



**ZytoLight**

## **Aneuploidy Panel 18/X/Y and 13/21**

REF Z-2279-20

Σ 20

Para a deteção qualitativa de sequências específicas do cromossoma humano 13 e 21, assim como de sequências específicas do cromossoma humano 18 e alfa satélites do cromossoma X e Y por hibridação *in situ* por fluorescência (FISH)



Dispositivo médico de diagnóstico *In Vitro*  
de acordo com a diretiva EU 98/79/CE

### 1. Utilização pretendida

O ZytoLight Aneuploidy Panel 18/X/Y and 13/21 destina-se a ser utilizado para a deteção qualitativa de sequências específicas do cromossoma humano 13 e 21, assim como de sequências específicas do cromossoma humano 18 e alfa satélites do cromossoma X e Y em amostras citológicas ou fixadas em formalina e impregnadas em parafina, através de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH). A sonda destina-se a ser utilizada em combinação com os ZytoLight FISH-Implementation Kit (Prod. N.º. Z-2028-5/-20, ou Z-2099-20).

A interpretação dos resultados deve ser realizada no âmbito do contexto da história clínica do paciente relativamente a outros dados clínicos e patológicos por um patologista qualificado.

### 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 celulares. Os fragmentos de ADN marcados por fluorescência, designados sondas FISH, e as respetivas cadeias-alvo de ADN nas amostras, são codenaturados 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 ZytoLight Aneuploidy Panel 18/X/Y and 13/21 é um kit compost por duas sondas separadas:

- ZytoLight SPEC 18/CEN X/Y Triple Color Probe (Prod. No. Z-2163-200)
- ZytoLight SPEC 13/21 Dual Color Probe (Prod. No. Z-2164-200)

O ZytoLight SPEC 13/CEN 18/SPEC 21 Triple Color Probe (PL119) é composto por:

- Polinucleótidos (~37 ng/μl) com marcação ZyBlue (excitação 418 nm/emissão 467 nm), dirigidos ao mapeamento de sequências alvo em 18q21.31-q21.32\* (chr18:55,690,725-56,455,119) (ver Fig. 1).
- Polinucleótidos (~4.5 ng/μl) com marcação ZyGreen (excitação 503 nm/emissão 528 nm), dirigidos ao mapeamento de sequências alvo em Xp11.1-q11.1 específicas para a região centromérica alfa satélite DXZ1 do cromossoma X.
- Polinucleótidos (~1.5 ng/μl) com marcação ZyOrange (excitação 547 nm/emissão 572 nm), dirigidos ao mapeamento de sequências alvo em Yp11.1-q11.1 específicas para a região centromérica alfa satélite DYZ3 do cromossoma Y.

• Tampão de hibridação baseado em formamida

\*De acordo com o Conjunto do Genoma Humano GRCh37/hg19

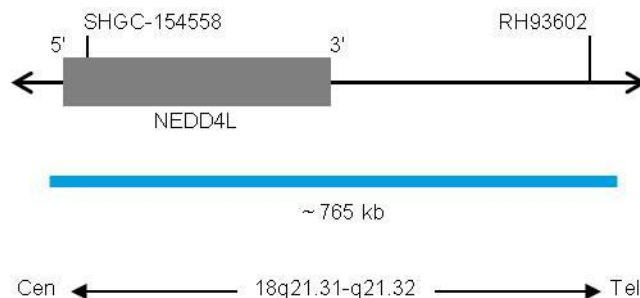


Fig. 1: SPEC 18 Mapa da sonda (sem escala)

O ZytoLight SPEC 13/21 Dual Color Probe (PL120) é composto por:

- Polinucleótidos (~10.0 ng/μl) com marcação ZyGreen (excitação 503 nm/emissão 528 nm), dirigidos ao mapeamento de sequências alvo em 13q12.11\* (chr13:20,200,365-20,892,494) (ver Fig. 2).
- Polinucleótidos (~4.5 ng/μl) com marcação ZyOrange (excitação 547 nm/emissão 572 nm), dirigidos ao mapeamento de sequências alvo em 21q22.13-q22.2\* (chr21:39,372,983-39,784,773) (ver Fig. 2).

