



ZytoLight SPEC ALK/EML4 TriCheck Probe

REF Z-2117-50	Σ	5 (0,05 ml)
REF Z-2117-200	Σ	20 (0,2 ml)

Pour la détection qualitative des réarrangements de ALK-EML4 par Hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)



Dispositif médical de diagnostic *in vitro*
En accord avec la directive européenne 98/79/CE

1. Utilisation prévue

ZytoLight SPEC ALK/EML4 TriCheck Probe (PL74) est prévu pour être utilisé pour la détection qualitative des réarrangements impliquant le gène humain ALK en 2p23.1-p23.2 et le gène humain EML4 en 2p21 fixés au formol et inclus en paraffine par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH). La sonde est prévue pour être utilisée avec le kit d'implémentation ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Prod. No. Z-2028-5/-20).

L'interprétation des résultats doit être effectuée dans le contexte de l'histoire clinique du patient par rapport à d'autres données cliniques et pathologiques du patient par un pathologiste qualifié.

2. Pertinence clinique

L'utilisation de cette sonde permet de distinguer les inversions et translocations EML4-ALK affectant ALK, mais pas EML4, telles que les translocations ALK-TFG ou ALK-KIF5B. Les inversions dans le bras court du chromosome 2 [inv(2)(p21p23)] ont été fréquemment détectées dans le cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC) et conduisent à la formation de transcrits de fusion EML4-ALK. Quelques rapports ont aussi identifié des transcrits de fusion EML4-ALK dans les cancers du sein, gastrique et colorectal. De nombreux points de rupture différents affectant ALK et EML4 ont été identifiés dans ces inversions respectives. Ainsi, de multiples variantes de transcrits EML4-ALK ont été identifiées, tous impliquant le domaine kinase intracellulaire de ALK. Les traitements ciblés de kinase ALK pourraient représenter une stratégie thérapeutique très efficace chez les patients CPNPC porteurs de réarrangements EML4-ALK. Pour la détection de ce sous-ensemble de patients CPNPC, la détection spécifique des réarrangements EML4-ALK au moyen de la fluorescence *in situ* hybridation (FISH) est un outil utile servant à faire un diagnostic et de sélectionner un traitement.

3. Principe du test

L'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) permet la détection et la visualisation de séquences d'acide nucléique spécifiques dans une préparation cellulaire. Les fragments d'ADN marqués par fluorescence, appelés sondes FISH, et leurs brins d'ADN complémentaires dans les échantillons sont dénaturés et puis ré-appariés pendant l'hybridation. Par la suite, les fragments de sonde non spécifiques et non hybridés sont éliminés par des étapes de lavage stringent. Après une contre coloration de l'ADN avec du DAPI, les fragments de sondes hybridés sont visualisés au moyen d'un microscope à fluorescence équipé de filtres d'excitation et d'émission spécifiques aux fluorochromes avec lesquels les fragments de sondes FISH ont été marqués.

4. Réactifs fournis

ZytoLight SPEC ALK/EML4 TriCheck Probe est composé de:

- Polynucléotides marqués au ZyGreen (excitation 503 nm/émission 528 nm) (~10.0 ng/ μ l), qui ciblent une séquence de 2p23.1-p23.2* (chr2:29,460,144-30,095,822) proximale de la région des points de rupture de ALK (voir figure 1).
- Polynucléotides marqués au ZyOrange (excitation 547 nm/émission 572 nm) (~4.5 ng/ μ l), qui ciblent une séquence de 2p23.2* (chr2:29,174,204-29,383,335) distale de la région des points de rupture de ALK (voir figure 1).
- Polynucléotides marqués au ZyBlue (excitation 418 nm/émission 467 nm) (~37.0 ng/ μ l), qui ciblent une séquence de 2p21* (chr2:41,573,525-43,349,624) hébergeant la région du gène EML4 (voir figure 1).

