



Instructions For Use

REF: LPF 003

**FAST FISH Prenatal 13 and 21
Enumeration Probe kit**

PROFESSIONAL USE ONLY

ENGLISH/FRANÇAIS/ITALIANO/DEUTSCH/ESPAÑOL

Further information available at www.ogt.com

Fluorescence *In Situ* Hybridisation (FISH) is a technique that allows DNA sequences to be detected on metaphase chromosomes or in interphase nuclei from fixed cytogenetic samples. The technique uses DNA probes that hybridise to entire chromosomes or single unique sequences, and serves as a powerful adjunct to classic cytogenetics. Recent developments have meant that this valuable technique can now be applied as an essential diagnostic tool in prenatal, haematological and pathological chromosomal analysis. Target DNA, after fixation and denaturation, is available for annealing to a similarly denatured, fluorescently labelled DNA probe, which has a complementary sequence. Following hybridisation, unbound and non-specifically bound DNA probe is removed and the DNA is counterstained for visualisation. Fluorescence microscopy then allows the visualisation of the hybridised probe on the target material.

Probe Information

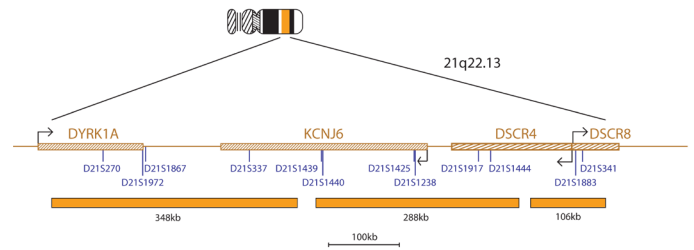
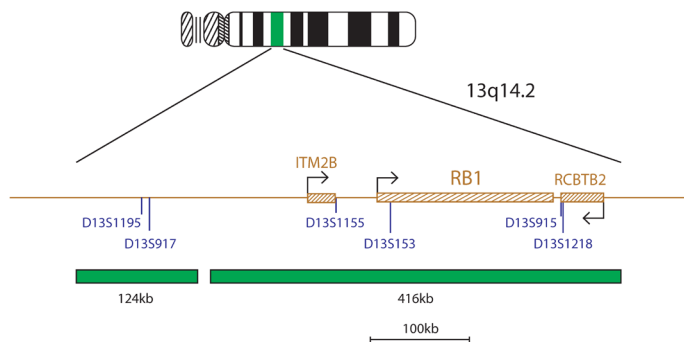
The CytoCell FAST FISH Prenatal assays are designed for the rapid and accurate detection of the most common foetal chromosomal disorders. The probe set is intended for the detection and quantification of chromosomes 13 and 21 in interphase nuclei of uncultured amniotic fluid cells by FISH. The assay should be used in conjunction with foetal karyotype analysis.

Trisomy of chromosome 21, resulting in Down syndrome¹, is one of the most common chromosome abnormalities in humans and the risk of having an affected child is known to increase with maternal age². The syndrome represents a particular combination of phenotypic findings, including characteristic facial appearance, a single palmar crease and mental retardation, and may also present with hearing and heart defects. Affected individuals show a highly increased incidence of leukaemia, particularly acute megakaryocytic leukaemia³.

The rarest trisomy, trisomy 13, responsible for Patau syndrome occurs in approximately 1 in 16,000 newborns⁴. Individuals with Patau syndrome present abnormalities affecting many parts of the body, including the heart, spinal cord, eyes, limbs, face/skull and muscles⁴.

Probe Specification

13 unique sequence, 13q14.2 Green
21 unique sequence, 21q22.13 Orange



The probe set 13 and 21 is a mixture of green and orange directly labelled fluorescent DNA probes containing unique sequences. The chromosome 13 probe includes RB1 gene as well as markers D13S1195, D13S1155 and D13S915. The chromosome 21 probe includes markers D21S270, D21S1867, D21S337, D21S1425, D21S1444 and D21S341.

Materials Provided

Probe: 50µl per vial (5 tests) or 100µl per vial (10 tests)

Amount of green 13q14.2 probe: 144 – 180ng/test

Amount of orange 21q22.13 probe: 48 – 60ng/test

The probes are provided premixed in hybridisation solution (Formamide; Dextran Sulphate; SSC) and are ready to use.

Counterstain: 150µl per vial (15 tests)

The counterstain is DAPI antifade (ES: 0.125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)).

Warnings and Precautions

1. For *in vitro* diagnostic use. For professional use only.
2. Wear gloves when handling DNA probes and DAPI counterstain.
3. Probe mixtures contain formamide, which is a teratogen; do not breathe fumes or allow skin contact. Wear gloves, a lab coat, and handle in a fume hood. Upon disposal, flush with a large volume of water.
4. DAPI is a potential carcinogen. Handle with care; wear gloves and a lab coat. Upon disposal, flush with a large volume of water.
5. All hazardous materials should be disposed of according to your institution's guidelines for hazardous waste disposal.

Storage and Handling

The kit should be stored between -25°C to -15 °C in a freezer until the expiry date indicated on the kit label. The probe and counterstain vials must be stored in the dark.

Equipment Necessary but not Supplied

1. Hotplate (with a solid plate and accurate temperature control up to 80°C).
2. Variable volume micropipettes and tips range 1µl - 200µl.
3. Water bath with accurate temperature control at 37°C and 72°C.
4. Microcentrifuge tubes (0.5ml).
5. Fluorescence microscope (Please see Fluorescence Microscope Recommendation section).
6. Plastic or glass coplin jars.
7. Forceps.
8. Fluorescence grade microscope lens immersion oil.
9. Bench top centrifuge.
10. Microscope slides.
11. 24x24mm coverslips.
12. Timer.
13. 37°C incubator.
14. Rubber solution glue.

Fluorescence Microscope Recommendation

For optimal visualisation of the probe we recommend a 100 watt mercury lamp and plan apochromat objectives x63 or x100. The triple bandpass filter DAPI/FITC/TRITC is optimal for viewing the green and orange fluorophores as well as counterstain simultaneously. The triple bandpass filter DAPI/FITC/Texas Red can also be used to view both fluorophores and DAPI simultaneously.

Sample Preparation

The prenatal kit is designed for use on uncultured amniocytes fixed in Carnoy's fixative (see procedure below). Amniotic fluid sample collection should be performed according to the laboratory or institution guidelines.

Amniotic fluid samples that appear bloody or brown should not be used, since they may contain maternal blood and may lead to false results.

Suggested Protocol**Preparation of fresh amniotic fluid samples for FISH:**

1. Centrifuge 2 – 5ml of whole amniotic fluid specimen for 7 minutes at 180xg, carefully remove the supernatant without disturbing the cell pellet.
2. Resuspend the pellet in 2ml of 0.075M KCl. Leave at room temperature (RT) for 5 minutes.
3. Add 2ml of fresh fixative (3:1 methanol:glacial acetic acid) to the cells/hypotonic solution, adding the first ml dropwise whilst continuously mixing. Mix well.
4. Centrifuge the suspension for 5 minutes at 280xg, carefully remove the supernatant and resuspend the pellet in 2ml of fresh fixative.
5. Fixed specimens can be stored at this stage in a freezer at -20°C.
6. If the sample is not to be frozen, centrifuge the tube at 280xg for 5 minutes. Remove as much supernatant as possible without disturbing the cell pellet. Flick the tube to resuspend the pellet in the small amount of fluid remaining.
7. To prepare slides for FISH, spot the cell suspension directly onto slide. Allow to air dry.

Recommended slide Pretreatment:

1. Immerse the slide prepared from uncultured amniocytes in 2xSSC for 2 minutes at 37°C.
2. Place the slide in freshly made pepsin working solution (5mg of pepsin added to 100ml of 0.01M HCl) for 13 minutes at 37°C.
3. Immerse the slide in phosphate buffered saline (PBS) at RT for 5 minutes.
4. Immerse the slide in post fixation solution (0.95% formaldehyde: 1.0ml of 37% formaldehyde, 0.18g of MgCl₂ and 39.0ml of PBS) for 5 minutes at RT.
5. Immerse the slide in PBS at RT for 5 minutes.
6. Immerse the slide in 70% ethanol at RT. Allow the slide to stand in the ethanol wash for 1 minute.
7. Remove the slide from 70% ethanol. Repeat step 6 with 85% ethanol, followed by 100% ethanol.
8. Allow to air dry.

