



A Sysmex Group Company



## Instructions For Use

REF: LPA 004

### Prenatal 18 Enumeration Probe kit



PROFESSIONAL USE ONLY

ENGLISH/FRANÇAIS/ITALIANO/DEUTSCH/ESPAÑOL

Further information available at [www.cytocell.com](http://www.cytocell.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

Cytocell's prenatal Fluorescence *In Situ* Hybridisation (FISH) 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 chromosome 18 in interphase nuclei of uncultured amniotic fluid cells by FISH. The assay should be used in conjunction with foetal karyotype analysis.

Trisomy of chromosome 18, resulting in Edwards syndrome, occurs in around 1 in 6000-8000 live births with a female sex bias<sup>1</sup>. The clinical findings are variable, though many exhibit growth delay, heart defects and craniofacial anomalies, as well as possible limb and kidney abnormalities<sup>2</sup>.

#### Probe Specification

18 centromere, 18p11.1 – q11.1 (D18Z1) Blue



The 18 centromere blue probe is a directly labelled fluorescent DNA probe specific for the alpha satellite DNA sequences at the D18Z1 region of the chromosome 18.

#### Materials Provided

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

Amount of blue 18 centromere (D18Z1) probe: 112 – 140ng/test

The probe is provided premixed in hybridisation solution (Formamide; Dextran Sulphate; SSC) and is 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 Aquarius® 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 blue fluorophore has specificity to the Aqua and DEAC spectrum (single bandpass Aqua or DEAC filter is required). The triple bandpass filter DAPI/FITC/Texas Red can be used to view the blue fluorophore 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 1 hour 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 MgCl<sub>2</sub> 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) overnight.

DS118/CE v007.00/2019-04-30 (A005 v3)

## 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.

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 two blue signals (2B). Cells with trisomy 18 should show 3 blue signals (3B).

## 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.cytocell.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, dénaturée 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

La sonde du chromosome 18 est un test prénatal permettant la détection de la trisomie 18 présente dans le syndrome de Down. La sonde est conçue pour détecter et quantifier le chromosome 18 des noyaux interphasiques des cellules de liquide amniotique non cultivées par FISH. Le test doit être effectué en liaison avec l'analyse du caryotype fœtal.

## Caractéristiques de la sonde

Sonde de la région centromère 18 a-satellite 18p11.1 – q11.1 (D18Z1) en bleu

La sonde du chromosome 18 ADN fluorescent bleu directement marquée est spécialement conçue pour les séquences d'ADN alpha-satellite dans la région D18Z du chromosome 18.

## Conditionnement

**Sonde** : 50µl par tube (5 tests) ou 100µl par tube (10 tests)

Quantité de sonde centromère 18 a-satellite (D18Z1) en bleu: 112 – 140ng/test

La sonde est fournie pré-mélangée prête-à-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-phénylindole)).

## 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 Aquarius® 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. Pinces.
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 fluorochrome bleu a une spécificité par rapport au spectre Aqua ou DEAC (un filtre Aqua ou DEAC est requis). Le filtre triple bande DAPI/FITC/Texas Red permet la visualisation des 3 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 :

1. Immerger le échantillon préparés à partir d'amniocytes non cultivés dans du tampon 2xSSC pendant 2 minutes à 37°C.
2. Mettre le échantillon dans une solution de pepsine fraîchement préparée (5mg de pepsine ajoutée dans 100ml de 0,01M HCl) pendant 13 minutes à une température de 37°C.
3. Immerger le échantillon dans une solution saline tamponnée au phosphate pendant 5 minutes à TA.
4. Immerger le échantillon dans la solution post-fixation (0,95% de formaldéhyde : 1,0ml de 37% de formaldéhyde, 0,18g MgCl<sub>2</sub> et 39,0ml de la solution saline tamponnée au phosphate) pendant 5 minutes à TA.
5. Immerger le échantillon dans une solution saline tamponnée au phosphate pendant 5 minutes à TA.
6. Immerger le échantillon dans de l'éthanol à 70% à TA. Laisser le échantillon dans la solution éthanol pendant une minute.
7. Sortir le échantillon de l'éthanol à 70%. Répéter l'étape 6 avec de l'éthanol à 85%, suivi par une procédure avec de l'éthanol à 100%.
8. Laisser sécher à l'air libre.

