



ZytoFast
EBV Probe
(Digoxigenin-labeled)

REF T-1114-400

40 (0,4 ml)

Kromojenik *in situ* hibridizasyon (CISH) ile insan Epstein-Barr virüsü (EBV) EBER RNA'sının kalitatif tespiti için

250380P101QC



In vitro diagnostik tıbbi cihaz
IVDR (AB) 2017/746'ya göre

1. Hedeflenen amaç

ZytoFast EBV Probe (PF29), kromojenik *in situ* hibridizasyon (CISH) ile Diffüz büyük B hücreli lenfomalar (DLBCL) veya Hodgkin lenfomalar gibi formalinle sabitlenmiş, parafine gömülü örneklerde insan Epstein-Barr virüsü (EBV) EBER RNA'sının kalitatif tespiti için kullanılmak üzere tasarlanmıştır. Probu şu ürünlerle birlikte kullanılması amaçlanmıştır ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB (Ürün No. T-1063-40).

Ürün sadece profesyonel kullanım için tasarlanmıştır. Ürünün kullanıldığı tüm testler sertifikalı, lisanslı bir anatomik patoloji laboratuvarında bir patolog/insan genetikçisinin gözetimi altında kalifiye personel tarafından gerçekleştirilmelidir.

Probu DLBCL veya Hodgkin lenfomalarının ayırıcı tanısına yardımcı olarak kullanılması amaçlanmıştır ve terapötik önlemler tek başına test sonucuna dayandırılmamalıdır.

2. Test prensibi

Kromojenik *in situ* hibridizasyon (CISH) tekniği, hücre preparatlarında spesifik nükleik asit dizilerinin tespit edilmesini ve görüntülenmesini sağlar. CISH problemleri olarak adlandırılan hapten-işaretli nükleotid fragmanları ve preparatlardaki tamamlayıcı hedef dizileri birlikte denatüre edilir ve daha sonra hibridizasyon sırasında tavlınmasına izin verilir. Daha sonra, spesifik olmayan ve bağlanmamış prob parçaları sıkı yıkama adımları ile uzaklaştırılır. İşaretli probun dubleks oluşumu, ikincil polimerize enzim-konjuge antikorlar tarafından tespit edilen birincil (işaretsiz) antikorlar kullanılarak görselleştirilebilir. Kromojenik substratlarla enzimatik reaksiyon daha sonra renkli çöktürmelerin oluşmasına yol açar. Çekirdeğin bir nükleer boya ile karşı boyanmasından sonra, hibridize prob parçaları ışık mikroskobu ile görselleştirilir.

3. Sağlanan reaktifler

ZytoFast EBV Probe oluşmaktadır:

- EBER-1 ve EBER-2 bölgelerini kodlayan mRNA dizilerini hedefleyen digoksigenin işaretili oligonükleotidler (~ 0,2 ng/µl).

ZytoFast EBV Probe tek boyutta mevcuttur:

- T-1114-400: 0,4 ml (her biri 10 µl'lik 40 reaksiyon)

4. Gerekli ancak sağlanmayan malzemeler

- ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB (Ürün No. T-1063-40)
- Pozitif ve negatif kontrol numuneleri
- Mikroskop lamaları, pozitif yüklü
- Su banyosu (55 °C, 98 °C)
- Hibridizatör veya sıcak plaka
- Hibridizasyon fırınında hibridizatör veya nem odası
- Ayarlanabilir kalibre edilmiş pipetler (10 µl, 100 µl, 1000 µl)
- Boyama kavanozları veya banyoları
- Zamanlayıcı
- Kalibre edilmiş termometre
- Etanol veya reaktif alkol
- Ksilen
- Metanol %100
- Hidrojen peroksit (H₂O₂) %30
- Deiyonize veya damıtılmış su
- Kapaklı Klipsler (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Kauçuk çimento, örneğin Fixogum Rubber Cement (Ürün No. E-4005-50/-125) veya benzeri
- Yeterince bakımı yapılmış ışık mikroskobu (100-200x)

5. Depolama ve taşıma

2-8 °C'de dik konumda saklayın. Kullanımdan hemen sonra saklama koşullarına geri döndürün. Etiket üzerinde belirtilen son kullanma tarihinden sonra reaktifleri kullanmayın. Ürün, uygun şekilde kullanıldığında etikette belirtilen son kullanma tarihine kadar stabildir.

