojas atbilstoši.

## 6. Brīdinājumi un piesardzības pasākumi

- Pirms lietošanas izlasiet lietošanas instrukciju!
- Neizmantojiet reaģentus pēc derīguma termiņa beigām!
- Šis produkts satur veselībai kaitīgas un potenciāli infekciozas vielas (nelielā koncentrācijā un daudzumā). Izvairieties no tiešas saskares ar reaģentiem. Veikt atbilstošus aizsardzības pasākumus (lietot vienreizlietojamus cimdus, aizsargbrilles un laboratorijas apģērbu)!
- Par jebkuru nopietnu negadījumu, kas noticis saistībā ar izstrādājumu, ziņojiet ražotājam un kompetentajai iestādei saskaņā ar vietējiem noteikumiem!
- Ja reaģenti nonāk saskarē ar ādu, nekavējoties noskalojiet ādu ar lielu daudzumu ūdens!
- Profesionālam lietotājam pēc pieprasījuma ir pieejama materiālu drošības datu lapa.
- Neizmantojiet reaģentus atkārtoti, ja vien atkārtota izmantošana nav skaidri atļauta!
- Izvairieties no paraugu savstarpējas piesārņošanas, jo tas var izraisīt kļūdainus rezultātus.
- Hibridizācijas un mazgāšanas laikā paraugiem nedrīkst ļaut nožūt.

## Bīstamības un piesardzības norādījumi:

Šī zonde nav klasificēta kā bīstama saskaņā ar Regulu (EK) Nr. 1272/2008.

## 7. Ierobežojumi

- Lietošanai *in vitro* diagnostikā.
- Tikai profesionālai lietošanai.
- Tikai neautomatizētai lietošanai.
- Pozitīva krāsojuma vai tā neesamības klīniskā interpretācija jāveic, ņemot vērā klīnisko anamnēzi, morfoloģiju, citus histopatoloģiskos kritērijus, kā arī citus diagnostiskos testus. Kvalificēta patologa/cilvēka ģenētiķa pienākums ir pārzināt CISH zondes, reaģentus, diagnostikas paneļus un metodes, ko izmanto, lai iegūtu krāsoto preparātu. Krāsošana jāveic sertificētā, licencētā laboratorijā patologa/cilvēka ģenētiķa uzraudzībā, kurš ir atbildīgs par iekrāsoto priekšmetstikliņu pārskatīšanu un pozitīvās un negatīvās kontroles atbilstības nodrošināšanu.

- Parauga krāsošana, jo īpaši signāla intensitāte un fona krāsojums, ir atkarīga no parauga apstrādes un apstrādes pirms krāsošanas. Nepareiza fiksācija, sasaldēšana, atkausēšana, mazgāšana, žāvēšana, sildīšana, griezumam veidošana vai piesārņojums ar citiem paraugiem vai šķidrumiem var radīt artefaktus vai kļūdainus rezultātus. Neatbilstošus rezultātus var izraisīt fiksācijas un iestrādes metožu atšķirības, kā arī paraugam raksturīgi nelīdzenumi.
- Zondi drīkst izmantot tikai 3. nodaļā aprakstītās secības noteikšanai. "Piegādātie reaģenti".
- Darbība tika validēta, izmantojot šajā lietošanas instrukcijā aprakstītās procedūras. Šo procedūru modifikācijas var mainīt veiktspēju, un tās ir jāapstiprina lietotājam. Šis IVD ir sertificēts kā CE tikai tad, ja to lieto, kā aprakstīts šajā lietošanas instrukcijā, atbilstoši paredzētajam lietojumam.

## 8. Vietas, kas rada traucējumus

Ar ISH nav saderīgi šādi fiksatori:

- Buēna fiksatīvs
- B5 fiksators
- Skābie fiksatori (piemēram, pikronskābe).
- Zenkera fiksatīvs
- Alkoholi (ja tos lieto atsevišķi)
- Dzīvsudraba hlorīds
- Formaldehīda/cinka fiksators
- Olanda fiksatīvs līdzeklis
- Nebuferēts formalīns

## 9. Paraugu sagatavošana

Sagatavojiet paraugus, kā aprakstīts ierīces lietošanas instrukcijā. ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB.

## 10. Ierīces sagatavošanas apstrāde

Produkts ir gatavs lietošanai. Nav nepieciešams atjaunot, sajaukt vai atšķaidīt. Pirms lietošanas zondi jāuzsilda līdz hibridizācijas temperatūrai (55 °C) un rūpīgi jāsauc.

## 11. Analīzes procedūra

### Parauga pirmāpstrāde

Veiciet paraugu priekšapstrādi (piemēram, atvaskošanu, proteolīzi) saskaņā ar attiecīgā ZytoFast CISH Implementation Kit lietošanas instrukciju.