FISH Protocol

(Note: Please ensure that exposure of the probe to laboratory lights is limited at all times)

Slide preparation (skip this step if the slide was pretreated according to the protocol above)

1. Spot the cell sample onto a glass microscope slide. Allow to dry.
2. Immerse the slide in 2xSSC for 2 minutes at RT without agitation.
3. Dehydrate in an ethanol series (70%, 85% and 100%), each for 2 minutes at RT.
4. Allow to dry.

Pre-Denaturation

5. Remove the probe from the freezer and allow it to warm to RT.
6. Ensure that the probe solution is uniformly mixed with a pipette.
7. Remove 10µl of probe per test, and transfer it to a microcentrifuge tube. Quickly return the remaining probe to the freezer.
8. Place the probe and the sample slide to prewarm on a 37°C (+/- 1°C) hotplate for 5 minutes.
9. Spot 10µl of probe mixture onto the cell sample and carefully apply a coverslip. Seal with rubber solution glue and allow the glue to dry completely.

Denaturation

10. Denature the sample and probe simultaneously by heating the slide on a hotplate at 75°C (+/- 1°C) for 2 minutes.

Hybridisation

11. Place the slide in a humid, lightproof container at 37°C (+/- 1°C) for 2 hours.

Post-Hybridisation Washes

12. Remove the coverslip and all traces of glue carefully.
13. Immerse the slide in 0.4xSSC (pH 7.0) at 72°C (+/- 1°C) for 2 minutes without agitation.
14. Drain the slide and immerse it in 2xSSC, 0.05% Tween-20 at RT (pH 7.0) for 30 seconds without agitation.
15. Drain the slide and apply 10µl of DAPI antifade onto each hybridisation area.
16. Cover with a coverslip, remove any bubbles and allow the colour to develop in the dark for 10 minutes.
17. View with a fluorescence microscope.

Stability of Finished Slides

FISHed slides remain analysable for up to 1 month if stored in the dark at or below RT.

Procedural Recommendations

1. Baking or ageing of slides is not recommended as it may reduce signal fluorescence.
2. Hybridisation conditions may be adversely affected by the use of reagents other than those provided or recommended by CytoCell Ltd.
3. The use of a calibrated thermometer is strongly recommended for measuring temperatures of solutions, waterbaths, and incubators as these temperatures are critical for optimum product performance.
4. The wash concentrations, pH and temperatures are important as low stringency can result in non-specific binding of the probe and too high stringency can result in a lack of signal.
5. Incomplete denaturation can result in lack of signal and over denaturation can also result in non-specific binding.

Interpretation of Results

The sensitivity and specificity of FISH depends on a number of parameters, which vary from one cell type to another; from one probe to another; with the cell techniques used; and within the individual laboratory. Therefore we recommend for the use of the prenatal kit, that each laboratory should have its own standard material and determine its own FISH assay cutoff values for karyotypically normal and aneuploid samples (for guidelines contact CytoCell).

Expected Results

A normal cell should show 2 green and 2 orange signals (2G, 2O). Cells with trisomy 13 should show 3 green and 2 orange signals (3G, 2O). Cells with trisomy 21 should show 2 green and 3 orange signals (2G, 3O).

Limitations

This test does not detect structural chromosome abnormalities and mosaicism. It also does not detect numerical abnormalities of chromosomes other than tested. The test is not designed to evaluate the risk of trisomy. Reporting and interpretation of FISH results should be consistent with professional standards of practice and should take into consideration other clinical and diagnostic information.

This kit is intended as an adjunct to other diagnostic laboratory tests and therapeutic action should not be initiated on the basis of the FISH result alone.

Additional Information

For additional product information please contact the CytoCell Technical Support Department.

T: +44 (0)1223 294048

E: techsupport@cytoCELL.com

W: www.ogt.com

FRANÇAIS

L'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH) est une technique qui permet de détecter des séquences ADN sur les chromosomes en métaphase ou sur les noyaux interphasiques d'échantillons cytogénétiques fixés. La technique utilise des sondes ADN qui s'hybrident aux chromosomes entiers ou à des séquences uniques spécifiques, et sert de test complémentaire à la cytogénétique classique. De récents développements ont démontré que cette technique informative peut maintenant être utilisée comme outil diagnostique essentiel lors de l'analyse des chromosomes en prénatal, hématologie et pathologie. Après fixation et dénaturation, l'ADN cible est alors disponible pour hybridation avec une sonde ADN complémentaire, dénaturation de la même manière et marquée par fluorescence. Après l'hybridation, l'ADN non hybridé et non lié spécifiquement est éliminé et l'ADN est ensuite contre-coloré. Un microscope à fluorescence permet ensuite la visualisation de la sonde hybridée sur l'ADN cible.

Informations concernant la sonde

Le kit de sondes de dénombrement prénatal FAST FISH de CytoCell est un kit de test prénatal permettant une détection rapide des trisomie 13 et 21 présentes, respectivement, dans les syndromes de Patau et de Down. Les sondes sont conçues pour détecter et quantifier les chromosomes 13 et 21 des noyaux interphasiques des cellules de liquide amniotique non cultivées par FISH. L'essai doit être utilisé en association avec l'analyse du caryotype.

Caractéristiques de la sonde

Sonde de la région 13 séquence unique 13q14.2 en vert
Sonde de la région 21 séquence unique 21q22.13 en orange

Les sondes des chromosome 13 et 21 sont un ensemble de sondes ADN directement marquées avec un fluorochrome vert et orange et qui contient des séquences uniques. La sonde du chromosome 13 inclut le gène RB1 ainsi que les marqueurs D13S1195, D13S1155 et D13S915. La sonde du chromosome 21 inclut les marqueurs D21S270, D21S1867, D21S337, D21S1425, D21S1444 et D21S341.

Conditionnement

Sonde : 50µl par tube (5 tests) ou 100µl par tube (10 tests)
Quantité de sonde 13 séquence unique 13q14.2 en vert: 144 – 180ng/test
Quantité de sonde 21 séquence unique 21q22.13 en orange: 48 – 60ng/test
La sonde est fournie prémélangée prête-à-l'emploi dans le tampon d'hybridation (formamide, sulfate de dextran, SSC).

Contre-colorant: 150µl par tube (15 tests)

Le contre-colorant est le DAPI antifade (ES: 0,125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)).

Avertissements et précautions

1. Pour utilisation en diagnostic *in vitro*. Pour usage professionnel uniquement.
2. Porter des gants lors de la manipulation des sondes ADN et du contre-colorant DAPI.
3. La sonde contient de la formamide qui est un tératogène. Ne pas respirer les vapeurs. Ne pas mettre en contact avec la peau. Porter des gants, une blouse de laboratoire et manipuler sous une hotte. Après élimination, rincer abondamment avec de l'eau.
4. Le DAPI est un carcinogène potentiel. Manipuler avec précaution. Porter des gants et une blouse de laboratoire. Après élimination, rincer abondamment avec de l'eau.
5. Toutes les matières dangereuses doivent être éliminées selon les réglementations concernant l'élimination des déchets dangereux en vigueur dans votre établissement.

Conservation et manipulation

Le kit devra être stocké au congélateur entre -25°C et -15°C jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'étiquette du kit. La sonde et le contre-colorant doivent être conservés à l'abri de la lumière.

Équipement nécessaire non fourni

1. Plaque chauffante (avec bloc et contrôle de la température jusqu'à 80°C).
2. Micropipettes de volume variable et gamme d'embouts de 1µl - 200µl.
3. Bain-marie avec contrôle précis de la température à 37°C et 72°C.
4. Tubes à microcentrifugation (0,5ml).
5. Microscope à fluorescence (Voir la section Microscope à fluorescence recommandés).
6. Bocal Coplin en plastique ou en verre.
7. Pincettes.
8. Huile à immersion pour microscope à fluorescence.
9. Centrifugeuse de paillasse.
10. Lames de microscope.
11. Lamelles 24x24mm.
12. Chronomètre.
13. Incubateur à 37°C.
14. Colle à base de caoutchouc.

Microscope à fluorescence recommandés

Pour une visualisation optimale de la sonde, nous recommandons l'utilisation d'une lampe à mercure de 100 watts et d'objectifs plan apochromatiques x63 ou x100. Le filtre triple bande DAPI/FITC/TRITC est optimal pour la visualisation des fluorochromes oranges et verts ainsi que des contre-colorant simultanément. Le filtre triple bande DAPI/FITC/Texas Red permet aussi la visualisation des 2 fluorochromes et du DAPI simultanément.

