ZytoFast human Ig-kappa Probe

(Digoxigenin-labeled)

REF T-1115-400 Σ 40 (0,4 ml)

Para a detecção qualitativa do RNAm da cadeia leve da Ig-kappa humana (κ) por hibridação *in situ* cromogénica (CISH)

4250380P102QE

CE 0483 IVD

Dispositivo médico de diagnóstico in vitro

de acordo com o RIV (UE) 2017/746

1. Objectivo pretendido

A sonda ZytoFast human Ig-kappa Probe (**PF30**) destina-se a ser utilizada para a detecção qualitativa do RNAm da cadeia leve Ig-kappa humana (κ) em amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina, tais como mieloma múltiplo, por hibridação in situ cromogénica (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.

O produto destina-se a ser utilizado como um auxiliar no diagnóstico diferencial do mieloma múltiplo 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 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 human Ig-kappa Probe é composto por:

- Oligonucleótidos marcados com digoxigenina (~ 0,2 ng/µl), que têm como alvo sequências de ARNm que codificam as regiões constantes da cadeia leve de Ig-kappa.

A ZytoFast human Ig-kappa Probe está disponível num único tamanho:

- T-1115-400: 0,4 ml (40 reacções de 10 µl 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 µl, 100 µl, 1000 µl)
- Frascos ou banhos de coloração
- Temporizador
- Termómetro calibrado
- Etanol ou álcool reagente
- Xileno
- Metanol 100%
- Peróxido de hidrogénio (H_2O_2) 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 hibridizador e desnaturar os espécimes durante 5 minutos a 75 °C.
4. Transferir as lâminas para uma câmara húmida e hibridizar 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 nas células B plasmáticas é indicada pela coloração citoplasmática.

No tecido linfóide, o rácio kappa/lambda normal é de cerca de 2:1; uma indicação de monoclonalidade é dada se o rácio kappa/lambda for >3:1 ou <0,3:1.

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: Uma célula B plasmática na amostra deve apresentar um padrão de coloração Ig-kappa ou Ig-lambda. As células da amostra que não pertençam ao tipo de células B, por exemplo, fibroblastos, não devem apresentar qualquer padrão de coloração..

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)

14.2 Desempenho clínico

Sensibilidade do diagnóstico:	100% (95% CI 86.3 -100.0) vs. IHC 100% . RAPID RISH Biocare/ Ensaio de restrição da cadeia leve sem soro 88.24% vs. IHC
Especificidade do diagnóstico:	100% (95% CI 86.3 -100.0) vs. IHC

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
Preparação insuficiente do substrato cromogénico	Em vez de preparar os substratos de cor por gotejamento, utilizar uma pipeta
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

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 recomendada nas instruções de utilização. Utilizar soluções 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 efectuado correctamente	Optimizar o tempo de incubação da pepsina

Pertubações 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 frescas; verificar a duração da desparafinagem
Pré-tratamento proteolítico não efectuado correctamente	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

- Lang G. (2010) *Journal of Histotechnology*.
- Sen A, et al. (2020) *Med J Armed Forces India*.
- Wilkinson DG: In Situ Hybridization, A Practical Approach, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.

18. Revisão

Revisão	Descrição da alteração
2.1.1	Alteração do organismo notificado

www.zytovision.com

Consulte 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*Fast*® são marcas comerciais da ZytoVision GmbH.