



ZytoFast

HPV High-Risk (HR) Types Probe

(Digoxigenin-labeled)

REF T-1140-400

40 (0,4 ml)

Na kvalitatívnu detekciu DNA ľudského papilomavírusu (HPV) typu
16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/66/68/82
pomocou chromogénnej *in situ* hybridizácie (CISH)

4250380P172R3



Diagnostická zdravotnícka pomôcka in vitro

podľa IVDR (EÚ) 2017/746

1. Zamýšľaný účel

Sonda ZytoFast HPV High-Risk (HR) Types Probe (PF46) je určená na kvalitatívnu detekciu ľudského papilomavírusu (HPV) typu 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/66/68/82 DNA vo formalínom fixovaných, do parafrínu vložených vzorkách, ako je karcinóm krčka maternice a skvamózny karcinóm orofaryngu (OSCC), pomocou chromogénnej *in situ* hybridizácie (CISH). Sonda je určená na použitie v kombinácii s ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB (Prod. No. T-1063-40).

Výrobok je určený len na profesionálne použitie. Všetky testy s použitím výrobku by mal vykonávať kvalifikovaný personál v certifikovanom, licencovanom laboratóriu anatomickej patológie pod dohľadom patológa/humánneho genetika.

Sonda je určená ako pomôcka pri diferenciálnej diagnostike karcinómu krčka maternice a OSCC a terapeutické opatrenia by sa nemali začínať len na základe výsledku testu.

2. Princíp testu

Technika chromogénnej *in situ* hybridizácie (CISH) umožňuje detekciu a vizualizáciu špecifických sekvencií nukleových kyselín v bunkových preparátoch. Hapténom označené nukleotidové fragmenty, tzv. sondy CISH, a ich komplementárne cieľové sekvencie v preparátoch sú počas hybridizácie spoločne kodenaturované a následne sa nechajú hybridizovať. Potom sa nešpecifické a nenaviazané fragmenty sond odstránia premytím. Tvorbu duplexu značenej sondy možno vizualizovať pomocou primárnych (neoznačených) protilátok, ktoré sa detekujú pomocou sekundárnych polymerizovaných protilátok konjugovaných s enzýmom. Enzymatická reakcia s chromogénnymi substrátmi následne vedie k tvorbe farebných precipitátov. Po kontrastnom farbení jadra jadrovým farbivom sa hybridizované fragmenty sondy vizualizujú svetelnou mikroskopiou.

3. Poskytnuté činidlá

ZytoFast HPV High-Risk (HR) Types Probe sa skladá z:

- Digoxigenínom značené oligonukleotidy (~ 2,2 ng/μl) špecifické pre HPV typu 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/66/68/82, ktoré sú zamerané na sekvencie DNA kódujúce HPV 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/66/68/82 proteíny E6, E7 a/alebo L1.

Sonda sa zameriava aj na príslušné sekvencie RNA proteínov E6, E7 a/alebo L1, ktoré sa exprimujú počas niektorých štádií infekcií.

- Hybridizačný pufer na báze formamidu

ZytoFast HPV High-Risk (HR) Types Probe je k dispozícii v jednej veľkosti:

- T-1140-40: 0,4 ml (40 reakcií po 10 μl)

4. Materiály požadované, ale neposkytované

- ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB (Prod. No. T-1063-40)
- Pozitívne a negatívne kontrolné vzorky
- Mikroskopické sklíčka, kladne nabité
- Vodný kúpeľ (55 °C, 98 °C)
- Hybridizér alebo horúca platňa
- Hybridizér alebo vlhká komora v hybridizačnej peci
- Nastaviteľné kalibrované pipety (10 μl, 100 μl, 1000 μl)
- Farbiace nádoby alebo kúpele
- Časovač
- Kalibrovateľný teplomer
- Etanol alebo reagenčný alkohol
- Xylén
- Metanol 100%
- Peroxid vodíka (H₂O₂) 30%
- Deionizovaná alebo destilovaná voda
- Krycie sklíčka (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Gumové lepidlo, napr. Fixogum Rubber Cement (výrobné číslo E-4005-50/-125) alebo podobný
- Primerane udržiavaný svetelný mikroskop (100-200x)

5. Skladovanie a manipulácia

Uchovávať pri teplote 2-8 °C vo zvislej polohe. Okamžite po použití vráťte do skladovacích podmienok. Nepoužívajte činidlá po dátume expirácie uvedenom na etikete. Produkt je stabilný do dátumu expirácie uvedeného na etikete, ak sa s ním zaobchádza primeraným spôsobom.

