# *Zyto**Light***
# SPEC PDGFRA/FIP1L1 TriCheck Probe

REF Z-2209-50 5 (0,05 ml)

Para a detecção qualitativa de rearranjos PDGFRA humanos com e sem participação do gene FIP1L1 humano por hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

4250380P295RL

CE 0483 IVD

Dispositivo médico de diagnóstico in vitro

de acordo com o RIV (UE) 2017/746

## 1. Objectivo pretendido

A sonda ZytoLight SPEC PDGFRA/FIP1L1 TriCheck Probe (**PL167**) destina-se a ser utilizada para a detecção qualitativa de rearranjos que envolvam o gene PDGFRA humano com e sem a participação do gene FIP1L1 humano em amostras citológicas por hibridação in situ por fluorescência (FISH). A sonda destina-se a ser utilizada em combinação com o ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit (Prod. No. Z-2099-20).

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 auxiliar no diagnóstico diferencial de vários cancros e não devem ser iniciadas medidas terapêuticas com base apenas no resultado do teste.

## 2. Princípio do teste

A técnica de hibridação *in situ por* fluorescência (FISH) permite a detecção e visualização de sequências específicas de ácidos nucleicos em preparações celulares. Os fragmentos de ADN marcados com fluorescência, designados por sondas FISH, e as suas cadeias de ADN alvo complementares nas preparações são co-desnaturados e, subsequentemente, deixados em contacto durante a hibridação. Em seguida, os fragmentos de sonda inespecíficos e não ligados são removidos através de passos de lavagem rigorosos. Após a coloração de contraste do ADN com DAPI, os fragmentos de sonda hibridizados são visualizados utilizando um microscópio de fluorescência equipado com filtros de excitação e emissão específicos para os fluorocromos com os quais os fragmentos de sonda FISH foram directamente marcados.

## 3. Reagentes fornecidos

O ZytoLight SPEC PDGFRA/FIP1L1 TriCheck Probe é composto por:

- Polinucleótidos marcados com ZyGreen (excitação 503 nm/emissão 528 nm) (~10,0 ng/µl), que têm como alvo sequências mapeadas em 4q12* (chr4:53,552,536-54,238,252) proximais à região do ponto de quebra FIP1L1 (ver Fig. 1).
- Polinucleótidos marcados com ZyOrange (excitação 547 nm/emissão 572 nm) (~4,5 ng/µl), que têm como alvo sequências mapeadas em 4q12* (chr4:54,351,156-54,749,671) proximais à região do ponto de quebra PDGFRA (ver Fig. 1).
- Polinucleótidos marcados com ZyBlue (excitação 418 nm/emissão 467 nm) (~37,0ng/µl), que têm como alvo sequências mapeadas em 4q12* (chr4:55,185,968-55,915,442) distal à região do ponto de quebra PDGFRA (ver Fig. 1).
- Tampão de hibridação à base de formamida

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

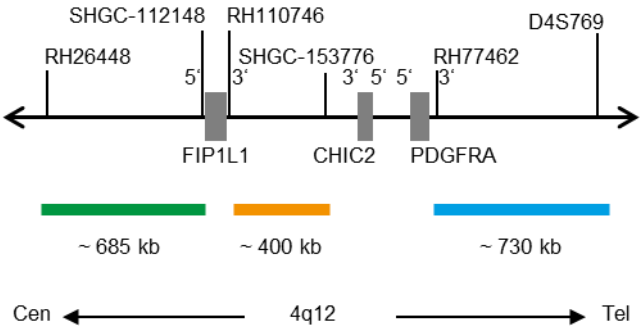


**Fig. 1: SPEC PDGFRA/FIP1L1 Mapa da sonda (não à escala)**

A ZytoLight SPEC PDGFRA/FIP1L1 TriCheck Probe está disponível num único tamanho:

- Z-2209-50: 0,05 ml (5 reacções de 10 µl cada)

## 4. Materiais necessários mas não fornecidos

- ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit (Prod. No. Z-2099-20)
- Amostras de controlo positivo e negativo
- Lâminas preparadas para microscópio, não revestidas
- Banho-maria(70 °C)
- Hibridizador ou placa de aquecimento
- Hibridizador ou câmara de humidade no forno de hibridação
- Pipetas ajustáveis (10 µl, 25 µl)
- Frascos ou banhos de coloração
- Temporizador
- Termómetro calibrado
- Etanol ou álcool
- 37% de formaldeído, sem ácido, ou 10% de formalina, com tampão neutro
- 2x Citrato salino-sódico (SSC), por exemplo, a partir de 20x SSC Solution (Prod. No. WB-0003-50)
- Água desionizada ou destilada
- Lamelas (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Cola, por exemplo, Fixogum Rubber Cement (Prod. No. E-4005-50/-125) ou similar
- Microscópio de fluorescência com manutenção adequada (400-1000x)
- Óleo de imersão aprovado para microscopia de fluorescência
- Conjuntos de filtros adequados

## 5. Armazenamento e manuseamento

Armazenar a 2-8 °C numa posição vertical protegida da luz. Utilizar ao abrigo da luz. 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.
- A sonda não deve ser exposta à luz, especialmente à luz forte, durante um longo período de tempo, ou seja, todos os passos devem ser efectuados, sempre que possível, no escuro e/ou utilizando recipientes à prova de luz.

**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.
- O ponto de corte analítico normal para o padrão de sinal anormal em causa deve ser estabelecido por um patologista/genético humano qualificado.
- 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 FISH, 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 de espécimes, 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 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 glóbulos vermelhos presentes na amostra podem apresentar autofluorescência, o que dificulta o reconhecimento do sinal.