### Denaturācija un hibridizācija

1. Uz katra iepriekš apstrādātā parauga ar pipeti uzpildiet 10 µl zondes.
  2. Pārklājiet paraugus ar 22 x 22 mm lielu pārklājplāksnīti (izvairieties no burbuļu veidošanās) un aiztaisiet pārklājplāksnīti.
- Bļvēšanai ieteicams izmantot gumijas cementu (piemēram, Fixogum).*
3. Novietojiet priekšmetstiklīņus uz karstās plates vai hibridizatora un denaturējiet paraugus 5 minūtes 75 °C temperatūrā.
  4. Pārnesiet priekšmetstiklīņus uz mitruma kameru un hibridizējiet 1 h 55 °C temperatūrā (piemēram, hibridizācijas krāsnī).

*Ir svarīgi, lai hibridizācijas laikā paraugi neizžūtu.*

### Pēc hibridizācijas

Veiciet pēchibridizācijas apstrādi (mazgāšana, noteikšana, pretkrāsošana, montāža, mikroskopēšana) saskaņā ar attiecīgā ZytoFast CISH Implementation Kit lietošanas instrukciju.

## 12. Rezultātu interpretācija

Izmantojot ZytoFast PLUS CISH ieviešanas komplektu HRP-DAB, hibridizēti ar digoksigenīnu iezīmēti oligonukleotīdi, ko nosaka ar mērutku peroksīdāzi (HRP) un DAB, parādās kā brūns raksts.

Pozitīvu reaktivitāti uz Epšteina-Barra vīrusa (EBV) EBER RNS mērķa šūnās norāda skaidri iekrāsots kodols.

### Lūdzu, ņemiet vērā:

- Signālu vizualizācija jāveic vismaz ar 100kārtīgu palielinājumu, lai iegūtu viegli saskatāmus signālus.
- Neizvērtējiet nekrozes zonas, pārklājošos kodolus, pārāk sagremotus kodolus un kodolus ar vāju signāla intensitāti.
- Negatīvu vai nespecifisku rezultātu var izraisīt vairāki faktori (skatīt 16. nodaļu "Problēmu novēršana").
- Lai pareizi interpretētu rezultātus, lietotājam šis produkts pirms lietošanas diagnostikas procedūrās ir jāapstiprina saskaņā ar valsts un/vai starptautiskajām vadlīnijām.

## 13. Ieteicamās kvalitātes kontroles procedūras

Lai uzraudzītu apstrādāto paraugu un testa reaģentu pareizu darbību, katrai analīzei ir jābūt pievienotai iekšējai un ārējai kontrolei. Ja iekšējās un/vai ārējās kontroles neuzrāda atbilstošu krāsojumu, rezultāti ar pacienta paraugiem jāuzskata par nederīgiem.

**Iekšējā kontrole:** Neskaitīdros gadījumos papildu precizēšanai jāizmanto RNS kontroles zondes.

**Ārējā vadība:** Apstiprināti pozitīvie un negatīvie kontroles paraugi.

## 14. Veiktspējas raksturojumi

### 14.1 Analītiskā veiktspēja

Veiktspēja tika novērtēta saskaņā ar ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB lietošanas instrukciju.

<b>Analītiskā jutība:</b>	100% (95% CI 99.7 – 100.0)
<b>Analītiskā specifika:</b>	100% (95% CI 99.8 – 100.0)

Tika pārbaudīta salīdzināmība no dienas uz dienu, salīdzinot viena eksaminētāja 10 dažādās dienās iegūtos rezultātus un novērtējot to atbilstību.

	Vienotānās procentos
negatīvs paraugs	100%
pozitīvs paraugs	100%
pozitīvs paraugs	100%

Atkārtotamība tika pārbaudīta, salīdzinot atkārtotus rezultātus, kas iegūti no viena eksaminētāja 10 dažādās dienās, un novērtējot atbilstību.

	Vienotānās procentos
negatīvs paraugs	100%
pozitīvs paraugs	100%
pozitīvs paraugs	100%

### 14.2 Klīniskā veiktspēja

<b>Diagnostikas jutīgums:</b>	<b>DLBCL:</b> 100% (95% CI 91.7 – 100.0) pret IHC  <b>HL:</b> 100% (95% CI 88.4 – 100.0) pret PCR
<b>Diagnostikas specifiskums:</b>	<b>DLBCL:</b> 98.41% (95% CI 91.7 – 100.0) pret IHC  <b>HL:</b> 100% (95% CI 88.4 – 100.0) pret PCR

## 15. Izmešana

Reaģentu iznīcināšana jāveic saskaņā ar vietējiem noteikumiem.

## 16. Problēmu novēršana

Jebkura novirze no lietošanas instrukcijām var novest pie sliktākiem krāsošanas rezultātiem vai arī pie tā, ka krāsošana vispār nenotiek. Sīkāku informāciju skatiet [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com).

### vāji signāli vai to nav vispār

Iespējamais iemesls	Rīcība
Nepareizi veikta proteolītiskā pirmāpstrāde	Optimizēt pepsīna inkubācijas laiku, vajadzības gadījumā to palielināt vai samazināt.

