F*lex*ISH
MYC/IGH TriCheck Probe

REF Z-2293-50 5 (0,05 ml)

Para a detecção qualitativa de translocações de rearranjos MYC humanos com e sem participação do locus IGH humano por hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

4250380P374RH

CE 0483

IVD

Dispositivo médico de diagnóstico in vitro

de acordo com o RIV (UE) 2017/746

1. Objectivo pretendido

A sonda F*lex*ISH MYC/IGH TriCheck Probe (**PL247**) destina-se a ser utilizada para a detecção qualitativa de rearranjos que envolvam o gene MYC humano com e sem a participação do locus IGH humano em amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina por hibridação in situ por fluorescência (FISH). A sonda destina-se a ser utilizada em combinação com o F*lex*ISH-Tissue Implementation Kit (N.° de produto Z-2182-5/-20).

O produto destina-se apenas a utilização profissional. Todos os testes que utilizem o produto devem ser realizados num laboratório de anatomia patológica certificado e licenciado, sob a supervisão de um profissional 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 de teste

A técnica de hibridação in situ por fluorescência (FISH) permite a deteção e visualização de sequências específicas de ácidos nucleicos em amostras de células. Os fragmentos de ADN marcados por fluorescência, designados sondas FISH, e as respetivas cadeias-alvo de ADN nas amostras, são codesnaturados e subsequentemente renaturados durante a hibridação. Posteriormente, os fragmentos da sonda não específicos e não ligados são removidos através de fases de lavagem de estringência. Após a coloração de contraste do ADN com DAPI, os fragmentos da sonda hibridizados são visualizados utilizando o microscópio de fluorescência equipado com filtros de excitação e emissão específicos para os fluorocromos com os quais os fragmentos da sonda FISH foram diretamente marcados.

3. Reagentes fornecidos

O F*lex*ISH MYC/IGH TriCheck Probe é composto por:

- Polinucleótidos marcados com ZyGreen (excitação 503 nm/emissão 528 nm) (~10 ng/µl), que têm como alvo sequências mapeadas em 8q24.21* (chr8:130,373,051-130,930,673) distal à região do ponto de quebra MYC (ver Fig. 1).
- Polinucleótidos marcados com ZyOrange (excitação 547 nm/emissão 572 nm) (~4,5 ng/µl), que têm como alvo sequências mapeadas em 8q24.21* (chr8:127,888,765-128,363,281) proximais à região do ponto de quebra MYC (ver Fig. 1).
- Polinucleótidos marcados com ZyBlue (excitação 418 nm/emissão 467nm) (~70,0 ng/µl), que têm como alvo sequências mapeadas em 14q32.33* (chr14:105,462,169-106,995,000) que albergam o locus IGH (ver Fig. 1).
- Tampão de hibridação à base de formamida

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

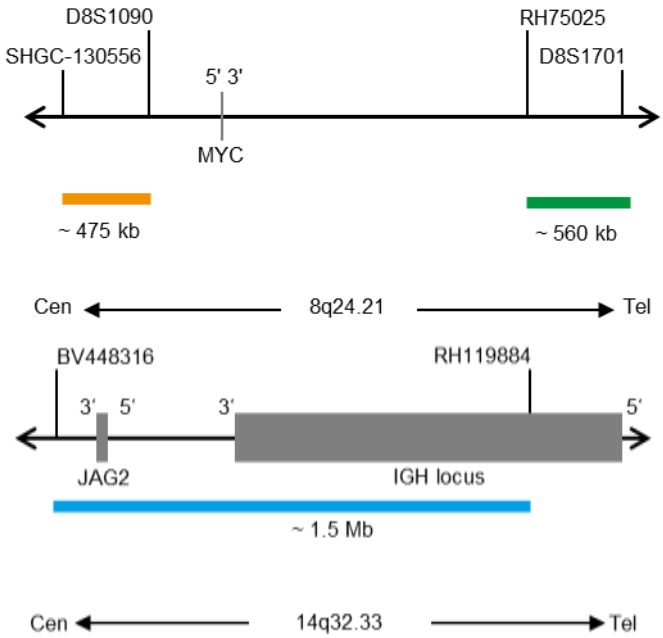

Fig. 1: Em cima: Mapa de sondas MYC, em baixo: Mapa de sondas IGH (não à escala)

A F*lex*ISH MYC/IGH TriCheck Probe está disponível num único tamanho:

- Z-2293-50: 0,05 ml (5 reacções de 10 µl cada)

4. Materiais necessários mas não fornecidos

- F*lex*ISH-Tissue Implementation Kit (N.° de produto Z-2182-5/-20)
- Amostras de controlo positivo e negativo
- Lâminas de microscópio, carregadas positivamente
- Banho-maria (37 °C, 98 °C)
- Hibridizador ou placa de aquecimento
- Hibridizador ou câmara de humidade na estufa de hibridação
- Pipetas ajustáveis (10 µl, 25 µl)
- Frascos ou banhos de coloração
- Temporizador
- Termómetro calibrado
- Etanol ou álcool
- Xileno
- Água desionizada ou destilada
- Lamelas (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Cola, por exemplo, Fixogum Rubber Cement (Prod. No.-E400550/-125-) ou similar
- Microscópio de fluorescência devidamente calibrado (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

H319	Provoca irritação ocular grave.
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.
P260	Não respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/spray.
P280	Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial.
P305+P351+P338	SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: Enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Retirar as lentes de contacto, se existirem e forem fáceis de retirar. Continuar a enxaguar.
P308+P313	Em caso de exposição ou preocupação: Obter aconselhamento/atenção médica.
P337+P313	Se a irritação ocular persistir: Consultar um médico.

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 profissional qualificado.
- A interpretação clínica de qualquer coloração positiva, ou da sua ausência, deve ser efectuada no contexto da história clínica, morfologia, e outros critérios histopatológicos, assim como outros testes de diagnóstico. É da responsabilidade do profissional qualificado estar familiarizado com as sondas FISH, reagentes, painéis de diagnóstico e métodos utilizados para produzir a preparação da coloração. A coloração deve ser realizada num laboratório certificado e licenciado, sob a supervisão de um patologista responsável pela revisão das lâminas de coloração e que garanta a adequação dos controlos positivos e negativos.
- A coloração de amostras, especialmente, a intensidade do sinal e a coloração de fundo, depende do manuseamento e do processamento da amostra antes da coloração. A fixação, congelamento, descongelamento, lavagem, secagem, aquecimento ou microtomia inadequada ou a contaminação com outras amostras ou fluidos pode produzir perturbações ou falsos resultados. Os resultados inconsistentes podem resultar de variações nos métodos de fixação e inclusão, assim 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 eritrócitos presentes na amostra podem apresentar autofluorescência, o que afeta o reconhecimento do sinal.

Os seguintes fixadores são incompatíveis com o FISH:

- 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 de amostras

Preparar as amostras conforme descrito nas instruções de utilização do F*ex*ISH-Tissue 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 por vórtex e rotação invertida durante alguns instantes.

11. Procedimento de teste

Pré-tratamento de amostras
Efectuar o pré-tratamento da amostra (desparafinagem, proteólise) de acordo com as instruções de utilização do F*ex*ISH-Tissue 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 10 minutos a 75 °C.
4. Efectuar a hibridação entre 2 h e 16 h (ou seja, de um dia para o outro) a 37 °C, transferindo as lâminas para um hibridador ou para uma câmara húmida e uma estufa de hibridação.

É essencial que as amostras não sequem durante a fase de hibridação.

Pós-hibridação
Efectuar o processamento pós-hibridação (lavagem, coloração de contraste, microscopia de fluorescência) de acordo com as instruções de utilização do F*ex*ISH-Tissue Implementation Kit.

12. Interpretação dos resultados

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

Situação normal: Nas interfases de células normais ou de células sem rearranjos MYC, 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. When using an appropriate triple color bandpass filter set, two green/orange fusion signals and two blue signals can be observed (ver Fig. 2).

Situação anormal: Um rearranjo da região do gene MYC que não envolva o locus IGH é indicado por um sinal de fusão verde/laranja, sinais verdes e cor-de-laranja separados e dois sinais azuis. Um rearranjo MYC que envolva o locus IGH é indicado por um sinal de fusão verde/laranja, um sinal azul separado e um sinal de fusão verde/azul, bem como um sinal de fusão laranja/azul. Numa célula com um rearranjo do locus IGH que não envolve o gene MYC ou uma trissomia do cromossoma 14, podem ser observados dois sinais de fusão verde/laranja e três sinais azuis (ver Fig. 2).

A sobreposição de sinais verdes e cor de laranja pode aparecer como sinais amarelos.