• Tampão de hibridação baseado em formamida

\*De acordo com o Conjunto do Genoma Humano GRCh37/hg19

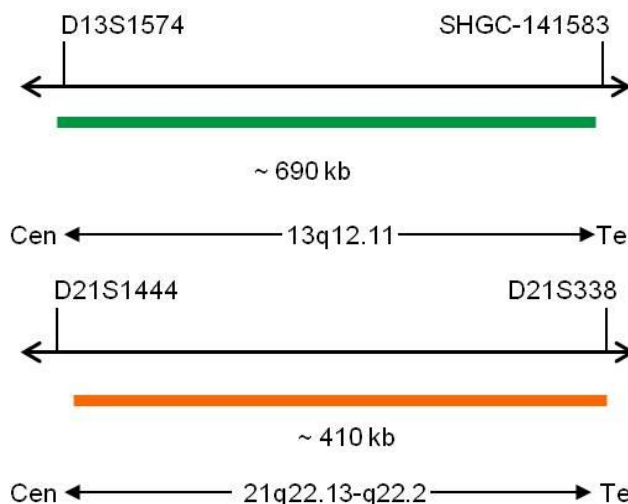


Fig. 2: Cima: SPEC 13q12.11 Mapa da sonda; Baixo: SPEC 21q22.13-q22.2 Mapa da sonda (sem escala)

O ZytoLight Aneuploidy Panel 18/X/Y and 13/21 está disponível na seguinte apresentação:

- Z-2279-20: As sondas, individualmente, são suficientes para 20 reações de 10 μl cada

#### 4. Materiais necessários mas não fornecidos

- Amostras de controlo positivo e negativo
- Hibridador ou placa quente
- Hibridador ou câmara húmida na estufa de hibridação
- Temporizador
- Frascos ou banhos de coloração
- Termómetro calibrado
- Pipetas ajustáveis (10 µl, 25 µl)
- Etanol ou álcool
- Água desionizada ou destilada
- Lamelas (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Cola, por ex.: Fixogum Rubber Cement (Prod. N.º. E-4005-50/-125) ou similar
- Microscópio de fluorescência devidamente calibrado (400-1000x)
- Óleo de imersão aprovado para microscopia de fluorescência
- Conjuntos de filtros adequados

#### Amostras de citologia

- ZytoLight FISH-Cytology-Implementation Kit (Prod. N.º. Z-2099-20)
- Lâminas de microscópio, não revestidas
- Banho-maria (70°C)
- Solução de formaldeído a 37%, isenta de ácido, ou formalina a 10%, com tampão neutro
- 2x solução salina de citrato de sódio (SSC), por ex.: de 20x solução SSC (Prod. N.º. WB-0003-50)

#### Amostras FFPE

- ZytoLight FISH-Tissue-Implementation Kit (Prod. N.º. Z-2028-5/-20)
- Lâminas de microscópio, com carregamento positivo
- Banho-maria (37°C, 98°C)
- Xilol

#### 5. Armazenamento e manuseamento

Armazenar a 2-8°C na posição vertical, protegido da luz solar. Utilizar protegido da luz. Repor as condições de armazenamento imediatamente após a utilização. Não utilizar reagentes após terminar a data de validade indicada no rótulo. O produto é estável até à data de validade indicada no rótulo, quando manuseado em conformidade.

#### 6. Avisos e precauções

- Ler as instruções antes de utilizar!
- Não utilizar reagentes após terminar a data de validade!
- Este produto contém substâncias (em concentrações e volume reduzidos) que são nocivas para a saúde e potencialmente infecciosas. Evitar qualquer contacto direto com os reagentes. Tomar as medidas de proteção adequadas (utilizar luvas descartáveis, óculos de proteção e vestuário de laboratório)!
- Caso os reagentes entrem em contacto com a pele, lavar imediatamente com água abundante!
- Está disponível a ficha de dados de segurança, se solicitada, para utilização profissional.
- Não reutilizar os reagentes.
- Evitar a contaminação cruzada das amostras dado que poderá conduzir a resultados incorretos.
- A sonda não deve ser exposta à luz, especialmente luz forte, por um período prolongado de tempo, ou seja, todos os passos devem ser realizados, quando possível, numa sala escura e/ou utilizando recipientes resistentes à luz!

#### Frases de risco e de aviso:

O componente que determina o risco é a formamida.