Conformité de l'échantillon et collecte

Le kit prénatal a été développé pour utilisation sur des amniocytes non cultivés qui sont fixés avec du fixateur Carnoy (voir la procédure ci-après). Les échantillons de liquide amniotique doivent être collectés selon les protocoles en vigueur dans le laboratoire ou établissement. Les échantillons de liquide amniotique sanguins ou de couleur brune ne doivent pas être utilisés parce qu'ils pourraient contenir du sang maternel et risquent de fausser les résultats.

Recommandations de protocole

Préparation d'échantillons de liquide amniotique frais pour le test FISH :

1. Centrifuger 2 - 5ml de l'échantillon de liquide amniotique total pendant 7 minutes à 180xg, puis enlever avec précaution le liquide surnageant sans perturber le culot cellulaire.
2. Resuspendre le culot dans 2ml de 0,075 KCl. Laisser à température ambiante (TA) pendant 5 minutes.
3. Ajouter 2ml de fixatif frais (3:1 méthanol:acide acétique glacial) à la solution cellulaire/hypotonique en ajoutant le premier ml goutte par goutte tout en mélangeant l'ensemble en continu. Bien mélanger.
4. Centrifuger la suspension pendant 5 minutes à 280xg, enlever avec précaution le liquide surnageant et resuspendre le culot dans 2ml de fixatif frais.
5. Les échantillons fixés peuvent être conservés dans un réfrigérateur dans cet état à une température de -20°C.
6. Lorsque l'échantillon ne doit pas être gelé, centrifuger le tube à 280xg pendant 5 minutes. Enlever autant de liquide surnageant que possible sans perturber le culot cellulaire. Secouer le tube pour resuspendre le culot dans la faible quantité de liquide résiduel.
7. Pour préparer les lames pour le test FISH, déposer la suspension cellulaire directement sur la lame en deux zones d'hybridation. Laisser sécher à l'air.

Prétraitement des échantillons recommandé :

DS155/CE v005.00/2021-05-05 (A001 v3 / A002 v2)

1. Immergere le etichette preparate a partire da amniociti non coltivati in un tampone 2xSSC per 2 minuti a 37°C.
2. Mettere le etichette in una soluzione di pepsina recentemente preparata (5mg di pepsina aggiunta in 100ml di 0,01M HCl) per 13 minuti a una temperatura di 37°C.
3. Immergere le etichette in una soluzione salina tamponata al fosfato per 5 minuti a TA.
4. Immergere le etichette in una soluzione post-fissazione (0,95% di formaldeide: 1,0ml di 37% di formaldeide, 0,18g MgCl₂ e 39,0ml di una soluzione salina tamponata al fosfato) per 5 minuti a TA.
5. Immergere le etichette in una soluzione salina tamponata al fosfato per 5 minuti a TA.
6. Immergere le etichette in etanolo al 70% a TA. Lasciare le etichette in una soluzione etanolo per una minuto.
7. Sortire le etichette dall'etanolo al 70%. Ripetere l'etapa 6 con etanolo al 85%, seguito da una procedura con etanolo al 100%.
8. Lasciare seccare all'aria libera.

Protocollo FISH

(Nota: Assicurarsi sempre di limitare l'esposizione della sonda all'illuminazione del laboratorio)

Preparazione della lamina (saltare questa etapa se la lamina e stata pretrattata conformemente al protocollo descritto qui sopra)

1. Deposare l'etichetta cellulare su una lamina in vetro. Lasciare seccare.
2. Immergere la lamina in un 2xSSC per 2 minuti a TA senza agitare.
3. Deidratare in una serie di bagni etanolo (70%, 85% e 100%), 2 minuti in ogni bagno a temperatura ambiente.
4. Lasciare seccare.

Pre-denaturazione

5. Ritirare la sonda dal congelatore e lasciarla riscaldare a temperatura ambiente.
6. Assicurarsi che la soluzione della sonda e miscelata omogeneamente con una pipetta.
7. Ritirare 10µl di sonda per test e trasferirla in un tubo di microcentrifugazione. Sostituire rapidamente il resto della sonda in un congelatore.
8. Mettere la sonda e la lamina etichettata in un piatto riscaldante a 37°C (+/- 1°C) per 5 minuti.
9. Deposare 10µl di sonda sull'etichetta e coprire con una lamina. Sigillare con la colla alla base di caoutchouc e lasciare seccare.

Denaturazione

10. Denaturare simultaneamente la sonda e l'etichetta in un piatto riscaldante a 75°C (+/- 1°C) per 2 minuti.

Ibridazione

11. Incubare la lamina per 2 ore a 37°C (+/- 1°C) in un contenitore umido e all'ombra della luce.

Lavaggi post-ibridazione

12. Rimuovere la lamina e eliminare ogni traccia di colla alla base di caoutchouc.
13. Lavare la lamina in un tampone 0,4xSSC (pH 7,0) a 72°C (+/- 1°C) per 2 minuti senza agitare.
14. Sciacquare la lamina e lavare in un tampone 2xSSC, 0,05% Tween-20 (pH 7,0) a temperatura ambiente per 30 secondi senza agitare.
15. Seccare la lamina e applicare 10µl di DAPI antifade su ogni etichetta.
16. Coprire con una lamina, eliminare le bolle e lasciare la colorazione apparire all'ombra della luce per 10 minuti.
17. Osservare con un microscopio a fluorescenza.

Stabilità delle lamine

Le lamine sono analizzabili per un mese se sono conservate all'ombra della luce e al di sotto della lamina.

Raccomandazioni

1. Non si consiglia di cuocere o invecchiare le lamine, ciò può ridurre l'intensità del segnale di fluorescenza.
2. Le condizioni di ibridazione possono essere influenzate dall'uso di reattivi diversi da quelli forniti o raccomandati da CytoCell Ltd.
3. L'uso di un termometro calibrato e' fortemente raccomandato per misurare le temperature delle soluzioni, bagni-marie e incubatori. Queste temperature sono essenziali per un'efficacia ottimale del prodotto.
4. Le concentrazioni dei lavaggi, pH e temperatura sono importanti. Una forte stringenza può risultare in una perdita di segnale della sonda e una forte stringenza può risultare in una perdita di segnale.
5. Una denaturazione incompleta può causare una perdita di segnale e una forte denaturazione una ibridazione non-specifica.

Interpretazione dei risultati

La sensibilità e la specificità del test FISH dipendono da numerosi parametri che variano da un tipo di cellula all'altro, da una sonda all'altra, in funzione delle tecniche cellulari utilizzate e del laboratorio. Noi raccomandiamo, per l'uso del kit prenatale, che ogni laboratorio disponga di un proprio standard e che determini i propri valori di riferimento per il test FISH per campioni aneuploidi e per il cariotipo normale (per ulteriori istruzioni, contattate CytoCell).

Risultati attesi

Una cellula normale deve presentare 2 segnali verdi e 2 segnali arancione (2V, 2O). Le cellule portatrici di una trisomia 13 devono presentare 3 segnali verdi e 2 segnali arancione (3V, 2O). Le cellule portatrici di una trisomia 21 devono presentare 2 segnali verdi e 3 segnali arancione (2V, 3O).

Limitazioni

Questo test non rileva le anomalie e la mosaica cromosomica strutturale. Non rileva le anomalie del numero di cromosomi diversi da quelli testati. Questo test non e' concepito per valutare il rischio di trisomia. Il reporting e l'interpretazione del test FISH devono essere effettuati conformemente alle norme professionali per la pratica e tutto in considerazione di altre informazioni cliniche e diagnostiche.

Questo test e' sviluppato come complemento ad altri test diagnostici di laboratorio. Per questo motivo, le azioni terapeutiche non devono essere basate solo sui risultati del test FISH.