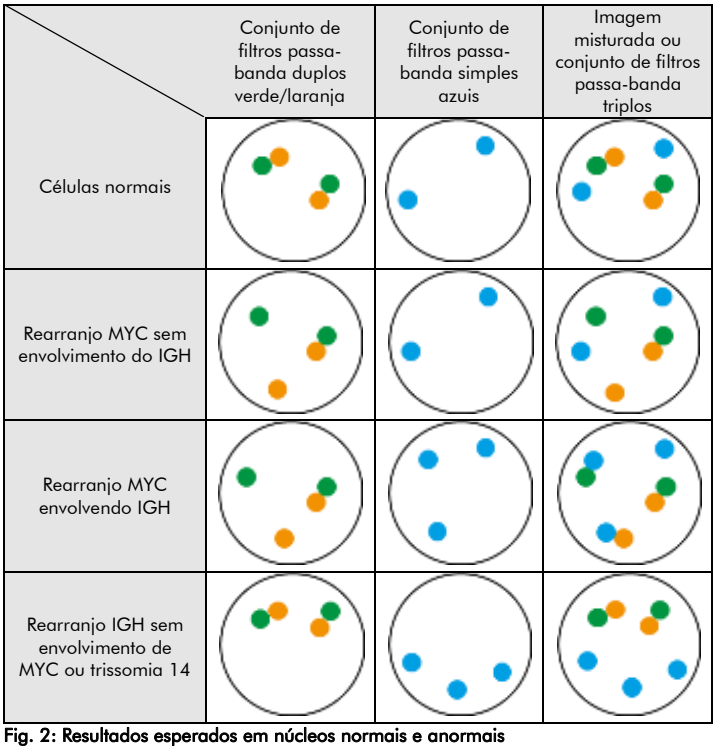

Fig. 2: Resultados esperados em núcleos normais e anormais

As aberrações genómicas devidas a pequenas delecções, duplicações ou inversões podem resultar em padrões de sinais discretos.

Devido às sequências homólogas de IGH em 16p11.2 e 15q11.2, podem ser observadas hibridações cruzadas ténues.

Outros padrões de sinais aberrantes podem ser causados pela perda completa ou parcial dos genes IGHC ou IGHV, bem como por inserções crípticas noutros loci. Além disso, sinais verdes ausentes ou diminuídos em um ou ambos os alelos podem representar deleções de genes IGHV resultantes de recombinação somática V-D-J normal.

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 sobre-digeridos (reconhecidos por áreas escuras visíveis no interior dos núcleos).
- Não contabilizar núcleos com autofluorescência forte, o que afeta o reconhecimento de sinais.
- Um resultado negativo ou não especifico 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

O desempenho foi avaliado de acordo com as instruções de utilização do F*ex*ISH-Tissue 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
A amostra não foi fixado correctamente	Optimizar o tempo de fixação e o fixador
Pré-tratamento proteolítico não efectuado correctamente	Optimizar o tempo de incubação da pepsina, aumentar ou reduzir conforme necessário

Evaporação da sonda	Quando utiliza um hibridador, a utilização de faixas húmidas/tanques com água é obrigatória. Quando utiliza uma estufa de hibridação, é necessária a utilização de uma câmara de humidade. Adicionalmente, as lamelas devem estar perfeitamente seladas, por ex.: com Fixogum, para evitar a secagem da amostra durante a hibridação
Conjuntos de filtros inadequados	Utilizar conjuntos de filtros adequados para os fluocromos da sonda. *Os conjuntos de filtros de passagem de banda tripla fornecem menos luz em comparação com 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
Desparafinagem incompleta	Utilizar soluções novas; verificar a duração da desparafinagem
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
A amostra não foi fixado correctamente	Optimizar o tempo de fixação e o fixador
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

Núcleos sobrepostos

Causa possível	Acção
Espessura inadequada das secções de tecido	Preparar secções de micrótomo de 2-4 µm

A amostra flutua para fora da lâmina

Causa possível	Acção
Pré-tratamento proteolítico demasiado forte	Reduzir o tempo de incubação da pepsina

Coloração de contraste fraca

Causa possível	Acção
Solução DAPI pouco concentrada	Em vez disso, utilizar DAPI/DuraTect-Solution (ultra) (N.º de produto 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
3.1.1	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 F*lex*ISH® são marcas comerciais da ZytoVision GmbH.