



## ZytoDot SPEC ERBB2 Probe Kit

REF C-3003-40

40

Para a detecção qualitativa de amplificações do gene ERBB2 humano por hibridação *in situ* cromogénica (CISH)

4250380N297W



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

### 1. Objectivo pretendido

A sonda ZytoDot SPEC ERBB2 Probe Kit destina-se a ser utilizada para a detecção qualitativa de amplificações que envolvam o gene humano ERBB2 em amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina, como o cancro da mama, por hibridação *in situ* cromogénica (CISH).

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 um auxiliar no diagnóstico diferencial do cancro da mama 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 duplex 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 leva à formação de precipitados coloridos. Após a coloração de contraste do núcleo com um corante nuclear, os fragmentos de sonda hibridizados são visualizados por microscopia óptica.

### 3. Reagentes fornecidos

O ZytoDot SPEC ERBB2 Probe Kit está disponível num tamanho e é composto por:

Código	Componente	Quantidade	Recipiente
		$\Sigma$ 40	
PT2	<u>Heat Pretreatment Solution EDTA</u>	500 ml	Frasco com tampa de rosca (grande)
ES1	<u>Pepsin Solution</u>	4 ml	Frasco conta-gotas, tampa branca
PD1	<u>ZytoDot SPEC ERBB2 Probe</u>	0.4 ml	Recipiente de reacção, tampa castanha
WB1	<u>Wash Buffer SSC</u>	560 ml	Frasco com tampa de rosca (grande)
WB4	<u>PBS/Tween</u>	2x	Embalagem de alumínio
BS1	<u>Blocking Solution</u>	4 ml	Frasco com conta-gotas, tampa cor-de-laranja
AB1	<u>Mouse Anti-Dig</u>	4 ml	Frasco com conta-gotas, tampa cor-de-rosa
AB2	<u>Anti-Mouse-HRP-Polymer</u>	4 ml	Frasco com conta-gotas, tampa violeta
SB1a	<u>DAB Solution A</u>	0.3 ml	Frasco com conta-gotas, tampa verde
SB1b	<u>DAB Solution B</u>	10 ml	Frasco com conta-gotas, tampa cinzenta
CS1	<u>Mayer's Hematoxylin Solution</u>	20 ml	Frasco com tampa de rosca, preto
MT4	<u>Mounting Solution (alcoholic)</u>	4 ml	Frasco de vidro, castanho
	Instruções de utilização	1	

**C-3003-40 (40 testes):** Componentes **PD1**, **ES1**, **BS1**, **AB1**, **AB2**, **SB1a-b**, **CS1**, e **MT4** são suficientes para 40 reacções. Componente **PT2** é suficiente para 7 tinas de coloração de 70 ml cada. Componente **WB1** é suficiente para 8 tinas de coloração de 70 ml cada. Componente **WB4** é suficiente para 28 tinas de coloração de 70 ml cada.

O ZytoDot SPEC ERBB2 Probe é composto por:

- Polinucleótidos marcados com digoxigenina (~1,8 ng/ $\mu$ l), que têm como alvo sequências mapeadas em 17q12\* (chr17:37,725,661-37,973,541) que albergam a região do gene ERBB2 (ver Fig. 1).
- Tampão de hibridação à base de formamida

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

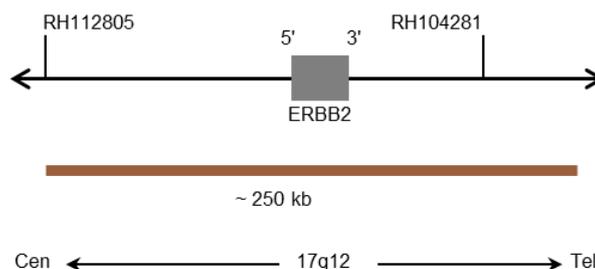


Fig. 1: SPEC ERBB2 Mapa da sonda (não à escala)

### 4. Materiais necessários mas não fornecidos

- Amostras de controlo positivo e negativo
- Lâminas de microscópio, carregadas positivamente
- Banho-maria (80 °C, 98 °C)
- Hibridizador ou placa de aquecimento
- Hibridizador ou câmara de humidade na estufa de hibridação
- Pipetas ajustáveis (10  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l)
- Tinas de coloração ou banheiras
- Temporizador
- Termómetro calibrado
- Etanol ou álcool reagente
- Xileno
- Metanol 100%

- Peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30%.
- Água desionizada ou destilada
- Lâminas (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Cola, por exemplo, Fixogum Rubber Cement (N.º de produto E-4005-50/-125) ou similar
- Microscópio de luz devidamente calibrado (400-630x)

## 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 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.

### 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 CS1 e WB4:

A mistura não está classificada como perigosa de acordo com o Regulamento (CE) n.º 1272/2008.

