ZytoVision

Zyto*Dot* 2C
CISH Implementation Kit

REF C-3044-10 Σ 10

REF C-3044-40 Σ 40

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

4250380N717V

CE
IVD

Dispositivo médico de diagnóstico in vitro

de acordo com o RIV (UE) 2017/746

1. Utilização prevista

O ZytoDot 2C CISH Implementation Kit destina-se a ser utilizado em combinação com sondas Zyto*Dot* 2C CISH marcadas com Digoxigenina/Dinitrofenilo 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*lex* 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 2C CISH Implementation Kit está disponível em dois tamanhos e é composto por:

Código	Componente	Quantidade Σ 40	Quantidade Σ 10	Recipiente
PT2	Heat Pretreatment Solution EDTA	500 ml	150 ml	Frasco com tampa de rosca (grande)
ES1	Pepsin Solution	4 ml	1 ml	Frasco conta-gotas, tampa branca
WB1	Wash Buffer SSC	560 ml	210 ml	Frasco com tampa de rosca (grande)
WB5	20x Wash Buffer TBS	2x 50 ml	50 ml	Frasco com tampa de rosca
AB14	Anti-DIG/DNP-Mix	4 ml	1 ml	Frasco com conta-gotas, tampa amarela
AB13	HRP/AP-Polymer-Mix	4 ml	1 ml	Frasco com conta-gotas, tampa azul
SB6a	AP-Red Solution A	0.4 ml	0.1 ml	Frasco com conta-gotas, tampa vermelha (pequena)
SB6b	AP-Red Solution B	15 ml	4 ml	Frasco com conta-gotas, tampa vermelha
SB7a	HRP-Green Solution A	0.8 ml	0.2 ml	Frasco com conta-gotas, tampa verde (pequeno)
SB7b	HRP-Green Solution B	15 ml	4 ml	Frasco com conta-gotas, tampa verde
CS2	Nuclear Blue Solution	20 ml	4 ml	Frasco com tampa de rosca, preto
MT4	Mounting Solution (alcoholic)	4 ml	1 ml	Frasco de vidro, castanho
	AP-Red recipiente de reação	2	1	Copo graduado, tampa vermelha
	HRP-Green recipiente de reação	2	1	Copo graduado, tampa verde
	Instruções de utilização	1	1	

C-3044-10 (10 testes): Componentes **ES1**, **AB14**, **AB13**, **SB6a-b**, **SB7a-b**, **CS2**, e **MT4** são suficientes para 10 reações. Componente **PT2** é suficiente para 2 tinas de coloração de 70 ml cada. Component **WB1** é suficiente para 3 tinas de coloração de 70 ml cada. Componente **WB5** é suficiente para 14 tinas de coloração de 70 ml cada.

C-3044-40 (40 testes): Componentes **ES1**, **AB14**, **AB13**, **SB6a-b**, **SB7a-b**, **CS2**, e **MT4** são suficientes para 40 reações. 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 **WB5** é suficiente para 28 tinas de coloração de 70 ml cada.

4. Materiais necessários mas não fornecidos

- Zyto*Dot* 2C 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 no forno de hibridação
- Pipetas ajustáveis (10 µl, 1000 µl)
- Frascos ou banhos de coloração
- Temporizador
- Termómetro calibrado
- Etanol ou álcool
- Xileno
- Metanol 100%
- Peróxido de hidrogénio (H_2O_2) 30%.
- Água desionizada ou destilada
- Coverslips (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Cimento de borracha, por exemplo, Fixogum Rubber Cement
- (N.° de fabrico E-4005-50/-125) ou similar
- Microscópio de luz com manutenção adequada (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 AB13, AB14, PT2, SB7b, WB1 e WB5:

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 reação 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 SB7a:

Os componentes determinantes para o perigo são o metanol e a solução de peróxido de hidrogénio a 30 %.

Perigo

H225	Líquido e vapor facilmente inflamáveis.
H301+H311 +H331	Tóxico por ingestão, contacto com a pele ou inalação.
H370	Afecta os órgãos.
P210	Manter afastado do calor, superfícies quentes, faíscas, chamas abertas e outras fontes de ignição. Não fumar.
P233	Manter o recipiente bem fechado.
P260	Não respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/ vapores/aerossóis.
P280	Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial.
P308+P311	EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico.
P403+P235	Armazenar em local bem ventilado. Conservar em ambiente fresco.

Indicações de perigo e de precaução para CS2:

Os componentes determinantes para o perigo são o etandiol, etilenoglicol.

Atenção

H373	A exposição prolongada ou repetida por ingestão pode provocar danos renais.
P260	Não respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/ vapores/aerossóis.
P314	Em caso de indisposição, consulte um médico.

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 SB6a:

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

H412	Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.
P273	Evitar a libertação para o ambiente.

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 pírico)
- 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 ≤ 0,5 cm^3.
- Utilizar parafina de qualidade Premium.
- A impregnação deve ser efetuada 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 20x Wash Buffer TBS (**WB5**) 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. Coloque a sonda à temperatura ambiente (RT) e misture brevemente antes de a utilizar.

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 tapado.
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 2C 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 2x 5 min em xileno.
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 Zyto*Dot* 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 79°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. WB1 pode formar precipitados a 2-8°C, que não afectam a qualidade e devem dissolver-se quando aquecidos.
2. *Preparar 1x Wash Buffer TBS:* Diluir 1 parte 20x Wash Buffer TBS (**WB5**) em 19 partes de água destilada ou desionizada.

1x Wash Buffer TBS diluído é estável durante uma semana quando armazenado a 2-8°C.

