



FlexISH- Tissue Implementation Kit

REF Z-2182-5 Σ 5

REF Z-2182-20 Σ 20

Para hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) utilizando sondas FlexISH



Dispositivo médico de diagnóstico *In Vitro*
de acordo com a diretiva EU 98/79/CE

1. Utilização pretendida

O FlexISH-Tissue Implementation Kit está concebido para utilização em combinação com as sondas FlexISH para a deteção de alterações genéticas, p.e., translocações, deleções, amplificações e aneuploidias cromossómicas, em amostras fixadas em formaldeído e impregnadas em parafina, por hibridação *in situ* por fluorescência (FISH).

A interpretação dos resultados deve ser efetuada por um patologista qualificado no contexto da história clínica do doente, tendo em consideração outros dados clínicos e patológicos.

2. Relevância clínica

Alterações genéticas como translocações, deleções e/ou amplificações estão associadas a várias neoplasias humanas.

3. Princípios básicos

A técnica de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) permite a deteção e visualização de sequências específicas de ácidos nucleicos em amostras celulares. Os fragmentos de ADN marcados por fluorescência, designados sondas FISH, e as respetivas cadeias-alvo de ADN nas amostras, são codenaturados e subsequentemente renaturados durante a hibridação. Posteriormente, os fragmentos da sonda não específicos e não ligados são removidos através de fases de lavagem de estringência. Após a coloração de contraste do ADN com DAPI, os fragmentos da sonda hibridados são visualizados utilizando o microscópio de fluorescência equipado com filtros de excitação e emissão específicos para os fluorocromos com os quais os fragmentos da sonda FISH foram diretamente marcados.

4. Reagentes fornecidos

O FlexISH-Tissue Implementation Kit é composto por:

Código	Componente	Quantidade		Recipiente
		20	5	
PT1	<u>Heat Pretreatment Solution Citric</u>	500 ml	150 ml	Frasco c/ tampa rosca (grande)
ES1	<u>Pepsin Solution</u>	4 ml	1 ml	Frasco conta-gotas, Tampa branca
WB10	<u>5x FlexISH Wash Buffer</u>	500 ml	150 ml	Frasco c/ tampa rosca (grande)
MT7	<u>DAPI/DuraTect-Solution</u>	0.8	0.2	Tubo de reação, tampa azul
	Instruções de utilização	1	1	

Z-2182-20 (20 testes): Componentes **ES1** e **MT7** são suficientes para 20 reações. Componente **WB10** é suficiente para 11x3 tinas de coloração de 70 ml cada. Componente **PT1** é suficiente para 7 tinas de coloração de 70 ml cada.

Z-2182-5 (5 testes): Componentes **ES1** e **MT7** são suficientes para 5 reações. Componente **WB10** é suficiente para 3x3 tinas de coloração de 70 ml cada. Componente **PT1** é suficiente para 2 tinas de coloração de 70 ml each.

5. Materiais necessários mas não fornecidos

- FlexISH probe
- Amostras de controlo positivo e negativo
- Lâminas de microscópio, com carregamento positivo
- Banho-maria (37°C, 98°C)
- Hibridador ou placa quente
- Hibridador ou câmara de humidade na estufa de hibridação
- Pipetas ajustáveis (10 µl, 30 µl)
- Tinas de coloração
- Temporizador
- Termómetro calibrado
- Etanol ou álcool
- Xilol
- Água desionizada ou destilada
- Lamelas (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Cola, por ex.: Fixogum Rubber Cement (Prod. N.º. E-4005-50/-125) ou similar
- Microscópio de fluorescência devidamente calibrado (400-1000x)
- Óleo de imersão aprovado para microscopia de fluorescência
- Conjuntos de filtros adequados

6. Armazenamento e manuseamento

Os componentes do kit devem ser armazenados entre 2 e 8°C. Adicionalmente, o DAPI/DuraTect-Solution (MT7) deve ser armazenado protegido da luz. Repor as condições de armazenamento imediatamente após a utilização. Se as condições de armazenamento forem respeitadas, o kit irá funcionar sem perdas no seu desempenho, pelo menos até à data de validade impressa no rótulo. Não utilizar reagentes após terminar a data de validade indicada.

7. Avisos e precauções

- Ler as instruções de utilização antes de utilizar!
- Não utilizar reagentes após terminar a data de validade!
- Este produto contém substâncias (em concentrações e volume reduzidos) que são nocivas para a saúde e potencialmente infecciosas. Evitar qualquer contacto direto com os reagentes. Tomar as medidas de proteção adequadas (utilizar luvas descartáveis, óculos de proteção e vestuário de laboratório)!
- Caso os reagentes entrem em contacto com a pele, lavar imediatamente com água abundante!
- Está disponível a ficha de dados de segurança, se solicitada, para utilização profissional.
- Não reutilizar os reagentes.

