



ZytoFast

HPV High-Risk (HR) Types Probe

(Digoxigenin-labeled)

REF T-1140-400

40 (0,4 ml)

Kvalitatīvai cilvēka papilomas vīrusa (HPV)
16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/66/68/82
tipa DNS noteikšanai ar hromogēno *in situ* hibridizāciju
(CISH)

4250380P172R3



In vitro diagnostikas medicīnas ierīce

saskaņā ar IVDR (ES) 2017/746

1. Paredzētais mērķis

ZytoFast HPV High-Risk (HR) Types Probe (PF46) ir paredzēta kvalitatīvai cilvēka papilomas vīrusa (HPV) 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/66/68/82 tipa DNS noteikšanai formalinā fiksētos, parafinā iestrādātos paraugos, piemēram, dzemdes kakla karcinomā un mutes kakla plakanšūnu vēzī (OSCC), izmantojot hromogēno *in situ* hibridizāciju (CISH). Zonde ir paredzēta izmantošanai kopā ar ZytoFast 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 palīgīdzekli dzemdes kakla karcinomas un OSCC diferenciāldiagnozei, un, pamatojoties tikai uz testa rezultātu, nevajadzētu uzsākt terapeitiskus pasākumus.

2. Testa princips

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

3. Sniegtie reaģenti

ZytoFast HPV High-Risk (HR) Types Probe sastāv no:

- Ar digoksigenīnu marķēti oligonukleotīdi (~ 2,2ng/μl), kas specifiski 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/66/68/82HPV tipam un ir vērsti pret DNS sekvencēm, kas kodē HPV 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/66/68/82 proteīnus E6, E7 un/vai L1.
- Zonde ir vērsta arī pret attiecīgajām E6, E7 un/vai L1 olbaltumvielām RNS sekvencēm, kas tiek ekspresētas dažos infekcijas posmos..

- Hibridizācijas buferis uz formamīda bāzes

ZytoFast HPV High-Risk (HR) Types Probe ir pieejama vienā izmērā:

- T-1140-40: 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 (H₂O₂) 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:

Bīstamību noteicošais komponents ir formamīds.



Bīstamība

H351	Aizdomas par vēža izraisīšanu.
H360FD	Var kaitēt auglībai. Var kaitēt nedzimušajam bērnam.
H373	Ilgstāša vai atkārtota iedarbība var izraisīt orgānu bojājumus.
P201	Pirms lietošanas saņemiet īpašus norādījumus.
P202	Nestrādājiet ar to, kamēr nav izlasīti un izprasti visi drošības pasākumi.
P260	Neelpot putekļus/dūmus/gāzi/smīdzeni/tvaikus/smīdzeni.
P280	Valkājiet aizsargcimdus/aizsargapģērbu/acu/ sejas aizsardzību.
P308+P313	Ja ir apdraudēta vai ir bažas: Saņemiet medicīnisku padomu/pievērsiet uzmanību.
P405	Veikals ir aizslēgts.

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, griezumveidošana 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 nelidzenumi.
- 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 (37 °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

- Uz katra iepriekš apstrādātā parauga ar pipeti uzpildiet 10 µl zondes.
 - Pārklājiet paraugus ar 22 x 22 mm lielu pārklājplāksnīti (izvairieties no burbuļu veidošanās) un aiztaisiet pārklājplāksnīti.
- Blīvēšanai ieteicams izmantot gumijas cementu (piemēram, Fixogum).*
- Novietojiet priekšmetstikliņus uz karstās plātes vai hibridizatora un denaturējiet paraugus 5 minūtes 75 °C temperatūrā.
 - Pārvietojiet priekšmetstikliņus mitruma kamerā un hibridizējiet 1 h 37 °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 mērītu peroksīdāzi (HRP) un DAB, parādās kā brūns raksts.

Nokrāsošanās zīmējums kodolā ir redzams kā skaidri punktveida signāli integrēta HPV gadījumā vai kā spēcīga un viendabīga kodola nokrāsošanās epizomāla HPV gadījumā. Citoplazmas krāsojumu novēro, ja tiek konstatētas HPV RNS sekvences.

