ZytoDot 2C
Glioma 1p/19q Probe Set

REF	C-3076-10	Σ	10
REF	C-3076-40	Σ	40

Para a detecção qualitativa de deleções que envolvam a região cromossómica humana 1p36.31, bem como de deleções que envolvam a região cromossómica humana 19q13.32-q13.33 por hibridação *in situ* cromogénica (CISH)

4250380N9183

CE
0483
IVD

Dispositivo médico de diagnóstico in vitro

de acordo com o RIV (UE) 2017/746

1. Objectivo pretendido

O conjunto de sondas ZytoDot 2C Glioma 1p/19q Probe Set destina-se a ser utilizado para a detecção qualitativa de deleções que envolvam a região cromossómica humana 1p36.31, bem como de deleções que envolvam a região cromossómica humana 19q13.32-q13.33 em amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina, tais como gliomas, por hibridação in situ cromogénica (CISH). A sonda destina-se a ser utilizada em combinação com o ZytoDot 2C CISH Implementation Kit (N.° 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 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 contra-coloração do núcleo com um corante nuclear, os fragmentos de sonda hibridizados são visualizados por microscopia óptica.

3. Reagentes fornecidos

O ZytoDot 2C Glioma 1p/19q Probe Set é um conjunto que inclui duas sondas separadas:

- ZytoDot 2C SPEC 1p36/1q25 Probe (N.° de produto C-3036-100/-400)
- ZytoDot 2C SPEC 19q13/19p13 Probe (N.° de produto C-3037-100/-400)

O ZytoDot 2C SPEC 1p36/1q25 Probe (**PD21**) 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

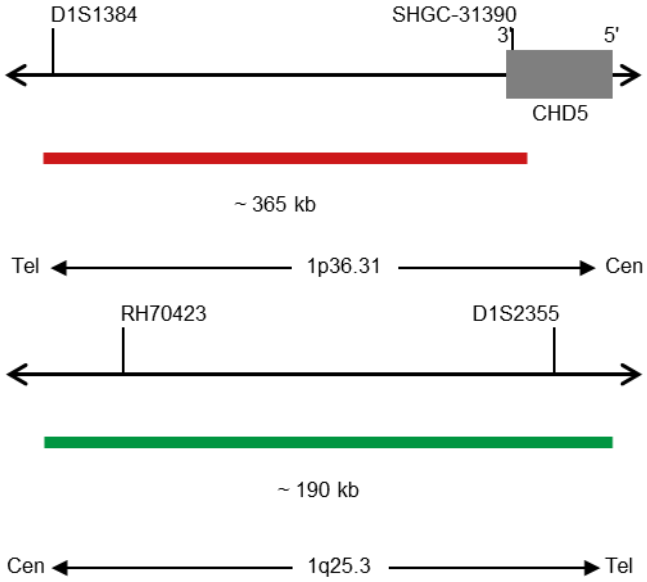

Fig. 1: Em cima: Mapa de sondas SPEC 1p36, em baixo: Mapa de sondas SPEC 1q25 (não à escala)

O ZytoDot 2C SPEC 19q13/19p13 Probe (**PD22**) é composto por:

- Polinucleótidos marcados com digoxigenina (~0,8 ng/µl), que têm como alvo sequências mapeadas em 19p13.3* (chr19:815,938-962,244) (ver Fig. 2).
- Polinucleótidos marcados com dinitrofenilo (~0,8 ng/µl), que visam sequências mapeadas em 19q13.32-q13.33* (chr19:47,857,776-48,339,398) (ver Fig. 2).
- Tampão de hibridação à base de formamida

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

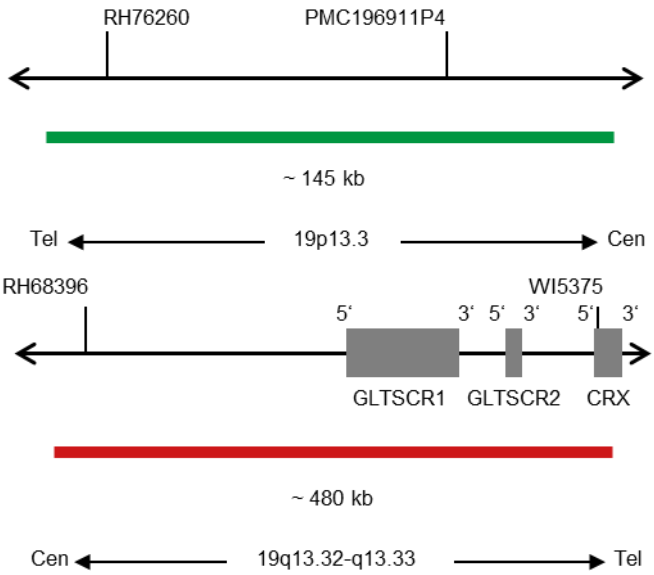

Fig. 2: Em cima: Mapa de sondas SPEC 19p13, em baixo: Mapa de sondas SPEC 19q13 (não à escala)