6. Upozornenia a bezpečnostné opatrenia

- Pred použitím si prečítajte návod na použitie!
- Nepoužívajte činidlá po uplynutí dátumu expirácie!
- Tento výrobok obsahuje látky (v nízkych koncentráciách a objemoch), ktoré sú zdraviu škodlivé a potenciálne infekčné. Vyhnite sa akémukoľvek priamemu kontaktu s činidlami. Prijmite vhodné ochranné opatrenia (používajte jednorazové rukavice, ochranné okuliare a laboratórny odev)!
- Každý závažný incident, ku ktorému došlo v súvislosti s výrobkom, nahláste výrobcovi a príslušnému orgánu podľa miestnych predpisov!
- Ak sa činidlá dostanú do kontaktu s pokožkou, okamžite ju opláchnite veľkým množstvom vody!
- Pre profesionálnych používateľov je na požiadanie k dispozícii karta bezpečnostných údajov.
- Reagencie nepoužívajte opakovane, pokiaľ nie je opakované použitie výslovne povolené!
- Vyhnite sa krížovej kontaminácii vzoriek, pretože to môže viesť k chybným výsledkom.
- Počas hybridizácie a premývania sa vzorky nesmú nechať vyschnúť.

Výstražné a bezpečnostné upozornenia:

Zložkou určujúcou nebezpečenstvo je formamid.



Nebezpečenstvo

H351	Podozrenie, že spôsobuje rakovinu.
H360FD	Môže poškodiť plodnosť. Môže poškodiť nenarodené dieťa.
H373	Môže spôsobiť poškodenie orgánov pri dlhodobej alebo opakovanej expozícii.
P201	Pred použitím si vyžiadajte špeciálne pokyny.
P202	Nemanipulujte s ním, kým si neprečítate a nepochopíte všetky bezpečnostné opatrenia.
P260	Nevdychujte prach/dym/plyn/hmlu/výpary/sprej.
P280	Používajte ochranné rukavice/ochranný odev/ochranu očí/ochranu tváre.
P308+P313	Ak je vystavená alebo znepokojená: Vyhľadajte lekársku pomoc/opatrenie.
P405	Skladujte uzamknuté.

7. Obmedzenia

- Na diagnostické použitie *in vitro*.
- Len na profesionálne použitie.
- Len na neautomatizované použitie.
- Klinická interpretácia akéhokoľvek pozitívneho farbenia alebo jeho neprítomnosti sa musí vykonať v kontexte klinickej anamnézy, morfológie, iných histopatologických kritérií, ako aj iných diagnostických testov. Kvalifikovaný patológ/humánny genetik je povinný poznať sondy CISH, reagenty, diagnostické panely a metódy používané na výrobu farbeného preparátu. Farbenie sa musí vykonávať v certifikovanom, licencovanom laboratóriu pod dohľadom patológa/ humánneho genetika, ktorý je zodpovedný za preskúmanie farbených preparátov a zabezpečenie primeranosti pozitívnych a negatívnych kontrol.
- Zafarbenie vzorky, najmä intenzita signálu a zafarbenie pozadia, závisí od manipulácie so vzorkou a jej spracovania pred zafarbením. Nesprávna fixácia, zmrazenie, rozmrazenie, umývanie, sušenie, zahrievanie, rezanie alebo kontaminácia inými vzorkami alebo tekutinami môže spôsobiť artefakty alebo falošné výsledky. Nekonzistentné výsledky môžu byť dôsledkom rozdielov v metódach fixácie a vkladania, ako aj vnútorných nepravidielností vo vzorke.
- Sonda by sa mala používať len na detekciu sekvencie opísanej v kapitole 3. "Dodávané činidlá".
- Výkon bol overený pomocou postupov opísaných v tomto návode na použitie. Úpravy týchto postupov môžu zmeniť výkon a musí ich overiť používateľ. Tento IVD je certifikovaný ako CE len vtedy, keď sa používa tak, ako je opísané v tomto návode na použitie v rozsahu určeného použitia.

8. Rušivé látky

Nasledujúce fixatíva sú nekompatibilné s ISH:

- Bouinovo fixačné činidlo
- Fixačné činidlo B5
- Kyslé fixačné prostriedky (napr. kyselina pikrová)
- Zenkerov fixatív
- Alkoholy (ak sa používajú samostatne)
- Chlorid ortuťnatý
- Formaldehydové/zinkové fixačné činidlo
- Hollandova fixácia
- Formálín bez pufru

9. Príprava vzoriek

Prípravte vzorky podľa návodu na použitie ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB.

