



ZytoFast
EBV Probe
(Digoxigenin-labeled)

REF T-1114-400  40 (0,4 ml)

Para a detecção qualitativa do RNA EBER do vírus de Epstein-Barr (EBV) humano por hibridação *in situ* cromogénica (CISH)

4250380P101QC



Dispositivo médico de diagnóstico *in vitro*
de acordo com o RIV (UE) 2017/746

1. Objectivo pretendido

A sonda ZytoFast EBV Probe (PF29) destina-se a ser utilizada para a detecção qualitativa do RNA EBER do vírus Epstein-Barr (EBV) humano em amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina, tais como linfomas difusos de grandes células B (DLBCL) ou linfomas de Hodgkin, por hibridação cromogénica *in situ* (CISH). A sonda destina-se a ser utilizada em combinação com a sonda ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB (Prod. No. T-1063-40).

O produto destina-se apenas a utilização profissional. Todos os testes que utilizem 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 auxiliar no diagnóstico diferencial de DLBCL ou linfomas de Hodgkin e as medidas terapêuticas não devem basear-se 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 conduz subsequentemente 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

A ZytoFast EBV Probe é composto por:

- Oligonucleótidos marcados com digoxigenina (~ 0,2 ng/ μ l), que têm como alvo sequências de ARNm que codificam as regiões EBER-1 e EBER-2

A ZytoFast EBV Probe está disponível num único tamanho:

- T-1114-400: 0,4 ml (40 20 reacções de 10 μ l cada)

4. Materiais necessários mas não fornecidos

- ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB (Prod. No. T-1063-40)
- Amostras de controlo positivo e negativo
- Lâminas de microscópio, carregadas positivamente
- Banho maria (55 °C, 98 °C)
- Hibridizador ou placa de aquecimento
- Hibridizador ou câmara de humidade no forno de hibridação
- Pipetas calibradas ajustáveis (10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l)
- Frascos ou banhos de coloração
- Temporizador
- Termómetro calibrado
- Étanol ou álcool reagente
- Xileno
- Metanol 100%
- Peróxido de hidrogénio (H₂ O₂) 30%.
- Água desionizada ou destilada
- Lamelas (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Cola, por exemplo, Fixogum Rubber Cement (Prod. No. E-4005-50/-125) ou similar
- Microscópio de luz com manutenção adequada (100-200x)

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 as 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:

Esta sonda não está classificada como perigosa de acordo com o Regulamento (CE) n.º 1272/2008.



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 da sequência descrita 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 conforme descrito nestas instruções de 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
- O fixador de Hollande
- Formalina não tamponada

9. Preparação das amostras

Preparar as amostras conforme descrito nas instruções de utilização do ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB.

10. Tratamento preparatório do dispositivo

O produto está pronto a usar. Não é necessária qualquer reconstituição, mistura ou diluição. Colocar a sonda à temperatura de hibridação (55 °C) e misturar bem antes de utilizar.

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 respectivo ZytoFast 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 hibridador e desnaturar os espécimes durante 5 minutos a 75 °C.

4. Transferir as lâminas para uma câmara húmida e hibridar durante 1 h a 55 °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 respectivo ZytoFast CISH Implementation Kit.

12. Interpretação dos resultados

Utilizando o ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB, os oligonucleótidos marcados com digoxigenina hibridizados aparecem como um padrão castanho quando detectados por peroxidase de rábano (HRP) e DAB.

Uma reactividade positiva para o RNA EBER do vírus de Epstein-Barr (EBV) nas células alvo é indicada por um núcleo nitidamente corado.

Atenção:

- A visualização dos sinais deve ser efectuada com uma ampliação de, pelo menos, 100 vezes, resultando em sinais facilmente visíveis.
- Não avaliar áreas de necrose, núcleos sobrepostos, núcleos demasiado digeridos e núcleos com fraca intensidade de sinal.
- 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 ensaio 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: Em casos pouco claros, devem ser utilizadas sondas de controlo de ARN para maior esclarecimento.

Controlo externo: Amostras de controlo positivo e negativo validados.

14. Características de desempenho

14.1 Desempenho analítico

O desempenho foi avaliado de acordo com as instruções de utilização do ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB.

Sensibilidade analítica:	100% (95% CI 99.7 – 100.0)
Especificidade analítica:	100% (95% CI 99.8 – 100.0)

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

	Porcentagem de acordo
amostra negativa	100%
amostra positiva	100%
amostra positiva	100%

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

	Porcentagem de acordo
amostra negativa	100%
amostra positiva	100%
amostra positiva	100%

14.2 Desempenho clínico

Sensibilidade do diagnóstico:	DLBCL: 100% (95% CI 91.7 – 100.0) vs. IHC HL: 100% (95% CI 88.4 – 100.0) vs. PCR
Especificidade do diagnóstico:	DLBCL: 98.41% (95% CI 91.7 – 100.0) vs. IHC HL: 100% (95% CI 88.4 – 100.0) vs. PCR