- As amostras não devem secar durante a hibridação e passos de 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!

Frases de risco e de aviso 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 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.

8. Limitations

- Para utilização em diagnóstico *in vitro*.
- Apenas para utilização profissional.
- A interpretação clínica de qualquer marcação positiva, ou a ausência desta, deve ser efetuada 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 FISH, reagentes, painéis de diagnóstico e métodos utilizados para realizar a técnica. A técnica deve ser realizada num laboratório certificado e licenciado, sob a supervisão de um patologista responsável pela revisão das lâminas marcadas e que garanta a adequação dos controlos positivos e negativos.
- A marcação das amostras, especialmente, a intensidade do sinal e a coloração de fundo, depende do manuseamento e do processamento da amostra antes realização da técnica. A fixação, congelamento, descongelamento, lavagem, secagem, aquecimento, microtomia inadequada ou a contaminação com outras amostras ou fluidos pode produzir artefactos ou falsos resultados.
- O desempenho foi validado utilizando os procedimentos descritos nestas instruções de utilização. Alterações a estes procedimentos podem afetar o desempenho e devem ser validadas pelo utilizador.

9. Substâncias que podem interferir

Os eritrócitos presentes na amostra podem apresentar autofluorescência, o que afeta o reconhecimento do sinal.

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

10. Preparação de amostras

Recomendações:

- Fixação em formalina tamponada neutra a 10% durante 24 h à temperatura ambiente (18-25°C).
- Dimensão da amostra ≤ 0,5 cm³.
- Utilizar parafina de qualidade Premium.
- A impregnação deve ser efetuada 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.

11. Passos preparatórios

5x FlexISH Wash Buffer (WB10) deve ser preparado de acordo com as instruções em 12. "Procedimento do teste". Todos os restantes reagentes são prontos a usar, não sendo necessária qualquer mistura ou diluição.

12. Procedimento do teste

12.1 Dia 1

Passos preparatórios

- (1) Preparação de duas series de etanol: (70%, 90%, e 100%): Diluir etanol 100% em água destilada ou desionizada. Estas soluções podem ser armazenadas em recipientes apropriados e reutilizadas até 160 lâminas.
- (2) Heat Pretreatment Solution Citric (PT1): Encher uma tina de coloração e aquecer a 98°C.
- (3) Sonda FlexISH: Trazer até à temperatura ambiente antes de usar, protegida da luz. Antes de abrir o frasco, misturar por vórtex e rotação durante alguns instantes.

Pré-tratamento (desparafinação/proteólise)

- (1) Incubar as lâminas 2x 5 min em xilol.
- (2) Incubar etanol 100%, 100%, 90%, e 70%, cada durante 2 min.
- (3) Lavar 2x 2 min em água destilada ou desionizada.
- (4) Incubar durante 20 min em solução Heat Pretreatment Solution Citric (PT1) pré-aquecida a 98°C.

Recomenda-se não utilizar mais de oito lâminas por tina de coloração. Após colocar as lâminas na solução, verificar a temperatura dentro da tina e iniciar a contagem do tempo quando atingir os 95°C.

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

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. Em regra, o tempo de incubação deve ser otimizado em testes prévios.

- (7) Lavar 2x 2 min em água destilada ou desionizada.
- (8) Desidratação: em etanol a 70%, 90% e 100%, 1 min. cada
- (9) Secar lâminas ao ar.

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 sonda FlexISH 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) Realizar a hibridação durante 2 h a 16 h (*overnight*), transferindo as lâminas para hibridador ou câmara húmida em estufa a 37°C.

É fundamental que as amostras não sequem durante a hibridação.

12.2 Dia 1 ou Dia 2

Passos preparatórios

- (1) Preparação de 1x FlexISH Wash Buffer: Diluir 1 parte de 5x FlexISH Wash Buffer (WB10) em 4 partes de água destilada ou desionizada. Encher três tinas de coloração com 1x FlexISH Wash Buffer, pré-aquecer uma tina a 72°C e manter as outras duas à temperatura ambiente.
- (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 FlexISH Wash Buffer à temperatura ambiente durante 1-2 min.
Para facilitar a remoção da lamela, este passo pode ser feito de forma alternativa, durante 2 min. a 37°C.
- (3) Lavar em 1x FlexISH Wash Buffer durante 10 min. a 72°C.
A solução 1x FlexISH Wash Buffer deve ser pré-aquecida. Verificar a temperatura com termómetro, se necessário. Não utilizar mais de oito lâminas por tina de coloração.
- (4) Lavar em 1x FlexISH Wash Buffer durante 3 min. à temperatura ambiente.
- (5) Incubar as lâminas em etanol a 70%, 90% e 100%, 1 min. cada
- (6) Air dry the samples protected from light.
- (7) 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 .

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.

