



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

REF T-1114-400

40 (0,4 ml)

Na kvalitatívnu detekciu ľudskej RNA vírusu Epstein-Barrovej (EBV) pomocou chromogénnej *in situ* hybridizácie (CISH)

4250380P101QC



Diagnostická zdravotnícka pomôcka in vitro  
podľa IVDR (EÚ) 2017/746

### 1. Zamýšľaný účel

Sonda ZytoFast EBV Probe (PF29) je určená na kvalitatívnu detekciu RNA ľudského vírusu Epstein-Barrovej (EBV) vo vzorkách fixovaných formalínom a vložených do parafrínu, ako sú difúzne veľkobunkové B-lymfómy (DLBCL) alebo Hodgkinove lymfómy, pomocou chromogénnej *in situ* hybridizácie (CISH). Sonda je určená na použitie v kombinácii s ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB (č 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 DLBCL alebo Hodgkinových lymfómov a terapeutické opatrenia by nemali byť založené len na 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 spoločne denaturované 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 EBV Probe sa skladá z:

- Digoxigenínom značené oligonukleotidy (~ 0,2 ng/μl), ktoré sú zamerané na mRNA sekvencie kódujúce oblasti EBER-1 a EBER-2

Sonda ZytoFast EBV Probe je k dispozícii v jednej veľkosti:

- T-1114-400: 0,4 ml (40 reakcií po 10 μl)

### 4. Požadované, ale neposkytované materiály

- ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB (č 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
- Kalibrovaný teplomer
- Etanol alebo reagenčný alkohol
- Xylén
- Metanol 100%
- Peroxid vodíka (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30%
- Deionizovaná alebo destilovaná voda
- Krycie sklíčka (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Gumové lepidlo, napr. Fixogum Rubber Cement (č 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. Vyhňte 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!
- Zabráňte krížovej kontaminácii vzoriek, pretože to môže viesť k chybným výsledkom.
- Počas hybridizácie a premývania sa vzorky nesmú nechať vyschnúť.

### Výstražné a bezpečnostné upozornenia:

Táto sonda nie je klasifikovaná ako nebezpečná podľa nariadenia (ES) č. 1272/2008.

### 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, reagencie, diagnostické panely a metódy používané na výrobu farebného 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
- Formolín 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 (55 °C) a dôkladne premiešajte.

## 11. Postup analýzy

### Predbežná úprava vzorky

Vykonajte predbežnú úpravu vzorky (napr. odparafinovanie, 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 teplote 55 °C (napr. v hybridizačnej peci).

*Je dôležité, aby vzorky počas hybridizácie nevyschli.*

### Po hybridizácii

Spracovanie po hybridizácii (premytie, detekcia, kontrastné farbenie, 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 chrenovej peroxidázy (HRP) a DAB..

Pozitívna reaktivita na Epstein-Barrvej vírus (EBV) EBER RNA v cieľových bunkách je indikovaná zreteľne zafarbeným jadrom.

### Upozornenie:

- Vizualizácia signálov by sa mala vykonávať aspoň pri 100-násobnom zväčšení, čo vedie k ľahko viditeľným signálom.
- Nehodnotte oblasti nekrózy, prekrývajúcich sa jadier, nadmerne natrávených 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 RNA.

**Externé ovládanie:** Validované pozitívne a negatívne kontrolné vzorky.

## 14. Výkonnostné charakteristiky

### 14.1 Analytický výkon

Výkon sa hodnotil podľa návodu na použitie súpravy ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB.

<b>Analytická citlivosť:</b>	100% (95% CI 99.7 – 100.0)
<b>Analytická špecifickosť:</b>	100% (95% CI 99.8 – 100.0)

Každodenná reprodukovateľnosť bola testovaná porovnaním výsledkov získaných od jedného vyšetrujúceho počas 10 rôznych dní a hodnotením zhody.

	Percentuálny súhlas
negatívna vzorka	100%
pozitívna vzorka	100%
pozitívna vzorka	100%

Opakovateľnosť bola testovaná porovnaním opakovaných výsledkov získaných od jedného vyšetrujúceho počas 10 rôznych dní a hodnotením zhody.

	Percentuálny súhlas
negatívna vzorka	100%
pozitívna vzorka	100%
pozitívna vzorka	100%

### 14.2 Klinický výkon

<b>Diagnostická senzitivita:</b>	<b>DLBCL:</b> 100% (95% CI 91.7 – 100.0) vs. IHC <b>HL:</b> 100% (95% CI 88.4 – 100.0) vs. PCR
<b>Diagnostická špecifita:</b>	<b>DLBCL:</b> 98.41% (95% CI 91.7 – 100.0) vs. IHC <b>HL:</b> 100% (95% CI 88.4 – 100.0) vs. PCR

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

### Slabý signál alebo žiadny signál

Možná príčina	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 vlhkých pásov/nádrží naplnených vodou povinné. Pri používaní hybridizačnej pece je potrebné používať vlhkú komoru. Okrem toho by malo byť krycie sklo úplne utesnené, 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	Vyhňte 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 príčina	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 príčina	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 príčina	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 stríasaním zo sklíčka. Malé množstvá zvyškovej 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 príčina	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 príčina	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 sú ochladené na izbovú teplotu	Rýchlo presuňte sklíčka na hybridizačnú teplotu

**Prekrývajúce sa signály**

Možná príčina	Akcia
Nevhodná hrúbka tkanivových rezov	Prípravte 3-5 µm rezy mikrotomom

**Vzorka vypláva zo sklíčka**

Možná príčina	Akcia
Príliš silná proteolytická predúprava	Skrátenie inkubačného času pepsínu

**17. Literatúra**

- 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. Revízia**
[www.zytovision.com](http://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](mailto:help@zytovision.com)

Prehľad o bezpečnosti a výkonnosti nájdete na [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com).



ZytoVision GmbH  
Fischkai 1  
27572 Bremerhaven/ Nemecko  
Telefón: +49 471 4832-300  
Fax: +49 471 4832-509  
[www.zytovision.com](http://www.zytovision.com)  
E-mail: [info@zytovision.com](mailto:info@zytovision.com)

**Ochranné známky:**

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