Informazioni supplementari

Per ulteriori informazioni sul prodotto, contattate l'assistenza tecnica CytoCell.
T: +44 (0)1223 294048
E: techsupport@cytozell.com
W: www.ogt.com

ITALIANO

L'ibridazione *in situ* a fluorescenza (Fluorescence *In Situ* Hybridisation - FISH) e' una tecnica che permette di rilevare sequenze di DNA su cromosomi in metafase o in nuclei in interfase in campioni citogenetici fissati. La tecnica prevede l'utilizzo di sonde di DNA in grado di ibridare con un intero cromosoma o con sequenze specifiche presenti in singola copia e costituisce quindi un

potente complemento delle metodologie citogenetiche classiche. Recenti progressi hanno ora reso possibile l'applicazione di questa utile tecnica come strumento diagnostico essenziale nell'analisi cromosomica in campo prenatale, ematologico e patologico. Dopo essere stato sottoposto a fissazione e denaturazione, il DNA bersaglio e' pronto per l'annealing con una sonda di DNA a sequenza complementare, anch'essa denaturata, marcata con una sostanza fluorescente. Terminata l'ibridazione, la sonda di DNA non legata o legata in modo aspecifico viene rimossa e il DNA viene colorato con un colorante di contrasto per essere visualizzato. Per osservare la sonda ibridata sulla sequenza bersaglio sara' quindi necessario un microscopio a fluorescenza.

Informazioni sulla sonda

Il kit FAST FISH Prenatal Enumeration Probe CytoCell e' un saggio prenatale per l'individuazione rapida delle trisomie 13 e 21 presenti rispettivamente nelle sindromi di Patau e Down. I set di sonde sono concepiti per permettere la rilevazione e quantificazione dei cromosomi 13 e 21 in nuclei in interfase di cellule di liquido amniotico non cresciute in coltura mediante FISH. Il saggio deve essere associato all'analisi del cariotipo fetale.

Specifiche della sonda

Regione sequenza unica di 13q14.2 verde
Regione sequenza unica di 21q22.13 arancione

Il set di sonde 13 e 21 e' una miscela di sonde fluorescenti di DNA marcate direttamente con fluorofori verdi e arancioni, e contengono sequenze presenti in singola copia. La sonda per il cromosoma 13 comprende il gene RB1 e i marcatori D13S1195, D13S1155 e D13S915. La sonda per il cromosoma 21 comprende i marcatori D21S270, D21S1867, D21S337, D21S1425, D21S1444 e D21S341.

Materiali forniti

Sonda: 50µl per flaconcino (5 test) o 100µl per flaconcino (10 test)
Quantità di sequenza unica di 13q14.2 verde: 144 - 180ng/test
Quantità di sequenza unica di 21q22.13 arancione: 48 - 60ng/test
Le sonde sono fornite pre-miscelate nella soluzione di ibridazione (formamide; destrano solfato; SSC) e pronte per l'uso.

Colorante di contrasto

150µl per flaconcino (15 test)
Il colorante di contrasto e' costituito da DAPI antifade (ES: 0,125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindolo)).

Avvertenze e precauzioni

1. Per uso diagnostico *in vitro*. Solo per uso professionale.
2. Quando si maneggiano le sonde e il colorante di contrasto DAPI, e' necessario indossare guanti.
3. Le miscele delle sonde contengono formamide, una sostanza teratogena. Non respirare i fumi ed evitare il contatto con la pelle. Indossare guanti e camice da laboratorio e maneggiare sotto cappa chimica. Per lo smaltimento, sciacquare con grandi quantità di acqua.
4. Il DAPI e' un potenziale cancerogeno. Maneggiare con cura, indossare guantecamiche da laboratorio. Per lo smaltimento, sciacquare con grandi quantità di acqua.
5. Lo smaltimento dei materiali pericolosi deve avvenire nel rispetto delle normative interne dell'istituzione relative allo smaltimento dei rifiuti pericolosi.

Conservazione e manipolazione

Conservare il kit in congelatore a una temperatura compresa tra -25°C e -15°C fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta. I flaconcini della sonda e del colorante di contrasto devono essere conservati al buio.

Apparecchiature necessarie ma non fornite

1. Piastra riscaldante (dotata di superficie d'appoggio e controllo accurato della temperatura fino a 80°C).
2. Micropipette a volume variabile con capacità da 1µl a 200µl e relativi puntali.
3. Bagno termostatico con controllo accurato della temperatura a 37°C e 72°C.
4. Provette da microcentrifuga (0,5ml).
5. Microscopio a fluorescenza (fare riferimento alla sezione Caratteristiche consigliate per il microscopio a fluorescenza).
6. Vaschette di Coplin in plastica o in vetro.
7. Pinzette.
8. Olio di immersione per obiettivi per microscopia a fluorescenza.
9. Centrifuga da banco.
10. Vetrini per microscopia.
11. Vetrini coprioggetto da 24x24mm.
12. Timer.
13. Incubatore a 37°C.
14. Colla tipo mastice.

Caratteristiche consigliate per il microscopio a fluorescenza

Per una visualizzazione ottimale della sonda si consiglia di utilizzare una lampada al mercurio da 100 watt e obiettivi fluorocromatici 63x o 100x. La soluzione ideale per visualizzare contemporaneamente i fluorofori verdi e arancioni e il colorante di contrasto e' il triplo filtro passabanda DAPI/FITC/TRITC. Per visualizzare contemporaneamente tutti e due i fluorofori e il DAPI e' possibile utilizzare il triplo filtro passabanda DAPI/FITC/Texas Red.

Preparazione del campione

Il kit prenatale e' concepito per essere utilizzato su amniociti non cresciuti in coltura, fissati in fissativo di Carnoy (vedere la procedura descritta di seguito). La raccolta del campione di liquido amniotico deve essere eseguita secondo il protocollo in uso nel proprio laboratorio o istituzione. Se il campione di liquido amniotico appare contaminato da sangue o di colore marrone, non deve essere utilizzato, in quanto potrebbe contenere sangue materno e, di conseguenza, fornire risultati errati.

Protocollo consigliato

Preparazione di campioni di liquido amniotico fresco per FISH:

1. Centrifugare 2 - 5ml del campione di liquido amniotico intero per 7 minuti a 180xg, rimuovere con la massima attenzione il soprannatante senza disturbare il pellet cellulare.
2. Risospendere il pellet in 2ml di KCl 0,075M. Lasciare a temperatura ambiente (TA) per 5 minuti.
3. Aggiungere 2ml di fissativo fresco (soluzione 3:1 di metanolo: acido acetico glaciale) alle cellule/soluzione ipotonica, aggiungendo il primo ml goccia a goccia mescolando costantemente. Mescolare bene.
4. Centrifugare la sospensione per 5 minuti a 280xg, rimuovere con la massima attenzione il soprannatante e risospendere il pellet in 2ml di fissativo fresco.
5. A questo punto della procedura i campioni fissati possono essere conservati in freezer a una temperatura di -20°C.
6. Se il campione non deve essere congelato, centrifugare la provetta a 280xg per 5 minuti. Rimuovere la maggiore quantità possibile di soprannatante senza disturbare il pellet cellulare. Agitare la provetta dando colpi col dito per risospendere il pellet nella ridotta quantità di liquido rimasto.
7. Per preparare i vetrini per la FISH, collocare la sospensione cellulare direttamente sul vetrino. Lasciare asciugare all'aria.

Pretrattamento raccomandato per i vetrini:

1. Immergere il vetrino preparato a partire da amniociti non cresciuti in coltura in SSC2X per 2 minuti a 37°C.

- Collocare il vetrino in una soluzione di lavoro di pepsina appena preparata (5mg di pepsina aggiunti a 100ml di HCl 0,01M) per 13 minuti a 37°C.
- Immergere il vetrino in tampone fosfato salino (PBS) a TA per 5 minuti.
- Immergere il vetrino in una soluzione post-fissazione (formaldeide allo 0,95%: 1,0 ml di formaldeide al 37%, 0,18g di MgCl₂ e 39,0ml di PBS) per 5 minuti a TA.
- Immergere il vetrino in PBS a TA per 5 minuti.
- Immergere il vetrino in una soluzione di etanolo al 70% a TA. Lasciare il vetrino nel lavaggio in etanolo per 1 minuto.
- Rimuovere il vetrino dalla soluzione di etanolo al 70%. Ripetere il passaggio 6 con etanolo all'85% e poi con etanolo al 100%.
- Lasciare asciugare all'aria.

Protocollo della FISH

(Nota: limitare l'esposizione della sonda alle luci del laboratorio durante l'intera procedura)

Preparazione del vetrino (se il vetrino è stato sottoposto a pretrattamento come descritto nel protocollo riportato sopra, saltare questo passaggio)

- Posizionare il campione cellulare su un vetrino per microscopia. Lasciare asciugare.
- Immergere il vetrino in SSC2x per 2 minuti a TA senza agitazione.
- Eseguire la disidratazione in una serie di soluzioni di etanolo a concentrazioni crescente (70%, 85% e 100%), con immersioni di 2 minuti ciascuna a TA.
- Lasciare asciugare il vetrino.

