



A Sysmex Group Company



Instruções de Utilização
REF: LPS 047-S/LPS 047

1p36/1q25 and 19q13/19p13 Deletion Probe Kit



APENAS PARA USO PROFISSIONAL

PORTUGUÊS

Mais informações disponíveis em www.ogt.com

Utilização prevista

O 1p36/1q25 and 19q13/19p13 Deletion Probe Kit destina-se a identificar, através da hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), as deleções da região 1p36.32 no cromossoma 1 e as deleções da região 19q13.33 no cromossoma 19 em doentes com tumores cerebrais gliais. Destina-se a ser utilizado em amostras de tecido fixado em formalina e incluído em parafina (FFPE). Este produto é apenas para uso profissional e destina-se a ser um adjuvante da citogenética clínica.

Contexto

A hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) é uma técnica que permite detetar sequências de ADN em cromossomas metafásicos ou em núcleos interfásicos de amostras citogenéticas fixadas. A técnica recorre a sondas de ADN que se hibridizam com cromossomas inteiros ou sequências únicas individuais e serve de forte adjuvante à citogenética clássica. Desenvolvimentos recentes fizeram com que esta valiosa técnica possa agora ser aplicada também à avaliação de biopsias de tumores sólidos, o que pode fornecer informações importantes para a previsão da progressão do tumor. As metodologias atuais, nomeadamente a imuno-histoquímica ou a "blotting", podem fornecer informações ao nível da expressão genética. Quando é realizada em secções de tecido (quer incluído em criostato ou parafina), a FISH pode fornecer informações ao nível do gene, *in situ*, no local exato dentro do tumor. Isto pode revelar a heterogeneidade entre células e permitir a deteção de pequenos clones de células geneticamente distintas.

Informações sobre a sonda

As deleções da região 1p36.32, incluindo o gene TP73 (*proteína tumoral 73*), e as deleções da região 19q13.33, incluindo os genes GLTSCR1 e GLTSCR2 (*genes 1 e 2 da região candidata a supressor tumoral em gliomas*), são frequentemente relacionadas em casos de tumores gliais.

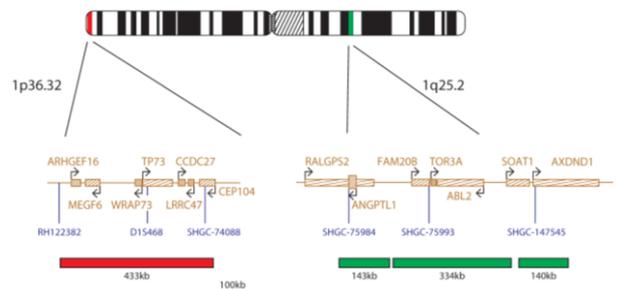
Astrocitomas e oligodendrogliomas são os gliomas mais comuns que surgem a partir de células gliais. Representam cerca de 40% de todos os tumores do SNC¹ e mais de 60% dos câncros cerebrais primários².

As perdas concomitantes, "co-deleção", das regiões 1p36.32 e 19q13.33 são comunicadas em aproximadamente 80% dos oligodendrogliomas, dois terços de oligodendrogliomas anaplásicos, bem como subconjuntos de oligoastrocitomas e oligoastrocitomas anaplásicos^{3,4}; a maior parte destas perdas foram demonstradas como mediadas pela presença de uma translocação t(1;19)(q10;p10) desequilibrada. A presença de uma co-deleção de 1p e 19q é um forte fator de prognóstico nestas doenças, onde está associada a um melhor prognóstico e capacidade de resposta à terapêutica⁵.

Foi também demonstrado que a co-deleção de 1p e 19q ocorre num subconjunto de neurocitomas extraventriculares, e pode estar associada a histologia agressiva nestes tumores⁶.