A ZytoDot 2C Glioma 1p/19q Probe Set está disponível em dois tamanhos:

- C-3076-10: As sondas individuais são suficientes para 10 reacções de 10 µl cada.
- C-3076-40: As sondas individuais são suficientes para 40 reacções de 10 µl cada

4. Materiais necessários mas não fornecidos

- ZytoDot 2C CISH Implementation Kit (N.° 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 (H O_{22}) 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.° 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

ZytoDot 2C SPEC 1p36/1q25 Probe:

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. 3).

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. 3).

Os sinais sobrepostos podem aparecer como sinais castanhos

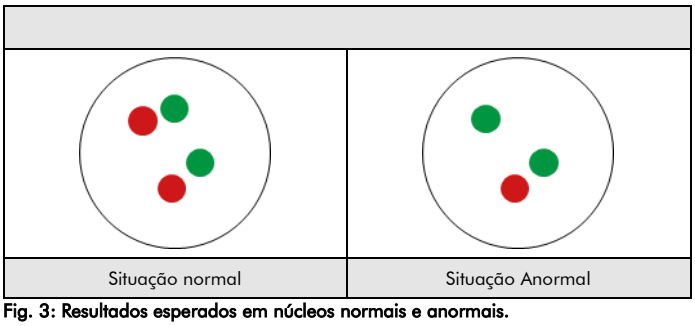

Fig. 3: Resultados esperados em núcleos normais e anormais.

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.

ZytoDot 2C SPEC 19q13/19p13 Probe:

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 19p13) e os polinucleótidos marcados com dinitrofenilo aparecem como pontos distintos de cor vermelha brilhante (locus 19p13).

Situação normal: Nas interfases de células normais ou de células sem deleção envolvendo o locus 19p13, aparecem dois sinais distintos em forma de ponto vermelho e dois sinais distintos em forma de ponto verde (ver Fig. 4).

Situação anormal: Numa célula com uma deleção que afecte o locus 19p13, será observado um número reduzido de sinais vermelhos. As deleções que afectam apenas partes do locus 19p13 podem resultar num padrão de sinal normal com sinais vermelhos de tamanho reduzido (ver Fig. 4).

Os sinais sobrepostos podem aparecer como sinais castanhos

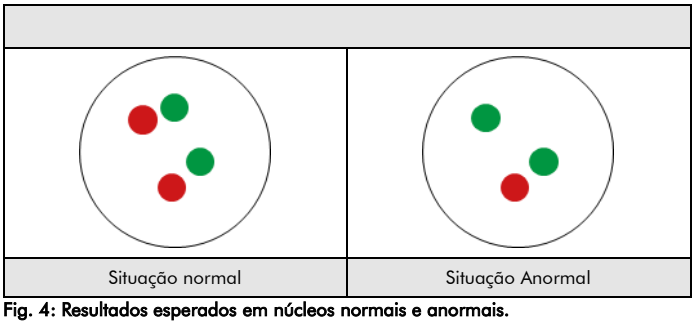

Fig. 4: Resultados esperados em núcleos normais e anormais.

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 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 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

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:	**ZytoDot 2C SPEC 1p36/1q25 Probe**: 100% (95% CI 91.6 – 100.0) vs FISH **ZytoDot 2C SPEC 19q13/19p13 Probe:** 100% (95% CI 91.4 – 100.0) vs. FISH
Especificidade do diagnóstico:	**ZytoDot 2C SPEC 1p36/1q25 Probe:** 100% (95% CI 91.6 – 100.0) vs FISH **ZytoDot 2C SPEC 19q13/19p13 Probe:** 100% (95% CI 91.4 – 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	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
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	Acção
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 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; 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

Revisão	Descrição da alteração
5.1.1	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.