Pre-denaturazione

- Rimuovere la sonda dal congelatore e lasciarla riscaldare a TA.
- Accertarsi che la soluzione della sonda sia miscelata in modo uniforme mediante l'uso di una pipetta.
- Pipettare 10µl di sonda per test e inserirli in una provetta da microcentrifuga. Riporre velocemente la sonda non utilizzata nel congelatore.
- Pre-riscaldare la sonda e il vetrino con il campione su una piastra riscaldante a 37°C (+/- 1°C) per 5 minuti.
- Collocare 10µl di miscela della sonda sul campione e cellulare e coprire delicatamente con un vetrino coprioggetto. Sigillare con una colla tipo mastice e attendere che la colla si asciughi completamente.

Denaturazione

- Denaturare contemporaneamente il campione e la sonda riscaldando il vetrino su una piastra riscaldante a 75°C (+/- 1°C) per 2 minuti.

Ibridazione

- Disporre il vetrino in una camera umida, non permeabile alla luce, a 37°C (+/- 1°C) per 2 ore.

Lavaggi post-ibridazione

- Rimuovere accuratamente il vetrino coprioggetto e qualsiasi residuo di colla.
- Immergere il vetrino in SSC0,4x (pH 7,0) a 72°C (+/- 1°C) per 2 minuti senza agitazione.
- Scolare il vetrino e immergerlo in SSC2x, Tween-20 0,05% (pH 7,0) a TA per 30 secondi senza agitazione.
- Scolare il vetrino e applicare 10µl di DAPI antifade su ciascun campione.
- Coprire con un vetrino coprioggetto, rimuovere eventuali bolle e attendere lo sviluppo del colore per 10 minuti lasciando il vetrino al buio.
- Esaminare con un microscopio a fluorescenza.

Stabilità dei vetrini ultimati

I vetrini sottoposti a FISH restano analizzabili per circa 1 mese se conservati al buio a TA o inferiore.

Raccomandazioni per la procedura

- L'eccessivo riscaldamento e l'invecchiamento dei vetrini sono sconsigliati in quanto potrebbero ridurre la fluorescenza del segnale.
- Le condizioni di ibridazione potrebbero essere influenzate negativamente dall'impiego di reagenti diversi da quelli forniti o consigliati da Cytocell Ltd.
- È fortemente consigliato l'uso di un termometro calibrato per la misurazione delle temperature delle soluzioni, dei bagni termostati e degli incubatori in quanto queste temperature sono di fondamentale importanza per il funzionamento ottimale del prodotto.
- Le concentrazioni, il pH e la temperatura dei lavaggi sono di fondamentale importanza in quanto condizioni di stringenza blanda possono favorire un legame aspecifico della sonda, mentre condizioni di stringenza troppo elevate possono determinare l'assenza di segnale.
- Una denaturazione incompleta può determinare l'assenza di segnale, mentre una denaturazione eccessiva può produrre un legame aspecifico.

Interpretazione dei risultati

La sensibilità e la specificità della FISH dipendono da un numero di parametri che variano da un tipo cellulare all'altro; da una sonda all'altra; a seconda delle tecniche cellulari utilizzate e all'interno del singolo laboratorio. Pertanto, per l'uso del kit prenatale è consigliabile che ogni laboratorio adoperi il proprio materiale standard e stabilisca i propri valori soglia per il saggio FISH per determinare quali campioni presentano un cariotipo normale e quali sono aneuploidi (per indicazioni contattare CytoCell).

Risultati attesi

Una cellula normale deve mostrare 2 segnali verdi e 2 arancioni (2V, 2A). Le cellule con trisomia 13 devono mostrare 3 segnali verdi e 2 arancioni (3V, 2A). Le cellule con trisomia 21 devono mostrare 2 segnali verdi e 3 arancioni (2V, 3A).

Limitazioni

Questo test non è in grado di rilevare anomalie strutturali dei cromosomi o mosaicismi. Inoltre, non permette di individuare anomalie numeriche dei cromosomi diverse da quelle oggetto del saggio. Il test non è indicato per valutare il rischio di trisomia. La referenziazione e l'interpretazione dei risultati della FISH devono rispettare gli standard professionali di pratica medica e devono tenere conto delle altre informazioni cliniche e diagnostiche. Questo kit va utilizzato come strumento complementare ad altri test diagnostici di laboratorio e non devono essere prese decisioni terapeutiche sulla base del solo risultato della FISH.

Informazioni aggiuntive

Per informazioni aggiuntive sul prodotto contattare il Reparto di Assistenza Tecnica CytoCell.
T: +44 (0)1223 294048
E: techsupport@cytozell.com
W: www.ogt.com

DEUTSCH

Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) ist eine Technik, mit der DNA-Sequenzen auf Metaphase-Chromosomen oder Interphase-Kernen von fixierten zytogenetischen Proben nachgewiesen werden. Diese Technik, bei der die verwendeten DNA-Sonden an vollständige Chromosomen oder an einzelne, eindeutige Sequenzen hybridisieren, dient als leistungsstarke Ergänzung zur klassischen Zytogenetik. Dank der jüngsten Entwicklungen kann diese nützliche Technik nun auch als ein wesentliches diagnostisches Werkzeug für pränatale, hämatologische und pathologische Chromosomenanalysen eingesetzt werden kann. Die Ziel-DNA lagert sich dabei nach Fixieren und Denaturieren an eine ebenso denaturierte fluoreszenzmarkierte DNA-Sonde mit komplementärer Sequenz an. Nach der Hybridisierung werden nicht gebundene und nicht spezifisch gebundene DNA-Sonden entfernt und die DNA zum Sichtbarmachen gegengefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop lässt sich dann die hybridisierte Sonde am Zielmaterial erkennen.

Sondeninformation

Das CytoCell FAST FISH Prenatal Enumeration Probe Kit ist ein pränataler Assay zum schnellen Nachweisen der Trisomien 13 und 21, die beim Patau- bzw. Down-Syndrom vorliegen. Die Sondenätze sind zum Nachweisen und Quantifizieren der Chromosomen 13 und 21 der Interphase-Kerne von nicht kultivierten Fruchtwasserzellen durch die FISH Technik ausgelegt. Zusätzlich zu diesem Assay sollte eine Analyse des fetalen Karyotypen durchgeführt werden.

Sondenspezifikation

13q14.2 einmalige Sequenz grünen
21q22.13 einmalige Sequenz orangen

Bei den Sondenätzen 13 und 21 handelt es sich um Mischungen von direkt markierten, grün und orange fluoreszierenden DNA-Sonden, die einmalige Sequenzen enthalten. Die Chromosom-13-Sonde enthält ein RB1-Gen sowie die Marker D13S1195, D13S1155 und D13S915. Die Chromosom-21-Sonde enthält die Marker D21S270, D21S1867, D21S337, D21S1425, D21S1444 und D21S341.

Bestandteile des Kits

Sonde: 50µl pro Röhrchen (5 Tests) oder 100µl pro Röhrchen (10 Tests)
Menge an 13q14.2 einmalige Sequenz grünen: 144 – 180ng/test.
Menge an 21q22.13 einmalige Sequenz orangen: 48 – 60ng/test.
Die Sonden werden vorgemischt und gebrauchsfertig in Hybridisierungslösung geliefert (Formamid, Dextransulfat, SSC).

Farbstoff für die Gegenfärbung: 150µl pro Röhrchen (15 Tests)

Der Farbstoff für die Gegenfärbung ist DAPI Antifade (ES: 0,125µg/ml DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol)).

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

- Zur Verwendung in der *In-vitro*-Diagnostik. Nur für die Verwendung durch Fachkräfte bestimmt.
- Beim Umgang mit DNA-Sonden und dem DAPI Farbstoff Handschuhe tragen.
- Sondenmischungen enthalten Formamid, das Teratogen ist. Keine Dämpfe einatmen und Hautkontakt vermeiden. Handschuhe und Labormantel tragen und unter einer Abzugshaube arbeiten. Bei der Entsorgung mit viel Wasser nachspülen.
- DAPI ist ein potenzielles Karzinogen. Vorsichtig damit umgehen, Handschuhe und Labormantel tragen. Bei der Entsorgung mit viel Wasser nachspülen.
- Alle Gefahrstoffe sollten gemäß den Leitlinien Ihrer Einrichtung zur Entsorgung von Sondermüll entsorgt werden.