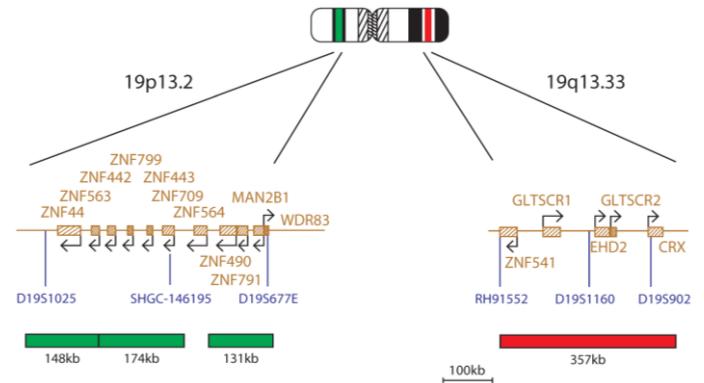
Especificação da sonda

Sonda 1:
1p36.32, Vermelho
1q25.2 Verde



A sonda 1p36.32, marcada a vermelho, tem o tamanho de 433 kb e abrange a região entre os marcadores RH122382 e SHGC-74088. A sonda 1q25.2, marcada a verde, consiste em três sondas (143 kb, 334 kb e 140 kb) que abrangem regiões incluindo os marcadores SHGC-75984 e SHGC-147545.

Sonda 2:
19p13.2 Verde
19q13.33, Vermelho



A sonda 19p13.2, marcada a verde, consiste em três sondas (148 kb, 174 kb e 131 kb) que abrangem regiões incluindo os marcadores D19S1025 e D19S677E. A sonda 19q13.33, marcada a vermelho, tem o tamanho de 357 kb e abrange a região entre os marcadores RH91552 e D19S902.

Materiais Fornecidos

50 µl por tubo (5 testes) ou 100 µl por tubo (10 testes)

Sonda 1:

Quantidade de sonda vermelha de 1p36.32: 80–100ng/teste

Quantidade de sonda verde de 1q25.2: 240–300ng/teste

Sonda 2:

Quantidade de sonda vermelha de 19q13.33: 60–75ng/teste

Quantidade de sonda verde de 19p13.2: 264–330ng/teste

As sondas são fornecidas pré-misturadas em solução de hibridização (formamida; sulfato de dextrano; SSC) e estão prontas para uso.

Contracorante: 150 µl por tubo (15 testes) ou 300 µl por tubo (30 testes)

O contracorante é o DAPI Antífade (ES: 0,125 µg/ml DAPI [4,6-diamidino-2-fenilindol]).

Advertências e Precauções

1. Para utilização em diagnóstico *in vitro*. Apenas para uso profissional.
2. Use luvas quando manusear sondas de ADN e o contracorante DAPI.
3. As soluções de sonda contêm formamida, que é um teratogénico. Não inale vapores provenientes das mesmas nem permita o contacto com a pele. Use luvas, uma bata de laboratório e manuseie num exaustor de laboratório. Para a respetiva eliminação, lave com um grande volume de água.
4. O DAPI é um potencial agente cancerígeno. Manuseie com cuidado. Use luvas e uma bata de laboratório. Para a respetiva eliminação, lave com um grande volume de água.
5. Elimine todos os materiais perigosos de acordo com as diretrizes da sua instituição para a eliminação de resíduos perigosos.
6. Os operadores têm de ser capazes de distinguir visualmente as cores vermelha, azul e verde.

Conservação e Manuseamento

O kit deve ser conservado num congelador a uma temperatura entre -25 °C e -15 °C, até ao prazo de validade indicado no rótulo do kit. Os frascos de sonda e de contracorante têm de ser conservados num local escuro.

Equipamento necessário, mas não fornecido

1. Placa quente (com uma placa sólida e controlo exato da temperatura até 80 °C).
2. Micropipetas e pontas de volume variável, entre 1 µl e 200 µl.
3. Banho-maria com controlo exato da temperatura de 72 °C.
4. Tubos de microcentrifugação (0,5 ml).
5. Microscópio de fluorescência (ver secção "Recomendação de Microscópio de Fluorescência").
6. Jarras de Coplin em plástico ou vidro.
7. Pinça.
8. Óleo de imersão de lentes para microscópio de fluorescência.
9. Centrifugadora de bancada.
10. Lâminas de microscópio.

- Lamelas de 24 x 24 mm.
- Temporizador.
- Incubadora a 37 °C.
- Cola de solução de borracha.
- Kit de pré-tratamento de tecidos (LPS 100).

