



A Sysmex Group Company



## Instruções de Utilização

REF: LPF 002

### Kit de Sondas de Enumeração Pré-Natal 13 e 21 FAST FISH



APENAS PARA USO PROFISSIONAL

PORTUGUÊS

Mais informações disponíveis em [www.ogt.com](http://www.ogt.com)

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 como uma ferramenta de diagnóstico essencial na análise cromossomática pré-natal, hematológica e patológica. O ADN alvo, após fixação e desnaturação, fica disponível para hibridização a uma sonda de ADN marcada por fluorescência e desnaturada de forma semelhante, que tem uma sequência complementar. Após a hibridização, a sonda de ADN não ligada e não especificamente ligada é removida e o ADN é submetido a contracoloração para efeitos de visualização. A microscopia de fluorescência permite então a visualização da sonda hibridizada no material alvo.

#### Informações sobre as sondas

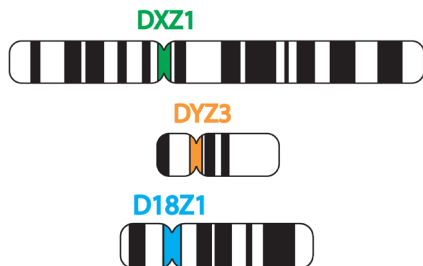
Os ensaios de sondas de enumeração pré-natal X, Y e 18 FAST FISH da CytoCell destinam-se à deteção rápida e precisa dos distúrbios cromossómicos fetais mais comuns. O conjunto de sondas destina-se à deteção e quantificação dos cromossomas 18, X e Y em núcleos interfásicos de células do líquido amniótico não cultivadas mediante a técnica FISH. O ensaio deve ser utilizado em conjunto com a análise de cariótipos fetais.

A trissomia do cromossoma 18, causadora da síndrome de Edwards, ocorre em cerca de 1 em 6000/8000 nados vivos e afeta principalmente o sexo feminino.<sup>1</sup> Os achados clínicos são variáveis, embora muitos apresentem atrasos de crescimento, deficiências cardíacas e anomalias craniofaciais, bem como possíveis anomalias nos membros e nos rins.<sup>2</sup> Números de cópias aberrantes dos cromossomas X e Y podem levar a várias doenças cromossómicas sexuais, tais como Klinefelter (47,XXY), Turner (45,X) e outras síndromes causadas por variações no número de cópias de X e/ou Y. Estas síndromes apresentam incidências e achados clínicos variáveis.<sup>3</sup>

O conjunto de sondas destina-se à deteção e quantificação dos cromossomas 18, X e Y em núcleos interfásicos de células do líquido amniótico não cultivadas mediante a técnica FISH. O ensaio deve ser utilizado em conjunto com a análise de cariótipos fetais.

#### Especificação das sondas

Centrómero X, Xp11.1-q11.1 (DXZ1) Verde  
Centrómero Y, Yp11.1-q11.1 (DYZ3) Laranja  
Centrómero 18, 18p11.1-q11.1 (D18Z1) Azul



O conjunto de sondas X, Y e 18 é uma mistura de sondas de ADN diretamente marcadas por fluorescência verdes, laranja e azuis, específicas para as sequências de ADN alfa satélite nas regiões DXZ1, DYZ3 e D18Z1 dos cromossomas X, Y e 18, respetivamente.

#### Materiais fornecidos

Sonda: 50 µl por frasco (5 testes) ou 100 µl por frasco (10 testes)  
Quantidade de sonda de centrómero X verde (DXZ1): 60-75ng/teste

Quantidade de sonda de centrómero Y laranja (DYZ3): 40-50ng/teste  
Quantidade de sonda de centrómero 18 azul (D18Z1): 280-350ng/teste  
As sondas são fornecidas pré-misturadas em solução de hibridização (formamida; sulfato de dextrano; SSC) e estão prontas a serem utilizadas.