### Indicações de perigo e de precaução para BS1, AB1, AB2, PT2, e WB1:

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 protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção 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 SB1a:

O componente que determina o risco é bifenil-3,3',4,4'-tetraamino; diamino benzidina.



#### Perigo

H350 Pode provocar cancro.  
P201 Pedir instruções específicas antes da utilização.  
P202 Não manuseie o produto antes de ter lido e percebido todas as precauções de segurança.  
P280 Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial/protecção auditiva.  
P308+P313 EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: consulte um médico.  
P405 Armazenar em local fechado à chave.

### Indicações de perigo e de precaução para SB1b:

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 protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção 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 MT4:

O componente que determina o risco é a xileno.



#### Atenção

H226 Líquido e vapor inflamáveis.  
H312+H332 Nocivo em contacto com a pele ou por inalação.  
H315 Provoca irritação cutânea.  
H319 Provoca irritação ocular grave.  
H335 Pode provocar irritação das vias respiratórias.  
H373 Pode afectar os órgãos após exposição prolongada ou repetida.  
P210 Manter afastado do calor, superfícies quentes, faíscas, chamas abertas e outras fontes de ignição. Não fumar.  
P260 Não respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.  
P280 Usar luvas de protecção/vestuário de protecção e protecção ocular/protecção facial.  
P305+P351+P338 SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar.  
P337+P313 Caso a irritação ocular persista: consulte um médico.  
P403+P235 Armazenar em local bem ventilado. Conservar em ambiente fresco.  
EUH208 Contém metacrilato de metilo; metil 2-metilprop-2-enoato; metil 2-metilpropenoato, metacrilato de n-butilo. Pode provocar uma reacção alérgica.

## Indicações de perigo e de precaução para PD1:

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.
- 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 profissional 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 profissional qualificado 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 da amostra 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 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
- fixador de Hollande
- Formalina não tamponada

## 9. Preparação das amostras

Recomendações:

- Evite a contaminação cruzada das amostras em qualquer fase da preparação, uma vez que tal pode conduzir a resultados erróneos.
- 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 3-5  $\mu\text{m}$ .
- 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 PBS/Tween (WB4) deve ser pré-tratado de acordo com as instruções em 11 "Procedimento de ensaio". Todos os outros reagentes do kit estão prontos 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 de teste

### 11.1 Dia 1

#### Passos preparatórios

- (1) *Prepare uma série de etanol (soluções de etanol a 70%, 90% e 100%):* Dilua o etanol a 100% com água desionizada ou destilada. Estas soluções podem ser armazenadas em recipientes adequados e podem ser reutilizadas.
- (2) *Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2):* Aqueça a 98°C num frasco de coloração coberto.
- (3) *Preparação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3%:* Dilua 1 parte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30% em 9 partes de metanol a 100%.
- (4) *ZytoDot CISH Probe:* Deixe-a atingir a temperatura ambiente (RT) antes de a utilizar.

#### Pré-tratamento (desparafinação/proteólise)

- (1) Incube as lâminas durante 10 minutos a 70°C (por exemplo, numa placa quente).
- (2) Incube as lâminas durante 5 minutos em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3%.
- (3) Incube as lâminas durante 3x 3 min em etanol a 100%.
- (4) Incube as lâminas durante 5 minutos em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3%.
- (5) Lâminas lavadas 2x 1 min em água desionizada ou destilada.
- (6) Incube durante 15 minutos em Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2) pré-aquecida a 98°C.

*Utilize oito lâminas por frasco de coloração (adicione lâminas fictícias, se necessário).*

- (7) Transfira imediatamente as lâminas para água desionizada ou destilada e lave-as durante 2x 2 min.
- (8) Aplique (gota a gota) Pepsin Solution (ES1) na amostra e incube durante 5-15 minutos a 37°C numa câmara húmida.

*ES1 pode formar precipitados, que não afectam a qualidade. Como regra geral, recomendamos que verifique o tempo ótimo para a proteólise em pré-testes.*

- (9) Mergulhe as lâminas em água desionizada ou destilada.
- (10) Desidratação em: 70%, 90% e 100% de etanol, cada um durante 1 min.
- (11) Secar as secções ao ar.

*Nota: Certifique-se de que as secções estão completamente secas antes da aplicação da sonda.*

#### Desnaturação e hibridação

- (1) Pipete 10  $\mu\text{l}$  da sonda ZytoDot CISH Probe em cada amostra pré-tratada.
- (2) Cubra as amostras com uma lamela de 22 mm x 22 mm (evite a formação de bolhas) e sele a lamela.

