ZytoDot
SPEC MDM2 Probe

REF C-3012-400 Σ 40 (0,4 ml)

Para a detecção qualitativa de amplificações do gene MDM2 humano por hibridação *in situ* cromogénica (CISH)

4250380P062QT

CE 0483

IVD

Dispositivo médico de diagnóstico in vitro

de acordo com o RIV (UE) 2017/746

1. Objectivo pretendido

A sonda ZytoDot SPEC MDM2 Probe (**PD9**) destina-se a ser utilizada para a detecção qualitativa de amplificações que envolvam o gene MDM2 humano em amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina, tais como tumor lipomatoso atípico/lipossarcoma bem diferenciado (ALT/WDLPS) e lipossarcoma desdiferenciado (DDLPS), por hibridação in situ cromogénica (CISH). A sonda destina-se a ser utilizada em combinação com o ZytoDot CISH Implementation Kit (N.º de produto C-3018-40).

O produto destina-se apenas a utilização profissional. Todos os testes que utilizem o produto devem ser realizados num laboratório de anatomia patológica certificado e licenciado, sob a supervisão de um profissional qualificado.

A sonda destina-se a ser utilizada como um auxiliar no diagnóstico diferencial de ALT/WDLPS e DDLPS e não devem ser iniciadas medidas terapêuticas com base apenas no resultado do teste.

2. Princípio do teste

A técnica de hibridação *in situ* cromogénica (CISH) permite a detecção e visualização de sequências específicas de ácidos nucleicos em preparações celulares. Os fragmentos de nucleótidos marcados com haptenos, as chamadas sondas CISH, e as suas sequências-alvo complementares nas preparações são desnaturados em conjunto e, subsequentemente, é-lhes permitido fazer o anelamento durante a hibridação. Posteriormente, os fragmentos de sonda inespecíficos e não ligados são removidos por passos de lavagem rigorosos. A formação de dup*lex* da sonda marcada pode ser visualizada utilizando anticorpos primários (não marcados), que são detectados por anticorpos secundários polimerizados conjugados com enzimas. A reacção enzimática com substratos cromogénicos leva à formação de precipitados coloridos. Após a coloração de contraste do núcleo com um corante nuclear, os fragmentos de sonda hibridizados são visualizados por microscopia óptica.

3. Reagentes fornecidos

O ZytoDot SPEC MDM2 Probe é composto por:

- Polinucleótidos marcados com digoxigenina (~1,8 ng/µl), que têm como alvo sequências mapeadas em 12q15* (chr12:69,190,708-69,430,185) que albergam a região do gene MDM2 (ver Fig. 1).
- Tampão de hibridação à base de formamida

*De acordo com a montagem do genoma humano GRCh37/hg19

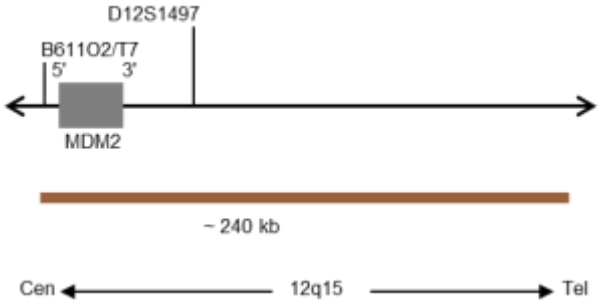

Fig. 1: SPEC MDM2 Mapa da sonda (não à escala)

A ZytoDot SPEC MDM2 Probe está disponível num único tamanho:

- C-3012-400: 0,4 ml (40 reacções de 10 µl cada)