## Protocole FISH

(Remarque : Veuillez toujours vous assurer de limiter l'exposition de la sonde à l'éclairage du laboratoire)

### Préparation de la lame (sauter cette étape si la lame a été prétraitée conformément au protocole décrit ci-dessus)

1. Déposer l'échantillon cellulaire sur une lame en verre. Laisser sécher.
2. Plonger la lame dans du 2xSSC pendant 2 minutes à TA sans agiter.
3. Déshydrater dans une série de bains éthanol (70%, 85% et 100%), 2 minutes dans chaque bain à température ambiante.
4. Laisser sécher.

## Pré-dénaturation

5. Retirez la sonde du congélateur et laissez-la réchauffer à température ambiante.
6. Assurez-vous que la solution de la sonde est mélangée de manière homogène avec une pipette.
7. Retirez 10µl de sonde par test et transférez-les dans un tube de microcentrifugation. Remplacez rapidement le reste de sonde dans le congélateur.
8. Mettre la sonde et la lame échantillon à préchauffer sur une plaque chauffante à 37°C (+/- 1°C) pendant 5 minutes.
9. Déposer 10µl de sonde sur l'échantillon et couvrir avec une lamelle. Sceller avec de la colle à base de caoutchouc et laisser sécher.

## Dénaturation

10. Dénaturer simultanément la sonde et l'échantillon en plaçant la lame sur une plaque chauffante à 75°C (+/- 1°C) pendant 2 minutes.

## Hybridation

11. Incuber la lame pendant une nuit à 37°C (+/- 1°C) dans un récipient humide et à l'abri de la lumière.

## Lavages post-hybridation

12. Retirer la lamelle et éliminer toute trace de colle à base de caoutchouc.
13. Laver la lame dans du tampon 0,4xSSC (pH 7,0) à 72°C (+/- 1°C) pendant 2 minutes sans agiter.
14. Egoutter la lame et laver dans du tampon 2xSSC, 0,05% Tween-20 (pH 7,0) à température ambiante pendant 30 secondes sans agiter.
15. Sécher la lame et appliquer 10µl de DAPI antifade sur chaque échantillon.
16. Recouvrir d'une lamelle, éliminer les bulles et laisser la coloration apparaître à l'abri de la lumière pendant 10 minutes.

17. Visualiser avec un microscope à fluorescence.

#### Stabilité des lames

Les lames sont analysables pendant un mois si elles sont conservées à l'abri de la lumière et à/ou au-dessous de la TA.

#### Recommandations

1. Il est déconseillé de cuire ou vieillir les lames, ceci pouvant réduire l'intensité du signal de la fluorescence.
2. Les conditions d'hybridation peuvent être affectées par l'utilisation de réactifs autres que ceux fournis ou recommandés par Cytocell Ltd.
3. L'utilisation d'un thermomètre calibré est fortement recommandée pour mesurer les températures des solutions, bains-marie et incubateurs. Ces températures sont essentielles pour une efficacité optimale du produit.
4. Les concentrations des lavages, pH et température sont importants. Une faible stringence peut résulter en une liaison non-spécifique de la sonde et une trop forte stringence peut résulter en une perte de signal.
5. Une dénaturation incomplète peut engendrer une perte de signal et une trop forte dénaturation une hybridation non-spécifique.

#### Interprétation des résultats

La sensibilité et la spécificité du test FISH dépend de nombreux paramètres qui varient d'un type de cellule à l'autre, d'une sonde à l'autre, en fonction des techniques cellulaires utilisées et au sein d'un laboratoire particulier. Nous recommandons donc, pour l'utilisation du kit prénatal, que chaque laboratoire dispose de son propre matériel standard et qu'il détermine ses propres valeurs de découpe pour le test FISH pour des échantillons aneuploïdes et au caryotype normal (pour plus d'instructions, contactez Cytocell).

#### Résultats attendus

Une cellule normale doit présenter 2 signaux bleus (2B). Les cellules porteuses d'une trisomie 18 doivent présenter 3 signaux bleus (3B).

#### Limitations

Ce test ne détecte pas les anomalies et la mosaïque chromosomiques structurelles. Il ne détecte pas les anomalies du nombre de chromosomes autres que celles testées. Ce test n'est pas conçu pour évaluer le risque de trisomie. Le reporting et l'interprétation du test FISH doivent être effectués conformément aux normes professionnelles pour la pratique et tout en prenant en compte d'autres informations cliniques et diagnostiques. Le test est développé comme complément aux autres tests diagnostiques de laboratoire. Pour cette raison, des actions thérapeutiques ne doivent pas être lancées sur la seule base des résultats du test FISH.