*Recomendamos que utilize cimento de borracha (por exemplo, Fixogum) para selar.*

- (3) Coloque as lâminas numa placa quente ou num hibridador e desnature as amostras durante 5 minutos a 94-95°C.
- (4) Transfira as lâminas para uma câmara húmida e hibridize durante a noite a 37°C (por exemplo, numa estufa de hibridação).

*É essencial que os espécimes não sequem durante a fase de hibridação.*

## 11.2 Dia 2

### Passos preparatórios

- (1) **Wash Buffer SSC (WB1)**: Para uma lavagem rigorosa, aqueça a 80°C num frasco de coloração tapado. O **WB1** pode formar precipitados a 2-8°C, que não afectam a qualidade e devem dissolver-se quando aquecidos.
- (2) **Preparação do tampão de lavagem PBS/Tween**: Adicione 1 pastilha de **PBS/Tween (WB4)** a 1000 ml de água desionizada ou destilada e dissolva.

O tampão de lavagem PBS/Tween é estável durante uma semana quando armazenado a 2-8°C.

- (3) **Blocking Solution (BS1)**, **Mouse-Anti-DIG (AB1)**, **Anti-Mouse-HRP-Polymer (AB2)**, **DAB Solution A (SB1a)**, **DAB Solution B (SB1b)**, **Mayer's Hematoxylin Solution (CS1)**, **Mounting Solution (alcoholic) (MT4)**: Deixe atingir a temperatura ambiente antes de utilizar.

### Pós-hibridação e detecção

- (1) Remova cuidadosamente o cimento de borracha ou a cola.
- (2) Remova a lamela submergindo as lâminas em **Wash Buffer SSC (WB1)** temperatura ambiente durante 5 min.

**WB1** pode ser reutilizado uma vez. Armazene a 2-8°C por um período máximo de uma semana.

- (3) Lave as lâminas durante 5 minutos em **Wash Buffer SSC (WB1)** a 80°C.

Utilize oito lâminas por frasco de coloração (adicione lâminas fictícias, se necessário).

- (4) Lave as lâminas 2x 1 min em água desionizada ou destilada.
- (5) Mergulhe as lâminas no tampão de lavagem PBS/Tween.
- (6) Aplique a **Blocking Solution (BS1)** (1-2 gotas por lâmina) nas lâminas e incube durante 10 minutos à temperatura ambiente.
- (7) Retire a **Blocking Solution (BS1)**, **mas não enxágue!**
- (8) Aplique **Mouse-Anti-DIG (AB1)** (1-2 gotas por lâmina) nas lâminas e incube durante 30 minutos à temperatura ambiente.
- (9) Lave as lâminas 3x 1 min em PBS/Tween.
- (10) Aplique **Anti-Mouse-HRP-Polymer (AB2)** (1-2 gotas por lâmina) nas lâminas e incube durante 30 minutos à temperatura ambiente.
- (11) Lave as lâminas 3x 1 min em PBS/Tween.
- (12) Prepare a solução DAB (solução de trabalho): encha 1 ml de **DAB Solution B (SB1b)** um copo graduado e adicione uma gota (30 µl) de **DAB Solution A (SB1a)**. Misture bem.
- (13) Aplique a DAB Solution (1-2 gotas por lâmina) nas lâminas e incube durante 30 minutos à temperatura ambiente.
- (14) Transfira as lâminas para um frasco de coloração e lave-as durante 2 minutos sob água corrente fria da torneira.
- (15) Faça a coloração de contraste das amostras durante 5-10 segundos com a **Mayer's Hematoxylin Solution (CS1)**.
- (16) Transfira as lâminas para um frasco de coloração e lave-as durante 2 minutos em água corrente fria da torneira.
- (17) Desidratação em: 70%, 90%, e 100% de etanol, cada um durante 1 min.
- (18) Incube as lâminas durante 2x 2 min em xileno (utilize xileno muito puro).
- (19) Evitando a formação de bolhas, cubra as amostras com uma lamela (22 mm x 22 mm; 24 mm x 32 mm) utilizando a **Mounting Solution (alcoholic) (MT4)**. Aguarde 20-30 minutos para que a lamela fique imobilizada.

A utilização de uma ponta de pipeta cortada para aumentar o tamanho da abertura pode facilitar o processo de pipetagem.

- (20) Avalie as amostras coradas utilizando a microscopia ótica.

## 12. Interpretação dos resultados

Utilizando o **kit de implementação ZytoDot CISH**, os sinais de hibridação dos polinucleótidos marcados com digoxigenina aparecem em castanho a castanho-escuro (região do gene ERBB2).

**Situação normal**: Nas interfases de células normais ou de células sem uma amplificação que envolva a região do gene ERBB2, aparecem dois sinais castanhos distintos em forma de pontos (ver Fig. 2).