- (8) Arquivar a lâmina no escuro. Para arquivo de longa duração guardar a lâmina entre 2-8°C.
- (9) 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

13. 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 do controlo da qualidade recomendados

De forma a monitorizar o desempenho correto das amostras processadas e dos reagentes de teste, cada teste deve ser acompanhado de controlos internos e externos. Caso os controlos internos e/ou externos não demonstrem uma marcação adequada, os resultados das amostras dos pacientes devem ser considerados inválidos.

Controlo interno: células não neoplásicas na amostra que apresentem um padrão de sinal normal, p.e., fibroblastos.

Controlo externo: amostras validadas de controlo positivo e negativo.

14. Características de desempenho

Consulte as instruções de utilização da respetiva sonda.

15. Eliminação

A eliminação de reagentes deve ser realizada de acordo com as normas locais.

16. Resolução de problemas

Qualquer desvio relativamente às instruções de utilização pode conduzir a resultados de coloração inferiores ou a ausência total de coloração.

Sinais fracos ou ausência de sinais

Causa possível	Ação
Sem sequências-alvo disponíveis	Utilizar os controlos adequados
Amostra de tecido ou de células indevidamente fixada	Otimizar o tempo de fixação e o fixador ou aplicar uma fase de pós-fixação conforme descrito em "12. Procedimento do teste"
Pré-tratamento de calor, proteólise, desnaturação, hibridação ou temperatura de lavagem de estringência incorretas	Verificar a temperatura de todos os dispositivos técnicos utilizados com um termómetro calibrado
Pré-tratamento proteolítico executado de forma incorreta	Otimizar o tempo de incubação da pepsina, aumentar ou reduzir conforme necessário
Evaporação da sonda	Quando utiliza um hibridador, a utilização de faixas húmidas/tanques com água é obrigatória. Quando utiliza uma estufa de hibridação, é necessária a utilização de uma câmara de humidade. Adicionalmente, as lamelas devem estar perfeitamente seladas, por ex.: com Fixogum, para evitar a secagem da amostra durante a hibridação
Baixa concentração da solução FlexISH Wash Buffer	Verificar concentração da solução FlexISH Wash Buffer
Soluções de desidratação antigas	Preparar soluções de desidratação novas
Microscópio de fluorescência incorretamente ajustado	Ajustar corretamente
Conjuntos de filtros inadequados	Utilizar conjuntos de filtros adequados para os fluorocromos da sonda. <i>Os conjuntos de filtros de passagem de banda tripla permitem menos luz, comparados com os conjuntos de filtros de passagem de banda dupla ou passagem simples. Consequentemente, os sinais podem surgir mais fracos utilizando os conjuntos de filtros de passagem de banda tripla</i>

Dano causado por exposição das sondas/fluoróforos	Realizar a hibridação e as fases de lavagem numa sala escura
---	--

Morfologia do tecido degradada

Causa possível	Ação
Amostra de tecido ou de células indevidamente fixada	Otimizar o tempo de fixação e o fixativo ou aplicar uma fase de pós-fixação conforme descrito em "12. Procedimento de teste"
Pré-tratamento proteolítico executado de forma incorreta	Otimizar o tempo de incubação da pepsina, aumentar ou reduzir conforme necessário
Secagem insuficiente antes da aplicação da sonda	Prolongar a secagem ao ar

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
Volume da sonda por área demasiado elevado	Reduzir o volume da sonda por secção/área, distribuir a sonda por gotas para evitar a concentração local
Lâminas arrefecidas à temperatura ambiente antes da hibridação	Transferir rapidamente as lâminas para 37°C
Tampão de lavagem de estringência demasiado concentrado	Verificar a concentração do tampão de lavagem de estringência
Temperatura de lavagem após a hibridação demasiado baixa	Verificar a temperatura; aumentar se necessário
Desidratação das amostras entre as fases de incubação individual	Evitar a desidratação selando as lâminas e realizando a incubação num ambiente húmido

Núcleos sobrepostos

Causa possível	Ação
Espessura inadequada das secções de tecido	Efetuar secções de micrótomo de 2-4 μm .

Amostra desliza da lâmina

Causa possível	Ação
Revestimento inadequado da lâmina	Utilizar lâminas adequadas
Pré-tratamento proteolítico demasiado forte	Reduzir o tempo de incubação da pepsina

Coloração de contraste fraca

Causa possível	Ação
Solução DAPI de baixa concentração	Utilizar <u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (Prod. No. MT-0008-0.8)
Tempo de incubação da solução DAPI demasiado curto	Ajustar o tempo de incubação da solução DAPI

17. Literature

- 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.

Os nossos especialistas estão disponíveis para responder às suas questões.

Contacte helptech@zytovision.com



ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/ Alemanha
Telefone: +49 471 4832-300
Fax: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
Email: info@zytovision.com

Marcas registadas:

ZytoVision® e F/lexSH® são marcas registadas da ZytoVision GmbH.