A Sysmex Group Company

CytoCell

Instruções de Utilização
REF: LPS 008-S/LPS 008

EWSR1/ERG Translocation, Dual Fusion Probe

CE IVD

APENAS PARA USO PROFISSIONAL

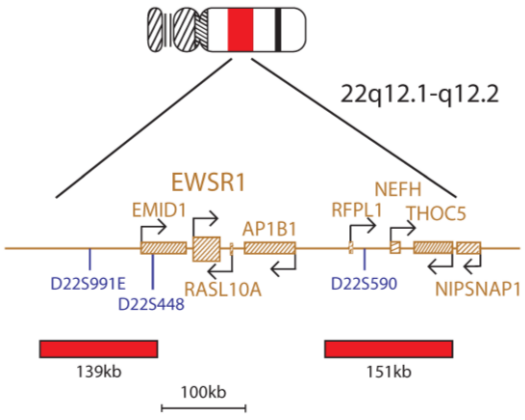
PORTUGUÊS

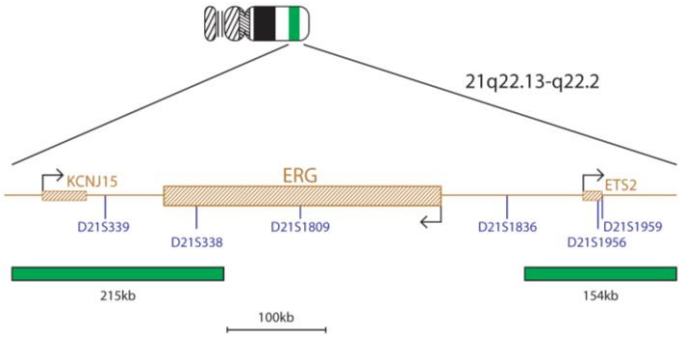
Mais informações disponíveis em www.ogt.com

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 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 "Southern blotting", podem fornecer informações ao nível da expressão genética. Quando é realizada em secções de tecido (quer incluído em crióstato 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
O sarcoma de Ewing (EWS) é o segundo cancro ósseo primário mais frequente em doentes com menos de 20 anos[1]. Caracteriza-se principalmente por uma translocação entre os dois genes – EWSR1 (região 1 do sarcoma de Ewing) e FLI1 (integração 1 do vírus Friend da leucemia) – na translocação t(11;22)(q24;q12), encontrada em 83% de tais tumores[2]. 10% dos restantes casos têm uma translocação variante que envolve EWSR1 e ERG, t(21;22)(q22;q12), e menos de 1% comportam uma das translocações de 7p22 (ETV1), 17q12 (E1AF) ou 2q36 (FEV) com EWSR1[3]. O EWSR1 também está envolvido em translocações em tumores desmoplásicos de células redondas pequenas, um subconjunto de histiocitomas fibrosos angiomatóides, e possivelmente em lipossarcoma mixoide[4,5].

Especificação da sonda
EWSR1, 22q12, Vermelho
ERG, 21q22, Verde





A EWSR1/ERG Translocation Probe consiste em sondas verdes (215 kb e 154 kb) que flanqueiam a região do ponto de quebra no locus do gene ERG e sondas vermelhas (139 kb e 151 kb) que flanqueiam a região do ponto de quebra no locus EWSR1.

Materiais Fornecidos
Sonda: 50 µl por tubo (5 testes) ou 100 µl por tubo (10 testes)
Quantidade de sonda vermelha de EWSR1: 80–100ng/teste
Quantidade de sonda verde de ERG: 240–300ng/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 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 uso profissional.
2. Use luvas quando manusear sondas de ADN e o contracorante DAPI.
3. As soluções de sonda contêm formamida, que é um teratógeno. 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. 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 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.
11. Lamelas de 24 x 24 mm.
12. Temporizador.
13. Incubadora a 37 °C.
14. Cola de solução de borracha.
15. Kit de pré-tratamento de tecidos (LPS 100).

Recomendação de Microscópio de Fluorescência
Para obter 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/Texas Red é ideal para visualizar todas as substâncias fluorescentes e DAPI simultaneamente. Alternativamente, para a visualização de substâncias fluorescentes vermelhas e verdes, utilize o filtro passa-banda duplo FITC/Texas Red.

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
1. Retire a sonda do congelador e deixe-a aquecer até à temperatura ambiente (TA).
2. Certifique-se de que a solução da sonda é uniformemente misturada com uma pipeta.
3. Retire 10 µl–15 µl (consoante o tamanho do tecido) de sonda por cada teste e transfira-os para um tubo de microcentrifugação. Reponha o restante volume da sonda no congelador.
4. Coloque a sonda e a lâmina da amostra numa placa quente a 37 °C (+/-1 °C) durante 5 minutos para pré-aquecimento.
5. 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
6. Desnature a amostra e a sonda em simultâneo aquecendo a lâmina numa placa quente a 75 °C (+/-1 °C) durante 5 minutos.

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

Lavagens pós-hibridização
8. Retire a lamela e todos os vestígios de cola com cuidado.
9. Mergulhe a lâmina em SSC 0,4x (pH 7,0) a 72 °C (+/-1 °C) durante 2 minutos sem agitar.
10. 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.
11. Drene a lâmina e aplique 10 µl–15 µl de DAPI Antifade em cada amostra.
12. Cubra a amostra com uma lamela, elimine eventuais bolhas e deixe a cor desenvolver-se no escuro durante 10 minutos.
13. 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
1. As condições de hibridização podem ser negativamente afetadas pela utilização de reagentes que não sejam os fornecidos ou recomendados pela Cytocell Ltd.
2. Recomenda-se vivamente a utilização de um termómetro calibrado para medir as temperaturas das soluções, banhos-maria e incubadoras, visto que estas temperaturas são críticas para o desempenho ideal do produto.
3. 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.
4. Uma desnaturação incompleta pode resultar em ausência de sinal e uma desnaturação excessiva também pode resultar numa ligação não específica.

Resultados Esperados
Na célula normal, estas sondas aparecerão como manchas vermelhas e verdes discretas, uma para cada homólogo (resultando numa conformação de 2G 2R). Num doente de t(21;22)(q22;q12), aparecerão dois sinais de fusão (amarelos) para além dos sinais vermelhos e verdes dos cromossomas normais 22 e 21 respetivamente (1R 1G 2Y).

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.

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

References/Bibliographie/Bibliografia/Literatur/Bibliografía

1. Bernstein M *et al*., Oncologist 2006;11(5):503-19
2. Turc-Carel C *et al*., Cancer Genet Cytogenet 1988;32:229-38
3. Suárez Antelo *et al.* Arch Bronconeumol. 2010;46(01):44-6
4. Borden EC *et al*., Clin Canc Res 2003;9:1941-56
5. Sandberg AA, Bridge JA, Cancer Genet Cytogenet 2000;123(1):1-26

REF	**PT:** Número de catálogo
IVD	**PT:** Dispositivo de diagnóstico *in vitro*
LOT	**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
CONT	**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