Zondes iztvaikošana	Ja izmantojat hibrīdizeru, obligāti jāizmanto slapjās svītras/ ar ūdeni piepildītas tvertnes. Izmantojot hibrīdizācijas krāsnī, obligāti jāizmanto mitruma kamera. Turklāt, lai novērstu parauga izžušanu hibrīdizācijas laikā, pārklājlapas pilnībā jāaizlīmē, piemēram, ar fiksogumu.
Nepietiekama hromogēnā substrāta sagatavošana	Tā vietā, lai pagatavotu krāsu substrātus pilnu veidā, izmantojiet pipeti.
Pārāk ilgs pretkrāsošanas laiks	Izvairieties no tumša pretkrāsojuma, jo tas var aizēnot pozitīvos krāsošanas signālus.
Nepareizi veikta pretkrāsojuma zilināšana	Zilināšanai izmantojiet aukstu tekošu krāna ūdeni; nelietojiet siltu vai karstu ūdeni vai zilināšanas reagentus.

#### Signālu izžušana vai apvienošana

Iespējamais iemesls	Rīcība
Ir izmantots nepiemērots montāžas risinājums	Izmantojiet tikai komplektā iekļauto vai lietošanas instrukcijā ieteikto montāžas risinājumu. Lietojiet šķidrumus bez piemaisījumiem; nelietojiet pārklājlapas lenti.

#### Nevienmērīgi vai dažās daļās tikai ļoti viegli traipi

Iespējamais iemesls	Rīcība
Nepilnīga deparafinēšana	Izmantojiet svaigus šķidrumus; pārbaudiet deparafinēšanas ilgumu.
Pārāk mazs reaģenta tilpums	Pārliecinieties, ka reaģenta tilpums ir pietiekami liels, lai pārklātu audu laukumu.

#### Nevienmērīgi rezultāti

Iespējamais iemesls	Rīcība
Nepietiekama žāvēšana pirms zondes uzklāšanas	Pagarināt žāvēšanu gaisā
Pārāk daudz ūdens/mazgāšanas bufera uz audiem pirms pepsīna, antivielu un/vai krāsu substrātu lietošanas.	Pārliecinieties, ka no audu griezumā ir noņemts liekais šķidrums, to noslaucot vai sakratot no priekšmetstiklīņa. Nelieli ūdens/mazgāšanas bufera atlikumi netraucē testam.
Audu fiksācijas un iestrādāšanas metožu variācijas	Optimizēt fiksācijas un iestrādes metodes
Audu griezumā biezuma izmaiņas	Optimizēt griezumā sadalīšanu

#### Morfoloģijas degradācija

Iespējamais iemesls	Rīcība
Šūnu vai audu paraugs nav pareizi fiksēts	Optimizēt fiksācijas laiku un fiksatoru
Nepareizi veikta proteolītiskā pirmāpstrāde	Pepsīna inkubācijas laika optimizēšana

#### Trokšņains fons

Iespējamais iemesls	Rīcība
Sekcijas izžušanas jebkurā laikā hibrīdizācijas laikā vai pēc tās.	Izvairieties no sekciju izžušanas; izmantojiet mitruma kameru; pienācīgi noslēdziet vāku.
Ilgāks substrāta inkubācijas laiks	Substrāta inkubācijas laika saīsināšana

Nepilnīga deparafinēšana	Izmantojiet svaigus šķidrumus; pārbaudiet deparafinēšanas ilgumu.
Nepareizi veikta proteolītiskā pirmāpstrāde	Pepsīna inkubācijas laika optimizēšana
Slaidi pirms hibrīdizācijas atdzesēti līdz istabas temperatūrai	Ātri pārvietojiet priekšmetstiklīņus hibrīdizācijas temperatūrā

#### Signālu pārklāšanās

Iespējamais iemesls	Rīcība
Neatbilstošs audu griezumā biezums	Sagatavojiet 3-5 µm mikrotoma griezumus

#### Paraugs peld no priekšmetstiklīņa

Iespējamais iemesls	Rīcība
Pārāk spēcīga proteolītiskā pirmāpstrāde	Pepsīna inkubācijas laika saīsināšana

#### 17. Literatūra

- 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. Pārskatīšana



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

Jaunākās lietošanas instrukcijas, kā arī lietošanas instrukcijas dažādās valodās skatīt [vietnē www.zytovision.com](http://www.zytovision.com).

Mūsu eksperti ir gatavi atbildēt uz jūsu jautājumiem.

Lūdzu, sazinieties ar [help@zytovision.com](mailto:help@zytovision.com)

Drošības un veiktspējas kopsavilkumu skatiet šādā dokumentā [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com).



ZytoVision GmbH

Fischkai 1

27572 Bremerhäfen/ Vācija

Tālrunis: +49 471 4832-300

Fakss: +49 471 4832-509

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

E-pasts: [info@zytovision.com](mailto:info@zytovision.com)

#### Preču zīmes:

ZytoVision® un ZytoFast® ir ZytoVision GmbH preču zīmes.