4. Materiais necessários mas não fornecidos

- ZytoDot CISH Implementation Kit (N.º de produto C-3018-40)
- Amostras de controlo positivo e negativo
- Lâminas de microscópio, carregadas positivamente
- Banho-maria (80 °C, 98 °C)
- Hibridizador ou placa de aquecimento
- Hibridizador ou câmara de humidade na estufa de hibridação
- Pipetas ajustáveis (10 µl, 1000 µl)
- Tinas de coloração ou banheiras
- Temporizador
- Termómetro calibrado
- Etanol ou álcool reagente
- Xileno
- Metanol 100%
- Peróxido de hidrogénio (H_2O_2) 30%.
- Água desionizada ou destilada
- Lâmelas (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Cola, por exemplo, Fixogum Rubber Cement (N.º de produto E-4005-50/-125) ou similar
- Microscópio de luz devidamente calibrado (400-630x)

5. Armazenamento e manuseamento

Armazenar a 2-8 °C numa posição vertical. Voltar às condições de armazenamento imediatamente após a utilização. Não utilizar os reagentes para além do prazo de validade indicado no rótulo. O produto é estável até ao prazo de validade indicado no rótulo quando manuseado em conformidade.

6. Avisos e precauções

- Ler o manual de instruções antes da utilização!
- Não utilizar os reagentes após o prazo de validade ter sido atingido!
- Este produto contém substâncias (em baixas concentrações e volumes) que são nocivas para a saúde e potencialmente infecciosas. Evitar qualquer contacto directo com os reagentes. Tomar medidas de protecção adequadas (utilizar luvas descartáveis, óculos de protecção e vestuário de laboratório)!
- Comunicar qualquer incidente grave relacionado com o produto ao fabricante e à autoridade competente, de acordo com os regulamentos locais!
- Se os reagentes entrarem em contacto com a pele, lavar imediatamente a pele com água abundante!
- A ficha de dados de segurança está disponível a pedido para o utilizador profissional.
- Não reutilizar os reagentes, excepto se a reutilização for explicitamente permitida!

- Evitar a contaminação cruzada das amostras, uma vez que tal pode conduzir a resultados erróneos.
- Não se deve deixar secar as amostras durante as fases de hibridação e lavagem.

Indicações de perigo e de precaução:

O componente determinante para o perigo é a formamida.

Perigo

H351	Suspeito de provocar cancro.
H360FD	Pode afectar a fertilidade. Pode afectar o feto.
H373	Pode afectar os órgãos após exposição prolongada ou repetida.
P201	Obter instruções especiais antes da utilização.
P202	Não manusear até que todas as precauções de segurança tenham sido lidas e compreendidas.
P260	Não respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/spray.
P280	Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial.
P308+P313	Em caso de exposição ou preocupação: Obter aconselhamento/atenção médica.
P405	Loja fechada.

7. Limitações

- Para utilização *em* diagnóstico *in vitro*.
- Apenas para uso profissional.
- Apenas para utilização não automatizada.
- A interpretação clínica de qualquer coloração positiva, ou da sua ausência, deve ser efectuada no contexto da história clínica, da morfologia, de outros critérios histopatológicos, bem como de outros testes de diagnóstico. É da responsabilidade de um professional qualificado estar familiarizado com as sondas CISH, os reagentes, os painéis de diagnóstico e os métodos utilizados para produzir a preparação corada. A coloração deve ser efectuada num laboratório certificado e licenciado, sob a supervisão de um professional qualificado pela revisão das lâminas coradas e pela garantia da adequação dos controlos positivos e negativos.
- A coloração das amostras, especialmente a intensidade do sinal e a coloração de fundo, depende do manuseamento e processamento da amostra antes da coloração. A fixação, congelação, descongelação, lavagem, secagem, aquecimento, seccionamento ou contaminação com outras amostras ou fluidos inadequados podem produzir artefactos ou resultados falsos. Os resultados inconsistentes podem resultar de variações nos métodos de fixação e incorporação, bem como de irregularidades inerentes à amostra.
- A sonda só deve ser utilizada para a detecção dos loci descritos no capítulo 3. "Reagentes fornecidos".
- O desempenho foi validado utilizando os procedimentos descritos nas presentes instruções de utilização. As modificações a estes procedimentos podem alterar o desempenho e têm de ser validadas pelo utilizador. Este IVD só é certificado como CE quando utilizado de acordo com as instruções descritas neste manual para utilização no âmbito da utilização prevista.