6. Uyarılar ve önlemler

- Kullanmadan önce kullanım talimatlarını okuyun!
- Reaktifleri son kullanma tarihi geçtikten sonra kullanmayın!
- Bu ürün sağlığa zararlı ve potansiyel olarak bulaşıcı maddeler (düşük konsantrasyonlarda ve hacimlerde) içerir. Reaktiflerle doğrudan temastan kaçının. Uygun koruyucu önlemleri alın (tek kullanımlık eldivenler, koruyucu gözlükler ve laboratuvar giysileri kullanın)!
- Ürünle ilgili olarak meydana gelen her türlü ciddi olayı yerel yönetmeliklere uygun olarak üreticiye ve yetkili makama bildirin!
- Reaktifler ciltle temas ederse, cildi derhal bol miktarda suyla yıkayın!
- Profesyonel kullanıcılar için talep üzerine bir malzeme güvenlik bilgi formu temin edilebilir.
- Tekrar kullanıma açıkça izin verilmediği sürece reaktifleri tekrar kullanmayın!
- Hatalı sonuçlara yol açabileceğinden numunelerin çapraz kontaminasyonundan kaçının.
- Hibridizasyon ve yıkama adımları sırasında numunelerin kurumasına izin verilmemelidir.

Tehlike ve önlem beyanları:

Bu prob, 1272/2008 sayılı Yönetmeliğe (EC) göre tehlikeli olarak sınıflandırılmamıştır.

7. Sınırlamalar

- In vitro* diagnostik kullanım için.
- Sadece profesyonel kullanım içindir.
- Yalnızca otomatik olmayan kullanım içindir.
- Herhangi bir pozitif boyamanın klinik yorumu veya yokluğu, klinik öykü, morfoloji, diğer histopatolojik kriterler ve diğer tanısal testler bağlamında yapılmalıdır. CISH problemleri, reaktifleri, tanı panelleri ve boyalı preparatı üretmek için kullanılan yöntemler hakkında bilgi sahibi olmak kalifiye bir patolog/insan genetikçisinin sorumluluğundadır. Boyama, boyanmış slaytları gözden geçirmekten ve pozitif ve negatif kontrollerin yeterliliğini sağlamaktan sorumlu olan bir patolog/insan genetikçisinin gözetimi altında sertifikalı, lisanslı bir laboratuvarında yapılmalıdır.

- Numune boyaması, özellikle sinyal yoğunluğu ve arka plan boyaması, boyamadan önce numunenin kullanımına ve işlenmesine bağlıdır. Uygun olmayan fiksasyon, dondurma, çözdürme, yıkama, kurutma, ısıtma, kesit alma veya diğer numuneler veya sıvılarla kontaminasyon artefaktlara veya yanlış sonuçlara neden olabilir. Tutarsız sonuçlar, fiksasyon ve gömme yöntemlerindeki farklılıkların yanı sıra numune içindeki doğal düzensizliklerden de kaynaklanabilir.
- Prob yalnızca bölüm 3'te açıklanan sekansı tespit etmek için kullanılmalıdır. "Sağlanan reaktifler".
- Performans, bu kullanım talimatlarında açıklanan prosedürler kullanılarak doğrulanmıştır. Bu prosedürlerde yapılacak değişiklikler performansı değiştirebilir ve kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır. Bu IVD, yalnızca bu kullanım talimatında açıklandığı şekilde amaçlanan kullanım kapsamında kullanıldığında CE sertifikasına sahiptir.

8. Müdahale eden maddeler

Aşağıdaki fiksatifler ISH ile uyumlu değildir:

- Bouin'in fiksatif
- B5 fiksatif
- Asidik fiksatifler (örn. pikrik asit)
- Zenker fiksatif
- Alkoller (tek başına kullanıldığında)
- Merkürük klorür
- Formaldehit/çinko fiksatif
- Hollande'nin sabitleyicisi
- Tamponlanmamış formalin

9. Numunelerin hazırlanması

Numuneleri, cihazın kullanım talimatlarında açıklandığı şekilde hazırlayın. ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB.

10. Cihazın hazırlık işlemi

Ürün kullanıma hazırdır. Sulandırma, karıştırma veya seyreltme gerekmez. Probu hibridizasyon sıcaklığına (55 °C) getirin ve kullanmadan önce iyice karıştırın.

11. Tahlil prosedürü

Numune ön işlemi

İlgili ZytoFast CISH Implementation Kit kullanım talimatlarına göre numune ön işlemini (örn. mum alma, proteoliz) gerçekleştirin.