#### Informations supplémentaires

Pour plus d'informations sur le produit, veuillez contacter l'Assistance technique Cytocell.  
T: +44 (0)1223 294048  
E: techsupport@cytocell.com  
W: www.cytocell.com

### ITALIANO

L'ibridazione *in situ* in fluorescenza (Fluorescence *In Situ* Hybridisation - FISH) è 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 è 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 poter essere visualizzato. Per osservare la sonda ibridata sulla sequenza bersaglio sarà quindi necessario un microscopio a fluorescenza.

#### Informazioni sulla sonda

La sonda per il cromosoma 18 è un test prenatale per l'individuazione della trisomia 18 presente nella sindrome di Edward. La sonda è concepita per permettere la rilevazione e quantificazione del cromosoma 18 in nuclei in interfase di cellule di liquido amniotico non cresciuto in coltura mediante FISH. Il test deve essere utilizzato congiuntamente all'analisi del cariotipo fetale.

#### Specifiche della sonda

Regione 18 centromero  $\alpha$ -satellite 18p11.1 – q11.1 (D18Z1) blu

Il kit sonda 18 DNA è un composto di sonde per DNA fluorescenti direttamente etichettate blu per le sequenze di DNA Alfa satellite a livello delle regioni D18Z1 del cromosoma 18

#### Materiali forniti

**Sonda:** : 50 $\mu$ l per flaconcino (5 test) o 100 $\mu$ l per flaconcino (10 test)  
Quantità di 18 centromero  $\alpha$ -satellite (D18Z1) blu: 112 – 140ng/test  
Le sonde sono fornite premiscelate nella soluzione di ibridazione (formamide; destrano solfato; SSC) e pronte per l'uso.

#### Colorante di contrasto: 150 $\mu$ l per flaconcino (15 test)

Il colorante di contrasto è costituito da DAPI antifade (ES: 0,125 $\mu$ g/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, è 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 camicia da laboratorio e maneggiare sotto cappa chimica. Per lo smaltimento, sciacquare con grandi quantità di acqua.
4. Il DAPI è un potenziale cancerogeno. Maneggiare con cura, indossare guantiecamie 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 Aquarius® 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 1 $\mu$ l a 200 $\mu$ l 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 Coplinin 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 planapocromatici 63x o 100x. La soluzione ideale per visualizzare contemporaneamente i fluorofori verdi e arancioni e il colorante di contrasto è il triplo filtro passa-banda DAPI/FITC/TRITC. Il fluoroforo blu presenta specificità per lo spettro di Aqua e DEAC (è necessario un filtro passa-banda per Aqua o DEAC). Per visualizzare contemporaneamente tutti i tre fluorofori e il DAPI è possibile utilizzare il triplo filtro passabanda DAPI/FITC/Texas Red.

#### Preparazione del campione

Il kit prenatale è 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 colpetti col dito per risospendere il pellet nella ridotta quantità di liquido rimasta.
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.
2. 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.
3. Immergere il vetrino in tampone fosfato salino (PBS) a TA per 5 minuti.
4. Immergere il vetrino in una soluzione post-fissazione (formaldeide allo 0,95%: 1,0 ml di formaldeide al 37%, 0,18g di MgCl<sub>2</sub> e 39,0ml di PBS) per 5 minuti a TA.
5. Immergere il vetrino in PBS a TA per 5 minuti.
6. Immergere il vetrino in una soluzione di etanolo al 70% a TA. Lasciare il vetrino nel lavaggio in etanolo per 1 minuto.
7. Rimuovere il vetrino dalla soluzione di etanolo al 70%. Ripetere il passaggio 6 con etanolo all'85% e poi con etanolo al 100%.
8. 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)

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

##### Pre-denaturazione

5. Rimuovere la sonda dal congelatore e lasciarla riscaldare a TA.
6. Accertarsi che la soluzione della sonda sia miscelata in modo uniforme mediante l'uso di una pipetta.
7. Pipettare 10 $\mu$ l di sonda per test e inserirli in una provetta da microcentrifuga. Riporre velocemente la sonda non utilizzata nel congelatore.
8. Pre-riscaldare la sonda e il vetrino con il campione su una piastra riscaldante a 37°C (+/- 1°C) per 5 minuti.
9. Collocare 10 $\mu$ l 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

