



ZytoDot 2C SPEC 1p36/1q25 Probe

| | | | |
|-----|------------|---|-------------|
| REF | C-3036-100 | ▽ | 10 (0,1 ml) |
| REF | C-3036-400 | ▽ | 40 (0,4 ml) |

Para a detecção qualitativa de deleções do cromossoma humano 1p36.31 e de sequências específicas de 1q25.3 por hibridação *in situ* cromogénica (CISH)

4250380P123QN

Dispositivo médico de diagnóstico *in vitro*

de acordo com o RIV (UE) 2017/746

1. Objectivo pretendido

A sonda ZytoDot 2C SPEC 1p36/1q25 Probe (PD21) destina-se a ser utilizada para a detecção qualitativa de deleções que envolvam a região cromossómica humana 1p36.31, bem como sequências específicas do cromossoma 1q25.3 em amostras fixadas em formol e incluídas em parafina, tais como gliomas, por hibridação cromogénica *in situ* (CISH). A sonda destina-se a ser utilizada em combinação com o ZytoDot 2C CISH Implementation Kit (N.º de produto C-3044-10/-40).

O produto destina-se apenas a utilização profissional. Todos os testes que utilizam o produto devem ser realizados num laboratório de patologia anatómica certificado e licenciado, sob a supervisão de um patologista/genético humano, por pessoal qualificado.

A sonda destina-se a ser utilizada como um auxiliar no diagnóstico diferencial de glioma 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 duplex 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 contra-coloração do núcleo com um corante nuclear, os fragmentos de sonda hibridizados são visualizados por microscopia óptica.

3. Reagentes fornecidos

O ZytoDot 2C SPEC 1p36/1q25 Probe é composto por:

- Polinucleótidos marcados com digoxigenina (~1,7 ng/μl), que têm como alvo sequências mapeadas em 1q25.3* (chr1:184,562,510-184,752,938) (ver Fig. 1).
- Polinucleótidos marcados com dinitrofenilo (~1,7 ng/μl), que visam sequências mapeadas em 1p36.31* (chr1:5,808,946-6,176,336) (ver Fig. 1).
- Tampão de hibridação à base de formamida

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

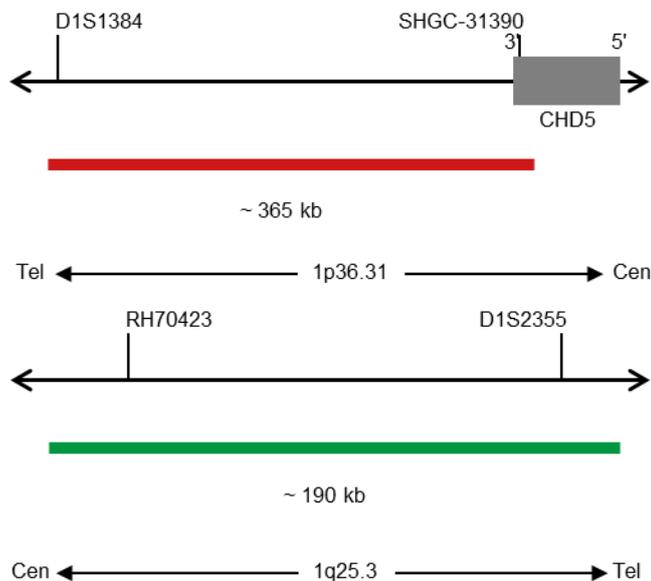


Fig. 1: Em cima: Mapa de sondas SPEC 1p36, em baixo: Mapa de sondas SPEC 1q25 (não à escala)

A ZytoDot 2C SPEC 1p36/1q25 Probe está disponível em dois tamanhos:

- C-3036-100: 0,1 ml (10 eacções de 10 μl cada)
- C-3036-400: 0,4 ml (40 eacções de 10 μl cada)

4. Materiais necessários mas não fornecidos

- ZytoDot 2C CISH Implementation Kit (N.º de produto C-3044-10/-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 no forno de hibridação
- Pipetas ajustáveis (10 μl, 1000 μl)
- Frascos ou banhos de coloração
- Temporizador
- Termómetro calibrado
- Etanol ou álcool
- Xileno
- Metanol 100%
- Peróxido de hidrogénio (H₂O₂) 30%
- Água desionizada ou destilada
- Coverslips (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Cimento de borracha, por exemplo, Fixogum Rubber Cement (N.º de fabrico E-4005-50/-125) ou similar
- Microscópio de luz com manutenção adequada (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 patologista/genético humano 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 patologista/genético humano responsável 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 do espécime 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 deve ser utilizada apenas 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 o [ZytoDot 2C CISH Implementation Kit](#).

10. Tratamento de preparação 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 do teste

Pré-tratamento de amostras

Efectuar o pré-tratamento da amostra (por exemplo, desparafinagem, proteólise) de acordo com as instruções de utilização do o [ZytoDot 2C 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 cimento de borracha (por exemplo, Fixogum) para selar.*
3. Colocar as lâminas numa placa quente ou num hibridizador e desnaturar as amostras durante 5 minutos a 79 °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 2C CISH Implementation Kit](#).