Denatürasyon ve hibridizasyon

1. Ön işlemden geçirilmiş her numuneye 10 µl prob pipetleyin.
2. Örnekleri 22 mm x 22 mm lamel ile kaplayın (sıkışmış kabarcıklardan kaçınım) ve lameli kapatın.

Sızdırmazlık için kauçuk çimento (örn. Fixogum) kullanmanızı öneririz.

3. Lamaları sıcak bir plaka veya hibridizatör üzerine yerleştirin ve örnekleri 75 °C'de 5 dakika denature edin.
4. Lamaları bir nem odasına aktarın ve 55 °C'de 1 saat boyunca hibridize edin (örn. bir hibridizasyon fırınında).

Hibridizasyon adımı sırasında numunelerin kurumaması çok önemlidir.

Hibridizasyon sonrası

Hibridizasyon sonrası işlemleri (yıkama, tespit, karşı boyama, montaj, mikroskop) ilgili ZytoFast CISH Implementation Kit kullanım talimatlarına göre gerçekleştirin.

12. Sonuçların yorumlanması

ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB kullanıldığında, hibridize Digoxigenin etiketli oligonükleotidler yaban turpu peroksidazı (HRP) ve DAB ile tespit edildiğinde kahverengi desen olarak görünür.

Hedef hücrelerde Epstein-Barr virüsü (EBV) EBER RNA için pozitif bir reaktivate, belirgin şekilde boyanmış bir çekirdek ile gösterilir

Lütfen unutmayın:

- Sinyallerin görselleştirilmesi en az 100 kat büyütme ile yapılmalı ve kolayca görülebilen sinyaller elde edilmelidir.

- Nekroz alanlarını, üst üste binen çekirdekleri, aşırı sindirilmiş çekirdekleri ve zayıf sinyal yoğunluğuna sahip çekirdekleri değerlendirmeyin.
- Negatif veya spesifik olmayan bir sonuç birden fazla faktörden kaynaklanabilir (bkz. Bölüm 16 "Sorun Giderme").
- Sonuçların doğru bir şekilde yorumlanabilmesi için, kullanıcı bu ürünü tanı prosedürlerinde kullanmadan önce ulusal ve/veya uluslararası kılavuzlara göre doğrulamalıdır.

13. Önerilen kalite kontrol prosedürleri

İşlenmiş numunelerin ve test reaktiflerinin doğru performansını izlemek için, her tahlile dahili ve harici kontroller eşlik etmelidir. Dahili ve/veya harici kontroller uygun boyamayı göstermezse, hasta numuneleriyle elde edilen sonuçlar geçersiz kabul edilmelidir.

İç kontrol: Net olmayan durumlarda, daha fazla açıklama için RNA Kontrol Problemleri kullanılmalıdır.

Harici kontrol: Onaylanmış pozitif ve negatif kontrol numuneleri.

14. Performans özellikleri

14.1 Analitik performans

Performans, ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB in kullanım talimatlarına göre değerlendirilmiştir.

Analitik hassasiyet:	100% (95% CI 99.7 – 100.0)
Analitik özgüllük:	100% (95% CI 99.8 – 100.0)

Günden Güne Tekrar Üretilirlik, bir denetçinin 10 farklı günde elde ettiği sonuçları karşılaştırarak ve uyumu değerlendirerek test edilmiştir..

	Yüzde Anlaşma
negatif numune	100%
pozitif numune	100%
pozitif numune	100%

Tekrarlanabilirlik, bir denetçiden 10 farklı günde elde edilen tekrarlanan sonuçlar karşılaştırılarak ve uyum değerlendirilerek test edilmiştir.

	Yüzde Anlaşma
negatif numune	100%
pozitif numune	100%
pozitif numune	100%

14.2 Klinik performans

Tanısal duyarlılık:	DLBCL: 100% (95% CI 91.7 – 100.0) vs. IHC HL: 100% (95% CI 88.4 – 100.0) vs. PCR
Teşhis özgüllüğü:	DLBCL: 98.41% (95% CI 91.7 – 100.0) vs. IHC HL: 100% (95% CI 88.4 – 100.0) vs. PCR

15. Bertaraf

Reaktiflerin imhası yerel yönetmeliklere uygun olarak gerçekleştirilmelidir.

16. Sorun Giderme

Kullanım talimatlarından herhangi bir sapma, düşük boyama sonuçlarına veya hiç boyama olmamasına neden olabilir. Daha fazla bilgi için lütfen www.zytovision.com adresine bakın.

