



A Sysmex Group Company



Instruções de Utilização

REF: LPE xxxR/G

Sondas de enumeração satélite



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, 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.

Limitações

O teste não se destina a ser utilizado como diagnóstico isolado, teste pré-natal, rastreio com base na população, como teste descentralizado ou autodiagnóstico. Este produto destina-se apenas a uma utilização profissional num ambiente laboratorial. Todos os resultados devem ser interpretados por técnicos adequadamente qualificados, tomando em consideração os resultados de outros testes relevantes.

Este produto não foi validado para ser utilizado com tipos de amostra ou tipos de doença que não sejam os especificados na secção da utilização prevista.

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 afetar o desempenho do produto e dar origem a falsos resultados positivos/negativos.

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

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

As sondas são produzidas numa forma concentrada para permitir a mistura, se necessário, de até três sondas na mesma hibridização, da gama de sondas satélite concentradas da CytoCell. É necessário um volume final de 10 µl de solução de sonda por hibridização.

As sondas são diretamente marcadas com uma substância fluorescente vermelha (espectro Texas Red) ou uma substância fluorescente verde (espectro FITC). Para especificações da sonda detalhadas consulte a Tabela 1.

Tabela 1: Especificações da sonda

Cromossoma	Número de catálogo*	Lócus	Região do cromossoma	Classe ADN
1	LPE 001R/G	D1Z1	1q12	satélite III
2	LPE 002R/G	D2Z2	2p11.1-q11.1	Satélite-α

3	LPE 003R/G	D3Z1	3p11.1-q11.1	Satélite-α
4	LPE 004R/G	D4Z1	4p11.1-q11.1	Satélite-α
1/5/19	LPE 005R/G	D1Z7 D5Z2 D19Z3	1p11.1-q11.1 5p11.1-q11.1 19p11.1-q11.1	Satélite-α
6	LPE 006R/G	D6Z1	6p11.1-q11.1	Satélite-α
7	LPE 007R/G	D7Z1	7p11.1-q11.1	Satélite-α
8	LPE 008R/G	D8Z2	8p11.1-q11.1	Satélite-α
9	LPE 009R/G	D9Z3	9q12	satélite III
10	LPE 010R/G	D10Z1	10p11.1-q11.1	Satélite-α
11	LPE 011R/G	D11Z1	11p11.1-q11.1	Satélite-α
12	LPE 012R/G	D12Z3	12p11.1-q11.1	Satélite-α
13/21	LPE 013R/G	D13Z1 D21Z1	13p11.1-q11.1 21p11.1-q11.1	Satélite-α
14/22	LPE 014R/G	D14Z1 D22Z1	14p11.1-q11.1 22p11.1-q11.1	Satélite-α
15	LPE 015R/G	D15Z4	15p11.1-q11.1	Satélite-α
16	LPE 016R/G	D16Z2	16p11.1-q11.1	Satélite-α
17	LPE 017R/G	D17Z1	17p11.1-q11.1	Satélite-α
18	LPE 018R/G	D18Z1	18p11.1-q11.1	Satélite-α
20	LPE 020R/G	D20Z1	20p11.1-q11.1	Satélite-α
X	LPE 0XR/G	DXZ1	Xp11.1-q11.1	Satélite-α
Y	LPE 0YcR/G	DYZ3	Yp11.1-q11.1	Satélite-α
Y	LPE 0YqR/G	DYZ1	Yq12	satélite III

*A letra R especifica uma marcação vermelha e a letra G uma marcação verde

O kit contém apenas uma das sondas da gama de sondas satélite clássicas e alfa humanas diretamente marcadas.

Materiais fornecidos

Sonda: 15 µl por frasco (5 testes)

Quantidade de sonda satélite vermelha: mínimo de 3,33 ng/teste

Quantidade de sonda satélite verde: mínimo de 6,67 ng/teste

A sonda é produzida numa forma concentrada. É fornecida em solução de hibridização (formamida, sulfato de dextrano; SSC).

Solução de hibridização (formamida, sulfato de dextrano; SSC): 150 µl por frasco

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 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. Todos os materiais perigosos devem ser eliminados de acordo com as diretrizes da sua instituição relativamente à eliminação de resíduos perigosos.
6. Certifique-se de que são utilizados os períodos de hibridização corretos e as concentrações SSC, de acordo com as instruções do protocolo fornecidas para as sondas individuais.

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.