Lagerung und Handhabung

Das Kit sollte bis zum Verfallsdatum, welches auf dem Etikett angegeben ist, in einem Gefrierschrank bei einer Temperatur zwischen -25°C und -15°C gelagert werden. Die Durchstechflaschen mit den Sonden und dem Farbstoff werden lichtgeschützt aufbewahrt.

Benötigte, aber nicht mitgelieferte Laborgeräte

- Heizplatte (mit stabiler Platte und genauer Temperatursteuerung bis 80°C).
- Mikropipetten mit unterschiedlichen Volumen von 1µl - 200µl.
- Wasserbad mit genauer Temperatursteuerung bei 37°C und 72°C.
- Mikrozentrifugenröhrchen (0,5ml).
- Fluoreszenzmikroskop (siehe auch „Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop“).
- Coplin-Färbetrog aus Kunststoff oder Glas.
- Pinzette.
- Für Fluoreszenzobjektive geeignetes Immersionsöl.
- Tischzentrifuge.
- Objektträger für das Mikroskop.
- 24x24mm Deckgläser.
- Zeituhr.
- 37°C-Inkubator.
- Gummilösung zum Versiegeln der Deckglasränder.

Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop

Zur bestmöglichen Beobachtung der Probe empfehlen wir eine 100-Watt-Quecksilberdampfampe und Plan Achromat Objektiv mit 63-facher oder 100-facher Vergrößerung. Das Dreifach-Bandpassfilter DAPI/FITC/TRITC ist für die simultane Beobachtung der grünen und orangen Fluorophore sowie der Gegenfärbung optimal geeignet. Das Dreifach-Bandpassfilter DAPI/FITC/Texasrot kann auch für die simultane Beobachtung beide Fluorophore und DAPI verwendet werden.

Probeneignung und Entnahme

Das Pränatalkit ist für die Verwendung an nicht kultivierten Amniocyten, die in Carnoy's Fixativ fixiert sind, ausgelegt (siehe folgendes Verfahren). Die Entnahme von Fruchtwasserproben sollte gemäß den Richtlinien des jeweiligen Labors oder der jeweiligen Einrichtung erfolgen. Fruchtwasserproben, die blutig oder braun scheinen, sind nicht zu verwenden, da sie Blut der Mutter enthalten könnten und somit die Ergebnisse verfälscht werden könnten.

Empfohlenes Protokoll

Vorbereitung von frischen Fruchtwasserproben für FISH:

- Zentrifugieren Sie 2 - 5ml der gesamten Fruchtwasserprobe 7 Minuten lang bei 180xg; entfernen Sie dann vorsichtig den Überstand, ohne das Zellpellet aufzuwirbeln.
- Resuspendieren Sie das Zellpellet in 2ml 0,075M KCl. Für 5 Minuten bei Zimmertemperatur stehen lassen.
- Geben Sie 2ml frisches Fixativ (3:1 – Methanol:Eisessig) zu den Zellen/der hypotonischen Lösung, wobei Sie den ersten ml tropfenweise unter ständigem Rühren zugeben. Mischen Sie das Ganze gut.
- Zentrifugieren Sie die Suspension für 5 Minuten bei 280xg, entfernen Sie den Überstand vorsichtig und resuspendieren Sie das Pellet in 2ml frischem Fixativ.
- Fixierte Proben können in diesem Zustand bei -20°C in einem Gefrierschrank aufbewahrt werden.
- Wenn die Probe nicht eingefroren werden soll, zentrifugieren Sie das Röhrchen bei 280xg für 5 Minuten. Entfernen Sie so viel Überstand wie möglich, ohne dabei das Zellpellet aufzuwirbeln. Schnippen Sie mit dem Finger gegen das Röhrchen, um das Pellet in der geringen Menge verbleibender Flüssigkeit zu resuspendieren.
- Zur Vorbereitung von Objektträgern für FISH tropfen Sie die Zellsuspension direkt auf den Objektträger. An der Luft trocknen lassen.

Empfohlene Vorbehandlung des Objektträgers:

- Tauchen Sie den aus nicht kultivierten Amniocyten gewonnenen Objektträger 2 Minuten bei 37°C in 2xSSC.
- Legen Sie den Objektträger dann 13 Minuten lang bei 37°C in frisch vorbereitete Pepsin-Arbeitslösung (5mg Pepsin werden in 100ml 0,01M HCl gegeben).
- Tauchen Sie den Objektträger bei Zimmertemperatur für 5 Minuten in phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS).
- Tauchen Sie den Objektträger für 5 Minuten bei Zimmertemperatur in Nachfixierungslösung (0,95% Formaldehyd; 1,0ml 37% Formaldehyd, 0,18g MgCl₂ und 39,0ml PBS).
- Tauchen Sie den Objektträger bei Zimmertemperatur für 5 Minuten in PBS.
- Tauchen Sie den Objektträger bei Zimmertemperatur in 70%iges Ethanol. Lassen Sie den Objektträger 1 Minute lang in der Ethanol-Waschlösung stehen.
- Nehmen Sie den Objektträger aus dem 70%igen Ethanol. Wiederholen Sie Schritt 6 mit 85%igem Ethanol und dann mit 100%igem Ethanol.
- An der Luft trocknen lassen.

FISH-Protokoll

(Hinweis: Bitte stellen Sie sicher, dass die Sonde nur in begrenztem Umfang der Strahlung von Laborlampen ausgesetzt ist.)

Vorbereitung des Objektträgers (überspringen Sie diesen Schritt, wenn der Objektträger gemäß dem obigen Protokoll vorbehandelt wurde)

1. Zellprobe auf gereinigten Mikroskop-Objektträger aufzutropfen Trocknen lassen.
 2. Objektträger bei Zimmertemperatur 2 Minuten lang ohne Schütteln in 2xSSC eintauchen.
 3. Entwässern in Alkoholreihe (70%, 85% und 100%), jeweils 2 Minuten bei Zimmertemperatur.
 4. Trocknen lassen.
- ### Vordenaturierung
5. Entnehmen Sie die Probe aus dem Gefrierschrank und lassen Sie sie Raumtemperatur annehmen.
 6. Stellen Sie sicher, dass die Probenlösung gleichmäßig mit einer Pipette gemischt wird.
 7. Entnehmen Sie pro Test 10µl der Probe und füllen Sie sie in ein Mikrozentrifugengefäß um. Stellen Sie die restliche Probe schnell wieder zurück in den Gefrierschrank.
 8. Sonde und Probenobjektträger zum Vorwärmen 5 Minuten lang auf eine 37°C (+/- 1°C) warme Heizplatte stellen.
 9. 10µl Sondenmischung auf die Zellprobe aufzutropfen und Deckglas sorgfältig auflegen. Mit Gummikleber-Lösung versiegeln und vollständig trocknen lassen.

Denaturierung

10. Probe und Sonde gleichzeitig durch 2 Minuten langes Erwärmen des Objektträgers auf einer 75°C (+/- 1°C) warmen Heizplatte denaturieren.

Hybridisierung

11. Den Objektträger 2 Stunden lang bei 37°C (+/- 1°C) in eine feuchte, lichtdichte Kammer geben.

Waschen nach der Hybridisierung

12. Deckglas und alle Kleberspuren vorsichtig entfernen.
13. Objektträger 2 Minuten lang bei 72°C (+/- 1°C) in 0,4xSSC (pH 7,0) waschen.
14. Objektträger abtropfen lassen und 30 Sekunden bei Zimmertemperatur in 2xSSC, 0,05% Tween-20 (pH 7,0), waschen.
15. Objektträger abtropfen lassen und 10µl DAPI Antifade zu jeder Probe geben.
16. Mit einem Deckglas abdecken, die Luftblasen entfernen und die Farbe 10 Minuten lang im Dunkeln entwickeln lassen.
17. Unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachten.

Stabilität der fertigen Objektträger

Objektträger mit FISH-Probem können bis zu einem Monat lang analysiert werden, wenn sie im Dunkeln bei oder unter Zimmertemperatur aufbewahrt werden.