Zayıf sinyaller veya hiç sinyal yok

Olası neden	Eylem
Proteolitik ön işlem düzgün yapılmamış	Pepsin inkübasyon süresini optimize edin, gerekirse artırın veya azaltın
Buharlaştırma probu	Bir hibridizatör kullanırken, ıslak şeritlerin/su dolu tankların kullanılması zorunludur. Bir hibridizasyon fırını kullanıldığında, bir nem odasının kullanılması gereklidir. Ayrıca, hibridizasyon sırasında numunenin kurummasını önlemek için lamel, örneğin Fixogum ile tamamen kapatılmalıdır

Kromojenik substratın yetersiz hazırlanması	Renk substratlarını damlatarak hazırlamak yerine bir pipet kullanın
Karşı boyama süresi çok uzun	Koyu karşı boyamadan kaçının, çünkü pozitif boyama sinyallerini gizleyebilir
Karşı lekenin mavileştirilmesi düzgün yapılmamış	Mavileştirme için soğuk akan musluk suyu kullanın; ılık veya sıcak su veya mavileştirme reaktifleri kullanmayın

Sinyaller kaybolur veya birleşir

Olası neden	Eylem
Uygun olmayan bir montaj çözümü kullanılmıştır	Yalnızca kitle birlikte verilen veya kullanım talimatlarında önerilen montaj solüsyonunu kullanın. Herhangi bir yabancı madde içermeyen solüsyonlar kullanın; lamel bandı kullanmayın

Düzensiz veya bazı kısımlarda sadece çok hafif lekelenme

Olası neden	Eylem
Eksik mum alma	Taze solüsyonlar kullanın; mum alma sürelerini kontrol edin
Reaktif hacmi çok küçük	Reaktif hacminin doku alanını kaplayacak kadar büyük olduğundan emin olun

Tutarsız sonuçlar

Olası neden	Eylem
Prob uygulamasından önce yetersiz kurutma	Hava ile kurutmayı uzatın
Pepsin, antikorlar ve/veya renk substratlarının uygulanmasından önce doku üzerinde çok fazla su/yıkama tamponu	Fazla sıvının doku kesitinden lekeleyerek veya lamdan sallayarak uzaklaştırıldığından emin olun. Az miktarda kalan su/yıkama tamponu testi etkilemez
Doku fiksasyonu ve gömme yöntemlerindeki varyasyonlar	Sabitlenme ve gömme yöntemlerini optimize edin
Doku kesit kalınlığındaki değişimler	Kesit almayı optimize edin

Morfoloji bozulmuş

Olası neden	Eylem
Hücre veya doku örneği uygun şekilde sabitlenmemiş	Sabitlenme süresini ve fiksatif optimize edin
Proteolitik ön işlem düzgün yapılmamış	Pepsin inkübasyon süresini optimize edin

Gürültülü arka plan

Olası neden	Eylem
Hibridizasyon sırasında veya sonrasında herhangi bir zamanda kurumuş kesitler	Kesitlerin kurumasını önleyin; nem odası kullanın; lamelleri uygun şekilde kapatın
Uzatılmış substrat inkübasyon süresi	Substrat inkübasyon süresini kısaltın
Eksik mum alma	Taze solüsyonlar kullanın; mum alma süresini kontrol edin
Proteolitik ön işlem düzgün yapılmamış	Pepsin inkübasyon süresini optimize edin
Hibridizasyondan önce oda sıcaklığına soğutulmuş slaytlar	Lamları hızlı bir şekilde hibridizasyon sıcaklığına aktarın

Çakışan sinyaller

Olası neden	Eylem
Doku kesitlerinin uygun olmayan kalınlığı	3-5 µm mikrotom kesitleri hazırlayın

Numune lam üzerinde yüzer

Olası neden	Eylem
Proteolitik ön işlem çok güçlü	Pepsin inkübasyon süresini kısaltın

17. Edebiyat

- 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. Revizyon

Revizyon	Değişikliğin açıklaması
2.1.1	Onaylanmış kuruluş değişikliği



www.zytovision.com

En güncel kullanım talimatları ve farklı dillerdeki kullanım talimatları için lütfen www.zytovision.com adresine bakın.

Uzmanlarımız sorularınızı yanıtlamak için hazırdır. Lütfen helptech@zytovision.com ile iletişime geçin. Güvenlik ve performans özeti için lütfen bkz. www.zytovision.com.



ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/ Almanya
Telefon numarası: +49 471 4832-300
Faks: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
E-posta: info@zytovision.com

Ticari markalar:

ZytoVision® ve ZytoFast®, ZytoVision GmbH'nin ticari markalarıdır.