



ZytoDot
CISH Implementation Kit

REF C-3018-40

Σ 40

Para utilização em procedimentos de hibridação in situ cromogénica (CISH)

4250380N397Z



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

1. Utilização prevista

O ZytoDot CISH Implementation Kit destina-se a ser utilizado em combinação com sondas ZytoDot marcadas com digoxigenina em amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina por hibridação *in situ* cromogénica (CISH)..

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* 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 dup/ex 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 CISH Implementation Kit está disponível num tamanho e é composto por:

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

C-3018-40 (40 testes): Componentes **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.

4. Materiais necessários mas não fornecidos

- ZytoDot CISH Probe
- 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 µl, 1000 µl)
- Tinas de coloração ou banheiras
- Temporizador
- Termómetro calibrado
- Etanol ou álcool reagente
- Xileno
- Metanol 100%
- Peróxido de hidrogénio (H₂O₂) 30%.
- Água desionizada ou destilada
- Lâmelas (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. 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.

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 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 SB1a:

O componente que determina o risco é bifenil-3,3',4,4'-tetraammina; diaminobenzidina.



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 proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial/proteção 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 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 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 proteção/vestuário de proteção e proteção ocular/proteção 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 CS1 e WB4:

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

Identificação especial para ES1:

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

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 seguintes fixadores são incompatíveis com o equipamento ISH:

- 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:

- 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 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 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.

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_2O_2 a 3%: Dilua 1 parte de H_2O_2 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_2O_2 a 3%.
- (3) Incube as lâminas durante 3x 3 min em etanol a 100%.
- (4) Incube as lâminas durante 5 minutos em H_2O_2 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 μl 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 hibridizador 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 ZytoDot CISH Implementation Kit, os sinais de hibridação dos polinucleótidos marcados com digoxigenina aparecem como pontos distintos de cor castanha a castanha escura. Nas interfases ou metáfases de células normais ou de células sem aberrações dos cromossomas examinados, aparecem dois sinais por alvo, exceto no caso das sondas que visam os cromossomas X ou Y, em que aparecem dois, nenhum ou um sinal, consoante o sexo e a sonda utilizada. Em células com aberrações cromossómicas, pode ser visível um padrão de sinal diferente em interfases ou metáfases. Para mais pormenores sobre a interpretação dos resultados, consulte as instruções de utilização da respectiva sonda ZytoDot CISH Probe.

13. Procedimentos de controlo de qualidade recomendados

Consultar as instruções de utilização da respectiva sonda ZytoVision.

14. Características de desempenho

Consultar as instruções de utilização da respectiva 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
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	Ação
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	Ação
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	Ação
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	Ação
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

- Isola J, Tanner M (2004) *Methods Mol Med* 97: 133-44.
- Speel EJ, et al. (1994) *J Histochem Cytochem* 42: 1299-307.
- Tsukamoto T, et al. (1991) *Int J Dev Biol* 35: 25-32.
- 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 <i>O tampão de lavagem PBS/Tween é estável durante uma semana quando armazenado a 2-8°C.</i>



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 ZytoDot® são marcas registadas da ZytoVision GmbH.