**Contracorante:** 150 µl por frasco (15 testes)

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

#### Advertências e precauções

1. Para utilização em diagnóstico *in vitro*. Apenas para utilização profissional.
2. Utilizar luvas ao manusear sondas de ADN e contracorante DAPI.
3. As misturas de sondas contêm formamida, que é um teratogénico; não inalar vapores nem permitir o contacto com a pele. Utilizar luvas, bata de laboratório e manusear sob um exaustor de laboratório. Ao eliminar, utilizar grandes quantidades de água.
4. O DAPI é um potencial agente cancerígeno. Manusear com cuidado; utilizar luvas e uma bata de laboratório. Ao eliminar, utilizar grandes quantidades de água.
5. Todos os materiais perigosos devem ser eliminados de acordo com as diretrizes da sua instituição relativamente à eliminação de resíduos perigosos.

#### 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 sondas e contracorante têm de ser conservados num abrigo da luz.

#### 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. Aparelho de banho-maria com controlo exato da temperatura a 37 °C e 72 °C.
4. Tubos para microcentrífuga (0,5 ml).
5. Microscópio de fluorescência (consultar a secção "Recomendação de microscópio de fluorescência").
6. Jarras de Coplin em plástico ou vidro.
7. Pinça.
8. Óleo de imersão para lentes de microscópio de fluorescência.
9. Centrífuga de bancada.
10. Lâminas de microscópio.
11. Lamelas de 24 x 24 mm.
12. Temporizador.
13. Incubadora a 37 °C.
14. Cola de solução de borracha.

#### Recomendação de microscópio de fluorescência

Para garantir a melhor visualização possível da sonda, recomendamos uma lâmpada de mercúrio de 100 watts e lentes planas apocromáticas 63x ou 100x. O filtro passa-banda triplo DAPI/FITC/TRITC é ideal para visualizar os fluoróforos verdes e laranja, bem como o corante em simultâneo. O fluoróforo azul tem especificidade para o espectro Aqua e DEAC (é necessário um filtro passa-banda simples Aqua ou DEAC). O filtro passa-banda triplo DAPI/FITC/Texas Red pode ser utilizado para visualizar os três fluoróforos e o DAPI simultaneamente.

#### Preparação de amostras

O kit pré-natal destina-se a ser utilizado em amniócitos não cultivados fixados em fixador de Carnoy (ver procedimento a seguir). A colheita de amostras de líquido amniótico deve ser efetuada de acordo com as diretrizes do laboratório ou da instituição em causa.

As amostras de líquido amniótico com vestígios de sangue ou acastanhadas não devem ser utilizadas, uma vez que podem conter sangue materno e conduzir a resultados falsos.

#### Protocolo sugerido

##### Preparação de amostras de líquido amniótico frescas para FISH:

1. Centrifugue 2-5 ml de espécime de líquido amniótico completo durante 7 minutos a 180 g; remova cuidadosamente o sobrenadante sem perturbar o sedimento celular.
2. Ressuspenda o sedimento em 2 ml de cloreto de potássio a 0,075 M. Deixe à temperatura ambiente (TA) durante 5 minutos.
3. Adicione 2 ml de fixador fresco (3:1 metanol:ácido acético glacial) à solução de células/hipotónica, adicionando os primeiros ml gota a gota enquanto mistura continuamente. Misture bem.
4. Centrifugue a suspensão durante 5 minutos a 280 g, remova cuidadosamente o sobrenadante e ressuspenda o sedimento em 2 ml de fixador fresco.
5. Os espécimes fixados podem ser armazenados, nesta fase, num congelador a -20 °C.
6. Se a amostra não for para ser congelada, centrifugue o tubo a 280 g durante 5 minutos. Remova o máximo de sobrenadante sem perturbar o sedimento celular. Vire o tubo para ressuspender o sedimento na pequena quantidade de líquido restante.
7. Para preparar as lâminas para FISH, coloque uma gota de suspensão celular diretamente na lâmina. Deixe secar ao ar.

##### Pré-tratamento recomendado de lâminas:

1. Mergulhe a lâmina preparada a partir de amniócitos não cultivados em 2xSSC durante 2 minutos a 37 °C.
2. Coloque a lâmina em solução ativa de pepsina fresca (5 mg de pepsina adicionada a 100 ml de ácido clorídrico a 0,01 M) durante 13 minutos a 37 °C.
3. Mergulhe a lâmina em solução salina tamponada com fosfato (PBS) à TA durante 5 minutos.
4. Mergulhe a lâmina em solução pós-fixação (formaldeído a 0,95%: 1,0 ml de formaldeído a 37%, 0,18 g de MgCl<sub>2</sub> e 39,0 ml de PBS) durante 5 minutos à TA.
5. Mergulhe a lâmina em PBS à TA durante 5 minutos.
6. Mergulhe a lâmina em etanol a 70% à TA. Permita que a lâmina permaneça no banho de etanol durante 1 minuto.

