



ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit

REF Z-2028-5 ∇_{Σ} 5

REF Z-2028-20 ∇_{Σ} 20

Para utilização em procedimentos de hibridação *in situ* por fluorescência

4250380N177P



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

1. Utilização prevista

O ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit destina-se a ser utilizado em combinação com as sondas ZytoLight FISH em amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina por hibridação *in situ* por fluorescência (FISH).

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

2. Princípio de 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 FISH-Tissue Implementation Kit está disponível em dois tamanhos e é composto por:

Código	Componente	Quantidade		Recipiente
		5	∇_{Σ} 20	
PT1	<u>Heat Pretreatment Solution Citric</u>	150 ml	500 ml	Franco c/ tampa rosca (grande)
ES1	<u>Pepsin Solution</u>	1 ml	4 ml	Conta-gotas, tampa branca
WB1	<u>Wash Buffer SSC</u>	210 ml	560 ml	Franco c/ tampa rosca (grande)
WB2	<u>25x Wash Buffer A</u>	50 ml	2x50 ml	Franco c/ tampa rosca (médio)
MT7	<u>DAPI/DuraTect-Solution</u>	0.2 ml	0.8 ml	tubo de reacção, Tampa azul
	Instruções de utilização	1	1	

Z-2028-5 (5 testes): Componentes **ES1** e **MT7** são suficientes para 5 reacções. Componente **WB2** é suficiente para 5x 3 tinas de coloração de 70ml cada. Componente **PT1** é suficiente para 2 tinas de coloração de 70 ml cada. Componente **WB1** é suficiente para 3 tinas de coloração de 70 ml cada.

Z-2028-20 (20 testes): Componentes **ES1** e **MT7** são suficientes para 20 reacções. Componente **WB2** é suficiente para 11x 3 tinas de coloração de 70ml cada. Componente **PT1** é suficiente para 7 tinas de coloração de 70 ml cada. Componente **WB1** é suficiente para 8 tinas de coloração de 70 ml cada.

4. Materiais necessários mas não fornecidos

- 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 μ l, 25 μ l)
- Frascos ou banheiras de coloração
- Temporizador
- Termómetro calibrado
- Etanol ou álcool reagente
- 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. Adicionalmente, o DAPI/DuraTect-Solution (MT7) deve ser armazenado protegido da luz. Repor as 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 prejudiciais para a saúde. 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.
- Não se deve deixar secar as amostras durante as fases de hibridação e lavagem.
- O DAPI/DuraTect-Solution (MT7) não deve ser exposto 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!

Identificação especial para ES1:

EUH208	Contém pepsina A. Pode provocar uma reacção alérgica.
EUH210	Ficha de segurança fornecida a pedido.

Indicações de perigo e de precaução para PT1, WB1, e WB2:

O componente que determina o risco é a mistura de: 5-cloro-2-metil-4-isotiazolina-3-um [EC no. 247-500-7] e 2-metil-2H-isotiazol-3-um [EC no. 220-239-6] (3:1).



Atenção

H317	Pode provocar uma reacção alérgica cutânea.
P261	Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.
P272	A roupa de trabalho contaminada não pode sair do local de trabalho.
P280	Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.
P302+P352	SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar abundantemente com água/...
P333+P313	Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico.
P362+P364	Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a voltar a usar.

Indicações de perigo e de precaução para MT7:

A mistura 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, morfologia, e outros critérios histopatológicos, assim como outros testes de diagnóstico. É da responsabilidade do profissional qualificado estar familiarizado com as sondas ISH, 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.

- O desempenho foi validado utilizando os procedimentos descritos nas instruções de utilização da respectiva sonda ZytoVision e do kit de implementação. 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 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 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 das amostras

Recomendações:

- 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 efectuada a temperaturas inferiores a 65°C.
- Preparar secções de micrótomo de 2-4 μm .
- 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 25x Wash Buffer (WB2) deve ser pré-tratado de acordo com as instruções em 11.2 "Procedimento de ensaio - Dia 2". Todos os outros reagentes do kit estão prontos a usar. Não é necessária qualquer reconstrução, mistura ou diluição.

11. Procedimento de teste

11.1 Dia 1

Passos preparatórios

- (1) Preparação de series de etanol: (70%, 90%, e 100%): Diluir 7, 9 e 10 partes de etanol 100% com 3, 1 e 0 partes água destilada ou desionizada, respetivamente. Estas soluções podem ser armazenadas em recipientes apropriados e reutilizadas.
- (2) Heat Pretreatment Solution Citric (PT1): pré-aquecer a 98°C.
- (3) Wash Buffer SSC (WB1): trazer para temperatura ambiente (TA).
- (4) ZytoLight FISH Probe: trazer para TA antes de utilizar e proteger da luz.

Opcional, quando efectuado passo de pós-fixação:

(altamente recomendado quando a fixação do tecido não é adequada)
Prepare uma Solução de Formaldeído 1% utilizando o Formaldehyde Dilution Buffer Set (PT-0006-100)

Pré-tratamento (desparafinação/proteólise)

- (1) Incubar lâminas 10 min. a 70°C (p.e., numa placa quente).
- (2) Incubar lâminas 2x 10 min in xilol.
- (3) Hidratar: etanol a 100%, 100%, 90%, e 70% ethanol, 5 min. cada
- (4) Lavar 2x 2 min. em água destilada ou desionizada
- (5) Incubar 15 min. em Heat Pretreatment Solution Citric (PT1), pré-aquecida a 98°C.

Recomendamos a utilização de menos de 8 lâminas por tina.