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

##### Ibridazione

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

##### Lavaggi post-ibridazione

12. Rimuovere accuratamente il vetrino coprioggetto e qualsiasi residuo di colla.
13. Immergere il vetrino in SSC0,4x (pH 7,0) a 72°C (+/- 1°C) per 2 minuti senza agitazione.
14. Scolare il vetrino e immergerlo in SSC2x, Tween-20 0,05% (pH 7,0) a TA per 30 secondi senza agitazione.
15. Scolare il vetrino e applicare 10 $\mu$ l di DAPI antifade su ciascun campione.
16. Coprire con un vetrino coprioggetto, rimuovere eventuali bolle e attendere lo sviluppo del colore per 10 minuti lasciando il vetrino al buio.
17. 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

1. L'eccessivo riscaldamento ed invecchiamento dei vetrini sono sconsigliati in quanto potrebbero ridurre la fluorescenza del segnale.
2. 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 blande 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 due segnali blu (2B). Le cellule con trisomia 18 devono mostrare 2 segnali blu (3B).

#### 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 refertazione 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@cytoCELL.com  
W: www.cytoCELL.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. 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

Die Chromosom-18-Sonde ist ein pränataler Test für eine Feststellung von Trisomie 18 bei dem Edward-Syndrom vorliegen. Die Chromosom-18-Sonde ist zum Nachweisen und Quantifizieren der Chromosom 18 der Interphase-Kerne von nicht kultivierten Fruchtwasserzellen durch die FISH. Der Test muss im Zusammenhang mit einer Analyse des fetalen Karyotypen.

#### Sondenspezifikation

18 Centromer  $\alpha$ -Satellit 18p11.1 – q11.1 (D18Z1) blauen

Das DNA Sondenkit ist ein Set bestehend blauen, direkt markierten, fluoreszierenden DNA Sonden, speziell für die Alpha-Satelliten-DNA Sequenzen in den D18Z1 Regionen des 18. Chromosom.

#### Bestandteile des Kits

**Sonde:** 50  $\mu$ l pro Röhrchen (5 Tests) oder 100  $\mu$ l pro Röhrchen (10 Tests)  
Menge an 18 Centromer  $\alpha$ -Satellit (D18Z1) blauen: 112 – 140 ng/test  
Die Sonden werden vorgemischt und gebrauchsfertig in Hybridisierungslösung geliefert (Formamid, Dextranulfat, SSC).

#### Farbstoff für die Gegenfärbung:

150  $\mu$ l pro Röhrchen (15 Tests)  
Der Farbstoff für die Gegenfärbung ist DAPI Antifade (ES: 0,125  $\mu$ g/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.
- Sondennmischungen 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 Aquarius<sup>®</sup> 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 Temperaturregelung bis 80°C).
- Mikropipetten mit unterschiedlichen Volumen von 1  $\mu$ l - 200  $\mu$ l.
- Wasserbad mit genauer Temperaturregelung 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 Objektive 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 blaue Fluorophor hat eine Spezifität gegenüber dem Aqua- oder DEAC-Spektrum (ein Aqua- oder DEAC-Einfach-Bandpassfilter ist erforderlich). Das Dreifach-Bandpassfilter DAPI/FITC/Texasrot ist für die simultane Beobachtung aller drei Fluorophore und DAPI optimal geeignet.

#### 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:Essig) 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 MgCl<sub>2</sub> 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)

- Zellprobe auf gereinigten Mikroskop-Objektträger auftropfen. Trocknen lassen.
- Objektträger bei Zimmertemperatur 2 Minuten lang ohne Schütteln in 2xSSC eintauchen.
- Entwässern in Alkoholreihe (70%, 85% und 100%), jeweils 2 Minuten bei Zimmertemperatur.
- Trocknen lassen.

#### Vordenaturierung

- Entnehmen Sie die Probe aus dem Gefrierschrank und lassen Sie sie Raumtemperatur annehmen.
- Stellen Sie sicher, dass die Probenlösung gleichmäßig mit einer Pipette gemischt wird.
- Entnehmen Sie pro Test 10  $\mu$ l der Probe und füllen Sie sie in ein Mikrozentrifugengefäß um. Stellen Sie die restliche Probe schnell wieder zurück in den Gefrierschrank.
- Sonde und Probenobjektträger zum Vorwärmen 5 Minuten lang auf eine 37°C (+/- 1°C) warme Heizplatte stellen.
- 10  $\mu$ l Sondenmischung auf die Zellprobe auftropfen und Deckglas sorgfältig auflegen. Mit Gummikleber-Lösung versiegeln und vollständig trocknen lassen.