10. Prípravné ošetrenie zariadenia

Výrobok je pripravený na použitie. Nie je potrebná rekonštitúcia, miešanie ani riedenie. Pred použitím sondu uveďte do hybridizačnej teploty (37 °C) a dôkladne premiešajte.

11. Postup analýzy**Predbežná úprava vzorky**

Vykonajte predbežnú úpravu vzorky (napr. odparačovanie, proteolýzu) podľa návodu na použitie príslušnej súpravy ZytoFast CISH Implementation Kit.

Denaturácia a hybridizácia

1. Pipetujte 10 µl sondy na každú vopred upravenú vzorku.
 2. Vzorky zakryte krycím sklíčkom s rozmermi 22 x 22 mm (zabráňte zachytávaniu bublín) a krycie sklíčko utesnite.
- Na utesnenie odporúčame použiť gumové lepidlo (napr. Fixogum).*
3. Umiestnite sklíčka na horúcu platňu alebo hybridizér a vzorky denaturujte 5 minút pri teplote 75 °C.
 4. Sklíčka preneste do vlhkej komory a hybridizujte 1 hodinu pri 37 °C (napr. v hybridizačnej peci).

Je dôležité, aby vzorky počas hybridizácie nevyschli.

Po hybridizácii

Spracovanie po hybridizácii (premytie, detekcia, protifarbenie, montáž, mikroskopovanie) vykonajte podľa návodu na použitie príslušnej súpravy ZytoFast CISH Implementation Kit.

12. Interpretácia výsledkov

Pri použití súpravy ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB sa hybridizované digoxigenínom značené oligonukleotidy zobrazia ako hnedý vzor pri detekcii pomocou chrovej peroxidázy (HRP) a DAB.

Vzor farbenia v jadre možno pozorovať ako zreteľné bodové signály v prípade integrovaného HPV alebo ako silné a homogénne jadrové farbenie v prípade epizomálneho HPV. Cytoplazmatické sfarbenie sa pozoruje, keď sú detekované RNA sekvencie HPV.

Upozornenie:

- Vizualizácia signálov by sa mala vykonávať pomocou súboru objektívov s minimálne 200-násobným až 630-násobným zväčšením. Prítomnosť epizomálneho vzoru farbenia sa zvyčajne jasne zistí pomocou objektívu s 200-násobným zväčšením, zatiaľ čo detekcia integrovaného vzoru si vyžaduje väčšie zväčšenie, najlepšie 630-násobné.
- Nehodnotte oblasti nekrózy, prekrývajúcich sa jadier, nadmerne strávených jadier a jadier so slabou intenzitou signálu.
- Negatívny alebo nešpecifický výsledok môže byť spôsobený viacerými faktormi (pozri kapitolu 16 "Riešenie problémov").
- V záujme správnej interpretácie výsledkov musí používateľ tento výrobok pred použitím v diagnostických postupoch validovať podľa národných a/alebo medzinárodných smerníc.

13. Odporúčané postupy kontroly kvality

Na monitorovanie správneho fungovania spracovaných vzoriek a testovacích činidiel by mali byť ku každému testu pripojené interné a externé kontroly. Ak interné a/alebo externé kontroly nepreukážu vhodné zafarbenie, výsledky so vzorkami pacientov sa musia považovať za neplatné.

Vnútna kontrola: V nejasných prípadoch by sa na ďalšie objasnenie mali použiť kontrolné sondy DNA.

Externé ovládanie: Validované pozitívne a negatívne kontrolné vzorky.

14. Výkonnostné charakteristiky

14.1 Analytický výkon

Analytická citlivosť:	100% (95% CI 63.1 - 100)
Analytická špecificita:	100% (95% CI 63.1 - 100)
Křížové hybridizácie:	HPV typu 16, 26, 45, 52, 54, 58, 67, 68, 85, 97

14.2 Klinický výkon

Diagnostická senzitivita:	Rakovina krčka maternice: 100% (95% CI 88.4 – 100.0) vs. p16/ki67 duálne farbenie OŠCC: 93.33% (95% CI 76.9 – 97.3) vs. p16 IHC
Diagnostická špecificita:	Rakovina krčka maternice: 100% (95% CI 88.4 – 100.0) vs. p16/ki67 duálne farbenie OŠCC: 81.82% (95% CI 76.9 – 97.3) vs. p16 IHC

15. Likvidácia

Likvidácia činidiel sa musí vykonávať v súlade s miestnymi predpismi.

16. Riešenie problémov

Akákoľvek odchýlka od návodu na obsluhu môže viesť k horším výsledkom farbenia alebo k tomu, že sa farbenie vôbec nevyskytne. Viac informácií nájdete na stránke www.zytovision.com.