Recomendação de Microscópio de Fluorescência

Utilize uma lâmpada de mercúrio de 100 watts e lentes planas apocromáticas 63x ou 100x para obter a melhor visualização possível. Utilize um filtro passa-banda triplo DAPI/FITC/Texas Red para obter a melhor visualização possível em simultâneo das substâncias fluorescentes vermelhas e verdes e DAPI.

Verifique o microscópio de fluorescência antes de o utilizar para garantir que está a funcionar corretamente. Utilize um óleo de imersão que seja adequado à microscopia de fluorescência e formulado para baixa autofluorescência. Siga as recomendações do fabricante relativamente à vida útil da lâmpada e à duração dos filtros.

Preparação das Amostras

O kit foi concebido para utilização em secções de tecido fixado em formalina e incluído em parafina (FFPE) ou microarrays de tecido (TMA) e deve ser preparado de acordo com as diretrizes do laboratório ou da instituição. Devem ser utilizadas secções de tecido FFPE de 4 µm–6 µm de espessura para a FISH.

Pré-tratamento das amostras de tecido

O pré-tratamento das amostras de tecido deve ser feito de acordo com as diretrizes do laboratório ou da instituição em causa. Para obter os melhores resultados, utilize o kit de pré-tratamento de tecidos (LPS 100).

Protocolo do FISH

(Nota: Certifique-se de que a exposição da sonda às luzes do laboratório está sempre limitada)

Pré-desnaturação

- Retire a sonda do congelador e deixe-a aquecer até à temperatura ambiente (TA). Centrifugue os tubos brevemente antes de os utilizar.
- Certifique-se de que a solução da sonda é uniformemente misturada com uma pipeta.
- Retire 10 µl–15 µl de sonda por cada teste e transfira para um tubo de microcentrifugação. Reponha o restante volume da sonda no congelador.
- Coloque a sonda e a lâmina da amostra numa placa quente a 37 °C (+/-1 °C) durante 5 minutos para pré-aquecimento.
- Coloque 10 µl–15 µl da solução de sonda na amostra e aplique uma lamela com cuidado. Vede com cola de solução de borracha e deixe a cola secar completamente.

Desnaturação

- Desnature a amostra e a sonda em simultâneo aquecendo a lâmina numa placa quente a 75 °C (+/-1 °C) durante 5 minutos.

Hibridização

- Coloque a lâmina num recipiente húmido resistente à luz a 37 °C (+/-1 °C) durante toda a noite.

Lavagens pós-hibridização

- Retire a lamela e todos os vestígios de cola com cuidado.
- Mergulhe a lâmina em SSC 0,4x (pH 7,0) a 72 °C (+/-1 °C) durante 2 minutos sem agitar.
- Drene a lâmina e mergulhe-a em SSC 2x e 0,05% de Tween-20 à TA (pH 7,0) durante 30 segundos sem agitar.
- Drene a lâmina e aplique 10 µl–15 µl de DAPI Antifade em cada amostra.
- Cubra a amostra com uma lamela, elimine eventuais bolhas e deixe a cor desenvolver-se no escuro durante 10 minutos.
- Visualize com um microscópio de fluorescência.

Comentários

A eficiência da hibridização e a morfologia dos tecidos estão geralmente correlacionadas negativamente. Os procedimentos de pré-tratamento agressivos que melhoram a eficiência da hibridização (por exemplo, um tempo prolongado de digestão enzimática) tendem a destruir a estrutura das células e a morfologia dos tecidos. No entanto, o pré-tratamento suave poupando as estruturas de tecido pode não ser suficiente para a penetração da sonda e para obter resultados de FISH bem-sucedidos.

A duração ideal do pré-tratamento térmico e do tempo de digestão enzimática dependerá da idade do bloco, da composição do tecido e da qualidade da fixação do tecido. A digestão enzimática deve ser reduzida para biopsias de agulha grossa e quaisquer secções que contenham poucas células tumorais ou que tenham grandes áreas de necrose. Estas amostras têm de ser manuseadas com especial cuidado para evitar uma digestão excessiva.