8. Substâncias interferentes

Os seguintes fixadores são incompatíveis com as ISH:

- Fixador de Bouin
- Fixador B5
- Fixadores ácidos (por exemplo, ácido pícrico)
- Fixador de Zenker
- Álcoois (quando utilizados isoladamente)
- Cloreto de mercúrio
- Fixador de formaldeído/zinco
- fixador de Hollande
- Formalina não tamponada

9. Preparação das amostras

Preparar as amostras conforme descrito nas instruções de utilização do ZytoDot CISH Implementation Kit.

10. Tratamento de prepraração do dispositivo

O produto está pronto a usar. Não é necessária qualquer reconstituição, mistura ou diluição. Colocar a sonda à temperatura ambiente (18-25 °C) antes de utilizar, proteger da luz. Antes de abrir o frasco, misturar em vórtex e centrifugar brevemente.

11. Procedimento de teste

Pré-tratamento de amostras
Efectuar o pré-tratamento da amostra (por exemplo, desparafinagem, proteólise) de acordo com as instruções de utilização do ZytoDot CISH Implementation Kit.

Desnaturação e hibridação

1. Pipetar 10 µl da sonda em cada amostra pré-tratada.
2. Cobrir as amostras com uma lamela de 22 mm x 22 mm (evitar a formação de bolhas) e selar a lamela.

Recomendamos a utilização de cola (por exemplo, Fixogum) para selar.

3. Colocar as lâminas numa placa quente ou num hibridizador e desnaturar as amostras durante 5 minutos a 94-95 °C.
4. Transferir as lâminas para uma câmara húmida e hibridizar durante a noite a 37 °C (por exemplo, numa estufa de hibridação).

É essencial que as amostras não sequem durante a fase de hibridação.

Pós-hibridação
Efectuar o processamento pós-hibridação (lavagem, detecção, contra-coloração, montagem, microscopia) de acordo com as instruções de utilização do ZytoDot CISH Implementation Kit.

12. Interpretação dos resultados

Utilizando o kit de implementação *ZytoDot* CISH, os sinais de hibridação dos polinucleótidos marcados com digoxigenina aparecem em castanho a castanho-escuro (região do gene MDM2).

Situação normal: Nas interfases de células normais ou de células sem uma amplificação que envolva a região do gene MDM2, aparecem dois sinais castanhos distintos em forma de pontos (ver Fig. 2).

Situação anormal: Nas células com uma amplificação da região do gene MDM2 ou com polissomia do cromossoma 12, observa-se um aumento do número de sinais castanhos ou de grupos de sinais castanhos (ver Fig. 2).

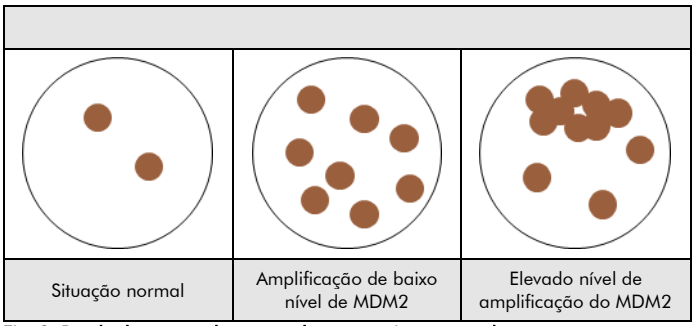

Fig. 2: Resultados esperados em núcleos normais e anormal

Em algumas amostras anormais podem ser observados outros padrões de sinais para além dos acima descritos. Estes padrões de sinais inesperados devem ser objecto de uma investigação mais aprofundada.