**Situação anormal**: In cells with an amplification of the ERBB2 gene region or polysomy of chromosome 17, an increased number of the brown signal or brown signal clusters will be observed (ver Fig. 2).

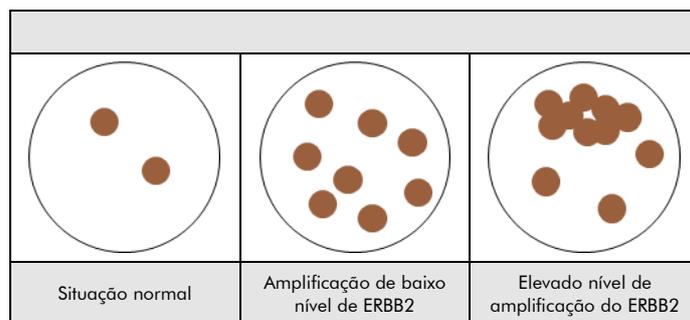


Fig. 2: Resultados esperados em núcleos normais e anormal

Em algumas 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 CISH individuais podem aparecer como pequenos grupos de sinais. Assim, dois ou três sinais do mesmo tamanho, separados por uma distância  $\leq 1$  diâmetro de sinal, devem ser contados como um sinal.
- Antes da contagem de sinais, a amostra deve ser analisada para detectar qualquer possível heterogeneidade intratumoral com uma ampliação de 100 a 200 vezes.
- A visualização dos sinais deve ser efectuada, pelo menos, com uma ampliação de 400 a 630 vezes, resultando em sinais facilmente visíveis.
- Não avaliar áreas de necrose, núcleos sobrepostos, núcleos demasiado digeridos e núcleos com fraca intensidade de sinal.
- Devido à mitose, podem ser visíveis sinais adicionais mesmo numa pequena percentagem de células não neoplásicas. Ocasionalmente, podem ser observados núcleos com sinais em falta em amostras incluídas em parafina devido a artefactos de corte.
- 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 teste deve ser acompanhado de controlos internos e externos. Se os controlos internos e/ou externos não demonstrarem uma coloração adequada, os resultados com as amostras dos doentes devem ser considerados inválidos.

**Controlo interno**: Células não neoplásicas dentro da amostra que exibem um padrão de sinal normal, por exemplo, fibroblastos.

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

## 14. Características de desempenho

### 14.1 Desempenho analítico

O desempenho da sonda foi determinado por comparação com a sonda FISH correspondente aprovada pelo IVD.

<b>Sensibilidade analítica:</b>	100% (95% CI 98.5 – 100.0)
<b>Especificidade analítica:</b>	100% (95% CI 97.0 – 100.0)

### 14.2 Especificidade analítica

<b>Sensibilidade do diagnóstico:</b>	100% (95% CI 83.2 – 100.0) vs. FISH, CISH
<b>Especificidade do diagnóstico:</b>	100% (95% CI 83.2 – 100.0) vs. FISH, CISH

## 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](http://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 utilizar uma gota de solução A de DAB, utilizar 30 µl
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 é efectuada correctamente	Utilizar água fria corrente da torneira para a coloração azulada; não utilizar água morna ou quente, nem reagentes de coloração azulada

### Sinais demasiado fortes

Causa possível	Acção
Pré-tratamento proteolítico efectuado durante demasiado tempo	Optimizar o tempo de incubação da pepsina, aumentar ou diminuir se necessário
A reacção do substrato é demasiado intensa	Reduzir o tempo de incubação do substrato; não aquecer a solução de substrato a mais de 25 °C; incubar apenas à temperatura ambiente

### 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 soluções de montagem à base de xileno isentas de quaisquer impurezas; não utilizar fita adesiva para lamelas

### Manchas irregulares ou, nalgumas partes, apenas muito ligeiras

Causa possível	Acção
Desparafinação incompleta	Utilizar soluções frescas; verificar a duração dos tempos de desparafinação

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 demasiado prolongado	Diminuir o tempo de incubação da pepsina

### Sinais de hibridação cruzada; perturbações 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
Desparafinação incompleta	Utilizar soluções novas; verificar a duração da desparafinação
Pré-tratamento proteolítico demasiado forte	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

- Nie X, et al. (2013) *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*.
- Wilkinson DG: *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.

## 18. Revisão



[www.zytovision.com](http://www.zytovision.com)

Consultar [www.zytovision.com](http://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](mailto:helptech@zytovision.com)

Para um resumo da segurança e do desempenho, consultar [www.zytovision.com](http://www.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)

Correio electrónico: [info@zytovision.com](mailto:info@zytovision.com)

### Marcas registadas:

ZytoVision® e ZytoDot® são marcas comerciais da ZytoVision GmbH.