Estabilidade das lâminas acabadas

As lâminas de FISH permanecem analisáveis durante um período máximo de 1 mês se conservadas no escuro a uma temperatura inferior a 4 °C.

Recomendações para o Procedimento

- As condições de hibridização podem ser negativamente afetadas pela utilização de reagentes que não sejam os fornecidos ou recomendados pela CytoCell Ltd.
- Utilize um termómetro calibrado para medir as temperaturas das soluções, aparelhos de banho-maria e incubadoras, visto que essas temperaturas são críticas para o ótimo desempenho do produto.
- As concentrações de lavagem, o pH e as temperaturas são importantes, visto que condições pouco rigorosas podem resultar numa ligação não específica da sonda e condições demasiado rigorosas podem resultar na ausência de sinal.
- Uma desnaturação incompleta pode resultar em ausência de sinal e uma desnaturação excessiva também pode resultar numa ligação não específica.
- Uma hibridização excessiva pode resultar em sinais adicionais ou inesperados.

- Os utilizadores devem otimizar o protocolo para as suas próprias amostras antes de utilizarem o teste para efeitos de diagnóstico.

Resultados Esperados

Sonda 1:

Uma célula normal deve mostrar dois sinais vermelhos e dois sinais verdes (2R, 2G). As células com uma deleção de 1p36 devem mostrar um sinal vermelho e dois sinais verdes (1R, 2G).

Sonda 2:

Uma célula normal deve mostrar dois sinais vermelhos e dois sinais verdes (2R, 2G). As células com uma deleção de 19q13 devem mostrar um sinal vermelho e dois sinais verdes (1R, 2G).

Reatividade Cruzada Conhecida

Nenhuma reatividade cruzada conhecida.

Limitações

A comunicação e interpretação dos resultados da FISH devem ser consistentes com as normas da prática profissional e devem tomar em consideração outras informações clínicas e de diagnóstico. Este kit destina-se a ser utilizado como adjuvante de outros testes de diagnóstico laboratoriais e não deve ser iniciada qualquer medida terapêutica apenas com base nos resultados da FISH.

O não cumprimento do protocolo pode alterar o desempenho do ensaio e produzir resultados errados.

Este kit não foi validado para outros efeitos que não os indicados na secção da utilização prevista.

Este dispositivo destina-se a detetar perdas genómicas maiores do que as regiões abrangidas pelos clones vermelhos neste conjunto de sondas, que incluem as regiões 1p36.32 e 19q13.33. Perdas genómicas fora destas regiões ou perdas parciais destas regiões poderão não ser detetadas com este produto.

Informações Adicionais

Para obter mais informações sobre o produto, contacte o departamento de assistência técnica da CytoCell.

T: +44 (0)1223 294048

E: techsupport@cytoCELL.com

W: www.ogt.com

Bibliografia

- CBTRUS (2004). Statistical Report: Primary Brain Tumors in the United States, 1997-2001. Central Brain Tumor Registry of the United States.
- Thompson L. World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of head and neck tumours. Ear Nose Throat J. 2006 Feb;85(2):74.
- Vogazianou AP, Chan R, Bäcklund LM, Pearson DM, Liu L, Langford CF, et al. Distinct patterns of 1p and 19q alterations identify subtypes of human gliomas that have different prognoses. Neuro Oncol. 2010 Jul;12(7):664-78.
- Bromberg JEC, et al., Oncol. 2009. 14:155-163.
- Jenkins RB et al., Cancer Res 2006;66(20):9852-61.
- Rodriguez FJ et al., Brain Pathol 2009;19(4):623-9.

REF	PT: Número de catálogo
	PT: Dispositivo de diagnóstico <i>in vitro</i>
	PT: Código de lote
	PT: Consulte as Instruções de utilização
	PT: Fabricante
	PT: Prazo de validade
	PT: Limites de temperatura
	PT: Suficiente para <n> testes
	PT: Conteúdo

Patentes e Marcas Comerciais

CytoCell é uma marca registada da CytoCell Ltd.

Este produto contém tecnologia licenciada pela Life Technologies Corporation e está disponível apenas para uso em diagnósticos humanos ou para fins de investigação na área das ciências da vida.

**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