#### Perigo

|           |                                                                                        |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| H351      | Suspeito de provocar cancro.                                                           |
| H360FD    | Pode afetar a fertilidade. Pode afetar o nascituro.                                    |
| H373      | Pode afetar os órgãos após exposição prolongada.                                       |
| P201      | Solicitar instruções específicas antes da utilização.                                  |
| P202      | Não manusear o produto antes de ter lido e percebido todas as precauções de segurança. |
| P260      | Não respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.                          |
| P280      | Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção                  |
| P308+P313 | Em caso de exposição: consultar um médico.                                             |
| P405      | Armazenar em local fechado à chave                                                     |

#### 7. Limitações

- Apenas para utilização em diagnóstico *in vitro*.
- Apenas para utilização profissional.
- A interpretação clínica de qualquer coloração positiva, ou a ausência desta, deve ser efetuada 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 deteção dos loci descritos em 3 "Reagentes fornecidos"
- O desempenho foi validado utilizando os procedimentos descritos nestas instruções de utilização. As alterações a estes procedimentos podem afetar o desempenho e devem ser validadas pelo utilizador.

#### 8. Substâncias que podem interferir

Os eritrócitos presentes na amostra podem apresentar autofluorescência, o que afeta o reconhecimento do sinal.

Os seguintes fixadores são incompatíveis com o equipamento FISH:

- Fixador de Bouin
- Fixador B5
- Fixadores ácidos (ex.: ácido pírco)
- Fixador de Zenker
- Álcoois (quando utilizados individualmente)
- Cloreto de mercúrio
- Fixador de formaldeído/zinco
- Fixador de Hollande
- Formalina não tamponada

#### 9. Preparação de amostras

##### Amostras de citologia

- Preparar as amostras de acordo com as instruções de utilização do ZytoLight FISH-Cytology-Implementation Kit.

## Amostras FFPE

- Fixação em formalina tamponada neutra a 10% durante 24 h à temperatura ambiente (18-25°C).
- Dimensão da amostra  $\leq 0,5 \text{ cm}^3$ .
- Utilizar parafina de qualidade Premium.
- A impregnação deve ser efetuada a temperaturas inferiores a 65°C.
- Efetuar secções de micrótomo de 2-4  $\mu\text{m}$ .
- Utilizar lâminas de microscópio com carregamento positivo.
- Adesão dos cortes durante 2-16 h a 50-60°C.

## 10. Tratamento de preparação do dispositivo

O produto está pronto a usar. Não requer reconstituição, mistura ou diluição. Permitir que a sonda atinja a temperatura ambiente (18-25°C) antes de a utilizar, protegida da luz. Antes de abrir o frasco, misturar por vórtex e rotação invertida durante alguns instantes.

## 11. Procedimento do teste

### Amostras de citologia

#### Pré-tratamento da amostra

Efetuar o pré-tratamento da amostra de acordo com as instruções de utilização do [ZytoLight FISH-Cytology-Implementation Kit](#).

#### Desnaturação e hibridação

1. Pipetar 10  $\mu\text{l}$  da sonda para cada amostra pré-tratada.
2. Cobrir as amostras com uma lamela de 22 mm x 22 mm (evitar bolhas de ar) e selar a lamela.

*Recomendamos a utilização de cola (ex.: Fixogum) para a selagem.*

3. Colocar as lâminas numa placa quente ou hibridador e desnaturar as amostras durante 5 min a 72°C.
4. Transferir as lâminas para um hibridador ou câmara húmida em estufa e hibridar durante 2h a 16h (overnight) a 37°C.

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

#### Pós-hibridação

Realizar o processamento pós-hibridação (lavagem, coloração de contraste, microscopia de fluorescência) de acordo com as instruções de utilização do [ZytoLight FISH-Cytology-Implementation Kit](#).

### Amostras FFPE

#### Pré-tratamento da amostra

Efetuar o pré-tratamento da amostra (desparafinação, proteólise) de acordo com as instruções de utilização do [ZytoLight FISH-Tissue-Implementation Kit](#).

#### Desnaturação e hibridação

1. Pipetar 10  $\mu\text{l}$  da sonda para cada amostra pré-tratada.
2. Cobrir as amostras com uma lamela de 22 mm x 22 mm (evitar bolhas de ar) e selar a lamela.

*Recomendamos a utilização de cola (ex.: Fixogum) para a selagem.*

3. Colocar as lâminas numa placa quente ou hibridador e desnaturar as amostras durante 10 min a 75°C.
4. Transferir as lâminas para uma câmara húmida e hibridar durante a noite a 37°C (por ex.: numa estufa de hibridação).