12. Interpretação dos resultados

Utilizando o [ZytoDot 2C CISH Implementation Kit](#), os sinais de hibridação dos polinucleótidos marcados com digoxigenina aparecem como pontos distintos de cor verde escura (locus 1q25) e os polinucleótidos marcados com dinitrofenilo aparecem como pontos distintos de cor vermelha brilhante (locus 1p36).

Situação normal: Nas interfases de células normais ou de células sem deleção envolvendo o locus 1p36, aparecem dois sinais distintos em forma de ponto vermelho e dois sinais distintos em forma de ponto verde (ver Fig. 2).

Situação anormal: Numa célula com uma deleção que afecte o locus 1p36, será observado um número reduzido de sinais vermelhos. As deleções que afectam apenas partes do locus 1p36 podem resultar num padrão de sinal normal com sinais vermelhos de tamanho reduzido (ver Fig. 2).

Os sinais sobrepostos podem aparecer como sinais castanhos

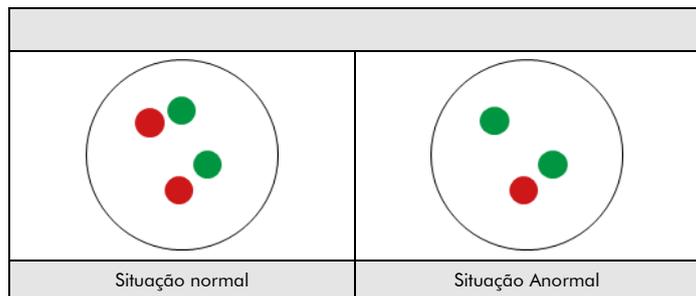


Fig. 2: Resultados esperados em núcleos normais e anormais.

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

Atenção:

- Devido à cromatina descondensada, os sinais FISH 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 com uma ampliação de, pelo menos, 400 vezes, resultando em sinais facilmente visíveis. Recomenda-se uma ampliação de 630 vezes para as sondas que detectam quebras cromossómicas. Não utilizar lentes com filtros que aumentem o contraste, uma vez que tal pode distorcer a cor do sinal. Para obter sinais em cores vivas, abrir o diafragma de abertura. Não esquecer de focar para cima e para baixo ao avaliar um núcleo, uma vez que os sinais vermelhos e verdes podem estar localizados uns sobre os outros.
- 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 amostras de doentes devem ser considerados inválidos.

Controlo interno: Células não neoplásicas na 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) |

14.2 Desempenho clínico

| | |
|---------------------------------------|-------------------------------------|
| Sensibilidade do diagnóstico: | 100% (95% CI 91.6 – 100.0) vs FISH |
| Especificidade do diagnóstico: | 100% (95% CI 91.6 – 100.0) vs. FISH |

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 conduzir 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 | Ação |
|---|---|
| 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 |
| 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 foi 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 | Ação |
|---|---|
| Pré-tratamento proteolítico efectuado durante demasiado tempo | Optimizar o tempo de incubação da pepsina, aumentar ou diminuir se necessário |
| O tempo de incubação da solução AP-Red não está correcto | Se necessário, o tempo de incubação pode ser reduzido para 5 minutos. Não aquecer a solução de substrato a mais de 25 °C; incubar apenas à temperatura ambiente |
| Tempo de incubação da solução HRP-Green incorrecto | Se necessário, o tempo de incubação pode ser reduzido para 7 minutos. Não aquecer a solução de substrato a mais de 25 °C; incubar apenas à temperatura ambiente |

Sinais vermelhos demasiado fracos

| Causa possível | Acção |
|--|--|
| A solução AP-Red foi exposta a luz directa forte | Preparar e utilizar a solução AP-Red protegida da luz directa forte |
| A solução AP-Red foi preparada demasiado cedo | Preparar antes da utilização imediata |
| O tempo de incubação da solução AP-Red não está correcto | Se necessário, o tempo de incubação pode ser prolongado até 15 minutos |
| Preparação insuficiente do substrato cromogénico | Não aumentar o volume da solução A |

Sinais verdes demasiado fracos

| Causa possível | Acção |
|--|--|
| Tempo de incubação de quaisquer passos de lavagem após coloração com HRP-Green demasiado longo | Não exceder os tempos de incubação indicados |
| Tempo de incubação da solução HRP-Green incorrecto | Se necessário, o tempo de incubação pode ser prolongado até 15 minutos |
| Preparação insuficiente do substrato cromogénico | Não aumentar o volume da solução A |

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 |
| As secções não foram desidratadas correctamente | Utilizar soluções frescas de etanol e xileno; utilizar apenas xileno de qualidade "pura" |

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 sectionamento |
|--|---------------------------|

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; Perturbações 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

- Lass U, et al. (2013) *Brain Pathol* 23: 311-8.
- Wilkinson DG: *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.

18. Revisão



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 ZytoDot® são marcas comerciais da ZytoVision GmbH.