- (6) Transferir lâminas rapidamente para água destilada ou desionizada, lavar 2x 2 min. e retirar da água.
- (7) Aplicar (conta-gotas) Pepsin Solution (ES1) diretamente na lâmina e incubar durante 15 min. a 37°C em câmara húmida.

O **ES1** pode formar precipitados, que não afectam a qualidade. Dependendo de múltiplos fatores, p.e., tipo e duração da fixação, espessura dos cortes, assim como o tipo de tecidos/células, podem ser necessários tempos diferentes de incubação. Recomendamos, como referência, tempos de incubação entre 2 a 30 min. para tecidos e 2 a 15 min. para amostras citológicas. O tempo de incubação deve ser otimizado em testes prévios.

(8) Lavar 5 min. em Wash Buffer SSC (WB1).

Opcional, quando efetuado passo de pós-fixação:

Incubar lâminas 15 min. em Solução de Formaldeído 1% e lavar de seguida 5 min. em Wash Buffer SSC (WB1)

(9) Lavar 1 min. em água destilada ou desionizada.

(10) Desidratação: etanol a 70%, 90%, e 100%, 1 min. cada

(11) Secar lâminas ao ar.

Nota: Assegurar que os cortes secam completamente antes da aplicação da sonda, uma vez que a existência de resíduos podem reduzir a intensidade dos sinais e/ou afetar a morfologia do tecido.

Desnaturação e hibridação

(1) Pipetar 10 µl de ZytoLight FISH Probe em cada lâmina.

Evitar exposição prolongada da sonda à luz.

(2) Cobrir as amostras com lamela 22 mm x 22 mm (evitar bolhas) e selar.

Recomendamos a utilização de cola (p.e., Fixogum Rubber Cement) para selar.

(3) Colocar as lâminas em placa quente ou hibridador para desnaturar, durante 10 min. a 75°C.

(4) Transferir as lâminas para câmara húmida e hibridar *overnight* a 37°C (p.e., num hibridador).

É fundamental que as amostras não sequem durante a hibridação.

11.2 Dia 2

Passos preparatórios

(1) Preparar 1x Wash Buffer A: Diluir 1 parte 25x Wash Buffer A (WB2) em 24 partes de água destilada ou desionizada. Encher três tinas de coloração com 1x Wash Buffer A e pré-aquecer a 37°C.

(2) DAPI/DuraTect-Solution (MT7): trazer para temperatura ambiente antes de utilizar e proteger da luz.

Pós-hibridação e deteção

(1) Remover cuidadosamente a cola.

(2) Retirar a lamela em 1x Wash Buffer A a 37°C durante 1-3 min.

(3) Lavar em 1x Wash Buffer A a 37°C, 2x 5 min.

O 1x Wash Buffer A deve estar pré-aquecido. Verificar temperatura com termómetro, se necessário.

(4) Incubar lâminas em etanol a 70%, 90% e 100%, 1 min. cada

(5) Secar lâminas ao ar, protegidas da luz.

(6) Pipetar 25 µl DAPI/DuraTect-Solution (MT7) por lâmina. Cobrir a amostra com lamela (24 mm x 60 mm), evitando a formação de bolhas. Incubar no escuro durante 15 min.

A utilização de uma ponta de pipeta cortada para aumentar o diâmetro da mesma, antes de pipetar, facilita a aplicação do reagente. Evitar a exposição do reagente à luz.

(7) Arquivar a lâmina no escuro. Para arquivo de longa duração guardar a lâmina entre 2-8°C.

(8) A avaliação das amostras deve ser efetuada num microscópio de fluorescência. São necessários conjuntos de filtros com as seguintes características:

Fluorocromo	Excitação	Emissão
ZyBlue	418 nm	467 nm
ZyGreen	503 nm	528 nm
ZyGreen 2.0	493 nm	518 nm
ZyGold	532 nm	553 nm
ZyOrange	547 nm	572 nm
ZyRed	580 nm	599 nm

12. Interpretação dos resultados

Com a utilização dos filtros adequados, em interfases ou metáfases de células normais ou células sem alterações cromossómicas, devem ser visíveis dois sinais por sonda/fluorocromo, exceto para sondas dirigidas aos cromossomas X e/ou Y, resultando em nenhum a dois sinais por sonda/fluorocromo, dependendo do sexo. Em células com alterações cromossómicas, podem ser visíveis diferentes padrões de sinais em interfases ou metáfases. Para mais informações relativamente à interpretação de resultados, deve consultar-se o manual da respetiva sonda.

13. Procedimentos de controlo de qualidade recomendados

Consultar as instruções de utilização da respetiva sonda ZytoVision.

14. Características de desempenho

Consultar as instruções de utilização da respetiva sonda ZytoVision.

15. Eliminação

A eliminação dos reagentes deve ser efectuada de acordo com as normas 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	Ação
Amostra de célula ou tecido não fixada correctamente	Optimizar o tempo de fixação e o fixador ou aplicar um passo de pós-fixação, conforme descrito no "procedimento de ensaio" do manual do <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</u>
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 hibridador, 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 fluorocromos da sonda. <i>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</i>

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

Lâminas arrefecidas à temperatura ambiente antes da hibridação	Transferir rapidamente as lâminas para 37 °C
--	--

Morfologia degradada

Causa possível	Acção
A amostra de células ou tecidos não foi fixada correctamente	Optimizar o tempo de fixação e o fixador ou aplicar um passo de pós-fixação, conforme descrito no "procedimento de ensaio" do manual do ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit
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

Contracoloração 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
1.2.1	11. Procedimento de teste ZyGreen 2.0 adicionados



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



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 ZytoLight® são marcas registadas da ZytoVision GmbH.