#### Denaturierung

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

#### Hybridisierung

- Den Objektträger über Nacht bei 37°C (+/- 1°C) in eine feuchte, lichtdichte Kammer geben.

#### Waschen nach der Hybridisierung

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

#### Stabilität der fertigen Objektträger

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

#### Empfehlungen zur Durchführung

- Wärmebehandlung oder Reifung der Proben ist nicht empfehlenswert, da dies zu einer verminderten Signalfluoreszenz führen kann.
- Die Verwendung von Reagenzien, die nicht von CytoCELL Ltd. empfohlen sind, können die Hybridisierungsbedingungen negativ beeinflusst werden.
- 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.
- 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.
- 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 Präntalkit 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 zwei blaue Signale (2B) aufweisen. Zellen mit Trisomie 18 sollten 3 blaue Signale (3B) 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@cytocell.com  
W: www.cytocell.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

La sonda prenatal para el cromosoma 18 de Cytocell permite la detección de la trisomía 18 responsable del síndrome de Edwards. La sonda está diseñada para la detección y la cuantificación mediante FISH de la cromosoma 18 de los núcleos en interfase de las células de líquido amniótico no cultivadas. Este ensayo debe utilizarse en combinación con un análisis de cariotipo fetal.

#### Especificaciones de las sondas

Región satélite  $\alpha$  del centrómero de 18 18p11.1 – q11.1 (D18Z1) azul

La sonda azul para el centrómero del cromosoma 18 es una sonda específica para los satélites alfa en la región D18Z1

#### Material incluido

**Sonda:** 50µl por vial (5 análisis) o 100µl por vial (10 análisis)  
Cantidad de satélite  $\alpha$  del centrómero de 18 (D18Z1) azul sonda: 112 – 140ng/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. Para 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 teratogénica; 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 Aquarius® 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. Centrifuga 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 fluorocromo azul tiene especificidad por el espectro Aqua o DEAC (se necesita filtro pasabanda sencillo Aqua o DEAC). El triple filtro pasabanda DAPI/FITC/Texas Red puede emplearse para visualizar simultáneamente los tres 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. Centrifuge 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. Centrifuge 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, centrifúguese 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 MgCl<sub>2</sub> 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.
6. Asegúrese de que la solución de la sonda quede homogéneamente mezclada con una pipeta.
7. Retire 10µl de la sonda en cada prueba y transfíralo a un tubo de microcentrifuga. Vuelva a colocar la solución que quede en la sonda al congelador.
8. Precaliente la sonda y el portaobjetos de la muestra en una placa calefactora a 37°C (+/- 1°C) durante 5 minutos.
9. 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

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

#### Hibridación

11. Introduzca el porta en un recipiente húmedo y opaco a 37°C (+/- 1°C) y déjelo toda la noche.

#### Lavados posthibridación

12. Quite el cubreobjetos y los restos del pegamento cuidadosamente.
13. Sumerja el portaobjetos en 0,4xSSC (pH 7,0) a 72°C (+/- 1°C) durante 2 minutos sin agitar.
14. Deje escurrir el portaobjetos y sumérgalo en 2xSSC, 0,05% de Tween-20 (pH 7,0) a TA durante 30 segundos sin agitar.
15. Escurra el portaobjetos y añada 10µl de DAPI antifade sobre cada muestra.
16. Coloque un cubreobjetos, extraiga las burbujas y deje revelar el color en un lugar oscuro durante 10 minutos.
17. 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

1. No se recomienda calentar ni dejar envejecer los portaobjetos ya que se podría reducir la fluorescencia de la señal.
2. Las condiciones de hibridación pueden verse afectadas negativamente si se emplean reactivos distintos de los suministrados o recomendados por Cytocell Ltd.
3. 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.
4. 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.
5. 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 azules (2A). Las células con trisomía del cromosoma 18 deben mostrar 3 señales azules (3A).

#### 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.cytocell.com

#### References/Bibliographie/Bibliographia/Literatur/Bibliografía

1. <http://www.ojrd.com/content/7/1/81/abstract>
2. Cereda and Carey. Orphanet J Rare Dis 2012; 7:81

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

#### Patents and Trademarks

Aquarius and Cytocell are registered trademarks 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.cytocell.com