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 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

1. Coloque uma gota de amostra celular numa lâmina de microscópio de vidro. Deixe secar.
2. Mergulhe a lâmina em SSC 2x durante 2 minutos à temperatura ambiente (TA) sem agitar.
3. Desidrate numa série de etanol (70%, 85% e 100%), cada uma 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 da sonda é uniformemente misturada com uma pipeta.
7. Utilizando pontas de pipetas novas, remova (volume final de 10 µl de solução de sonda):
 - para uma **hibridização de sonda única**: 3 µl de sonda e 7 µl de solução de hibridização por teste
 - para uma **hibridização de duas sondas**: 3 µl de cada sonda e 4 µl de solução de hibridização por teste
 - para uma **hibridização de três sondas**: 3 µl de cada sonda e 1 µl de solução de hibridização por testee transfira para um tubo de microcentrifugação. Agite gentilmente no vórtex para misturar e centrifugue de forma intermitente na microcentrifugadora. Coloque rapidamente o restante volume da 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 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

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) entre **uma hora e toda a noite**. Para LPE 005R/G, LPE 016R e LPE 020R/G, coloque a lâmina num recipiente húmido resistente à luz a 37 °C (+/-1 °C) durante toda a noite.

Lavagens pós-hibridização

12. Retire a lamela e todos os vestígios de cola com cuidado.
13. Mergulhe a lâmina em SSC 0,25x (pH 7,0) a 72 °C (+/-1 °C) durante 2 minutos sem agitar*. Para LPE 005R/G, LPE 016R e LPE 020R/G, mergulhe a lâmina em SSC 0,4x (pH 7,0) a 72 °C (+/-1 °C) durante 2 minutos sem agitar.
14. 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.
15. Drene a lâmina e aplique 10 µl de DAPI Antifade em cada amostra.
16. Cubra a amostra com uma lamela, elimine eventuais bolhas e deixe a cor desenvolver-se no escuro durante 10 minutos.
17. Visualize com um microscópio de fluorescência.

*Se o sinal final é fraco, repita a FISH, utilizando SSC 0,4x em lavagem pós-hibridização.

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 para uma hibridização de sonda única

Irão existir diferenças no tamanho relativo dos sinais observados entre cromossomas devido à diferença no número de cópia das sequências repetidas entre cromossomas.

1. Utilizando uma das sondas satélite para os cromossomas 1–12 e 15–20 (exceto a sonda 1/5/19), uma amostra diploide deve mostrar um sinal fluorescente no centrómero de ambos os cromossomas correspondentes.
2. Utilizando a sonda para cromossomas 1/5/19, uma amostra diploide deve mostrar um sinal fluorescente no centrómero de cada um dos cromossomas 1, 5 e 19.

3. Utilizando a sonda para cromossomas 13/21 ou 14/22, uma amostra diploide deve mostrar um sinal fluorescente no centrómero de ambos os cromossomas para os cromossomas 13 e 21 ou 14 e 22.

Reatividade Cruzada Conhecida

1. A sonda satélite III do cromossoma 1 pode apresentar uma hibridização cruzada leve para os cromossomas 9, 5 e 19.
2. A sonda satélite- α do cromossoma 2 pode apresentar uma hibridização cruzada leve para o cromossoma 20.
3. A sonda satélite- α do cromossoma 4 pode apresentar uma hibridização cruzada leve para os cromossomas 8 ou 9.
4. A sonda satélite- α do cromossoma 10 pode apresentar uma hibridização cruzada leve para os cromossomas 9, 10 ou 11.
5. A sonda satélite- α do cromossoma 11 pode apresentar uma hibridização cruzada leve para os centrómeros dos cromossomas 17 e X.
6. A sonda satélite- α do cromossoma 12 pode apresentar uma hibridização cruzada leve para os centrómeros nos cromossomas 3, 6, 7 e 10.
7. A sonda satélite- α do cromossoma 17 pode apresentar uma hibridização cruzada leve para os centrómeros dos cromossomas 11 e X.
8. A sonda satélite- α do cromossoma 19 pode apresentar uma hibridização cruzada leve para os cromossomas 1 e 5.
9. A sonda satélite- α do cromossoma X pode apresentar uma hibridização cruzada leve para os centrómeros dos cromossomas Y, 11 e 17.
10. A sonda satélite- α do cromossoma XcYc pode apresentar uma hibridização cruzada leve para o cromossoma Y e para os centrómeros dos cromossomas 11 e 17.
11. A sonda satélite- α /satélite III do cromossoma XcYq pode apresentar uma hibridização cruzada leve para o cromossoma Y e para os centrómeros dos cromossomas 11 e 17.
12. A sonda satélite- α do cromossoma Yc pode apresentar uma hibridização cruzada leve para o cromossoma X.

A probabilidade de hibridação cruzada pode ser reduzida quando se utiliza uma lavagem rigorosa SSC 0,25x, em comparação com uma lavagem rigorosa SSC 0,4x.

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@cytozell.com

W: www.ogt.com

	REF PT: Número de catálogo
	IVD PT: Dispositivo de diagnóstico <i>in vitro</i>
	LOT PT: Código de lote
	i PT: Consulte as Instruções de utilização
	F PT: Fabricante
	V PT: Prazo de validade
	T PT: Limites de temperatura
	Σ PT: Suficiente para 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@cytozell.com
W: www.ogt.com

