



A Sysmex Group Company



Instruções de Utilização  
REF: LPE 0XYc / LPE 0XYq

## Conjuntos de sondas de satélite marcadas duplamente



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 cromossómica pré-natal, hematológica e patológica. O ADN alvo, após fixação e desnaturação, está disponível para emparelhamento com 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 contracorado para efeitos de visualização. A microscopia de fluorescência permite então a visualização da sonda hibridizada no material alvo.

### Informações sobre a sonda

As sondas satélite da CytoCell são específicas para cromossomas humanos. São sequências altamente repetidas de ADN humano encontradas no bloco centromérico, pericentromérico ou heterocromático de cada um dos 24 cromossomas. As sondas permitem a identificação e enumeração de cromossomas humanos em células em interfase ou cromossomas em metafase de amostras de sangue periférico.

### Especificação da sonda

#### XYc

DXZ1, Xp11.1-q11.1, Verde

DYZ3, Yp11.1-q11.1, Vermelho

#### XYq

DXZ1, Xp11.1-q11.1, Verde

DYZ1, Yq12, Vermelho

### Satélite- $\alpha$ do cromossoma X (DXZ1) e satélite- $\alpha$ do cromossoma Y (DYZ3)

Este conjunto de sondas de enumeração contém sequências repetidas de ADN alvo específicas de cromossomas localizadas nos centrómeros do cromossoma X e do cromossoma Y.

### Satélite- $\alpha$ do cromossoma X (DXZ1) e satélite III do cromossoma Y (DYZ1)

Este conjunto de sondas de enumeração contém sequências repetidas de ADN específicas de cromossomas localizadas no centrómero do cromossoma X e no bloco heterocromático do cromossoma Y.

### Materiais fornecidos

**Sonda:** 100  $\mu$ l por frasco (10 testes)

#### XYc

Quantidade de sonda satélite- $\alpha$  X: 0,6 ng/teste

Quantidade de sonda satélite- $\alpha$  Y: 500 ng/teste

#### XYq

Quantidade de sonda satélite- $\alpha$  X: 0,6 ng/teste

Quantidade de sonda satélite III Y: 8,3 ng/teste

As sondas são fornecidas em solução de hibridização (formamida; sulfato de dextrano; SSC) e estão prontas para uso. A sonda de ADN é diretamente marcada: X com uma substância fluorescente verde e a sonda Y com uma solução fluorescente vermelha.

**Contracorante:** 150  $\mu$ l por frasco (15 testes)

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

### Advertências e Precauções

- Para utilização em diagnóstico *in vitro*. Apenas para uso profissional.
- Use luvas quando manusear sondas de ADN e o contracorante DAPI.

- 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.
- 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.
- 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

- Placa quente (com uma placa sólida e controlo exato da temperatura até 80 °C).
- Micropipetas e pontas de volume variável, entre 1  $\mu$ l e 200  $\mu$ l.
- Banho-maria com controlo exato da temperatura de 72 °C.
- Tubos de microcentrifugação (0,5 ml).
- Microscópio de fluorescência (ver secção "Recomendação de Microscópio de Fluorescência").
- Jarras de Coplin em plástico ou vidro.
- Pinça.
- Óleo de imersão de lentes para microscópio de fluorescência.
- Centrifugadora de bancada.
- Lâminas de microscópio.
- Lamelas de 24 x 24 mm.
- Temporizador.
- Incubadora a 37 °C.
- Cola de solução de borracha.

### 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.

### Preparação das Amostras

O kit destina-se a ser utilizado em células de sangue periférico em culturas ou células de medula óssea em cultura fixadas no fixador de Carnoy que deve ser preparado de acordo com as diretrizes do laboratório ou instituição. Prepare amostras secas ao ar em lâminas de microscópio, de acordo com os procedimentos citogenéticos padrão.

### Protocolo FISH

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

### Preparação das lâminas

- Coloque uma gota de amostra celular numa lâmina de microscópio de vidro. Deixe secar.
- Mergulhe a lâmina em SSC 2x durante 2 minutos à temperatura ambiente (TA) sem agitar.
- Desidrate numa série de etanol (70%, 85% e 100%), cada uma 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 da sonda é uniformemente misturada com uma pipeta.
- Retire 10  $\mu$ l de sonda por cada teste e transfira para um tubo de microcentrifugação. Coloque rapidamente 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  $\mu$ l da solução 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

- Desnatura 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 uma hora.

### 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  $\mu$ l 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.

\*Se for observado fundo, as lâminas podem ser lavadas em SSC 0,25x no passo 13 em vez de SSC 0,4x para aumentar o rigor da lavagem.

### Estabilidade das lâminas acabadas

As lâminas de FISH permanecem analisáveis durante, no máximo, um mês, se conservadas no escuro a uma temperatura igual ou inferior à TA.

## Recomendações para o Procedimento

1. Não é recomendado o aquecimento ou envelhecimento das 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 das soluções, banhos-maria e incubadoras, visto que estas temperaturas são críticas para o desempenho ideal do produto.
4. 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.
5. Uma desnaturação incompleta pode resultar em ausência de sinal e uma desnaturação excessiva também pode resultar numa ligação não específica.

## Resultados Esperados

### Satélite- $\alpha$ do cromossoma X (DXZ1) e satélite- $\alpha$ do cromossoma Y (DYZ3)

1. Uma amostra feminina diploide deve apresentar um sinal fluorescente verde no centrómero de cada cromossoma X correspondente em 98–100% das células analisadas.
2. Uma amostra masculina diploide deve apresentar um sinal de fluorescência verde no centrómero do cromossoma X juntamente com um sinal de fluorescência vermelha no centrómero do cromossoma Y em 98–100% das células analisadas.
3. A sonda não irá detetar anomalias estruturais adquiridas ou constitucionais nos cromossomas sexuais.
4. A sonda identifica apenas a proporção de células dadoras e receptoras em amostras de medula óssea de receptores de transplante de medula óssea do sexo oposto. Não distingue entre células normais ou malignas.
5. A aneuploidia constitucional dos cromossomas sexuais no paciente ou dador complicará a enumeração do sinal e a interpretação do teste quando a sonda for utilizada para monitorizar pós-transplante os pacientes com medula óssea do sexo oposto.

### Satélite- $\alpha$ do cromossoma X (DXZ1) e satélite III do cromossoma Y (DYZ1)

1. Uma amostra feminina diploide deve apresentar um sinal fluorescente verde no centrómero de cada cromossoma X correspondente em 98–100% das células analisadas.
2. Uma amostra masculina diploide deve apresentar um sinal de fluorescência verde no centrómero do cromossoma X juntamente com um sinal de fluorescência vermelha na região heterocromatina do cromossoma Y em 98–100% das células analisadas.
3. A sonda não irá detetar anomalias estruturais adquiridas ou constitucionais nos cromossomas sexuais.
4. A sonda identifica apenas a proporção de células dadoras e receptoras em amostras de medula óssea de receptores de transplante de medula óssea do sexo oposto. Não distingue entre células normais ou malignas.
5. A aneuploidia constitucional dos cromossomas sexuais no paciente ou dador complicará a enumeração do sinal e a interpretação do teste quando a sonda for utilizada para monitorizar pós-transplante os pacientes com medula óssea do sexo oposto.

## 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

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

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