Lūdzu, ņemiet vērā:

- Signālu vizualizācija jāveic, izmantojot objektīvu komplektu ar vismaz 200 līdz 630kārtīgu palielinājumu. Epizomas krāsojuma rakstu klātbūtni parasti skaidri konstatē ar objektīvu ar 200kārtīgu palielinājumu, savukārt integrētā raksta konstatēšanai nepieciešams lielāks palielinājums, vēlams 630kārtīgs.
- 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: Neskaitāmos gadījumos turpmākai precizēšanai jāizmanto DNS kontroles zondes.

Ārējā vadība: Apstiprināti pozitīvie un negatīvie kontroles paraugi.

14. Veiktspējas raksturlielumi**14.1 Analītiskā veiktspēja**

Analītiskā jutība:	100% (95% CI 63.1 - 100)
Analītiskā specifika:	100% (95% CI 63.1 - 100)
Krusteniskā hibridizācija:	HPV types 16, 26, 45, 52, 54, 58, 67, 68, 85, 97



14.2 Klīniskā veikspēja

Diagnostikas jutīgums:	dzemdes kakla karcinomā: 100% (95% CI 88.4 – 100.0) pret p16/ki67 dubulto krāsošanu OSCC: 93.33% (95% CI 76.9 – 97.3) vs. p16 IHC
Diagnostikas specifiskums:	dzemdes kakla karcinomā: 100% (95% CI 88.4 – 100.0) pret p16/ki67 dubulto krāsošanu OSCC: 81.82% (95% CI 76.9 – 97.3) vs. p16 IHC

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.

vāji signāli vai to nav vispār

Iespējamais iemesls	Rīcība
Nepareizi veikta proteolītiskā pirmapstrāde	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 krāsni, obligāti jāizmanto mitruma kamera. Turklāt, lai novērstu parauga izžūšanu hibrīdizācijas laikā, pārklājlapas pilnībā jāaizlīmē, piemēram, ar fiksogumu.
Nepietiekama hromogēnā substrāta sagatavošana	Tā vietā, lai pagatavotu krāsu substrātus pilienu veidā, izmantojiet pipeti.
Pārāk ilgs pretkrāsošanas laiks	Izvairieties no tumša pretkrāsojuma, jo tas var aizēnot pozitīvos krāsošanas signālus.
Nepareizi veikta pretkrāsojuma zīlināšana	Zīlināšanai izmantojiet aukstu tekošu krāna ūdeni; nelietojiet siltu vai karstu ūdeni vai zīlināšanas reaģentus.

Signāli izbalē vai saplūst

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

Nevienmērīgi vai dažviet tikai ļoti viegli traipi

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

Nesaskaņoti 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 sakrāt no priekšmetstikliņa. Nelieli ūdens/mazgāšanas bufera atlikumi netraucē testam.
Audu fiksācijas un iestrādāšanas metožu variācijas	Optimizēt fiksācijas un iestrādes metodes
Audu griezumā biezuma izmaiņas	Optimizēt griezumu sadalīšanu

Morfoloģija degradēta

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

Trokšņains fons

Iespējamais iemesls	Rīcība
Sekcijas izžuvušas jebkurā laikā hibrīdizācijas laikā vai pēc tās.	Izvairieties no sekciju izžūšanas; izmantojiet mitruma kameru; pienācīgi noslēdziet vāku.
Ilgāks substrāta inkubācijas laiks	Substrāta inkubācijas laika saīsināšana
Nepilnīga deparafinēšana	Izmantojiet svaigus šķīdumus; pārbaudiet deparafinēšanas ilgumu.
Nepareizi veikta proteolītiskā pirmapstrāde	Pepsīna inkubācijas laika optimizēšana
Slaidi pirms hibrīdizācijas atdzesēti līdz istabas temperatūrai	Ātri pārvietojiet priekšmetstikliņus hibrīdizācijas temperatūrā

Signālu pārklāšanās

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

Paraugs peld no priekšmetstikliņa

Iespējamais iemesls	Rīcība
Pārāk spēcīga proteolītiskā pirmapstrāde	Pepsīna inkubācijas laika saīsināšana

17. Literatūra

- 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. Pārskatīšana



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 helptech@zytovision.com

Drošības un veikspējas kopsavilkumu skatiet šādā dokumentā www.zytovision.com.



ZytoVision GmbH

Fischkai 1

27572 Bremerhäfena/ Vācija

Tālrunis: +49 471 4832-300

Fakss: +49 471 4832-509

www.zytovision.com

E-pasts: info@zytovision.com

Preču zīmes:

ZytoVision® un ZytoFast® ir ZytoVision GmbH preču zīmes.