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

#### Pós-hibridação

Realizar o processamento pós-hibridação (lavagem, coloração de contraste, microscopia de fluorescência) de acordo com as instruções de utilização do [ZytoLight FISH-Tissue-Implementation Kit](#).

## 12. Procedimentos do controlo da qualidade recomendados

De forma a monitorizar o desempenho correto das amostras processadas e dos reagentes de teste, cada teste deve ser acompanhado de controlos internos e externos. Caso os controlos internos e/ou externos não demonstrem uma coloração adequada, os resultados das amostras dos pacientes devem ser considerados inválidos.

**Controlo interno:** células não neoplásicas na amostra que apresentem um padrão de sinal normal.

**Controlo externo:** amostras de controlo positivo e negativo validadas.

## 13. Características de desempenho

### Amostras de citologia

O desempenho foi avaliado de acordo com as instruções de utilização do [ZytoLight FISH-Cytology-Implementation Kit](#).

**Precisão:** a localização de hibridação da sonda foi avaliada em proliferações de metáfase de um indivíduo do género masculino de cariótipo normal. Em todas as amostras testadas a sonda hibridou somente nos loci esperados. Não foram observados sinais adicionais ou hibridações cruzadas. Assim, a precisão foi calculada como sendo de 100%.

**Sensibilidade analítica:** para avaliação da sensibilidade analítica, a sonda foi avaliada em proliferações de metáfase de indivíduos do género masculino de cariótipo normal. Todos os núcleos mostraram o padrão de sinais esperado em todas as amostras testadas. Assim, a sensibilidade analítica foi calculada como sendo de 100%.

**Especificidade analítica:** para avaliação da especificidade analítica, a sonda foi avaliada em proliferações de metáfase de indivíduos do género masculino de cariótipo normal. Em todas as amostras testadas, todos os sinais hibridaram apenas nos loci alvo esperados e em nenhum outro loci. Assim, a especificidade analítica foi calculada como sendo de 100%.

### Amostras FFPE

O desempenho foi avaliado de acordo com as instruções de utilização do [ZytoLight FISH-Tissue-Implementation Kit](#).

**Precisão:** a localização de hibridação da sonda foi avaliada em proliferações de metáfase de um indivíduo do género masculino de cariótipo normal. Em todas as amostras testadas a sonda hibridou somente nos loci esperados. Não foram observados sinais adicionais ou hibridações cruzadas. Assim, a precisão foi calculada como sendo de 100%.

**Sensibilidade analítica:** para avaliação da sensibilidade analítica, a sonda foi avaliada em proliferações de metáfase de indivíduos do género masculino de cariótipo normal. Todos os núcleos mostraram o padrão de sinais esperado em todas as amostras testadas. Assim, a sensibilidade analítica foi calculada como sendo de 100%.

**Especificidade analítica:** para avaliação da especificidade analítica, a sonda foi avaliada em proliferações de metáfase de indivíduos do género masculino de cariótipo normal. Em todas as amostras testadas, todos os sinais hibridaram apenas nos loci alvo esperados e em nenhum outro loci. Assim, a especificidade analítica foi calculada como sendo de 100%.

## 14. Eliminação

A eliminação de reagentes deve ser realizada de acordo com as normas locais.

## 15. Resolução de problemas

Qualquer desvio relativamente às instruções de utilização pode conduzir a resultados de coloração inferiores ou a ausência total de coloração. Algumas indicações nesta secção aplicam-se apenas à utilização do [ZytoLight FISH-Implementation Kit](#).

### Sinais fracos ou ausência de sinais

| Causa possível                                       | Ação                                                                                                                                                                                          |
|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Sem sequências-alvo disponíveis                      | Utilizar os controlos adequados                                                                                                                                                               |
| Amostra de tecido ou de células indevidamente fixada | Otimizar o tempo de fixação e o fixador ou aplicar uma fase de pós-fixação conforme descrito no "procedimento de teste" do manual do <a href="#">ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</a> |