Atenção:

- Devido à cromatina descondensada, os sinais CISH individuais podem aparecer como pequenos grupos de sinais. Assim, dois ou três sinais do mesmo tamanho, separados por uma distância ≤ 1 diâmetro de sinal, devem ser contados como um sinal.
- Antes da contagem de sinais, a amostra deve ser analisada para detectar qualquer possível heterogeneidade intratumoral com uma ampliação de 100 a 200 vezes.
- A visualização dos sinais deve ser efectuada, pelo menos, com uma ampliação de 400 a 630 vezes, resultando em sinais facilmente visíveis.
- Não avaliar áreas de necrose, núcleos sobrepostos, núcleos demasiado digeridos e núcleos com fraca intensidade de sinal.
- Devido à mitose, podem ser visíveis sinais adicionais mesmo numa pequena percentagem de células não neoplásicas. Ocasionalmente, podem ser observados núcleos com sinais em falta em amostras incluídas em parafina devido a artefactos de corte.
- Um resultado negativo ou inespecífico pode ser causado por vários factores (ver capítulo 16 "Resolução de problemas").
- Para interpretar correctamente os resultados, o utilizador deve validar este produto antes de o utilizar em procedimentos de diagnóstico, de acordo com as directrizes nacionais e/ou internacionais.

13. Procedimentos de controlo de qualidade recomendados

A fim de monitorizar o desempenho correcto das amostras processadas e dos reagentes de teste, cada teste deve ser acompanhado de controlos internos e externos. Se os controlos internos e/ou externos não demonstrarem uma coloração adequada, os resultados com as amostras dos doentes devem ser considerados inválidos.

Controlo interno: Células não neoplásicas dentro da amostra que exibem um padrão de sinal normal, por exemplo, fibroblastos.

Controlo externo: Amostras de controlo positivo e negativo validados.

14. Características de desempenho

14.1 Desempenho analítico

O desempenho da sonda foi determinado por comparação com a sonda FISH correspondente aprovada pelo IVD.

Desempenho analítico:	100% (95% CI 98.5 – 100.0)
Especificidade analítica:	100% (95% CI 97.0 – 100.0)

A reprodutibilidade dia a dia foi testada comparando os resultados obtidos por um examinador em 10 dias diferentes e avaliando a concordância.

	Percentagem de acordo
amostra negativa	100%
amostra positiva	100%

A repetibilidade foi testada comparando os resultados replicados obtidos por um examinador em 10 dias diferentes e avaliando a concordância.

	Percentagem de acordo
amostra negativa	100%
amostra positiva	100%

14.2 Desempenho clínico

Sensibilidade do diagnóstico:	**ALT/WDLPS:** 100% (95% CI 55.0 – 97.7) vs. dados histopatológicos **DDLPS:** 100% vs. avaliação histopatológica
Especificidade do diagnóstico:	**ALT/WDLPS:** 50 % (95% CI 55.0 – 97.7) vs. dados histopatológicos

15. Eliminação

A eliminação dos reagentes deve ser efectuada de acordo com os regulamentos locais.

16. Resolução de problemas

Qualquer desvio das instruções de funcionamento pode levar a resultados de coloração inferiores ou à ausência de coloração. Para mais informações, consultar www.zytovision.com.

Sinais fracos ou ausência de sinais

Causa possível	Acção
Pré-tratamento proteolítico não efectuado correctamente	Optimizar o tempo de incubação da pepsina, aumentar ou diminuir se necessário
Evaporação da sonda	Quando se utiliza um hibridizador, é obrigatória a utilização das riscas húmidas/tanques cheios de água. Quando se utiliza uma estufa de hibridação, é necessária a utilização de uma câmara de humidade. Além disso, a lamela deve ser completamente selada, por exemplo, com Fixogum, para evitar a secagem da amostra durante a hibridação
Preparação insuficiente do substrato cromogénico	Em vez de utilizar uma gota de solução A de DAB, utilizar 30 µl
Tempo de contracoloração demasiado longo	Evitar a contracoloração escura, uma vez que pode obscurecer os sinais de coloração positivos
A coloração azul da contracoloração não é efectuada correctamente	Utilizar água fria corrente da torneira para a coloração azulada; não utilizar água morna ou quente, nem reagentes de coloração azulada