- Retire a lâmina do etanol a 70%. Repita o passo 6 com etanol a 85%, seguido de etanol a 100%.
- Deixe secar ao ar.

#### Protocolo FISH

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

#### Preparação da lâmina (ignore este passo se a lâmina tiver sido pré-tratada de acordo com o protocolo acima)

- Coloque uma gota de amostra celular numa lâmina de vidro para microscópio. Deixe secar.
- Mergulhe a lâmina em 2xSSC durante 2 minutos à TA sem agitar.
- Desidrate numa série de etanol (70%, 85% e 100%), cada fase durante 2 minutos à TA.
- Deixe secar.

#### Pré-desnaturação

- Retire a sonda do congelador e deixe-a aquecer até à TA.
- Certifique-se de que a solução de sonda é uniformemente misturada com uma pipeta.
- Retire 10 µl de sonda por cada teste e transfira-os para um tubo para microcentrifuga. Reponha rapidamente o restante volume de 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 de mistura de sonda na amostra de células 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 2 minutos.

#### Hibridização

- Coloque a lâmina num recipiente húmido resistente à luz a 37 °C (+/-1 °C) durante 2 horas.

#### Lavagens pós-hibridização

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

#### Estabilidade das lâminas acabadas

As lâminas submetidas a FISH permanecem analisáveis durante, no máximo, 1 mês, se conservadas abrigadas da luz a uma temperatura igual ou inferior à TA.

#### Recomendações para o procedimento

- Não é recomendado recozer ou maturar as lâminas, uma vez que tal pode reduzir a fluorescência do sinal.
- As condições de hibridização podem ser negativamente afetadas pela utilização de reagentes que não sejam os fornecidos ou recomendados pela CytoCell Ltd.
- Recomenda-se vivamente a utilização de um termómetro calibrado para medir as temperaturas de soluções, banhos-maria e incubadoras, visto que estas temperaturas são críticas para o desempenho ideal do produto.
- As temperaturas, o pH e as concentrações de lavagem são críticas, uma vez que condições pouco rigorosas podem resultar em 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 em ligação não específica.

#### Interpretação dos resultados

A sensibilidade e a especificidade da FISH dependem de uma série de parâmetros que variam de um tipo de célula para outro; de uma sonda para outra; com as técnicas celulares utilizadas e dentro do próprio laboratório. Por conseguinte, recomendamos que, na utilização do kit pré-natal, cada laboratório tenha o seu próprio material padrão e determine os seus próprios valores de corte do ensaio FISH para amostras aneuploides e cariotipicamente normais (para obter orientações, contacte a CytoCell).

#### Resultados esperados

Uma célula feminina normal deve apresentar 2 sinais verdes e 2 azuis (2G, 2B). Uma célula masculina normal deve apresentar 1 sinal verde, 1 laranja e 2 azuis (1G, 1O, 2B). As células com trissomia 18 devem apresentar 2 sinais verdes e 3 azuis (2G, 3B) para amostras femininas e 1 verde, 1 laranja e 3 azuis (1G, 1O, 3B) para amostras masculinas. Existem várias combinações diferentes de padrões de sinais possíveis para os cromossomas X e Y, para além dos padrões de sinais normais descritos acima.

A sonda DXZ1 pode apresentar hibridização cruzada aos centrómeros dos cromossomas 11, 17 e Y

#### Limitações

Este teste não deteta anomalias cromossômicas estruturais nem mosaicismo. Também não deteta anomalias numéricas de cromossomas para além dos testados.

O teste não foi concebido para avaliar o risco de trissomia.

A comunicação e a interpretação de resultados de 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 a outros testes de diagnóstico laboratoriais e não deve ser iniciada qualquer medida terapêutica apenas com base nos resultados da FISH.

#### 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

- <http://www.ojrd.com/content/7/1/81/abstract>
- Cereda and Carey. Orphanet J Rare Dis 2012; 7:81
- Visootsak and Graham. Orphanet Journal of Rare Diseases 2006, 1:42

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

#### Patentes e marcas comerciais

CytoCell é uma marca registada da 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