Empfehlungen zur Durchführung

1. Wärmebehandlung oder Reifung der Proben ist nicht empfehlenswert, da dies zu einer verminderten Signalfluoreszenz führen kann.
2. Durch die Verwendung von Reagenzien, die nicht von CytoCell Ltd. empfohlen sind, können die Hybridisierungsbedingungen negativ beeinflusst werden.
3. Es wird dringend empfohlen, zur Temperaturmessung von Lösungen, Wasserbädern und Inkubatoren ein geeichtes Thermometer zu verwenden, da diese Temperaturen für die optimale Leistung des Produkts ausschlaggebend sind.
4. Die Konzentration der Waschlösungen, pH und Temperatur sind wichtig, da niedrig stringente Bedingungen zu nicht spezifischer Bindung der Sonde führen kann und zu hohe Stringenz zum Verlust des Signals.
5. Unvollständige Denaturierung kann zu einem Verlust des Signals führen und übermäßige Denaturierung kann zu nicht spezifischer Bindung der Sonde führen.

Interpretation der Ergebnisse

Die Empfindlichkeit und Spezifität des FISH Tests hängt von einer Reihe von Parametern ab, die von Zelltyp zu Zelltyp, von Sonde zu Sonde sowie entsprechend den verwendeten Zelltechniken und dem jeweiligen Labor unterschiedlich sind. Wir empfehlen daher, dass das Pränatalkit verwendet wird und dass jedes Labor seine eigenen Standardmaterialien verwenden und seine eigenen Cutoff-Werte für karyotypisch normale und aneuploide Zellproben für den FISH Assay bestimmen sollte (erfragen Sie Richtlinien direkt von CytoCell).

Zu erwartende Ergebnisse

Eine normale Zelle sollte 2 grüne und 2 rote Signale (2G, 2O) aufweisen. Zellen mit Trisomie 13 sollten 3 grüne und 2 orange Signale (3G, 2O) aufweisen. Zellen mit Trisomie 21 sollten 2 grüne und 3 orange Signale (2G, 3O) aufweisen.

Einschränkungen

Dieser Test weist weder strukturelle Chromosomenanomalien noch Mosaizismen nach. Er weist auch keine numerischen Aberrationen von Chromosomen nach, auf die nicht getestet wird.

Der Test ist nicht zur Einschätzung des Risikos einer Trisomie geeignet. Protokollierung und Interpretation der FISH-Tests müssen den fachlichen Standards für die Praxis entsprechen und unter Berücksichtigung anderer klinischer und diagnostischer Informationen erfolgen.

Der Test ist als Ergänzung zur klassischen Zytogenetik gedacht. Daher sollten therapeutische Maßnahmen nicht allein auf Grundlage der FISH-Ergebnisse eingeleitet werden.

Weitere Informationen:

Weitere Produktinformationen erhalten Sie vom Technischen Kundendienst von CytoCell.

T: +44 (0)1223 294048

E: techsupport@cytozell.com

W: www.ogt.com

ESPAÑOL

La hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH) es una técnica que permite detectar secuencias de ADN en cromosomas metafásicos o núcleos en interfase de muestras citogenéticas fijadas. La técnica emplea sondas de ADN que se hibridan con cromosomas enteros o con secuencias únicas y es una poderosa prueba complementaria para la citogenética clásica. Los recientes avances han conseguido que esta valiosa técnica pueda aplicarse ahora como herramienta esencial de diagnóstico para el análisis de cromosomas prenatal, hematológico y patológico. El ADN diana después de ser fijado y desnaturalizado queda listo para hibridarse con una sonda de ADN, también desnaturalizada y marcada con fluorescencia, de secuencia complementaria. Después de la hibridación, la sonda de ADN unida inespecíficamente y no unida se lava y posteriormente se aplica una contratinción al ADN para su visualización. El uso de un microscopio de fluorescencia permite la visualización de la sonda hibridada en el material diana.

Información sobre las sondas

El kit CytoCell FAST FISH Prenatal Enumeración Probe es un análisis prenatal para la detección rápida de las trisomías 13 y 21 que se encuentran en los síndromes de Patau y Down respectivamente. Los conjuntos de sondas han sido diseñados para la detección y la cuantificación mediante FISH de los cromosomas 13 y 21 de los núcleos en interfase de las células de líquido amniótico no cultivadas. La prueba debe emplearse junto con el análisis cariotípico fetal.

Especificaciones de las sondas

Región secuencia única 13q14.2 verde

Región secuencia única 21q22.13 naranja

El conjunto de sondas 13 y 21 es una mezcla de sondas de ADN fluorescentes directamente marcadas de color verde y naranja que contienen secuencias únicas. La sonda del cromosoma 13 incluye el gen RB1 además de los marcadores D13S1195, D13S1155 y D13S915. La sonda del cromosoma 21 incluye los marcadores D21S270, D21S1867, D21S337, D21S1425, D21S1444 y D21S341.

Material incluido

Sonda: 50µl por vial (5 análisis) o 100µl por vial (10 análisis)

Cantidad de secuencia única 13q14.2 verde sonda: 144 – 180ng/análisis

Cantidad de secuencia única 21q22.13 naranja sonda: 48 – 60ng/análisis

Las sondas se presentan premezcladas en la solución de hibridación (formamida; sulfato de dextrano; SSC) y listas para usar.

Contratinción: 150µl por vial (15 análisis)

La tinción se realiza con DAPI Antifade (ES: 0,125µg/ml de DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol)).

Advertencias y precauciones

1. Parar diagnóstico *in vitro*. Sólo para uso profesional.
2. Utilizar guantes al manipular las sondas de ADN y la contratinción DAPI.
3. Las soluciones de las sondas contienen formamida, que es teratogena; no respire los vapores y evite el contacto con la piel. Utilice guantes y bata de laboratorio con una campana de ventilación. Al desechar, lave abundantemente con agua.
4. El DAPI puede producir cáncer. Manipúlelo con cuidado; utilice guantes y bata de laboratorio. Al desechar, lave abundantemente con agua.
5. Las sustancias peligrosas deben eliminarse de acuerdo con las directrices de su institución sobre la eliminación de residuos peligrosos.

Almacenamiento y manipulación

El kit debe almacenarse en un congelador a una temperatura comprendida entre -25°C y -15°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit. Los viales de las sondas y de la contratinción deben almacenarse en un lugar oscuro.

Material necesario pero no incluido

1. Placa calefactora (con una placa estable y un control de temperatura preciso hasta 80°C).
2. Micropipetas y puntas de volumen variable (de 1µl a 200µl).
3. Baño maría con control preciso de temperatura a 37°C y 72°C.
4. Tubos de microcentrifugación (0,5ml).
5. Microscopio de fluorescencia (véase la sección Recomendaciones sobre el microscopio de fluorescencia).
6. Cubetas Coplin de cristal y de plástico.
7. Pinzas.
8. Aceite de inmersión para objetivos de microscopio de fluorescencia.
9. Centrífuga sobremesa.
10. Portaobjetos para microscopio.
11. Cubreobjetos de 24x24mm.
12. Temporizador.
13. Incubadora a 37°C.
14. Pegamento de solución de caucho.

Recomendaciones sobre el microscopio de fluorescencia

Para una visualización óptima de la sonda, se recomienda utilizar una lámpara de mercurio de 100 vatios y objetivos Plan-Apochromat de 63 o 100 aumentos. El triple filtro pasabanda DAPI/FITC/TRITC es la mejor solución para visualizar simultáneamente los fluorocromos naranja y verde y la contratinción. El triple filtro pasabanda DAPI/FITC/Texas Red puede emplearse también para visualizar simultáneamente ambos fluorocromos y DAPI.

Preparación de las muestras

El kit prenatal está diseñado para su uso con amniocitos no cultivados fijados con fijador de Carnoy (véase el procedimiento más abajo). La obtención de las muestras de líquido amniótico debe realizarse de conformidad con las directrices de la institución.

Las muestras de líquido amniótico que presenten un aspecto sanguinolento o marrón no deben utilizarse, ya que pueden contener sangre materna y pueden producir resultados incorrectos.

Protocolo propuesto

Preparación de muestras de líquido amniótico recientes para FISH:

1. Centrifugue 2 - 5ml extraídos de la muestra total del líquido amniótico durante 7 minutos a 180xg, extraiga con cuidado el sobrenadante sin afectar al sedimento celular.
2. Resuspenda el sedimento en 2ml de KCl a 0,075M. Deje reposar a temperatura ambiente (TA) durante 5 minutos.
3. Añada 2ml de fijador reciente (metanol:ácido acético glacial en proporción 3:1) a las células/solución hipotónica, agregando el primer ml gota a gota mientras se sigue mezclando sin parar. Mezcle bien.
4. Centrifugue la suspensión durante 5 minutos a 280xg, retirando con cuidado el sobrenadante y resuspendiendo el sedimento en 2ml de fijador reciente.
5. En este punto, las muestras fijadas pueden almacenarse en un congelador a -20°C.
6. Si la muestra no va a congelarse, centrifugue el tubo a 280xg durante 5 minutos. Retire todo el sobrenadante que pueda sin afectar al sedimento celular. Sacuda el tubo para resuspender el sedimento en la pequeña cantidad de líquido restante.
7. Para preparar los portaobjetos para FISH, vierta la suspensión celular directamente sobre el portaobjetos. Deje que se seque al aire.