3. Anti-DIG/DNP-Mix (**AB14**), HRP/AP-Polymer-Mix (**AB13**), AP-Red Solution A (**SB6a**), AP-Red Solution B (**SB6b**), HRP-Green Solution A (**SB7a**), HRP-Green Solution B (**SB7b**) Nuclear Blue Solution (**CS2**),

Mounting Solution (alcoholic) (**MT4**): Deixe atingir a temperatura ambiente antes de utilizar.

*Os componentes **SB7a** e **SB7b** podem formar precipitados, que não afectam a qualidade da coloração.*

Pós-hibridiação e deteção

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 1x Wash Buffer TBS.
6. Aplique a Anti-DIG/DNP-Mix (**AB14**) (1-2 gotas por lâmina) nas lâminas e incube durante 15 minutos a 37°C numa câmara húmida.
7. Lave as lâminas 3x 1 min em 1x Wash Buffer TBS.
8. Aplique a HRP/AP-Polymer-Mix (**AB13**) (1-2 gotas por lâmina) nas lâminas e incube durante 15 minutos a 37°C numa câmara húmida.
9. Lave as lâminas 3x 1 min em 1x Wash Buffer TBS.
10. Prepare a AP-Red Solution (solução de trabalho): encha 1 ml da AP-Red Solution B (**SB6b**) num copo graduado e adicione uma gota (30 µl) da AP-Red Solution A (**SB6a**). Misture bem.
11. Aplique a AP-Red Solution (1-2 gotas por lâmina) nas lâminas e incubar no escuro durante 10 minutos à temperatura ambiente.
12. Durante a incubação, preparar a HRP-Green Solution (solução de trabalho): deitar 1 ml de HRP-Green Solution B (**SB7b**) num copo graduado e adicionar duas gotas (2x 20 µl) de HRP-Green Solution A (**SB7a**). Misture bem.
13. Lave as lâminas durante 2 minutos em água desionizada ou destilada.
14. Aplique a HRP-Green Solution gota a gota (1-2 gotas por lâmina) nas lâminas e incube no escuro durante 10 min à temperatura ambiente.
15. Lave as lâminas durante 2 minutos em água desionizada ou destilada.
16. Faça a coloração de contraste das amostras durante 2 minutos com a Nuclear Blue Solution (**CS2**).
17. Transfira as lâminas para um frasco de coloração e lave-as durante 2 minutos sob água corrente fria da torneira.
18. Desidrate 3x 30 s em etanol a 100% (utilize etanol muito puro).
19. Incube as lâminas durante 2x 30 s em xileno (utilize xileno muito puro).

Não prolongue nem encurte o tempo de incubação, pois isso pode resultar na perda de sinais!

20. 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.

21. Avalie as amostras coradas utilizando a microscopia ótica.

12. Interpretação dos resultados

Utilizando o *ZytoDot* 2C CISH Implementation Kit, os sinais de hibridação dos polinucleótidos marcados com digoxigenina aparecem como pontos distintos de cor verde escura e os polinucleótidos marcados com dinitrofenilo aparecem como pontos distintos de cor vermelho vivo. Nas interfases ou metáfases de células normais ou de células sem aberrações dos cromossomas examinados, aparecem dois sinais por sonda/marcador de hapteno, exceto no caso das sondas que visam os cromossomas X e/ou Y, em que não aparecem nenhum a dois sinais por sonda/marcador de hapteno, dependendo do sexo. 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* 2C 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 conduzir a resultados de coloração inferiores ou à ausência de coloração. Para mais informações, consultar www.zytovision.com.

Sinais fracos ou ausência de sinais

Causa possível	Acção
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
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 foi 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
O tempo de incubação da solução AP-Red não está correcto	Se necessário, o tempo de incubação pode ser reduzido para 5 minutos. Não aquecer a solução de substrato a mais de 25 °C; incubar apenas à temperatura ambiente
Tempo de incubação da solução HRP-Green incorrecto	Se necessário, o tempo de incubação pode ser reduzido para 7 minutos. Não aquecer a solução de substrato a mais de 25 °C; incubar apenas à temperatura ambiente

Sinais vermelhos demasiado fracos

Causa possível	Acção
A solução AP-Red foi exposta a luz directa forte	Preparar e utilizar a solução AP-Red protegida da luz directa forte
A solução AP-Red foi preparada demasiado cedo	Preparar antes da utilização imediata
O tempo de incubação da solução AP-Red não está correcto	Se necessário, o tempo de incubação pode ser prolongado até 15 minutos

Preparação insuficiente do substrato cromogénico	Não aumentar o volume da solução A

Sinais verdes demasiado fracos

Causa possível	Acção
Tempo de incubação de quaisquer passos de lavagem após coloração com HRP-Green demasiado longo	Não exceder os tempos de incubação indicados
Tempo de incubação da solução HRP-Green incorrecto	Se necessário, o tempo de incubação pode ser prolongado até 15 minutos
Preparação insuficiente do substrato cromogénico	Não aumentar o volume da solução A

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
As secções não foram desidratadas correctamente	Utilizar soluções frescas de etanol e xileno; utilizar apenas xileno de qualidade "pura

Manchas irregulares ou, nalgumas partes, apenas muito ligeiras

Causa possível	Acção
Desparafinagem incompleta	Utilizar soluções frescas; verificar a duração dos tempos de desparafinagem
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
Desparafinagem incompleta	Utilizar soluções novas; verificar a duração da desparafinagem
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.
- Kounelis S, et al. (2005) *Anticancer Res* 25: 939-46.
- 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

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 Zyto*Dot*® são marcas registadas da ZytoVision GmbH.