- Tampon d'hybridation à base de formol

* selon Human Genome Assembly GRCh37/hg19

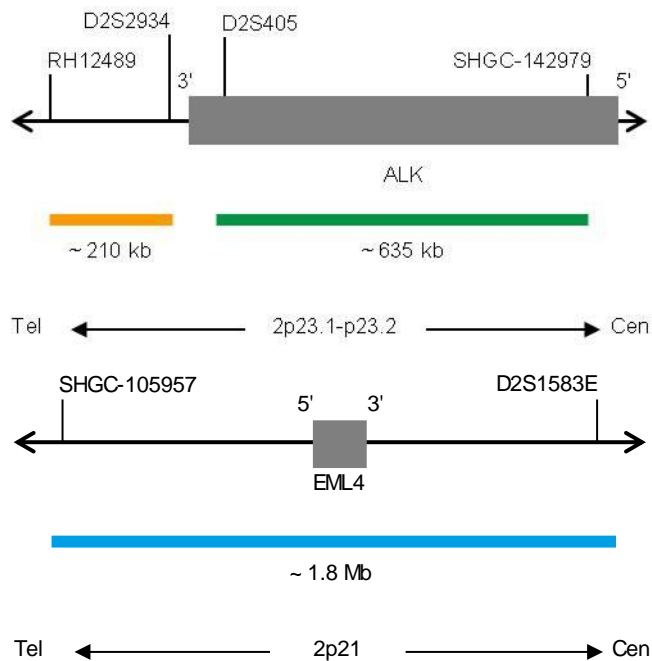


Fig. 1 : En haut : Carte de la sonde SPEC ALK ; En bas : Carte de la sonde SPEC EML4 (pas à l'échelle)

ZytoLight SPEC ALK/EML4 TriCheck Probe est disponible en deux tailles :

- Z-2117-50 : 0,05 ml (5 réactions de 10 µl chacune)
- Z-2117-200 : 0,2 ml (20 réactions de 10 µl chacune)

5. Matériel requis mais non fourni

- ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Prod. No. Z-2028-5/-20)
- Echantillons pour les contrôles positifs et négatifs
- Lames pour microscope, chargées positivement
- Bain-marie (37 °C, 98 °C)
- Système d'hybridation ou plaque chauffante
- Système d'hybridation ou chambre humide dans un four à hybridation
- Pipettes ajustables (10 µl, 25 µl)
- Pots ou bacs de coloration
- Chronomètre
- Thermomètre calibré
- Ethanol ou réactif à l'alcool
- Xylène
- Eau distillée ou déminéralisée
- Lamelles (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Ciment caoutchouc, comme par exemple: Fixogum Rubber Cement (Prod. No. E-4005-50/-125) ou similaire
- Microscope à fluorescence adéquatement entretenu (400-1000x)
- Huile à immersion compatible avec la microscopie à fluorescence
- Sets de filtres appropriés

6. Stockage et manipulation

Conserver entre 2 et 8 °C dans une position verticale et protégée à l'abri de la lumière.

Utiliser à l'abri de la lumière. Remettre dans les conditions de stockage immédiatement après utilisation. Ne pas utiliser les réactifs après leur date de péremption indiquée sur l'étiquette. Le produit est stable jusqu'à sa date de péremption indiquée sur l'étiquette lorsqu'il est utilisé dans les bonnes conditions.

7. Avertissements et précautions

- Lire les instructions avant utilisation !
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
- Ce produit contient des substances (en faibles concentrations et volumes) nocifs pour la santé et potentiellement infectieux. Eviter le contact direct avec ces réactifs. Prenez les mesures de protection appropriées (utilisez des gants jetables, des lunettes de protection et des vêtements de laboratoire).
- Si les réactifs entrent en contact avec la peau, rincer immédiatement avec beaucoup d'eau.
- Une fiche signalétique de sécurité à l'usage de l'utilisateur professionnel est disponible sur demande.
- Ne pas réutiliser les réactifs.
- Éviter la contamination croisée des échantillons car cela peut entraîner des résultats erronés.
- La sonde ne doit pas être exposée à la lumière, en particulier à une lumière intense, pendant une longue période ; chaque étape doit être faite, si possible, dans l'obscurité et/ou en utilisant des récipients opaques.

Mentions de danger et conseils de prudence:

Le composant dangereux déterminant est le formol.



Danger

H351	Susceptible de provoquer le cancer.
H360FD	Peut nuire à la fertilité. Peut nuire au fœtus.
H373	Risque présumé d'effets graves pour les organes à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée.
P201	Se procurer les instructions spéciales avant utilisation.
P202	Ne pas manipuler avant d'avoir lu et compris toutes les précautions de sécurité.
P260	Ne pas respirer les poussières/ fumées/gaz/ brouillards/ vapeurs/ aérosols.
P280	Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
P308+P313	EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée: consulter un médecin.
P405	Garder sous clef.