## 9. Preparação das amostras

Preparar as amostras conforme descrito nas instruções de utilização do Zyto*Light* FISH-Cytology 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 (desparafinagem, proteólise) de acordo com as instruções de utilização do Zyto*Light* FISH-Cytology 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 72 °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, contracoloração, microscopia de fluorescência) de acordo com as instruções de utilização do Zyto*Light* FISH-Cytology Implementation Kit.

## 12. Interpretação dos resultados

Com a utilização de conjuntos de filtros adequados, os sinais de hibridação da sonda aparecem a verde (proximal à região do ponto de ruptura FIP1L1), a laranja (proximal à região do ponto de ruptura PDGFRA) e a azul (distal à região do ponto de ruptura PDGFRA).

**Situação normal:** Nas interfases de células normais ou de células sem rearranjos PDGFRA-FIP1L1, aparecem dois sinais de fusão verde/laranja quando se utiliza um conjunto adequado de filtros passa-banda duplos e dois sinais azuis quando se utiliza um conjunto adequado de filtros passa-banda simples. Quando se utiliza um conjunto adequado de filtros passa-banda de três cores, podem ser observados dois sinais de fusão verde/laranja/azul (ver Fig. 2).

**Situação anormal:** Uma fusão PDGFRA-FIP1L1 resultante de uma deleção do DNA intersticial é indicada pela perda de um sinal laranja que leva a um sinal verde separado co-localizado com um sinal azul. Uma translocação de PDGFRA sem envolvimento de FIP1L1 é indicada por um sinal de fusão verde/laranja e um sinal azul separado (ver Fig. 2).

*Os sinais que se sobrepõem podem aparecer como sinais amarelos.*

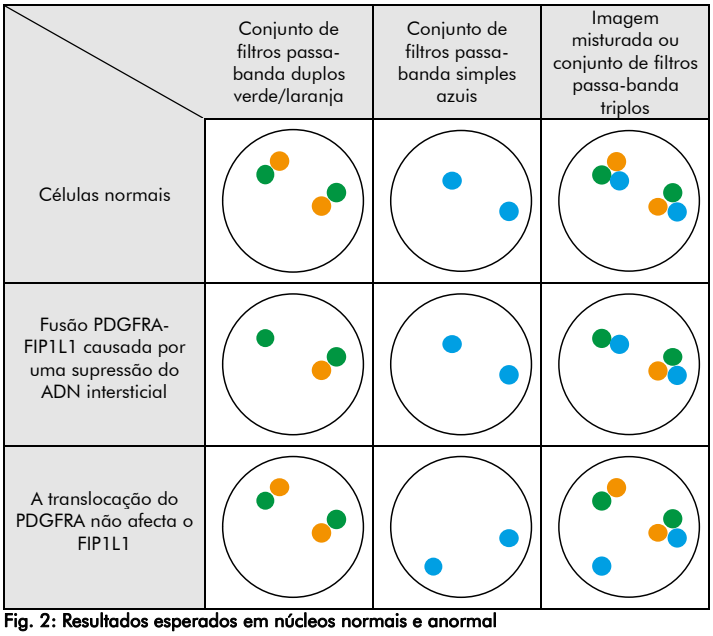


**Fig. 2: Resultados esperados em núcleos normais e anormal**

Nalgumas 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 individuais de FISH 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.
- Não avaliar núcleos sobrepostos.
- Não contar os núcleos demasiado digeridos (reconhecidos por áreas escuras visíveis no interior dos núcleos).
- Não contar núcleos com forte auto-fluorescência, que dificulta o reconhecimento do 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 espécimes 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

O desempenho foi avaliado de acordo com as instruções de utilização do ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit.

| | |
|---|---|
| **Sensibilidade analítica:** | 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% |

## 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 |
| Utilização de conjuntos de filtros inadequados | Utilizar conjuntos de filtros adequados para os fluocromos da sonda.<br><br>Os conjuntos de filtros de passagem de banda tripla fornecem menos luz do que os conjuntos de filtros de passagem de banda simples ou dupla. Consequentemente, os sinais podem parecer mais fracos utilizando estes conjuntos de filtros de passagem de banda tripla |

**Sinais de hibridação cruzada; Perturbações de fundo**

| Causa possível | Acção |
|---|---|
| Pré-tratamento proteolítico demasiado forte | Reduzir o tempo de incubação da pepsina |
| Lâminas arrefecidas à temperatura ambiente antes da hibridação | Transferir rapidamente as lâminas para 37 °C |

**Morfologia degradada**

| Causa possível | Acção |
|---|---|
| Pré-tratamento proteolítico não efectuado correctamente | Optimizar o tempo de incubação da pepsina, diminuir se necessário |

| | |
|---|---|
| Secagem insuficiente antes da aplicação da sonda | Prolongar a secagem ao ar |

**Contracoloração fraca**

| Causa possível | Acção |
|---|---|
| Solução DAPI pouco concentrada | Em vez disso, utilizar DAPI/DuraTect-Solution (ultra) (Prod. No MT-0008-0.8) |
| Tempo de incubação do DAPI demasiado curto | Ajustar o tempo de incubação do DAPI |

## 17. Literatura


- Kievits T, et al. (1990) Cytogenet Cell Genet 53: 134-6.
- Wilkinson DG: In Situ Hybridization, A Practical Approach, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.


## 18. Revisão

| Revisão | Descrição da alteração |
|---|---|
| 4.1.1 | Alteração do organismo notificado<br>14. Características de desempenho<br>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*Light*® são marcas comerciais da ZytoVision GmbH.