Slabé signály alebo žiadne signály

Možná příčina	Akcia
Predbežná proteolytická úprava nebola vykonaná správne	Optimalizujte čas inkubácie pepsínu, v prípade potreby ho predĺžte alebo skráťte
Odparovanie sondy	Pri používaní hybridizéra je používanie mokrych pásov/nádob naplnených vodou povinné. Pri používaní hybridizačnej pece je potrebné používať vlhkú komoru. Okrem toho by malo byť krycie sklo úplne utesnený, napr. pomocou Fixogumu, aby sa zabránilo vysychaniu vzorky počas hybridizácie
Nedostatočná príprava chromogénneho substrátu	Namiesto prípravy farebných substrátov kvapkaním použite pipetu
Príliš dlhý čas kontrastného farbenia	Vyhnite sa tmavému kontrastnému farbeniu, pretože môže zakryť pozitívne signály farbenia
Nesprávne vykonané modrenie kontrastného farbiva	Na modrenie používajte studenú tečúcu vodu z vodovodu; nepoužívajte teplú alebo horúcu vodu ani modriace činidlá.

Signály zanikajú alebo sa spájajú

Možná příčina	Akcia
Bolo použité nevhodné montovacie médium	Používajte iba montážny roztok dodaný so súpravou alebo odporúčaný v návode na použitie. Používajte roztoky bez akýchkoľvek nečistôt; nepoužívajte kryciu pásku

Nerovnomerné alebo v niektorých častiach len veľmi ľahké zafarbenie

Možná příčina	Akcia
Neúplné odparačovanie	Používajte čerstvé roztoky; skontrolujte dĺžku trvania odparačovania
Príliš malý objem činidla	Uistite sa, že objem činidla je dostatočne veľký na pokrytie plochy tkaniva

Nekonzistentné výsledky

Možná příčina	Akcia
Nedostatočné vysušenie pred aplikáciou sondy	Predĺženie sušenia na vzduchu
Príliš veľa vody/preplachovacieho pufra na tkanive pred aplikáciou pepsínu, protilátok a/alebo farebných substrátov	Uistite sa, že prebytočná tekutina je z tkanivového rezu odstránená odsátím alebo vytriasaním zo sklíčka. Malé množstvá zvyšovej vody/preplachovacieho pufra neinterferujú s testom
Rozdiely v metódach fixácie a vkladania tkaniva	Optimalizácia metód fixácie a vkladania
Zmeny v hrúbke tkanivového rezu	Optimalizácia delenia na sekcie

Zhoršená morfológia

Možná příčina	Akcia
Vzorka buniek alebo tkaniva nebola správne fixovaná	Optimalizácia času fixácie a fixačného prostriedku
Predbežná proteolytická úprava nebola vykonaná správne	Optimalizujte čas inkubácie pepsínu

Silné pozadie

Možná příčina	Akcia
Sekcie vysušené kedykoľvek počas hybridizácie alebo po nej	Zabráňte vysušeniu rezov; použite vlhkú komoru; riadne utesnite krycie sklíčko
Predĺžený čas inkubácie substrátu	Skrátenie času inkubácie substrátu
Neúplné odparačovanie	Používajte čerstvé roztoky; skontrolujte trvanie odparačovania
Predbežná proteolytická úprava nebola vykonaná správne	Optimalizujte čas inkubácie pepsínu
Sklíčka pred hybridizáciou ochladené na izbovú teplotu	Rýchlo presuňte sklíčka na hybridizačnú teplotu

Prekrývajúce sa signály

Možná příčina	Akcia
Nevhodná hrúbka tkanivových rezov	Pripravte 3-5 µm rezy mikrotomom

Vzorka vypláva zo sklíčka

Možná příčina	Akcia
Príliš silná proteolytická predúprava	Skrátenie inkubačného času pepsínu

17. Literatúra

- 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. Revízia



www.zytovision.com

Najnovší návod na použitie, ako aj návod na použitie v rôznych jazykoch nájdete na [stránke www.zytovision.com](http://www.zytovision.com).

Naši odborníci sú pripravení odpovedať na vaše otázky.

Obráťte sa na help@zytovision.com

Prehľad o bezpečnosti a výkonnosti nájdete na www.zytovision.com.



ZytoVision GmbH

Fischkai 1

27572 Bremerhaven/ Nemecko

Telefón: +49 471 4832-300

Fax: +49 471 4832-509

www.zytovision.com

E-mail: info@zytovision.com

Ochranné známky:

ZytoVision® a ZytoFast® sú ochranné známky spoločnosti ZytoVision GmbH.