|                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Pré-tratamento de calor, proteólise, desnaturação, hibridação ou temperatura de lavagem de estringência incorretas | Verificar a temperatura de todos os dispositivos técnicos utilizados com um termómetro calibrado                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| Pré-tratamento proteolítico executado de forma incorreta                                                           | Otimizar 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 húmida. Adicionalmente, as lamelas devem estar perfeitamente seladas, por ex.: com Fixogum, para evitar a secagem da amostra durante a hibridação                                     |
| Tampão de lavagem de estringência com concentração demasiado baixa                                                 | Verificar a concentração do tampão de lavagem de estringência                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Soluções de desidratação antigas                                                                                   | Preparar soluções de desidratação novas                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Microscópio de fluorescência incorretamente ajustado                                                               | Ajustar corretamente                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Conjuntos de filtros inadequados                                                                                   | Utilizar conjuntos de filtros adequados para os fluorocromos da sonda.<br><i>Os conjuntos de filtros de passagem de banda tripla permitem menos luz, comparados com os conjuntos de filtros de passagem de banda dupla ou passagem simples. Consequentemente, os sinais podem surgir mais fracos utilizando os conjuntos de filtros de passagem de banda tripla</i> |
| Dano causado por exposição das sondas/fluoróforos                                                                  | Realizar a hibridação e as fases de lavagem numa sala escura                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

**Sinais de hibridação cruzada; perturbações de fundo**

| Causa possível                                                   | Ação                                                                                                     |
|------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Desparafinação incompleta                                        | Utilizar soluções novas; verificar a duração da desparafinação                                           |
| Pré-tratamento proteolítico demasiado forte                      | Reduzir o tempo de incubação da pepsina                                                                  |
| Volume da sonda por área demasiado elevado                       | Reduzir o volume da sonda por secção/área, distribuir a sonda por gotas para evitar a concentração local |
| Lâminas arrefecidas à temperatura ambiente antes da hibridação   | Transferir rapidamente as lâminas para 37°C                                                              |
| Tampão de lavagem de estringência demasiado concentrado          | Verificar a concentração do tampão de lavagem de estringência                                            |
| Temperatura de lavagem após a hibridação demasiado baixa         | Verificar a temperatura; aumentar se necessário                                                          |
| Desidratação das amostras entre as fases de incubação individual | Evitar a desidratação selando as lâminas e realizando a incubação num ambiente húmido                    |

**Morfologia degradada**

| Causa possível                                           | Ação                                                                                                                                                                                 |
|----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Amostra de tecido ou de células indevidamente fixada     | Otimizar o tempo de fixação e o fixador ou aplicar uma fase de pós-fixação conforme descrito no "procedimento de teste" do manual do <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</u> |
| Pré-tratamento proteolítico executado de forma incorreta | Otimizar o tempo de incubação da pepsina, aumentar ou reduzir conforme necessário                                                                                                    |
| Secagem insuficiente antes da aplicação da sonda         | Prolongar a secagem ao ar                                                                                                                                                            |

**Núcleos sobrepostos**

| Causa possível                             | Ação                                    |
|--------------------------------------------|-----------------------------------------|
| Espessura inadequada das secções de tecido | Efetuar secções de micrótomo de 2-4 µm. |

**Amostra desliza da lâmina**

| Causa possível                              | Ação                                    |
|---------------------------------------------|-----------------------------------------|
| Revestimento inadequado da lâmina           | Utilizar lâminas adequadas              |
| Pré-tratamento proteolítico demasiado forte | Reduzir o tempo de incubação da pepsina |

**Coloração de contraste fraca**

| Causa possível                                     | Ação                                                                   |
|----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| Solução DAPI de baixa concentração                 | Utilizar <u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (Prod. No. MT-0008-0.8) |
| Tempo de incubação da solução DAPI demasiado curto | Ajustar o tempo de incubação da solução DAPI                           |

**16. Literatura**

- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Klinger K, et al. (1992) *Am J Hum Genet* 51: 55-65.
- Korenberg JR, et al. (1990) *Am J Hum Genet* 47: 236-46.
- Waye JS, Willard HF (1987) *Nucleic Acids Res* 15: 7549-69.
- Wilkinson DG: In Situ Hybridization, A Practical Approach, *Oxford University Press* (1992) ISBN 0 19 963327 4.

Os nossos especialistas estão disponíveis para responder às suas questões.

Contacte [helptech@zytovision.com](mailto:helptech@zytovision.com)



ZytoVision GmbH  
Fischkai 1  
27572 Bremerhaven/ Alemanha  
Telefone: +49 471 4832-300  
Fax: +49 471 4832-509  
[www.zytovision.com](http://www.zytovision.com)  
E-mail: [info@zytovision.com](mailto:info@zytovision.com)

**Marcas registadas:**

ZytoVision® e ZytoLight® são marcas registadas da ZytoVision GmbH.