Pretratamiento del portaobjetos recomendado:

1. Sumerja el portaobjetos preparado a partir de amniocitos no cultivados en 2xSSC durante 2 minutos a 37°C.
2. Coloque el portaobjetos en solución de trabajo de pepsina recién preparada (5mg de pepsina añadidos a 100ml de HCl a 0,01M) durante 13 minutos a 37°C.
3. Sumerja el portaobjetos en solución salina con tampón fosfato (PBS) a TA durante 5 minutos.
4. Sumerja el portaobjetos en solución de posfijación (formaldehído a 0,95%: 1,0ml de formaldehído a 37%, 0,18g de MgCl₂ y 39,0ml de PBS) durante 5 minutos a TA.
5. Sumerja el portaobjetos con PBS a TA durante 5 minutos.
6. Sumerja el portaobjetos en etanol al 70% a TA. Deje el portaobjetos sumergido en el baño de etanol durante 1 minuto.
7. Retire el portaobjetos del etanol al 70%. Repita el paso 6 con etanol al 85%, seguido de etanol al 100%.
8. Deje secar al aire.

Protocolo para la FISH

(Observación: asegúrese de limitar la exposición de la sonda a las luces del laboratorio en todo momento)

Preparación de los portaobjetos (omite este paso si el portaobjetos ha sido pretratado según el protocolo anterior)

1. Vierta la muestra de células sobre un portaobjetos. Deje secar.
2. Sumerja el portaobjetos en 2xSSC durante 2 minutos a TA sin agitar.
3. Deshidrate en soluciones graduales de etanol (70%, 85% y 100%), durante 2 minutos en cada una a TA.
4. Deje secar.

Antes de la desnaturalización

5. Retire la sonda del congelador y deje que alcance la temperatura ambiente.

- Asegúrese de que la solución de la sonda quede homogéneamente mezclada con una pipeta.
- Retire 10µl de la sonda en cada prueba y transféralo a un tubo de microcentrifuga. Vuelva a colocar la solución que quede en la sonda al congelador.
- Pre caliente la sonda y el portaobjetos de la muestra en una placa calefactora a 37°C (+/- 1°C) durante 5 minutos.
- Vierta 10µl de la solución de la sonda sobre la muestra de células y coloque cuidadosamente un cubreobjetos. Selle con pegamento de solución de caucho y deje que el pegamento se seque completamente.

Desnaturalización

- Desnaturalice la muestra y la sonda simultáneamente calentando el porta sobre la placa calefactora a 75°C (+/- 1°C) durante 2 minutos.

Hibridación

- Introduzca el porta en un recipiente húmedo y opaco a 37°C (+/- 1°C) y déjelo 2 horas.

Lavados posthibridación

- Quite el cubreobjetos y los restos del pegamento cuidadosamente.
- Sumerja el portaobjetos en 0,4xSSC (pH 7,0) a 72°C (+/- 1°C) durante 2 minutos sin agitar.
- Deje escurrir el portaobjetos y sumérjalo en 2xSSC, 0,05% de Tween-20 (pH 7,0) a TA durante 30 segundos sin agitar.
- Escorra el portaobjetos y añada 10µl de DAPI antifade sobre cada muestra.
- Coloque un cubreobjetos, extraiga las burbujas y deje revelar el color en un lugar oscuro durante 10 minutos.
- Visualice con un microscopio de fluorescencia.

Estabilidad de los portaobjetos terminados

Los portaobjetos sometidos a la técnica FISH pueden analizarse durante 1 mes si se conservan en un lugar oscuro y a TA o inferior.

Recomendaciones para los procedimientos

- No se recomienda calentar ni dejar envejecer los portaobjetos ya que se podría reducir la fluorescencia de la señal.
- Las condiciones de hibridación pueden verse afectadas negativamente si se emplean reactivos distintos de los suministrados o recomendados por CytoCell Ltd.
- Se recomienda encarecidamente el uso de un termómetro de precisión para medir las temperaturas de soluciones, baños maría e incubadores ya que estas temperaturas son cruciales para un resultado óptimo del producto.
- Las concentraciones de los lavados, el pH y las temperaturas son importantes ya que unas condiciones poco rigurosas pueden provocar una hibridación inespecífica de la sonda y unas condiciones demasiado rigurosas pueden derivar en una falta de señal.
- Una desnaturalización incompleta puede provocar falta de señal y una desnaturalización excesiva también puede originar una hibridación inespecífica.

Interpretación de los resultados

La sensibilidad y la especificidad de la FISH dependen de varios parámetros, que difieren dependiendo del tipo celular, de la sonda, de las técnicas celulares y del laboratorio en que se realice. Por lo tanto, a la hora de emplear el kit prenatal, se recomienda que cada laboratorio prepare su propio material estándar y que determine sus propios valores de corte de la prueba FISH para las muestras cariotípicamente normales y aneuploides (si desea que se le faciliten pautas, póngase en contacto con CytoCell).

Resultados esperados

Una célula normal debe mostrar 2 señales verdes y 2 naranjas (2V, 2N). Las células con trisomía del cromosoma 13 deben mostrar 3 señales verdes y 2 naranjas (3V, 2N). Las células con trisomía del cromosoma 21 deben mostrar 2 señales verdes y 3 naranjas (2V, 3N).

Limitaciones






Esta prueba no detecta las anomalías cromosómicas estructurales ni el mosaicismo. Tampoco detecta las anomalías numéricas de los cromosomas que no se analizan. La prueba no está diseñada para valorar el riesgo de trisomía. Los informes y la interpretación de los resultados de los análisis FISH deben respetar las normas de la práctica profesional y deben tomar en consideración otros informes clínicos y diagnósticos. Este kit se ha concebido como una prueba complementaria a otros análisis de laboratorio y no deben tomarse medidas terapéuticas basándose únicamente en el resultado de la FISH.

Información adicional

Si desea obtener información adicional sobre el producto, póngase en contacto con el Departamento de soporte técnico de CytoCell.
T: +44 (0)1223 294048
E: techsupport@cytoCELL.com
W: www.ogt.com

References/Bibliographie/Bibliographia/Literatur/Bibliografía

- Lejeune *et al.*, C. R. Acad. Sci. 1959; 248: 1721-1722
- Penrose *et al.*, J. Genet. 1933; 27: 219-224
- <http://www.omim.org/entry/190685>
- <http://ghr.nlm.nih.gov/condition/trisomy-13>

REF	EN: Catalogue number DE: Bestellnummer FR: Référence du catalogue IT: Numero di catalogo ES: Número de catálogo
IVD	EN: <i>In vitro</i> diagnostic device DE: <i>In-vitro</i> -Diagnostikum FR: Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> IT: Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i> ES: Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>
LOT	EN: Batch code DE: Ch.-B. FR: Code du lot IT: Codice lotto ES: Código de lote
	EN: Consult instructions for use DE: Gebrauchsanweisung beachten FR: Consulter la notice d'utilisation IT: Consultare le istruzioni per l'uso ES: Consulte las instrucciones de uso
	EN: Manufacturer DE: Hersteller FR: Fabricant IT: Prodotto da ES: Fabricante
	EN: Use by DE: Haltbarkeitsdatum FR: A utiliser avant IT: Scadenza ES: Fecha de caducidad
	EN: Temperature limitation DE: Temperaturbegrenzung FR: Limites de température IT: Limiti di temperatura ES: Limitación de temperatura
	EN: Sufficient for <n> tests DE: Ausreichend für <n> Tests FR: Suffisant pour <n> tests IT: Sufficiente per <n> test ES: Válido para <n> análisis
CONT	EN: Contents DE: Inhalt FR: Contenu IT: Contenuto ES: Contenido

Patents and Trademarks

CytoCell is a registered trademark of CytoCell Ltd.



CytoCell Ltd.
Oxford Gene Technology,
418 Cambridge Science Park,
Milton Road,
Cambridge, CB4 0PZ, UK
T: +44(0)1223 294048
F: +44(0)1223 294986
E: probes@cytoCELL.com
W: www.ogt.com