Sinais demasiado fortes

Causa possível	Acção
Pré-tratamento proteolítico efectuado durante demasiado tempo	Optimizar o tempo de incubação da pepsina, aumentar ou diminuir se necessário
A reacção do substrato é demasiado intensa	Reduzir o tempo de incubação do substrato; não aquecer a solução de substrato a mais de 25 °C; incubar apenas à temperatura ambiente

Os sinais desvanecem-se ou fundem-se

Causa possível	Acção
Foi utilizada uma solução de montagem inadequada	Utilizar apenas a solução de montagem fornecida com o kit ou soluções de montagem à base de xileno isentas de quaisquer impurezas; não utilizar fita adesiva para lamelas

Manchas irregulares ou, nalgumas partes, apenas muito ligeiras

Causa possível	Acção
Desparafinagem incompleta	Utilizar soluções frescas; verificar a duração dos tempos de desparafinagem
Volume de reagente demasiado pequeno	Assegurar que o volume de reagente é suficientemente grande para cobrir a área do tecido

Resultados inconsistentes

Causa possível	Acção
Secagem insuficiente antes da aplicação da sonda	Prolongar a secagem ao ar
Demasiada água/tampão de lavagem no tecido antes da aplicação de pepsina, anticorpos e/ou substratos corantes	Assegurar que o excesso de líquido é removido da secção de tecido através de uma mancha ou agitação da lâmina. Pequenas quantidades de água residual/tampão de lavagem não interferem com o teste
Variações nos métodos de fixação e inclusão de tecidos	Optimizar os métodos de fixação e incorporação
Variações na espessura da secção de tecido	Optimizar o seccionamento

Morfologia degradada

Causa possível	Acção
A amostra de células ou tecidos não foi correctamente fixada	Optimizar o tempo de fixação e o fixador
Pré-tratamento proteolítico não demasiado prolongado	Diminuir o tempo de incubação da pepsina

Sinais de hibridação cruzada; pertubrações de fundo

Causa possível	Acção
As secções secaram em qualquer altura durante ou após a hibridação	Evitar a secagem das secções; utilizar uma câmara húmida; selar correctamente a lamela
Tempo de incubação prolongado do substrato	Reduzir o tempo de incubação do substrato
Desparafinagem incompleta	Utilizar soluções novas; verificar a duração da desparafinagem
Pré-tratamento proteolítico demasiado forte	Optimizar o tempo de incubação da pepsina
Lâminas arrefecidas à temperatura ambiente antes da hibridação	Transferir rapidamente as lâminas para a temperatura de hibridação

Sinais sobrepostos

Causa possível	Acção
Espessura inadequada das secções de tecido	Preparar secções de micrótomo de 3-5 µm

A amostra flutua para fora da lâmina

Causa possível	Acção
Pré-tratamento proteolítico demasiado forte	Reduzir o tempo de incubação da pepsina

17. Literatura

- Agaimy A, et al. (2018) *Hum Pathol.*
- Putri RI, et al. (2014) *Indian J Pathol Microbiol.*
- Wilkinson DG: In Situ Hybridization, A Practical Approach, *Oxford University Press* (1992) ISBN 0 19 963327 4.

18. Revisão

Revisão	Descrição da alteração
3.1.1	Alteração do organismo notificado 14. Características de desempenho add adicionar precisão

www.zytovision.com

Consultar www.zytovision.com para obter as instruções de utilização mais recentes, bem como as instruções de utilização em diferentes línguas.

Os nossos especialistas estão disponíveis para responder às suas perguntas.
Contactar helptech@zytovision.com
Para um resumo da segurança e do desempenho, consultar www.zytovision.com.

ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/ Alemanha
Telefone: +49 471 4832-300
Fax: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
Correio electrónico: info@zytovision.com

Marcas registadas:
ZytoVision® e Zyto*Dot*® são marcas comerciais da ZytoVision GmbH.