



ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit

REF Z-2099-20

20

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

4250380N727X



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

1. Utilização prevista

O ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit destina-se a ser utilizado em combinação com as sondas ZytoLight FISH em amostras citológicas 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-Cytology Implementation Kit está disponível num tamanho e é composto por:

Código	Componente	Quantidade		Recipiente
		Σ	20	
ES2	<u>Cytology Pepsin Solution</u>	4 ml		Conta-gotas, tampa transparente
WB5	<u>20x Wash Buffer TBS</u>	50 ml		Franco c/ tampa rosca
PT4	<u>10x MgCl₂</u>	50 ml		Franco c/ tampa rosca
PT5	<u>10x PBS</u>	50 ml		Franco c/ tampa rosca
WB7	<u>Cytology Stringency Wash Buffer SSC</u>	500 ml		Franco c/ tampa rosca (grande)
WB8	<u>Cytology Wash Buffer SSC</u>	500 ml		Franco c/ tampa rosca (grande)
MT7	<u>DAPI/DuraTect-Solution</u>	0.8 ml		Tubo de reacção, Tampa azul
	Instruções de utilização	1		

Z-2099-20 (20 testes): Componentes **ES2** e **MT7** são suficientes para 20 reacções. Componentes **PT4**, **PT5**, **WB7** e **WB8** são suficientes para 7 finas de coloração, 70 ml cada. Componente **WB5** é suficiente para 14 finas de coloração, 70 ml cada.

4. Materiais necessários mas não fornecidos

- ZytoLight FISH probe
- Amostras de controlo positivo e negativo
- Lâminas preparadas para microscópio, não revestidas
- Banho-maria(70 °C)
- Hibridizador ou placa de aquecimento
- Hibridizador ou câmara de humidade no forno de hibridação
- Pipetas ajustáveis (10 μ l, 25 μ l)
- Frascos ou banhos de coloração
- Temporizador
- Termómetro calibrado
- Etanol ou álcool
- 37% de formaldeído, sem ácido, ou 10% de formalina, com tampão neutro
- 2x Citrato salino-sódico (SSC), por exemplo, a partir de 20x SSC Solution (Prod. No. WB-0003-50)
- Água desionizada ou destilada
- Lamelas (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Cola, por exemplo, Fixogum Rubber Cement (Prod. No. E-4005-50/-125) ou similar
- Microscópio de fluorescência com manutenção adequada (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 ES2:

EUH210 Ficha de segurança fornecida a pedido.
< 20 % da mistura é constituída por ingrediente(s) de toxicidade aguda desconhecida (inalação).

Indicações de perigo e de precaução para PT4, PT5, WB5, WB7, e WB8:

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 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.

9. Preparação das amostras

Incubar as lâminas 2 min. em solução 2x SSC a 73°C imediatamente antes da proteólise para amadurecimento.

Alternativamente, o amadurecimento das amostras pode ser efetuado incubando as amostras overnight (12-16 h) a 37°C.

10. Tratamento de preparação do dispositivo

20x Wash Buffer TBS (WB5), 10x MgCl₂ (PT4), e 10x PBS (PT5) devem ser preparados de acordo com as instruções em 11. "Procedimento do teste". Os componentes (PT4) e (PT5) podem formar precipitados a 2-8°C. Se necessário, aqueça a 37°C durante 10 minutos até os precipitados se dissolverem completamente antes de os utilizar. 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

- Preparação de 1x Wash Buffer TBS: Diluir 1 parte de 20x Wash Buffer TBS (WB5) em 19 partes de água destilada ou desionizada.
- Preparação de Solução Formaldeído 1% (para 100 ml): misturar 2.7ml de solução de formaldeído a 37%, isenta de ácido, ou 25ml formol neutro tamponado (4% formaldeído) com 10 ml de 10x MgCl₂ (PT4) e 10 ml de 10x PBS (PT5). Ajustar volume para 100 ml com água destilada ou desionizada. Homogeneizar.
- 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.

Pré-tratamento (Proteólise/Pós-Fixação)

- (1) Aplicar (conta-gotas) Cytology Pepsin Solution (ES2) diretamente na lâmina com a amostra citológica e incubar durante 10 min. a 37°C em câmara húmida.

O ES2 pode formar precipitados, que não afectam a qualidade.

Dependendo de múltiplos fatores, p.e., tipo e duração da fixação, assim como o tipo de células, podem ser necessários tempos diferentes de incubação. Recomendamos tempos de incubação entre 5 a 15 min para amostras citológicas. O tempo de incubação deve ser otimizado em testes prévios.

- (2) Incubar lâminas 5 min. em 1x Wash Buffer TBS.
- (3) Incubar lâminas 5 min. em Solução de Formaldeído a 1%.
- (4) Incubar lâminas 5 min. em 1x Wash Buffer TBS.
- (5) Desidratar: em etanol a 70%, 90% e 100%, 1 min. cada.

Secar ao ar.

Desnaturação e hibridação

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

Evitar a exposição da sonda à luz por longos períodos.

- (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 5 min. a 72°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

- Cytology Stringency Wash Buffer SSC (WB7): pré-aquecer a 70°C.
- Cytology Wash Buffer SSC (WB8): trazer para temperatura ambiente
- 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 cuidadosamente a lamela.
- (3) Lavagem com Cytology Stringency Wash Buffer SSC (WB7) durante 2 min. a 70°C.

O Cytology Stringency Wash Buffer SSC deve ser pré-aquecido. Verificar temperatura com termómetro, se necessário.

Recomendamos a utilização de 4 lâminas por tina. Se necessário utilizar lâminas em branco para perfazer o número recomendado.

- (4) Lavagem com Cytology Wash Buffer SSC (WB8) durante 1 min. à temperatura ambiente.

O Cytology Wash Buffer SSC deve ser pré-aquecido até à temperatura ambiente. Verificar temperatura com termómetro, se necessário.

- (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
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 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 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. 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

Sinais de hibridação cruzada; Perturbações de fundo

Causa possível	Ação
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	Ação
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

Contracoloração fraca

Causa possível	Ação
Solução DAPI pouco concentrada	Em vez disso, utilizar <u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (Prod. No 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.