



A Sysmex Group Company



Instruções de Utilização

REF: LPA 004

Kit de Sonda de Enumeração Pré-Natal 18



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 como uma ferramenta de diagnóstico essencial na análise cromossómica 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 hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) pré-natal da CytoCell destina-se à deteção rápida e precisa dos distúrbios cromossómicos fetais mais comuns. O conjunto de sondas destina-se à deteção e quantificação do cromossoma 18 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.¹ 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.²

Especificação das sondas

Centrómero 18, 18p11.1-q11.1 (D18Z1) Azul



A sonda azul do centrómero 18 é uma sonda de ADN diretamente marcada por fluorescência específica para as sequências de ADN alfa satélite na região D18Z1 do cromossoma 18.

Materiais fornecidos

Sonda: 50 µl por frasco (5 testes) ou 100 µl por frasco (10 testes)

Quantidade de sonda de centrómero 18 azul (D18Z1): 112–140ng/teste

A sonda é fornecida pré-misturada em solução de hibridização (formamida; sulfato de dextrano; SSC) e está pronta a ser utilizada.

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 teratógeno; 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 microcentrifuga (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. Centrifuga 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 fluoróforo azul tem especificidade para o espetro 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 o fluoróforo azul 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. Ressuspensão 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 ressuspensão 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 1 hora 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 MgCl₂ 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.
7. Retire a lâmina do etanol a 70%. Repita o passo 6 com etanol a 85%, seguido de etanol a 100%.
8. 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)

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

Pré-desnaturação

5. Retire a sonda do congelador e deixe-a aquecer até à TA.
6. Certifique-se de que a solução de sonda é uniformemente misturada com uma pipeta.

7. Retire 10 µl de sonda por cada teste e transfira-os para um tubo para microcentrífuga. Reponha rapidamente o restante volume de sonda no congelador.
8. Coloque a sonda e a lâmina da amostra numa placa quente a 37 °C (+/-1 °C) durante 5 minutos para pré-aquecimento.
9. 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

10. Desnatura a amostra e a sonda em simultâneo aquecendo a lâmina numa placa quente a 75 °C (+/-1 °C) durante 2 minutos.

Hibridização

11. Coloque a lâmina num recipiente húmido resistente à luz a 37 °C (+/-1 °C) e deixe-a no mesmo de um dia para o outro.

Lavagens pós-hibridização

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

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

1. Não é recomendado recozer ou maturar as lâminas, uma vez que tal pode reduzir a fluorescência do sinal.
2. As condições de hibridização podem ser negativamente afetadas pela utilização de reagentes que não sejam os fornecidos ou recomendados pela CytoCell Ltd.
3. 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.
4. 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.
5. 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 normal deve mostrar dois sinais azuis (2B). As células com trissomia 18 devem apresentar 3 sinais azuis (3B).

Limitações

Este teste não deteta anomalias cromossómicas 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@cytozell.com

W: www.ogt.com

Bibliografia

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

REF	PT: Número de catálogo
	PT: Dispositivo de diagnóstico <i>in vitro</i>
	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
	PT: Conteúdo

Patentes e marcas comerciais

CytoCell é uma marca registada da Cytozell Ltd.



Cytozell 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@cytozell.com
W: www.ogt.com