8. Restrictions

- Destiné à une utilisation en diagnostic *in vitro*.
- Destiné à un usage professionnel uniquement.
- L'interprétation clinique de la présence ou de l'absence de marquage doit être faite en tenant compte du contexte Clinique, de la morphologie, et d'autres critères histo-pathologiques ainsi que d'autres tests diagnostiques. Il incombe à un pathologiste qualifié de connaître les sondes FISH, les réactifs, les tableaux de diagnostic et les méthodes utilisées pour produire la préparation colorée. La coloration doit être effectuée dans un laboratoire certifié et sous licence sous la supervision d'un pathologiste ayant la responsabilité d'examiner les lames colorées et d'assurer l'adéquation des contrôles positifs et négatifs.
- La coloration de l'échantillon, en particulier l'intensité du signal et le bruit de fond, dépend de la manipulation et de la préparation de l'échantillon avant marquage. Une mauvaise fixation, congélation, décongélation, un mauvais lavage, séchage, chauffage, de mauvaises coupes, ou une contamination avec d'autres échantillons ou fluides peut produire des artefacts et de faux résultats. Des résultats incohérents peuvent résulter des variations des méthodes de fixation et d'inclusion, ainsi que des irrégularités inhérentes à l'échantillon.
- La sonde doit être utilisée uniquement pour la détection du locus décrit au paragraphe 4. « Réactifs fournis ».
- Les performances ont été validées en utilisant les instructions décrites dans cette notice. Les modifications de ces procédures peuvent altérer les performances et doivent être validées par l'utilisateur.

9. Substances interférentes

Les globules rouges présents dans l'échantillon peuvent présenter une autofluorescence qui entrave la reconnaissance du signal.

Les fixateurs suivants sont incompatibles avec la FISH:

- Fixateur de Bouin
- Fixateur B5
- Fixateurs acides (par exemple l'acide picrique)
- Fixateur de Zenker
- Alcools (lorsqu'ils sont utilisés seuls)
- Chlorure de mercure
- Fixateur formaldéhyde/zinc
- Fixateur de Hollande
- Formol non tamponné

10. Préparation des échantillons

Recommandations:

- Fixation dans 10 % de formol tamponné pendant 24 h à température ambiante (18 à 25 °C)
- Taille de l'échantillon $\leq 0,5 \text{ cm}^3$.
- Utiliser de la paraffine de bonne qualité
- L'inclusion doit être faite à une température inférieure à 65 °C.
- Préparer des sections de 2-4 μm .
- Utiliser des lames pour microscope chargées positivement
- Fixer pendant 2 à 16 h à 50-60 %.

11. Traitement préparatoire du produit

Le produit est prêt-à-l'emploi. Il n'est pas nécessaire de le reconstituer, le mélanger ou le diluer. Mettre la sonde à température ambiante (18 à 25 °C) avant utilisation, à l'abri de la lumière. Avant d'ouvrir le tube, mélanger à l'aide d'un vortexeur et centrifuger brièvement.

12. Protocole

Prétraitement de l'échantillon

Effectuer le prétraitement de l'échantillon (déparaffinage et protéolyse) selon les instructions d'utilisation du [ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit](#).

Dénaturation et hybridation

1. Mettre 10 μl de sonde sur chaque échantillon prétraité
 2. Couvrir les échantillons avec des lamelles de 22 mm x 22 mm (en évitant les bulles) et sceller les lamelles.
- Nous recommandons d'utiliser un ciment caoutchouc (par exemple le Fixogum) pour sceller.*
3. Placer les lames sur une plaque chauffante ou dans un système d'hybridation pour dénaturer les échantillons pendant 10 min à 75 °C.
 4. Transférer les lames dans une chambre humide et hybrider toute la nuit à 37 °C (par exemple dans un four à hybridation).

Il est essentiel que les échantillons ne sèchent pas pendant l'étape d'hybridation.

Post-hybridation

Effectuer l'étape de post-hybridation (lavage, contre-coloration et visualisation au microscope à fluorescence) en suivant les instructions d'utilisation du [ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit](#).

13. Interprétation des résultats

Au moyen de l'utilisation de sets de filtres appropriés, les signaux d'hybridation de la sonde apparaissent en vert (en position proximale de la région des points de rupture de ALK), en orange (en position distale de la région des points de rupture de ALK) et en bleu (région du gène EML4).

Situation normale: Dans les interphases de cellules normales sans réarrangement de la région du gène EML4-ALK, deux signaux de fusion orange/verts et deux signaux bleus apparaissent (voir figure 2).

Situation aberrante: Une inversion de EML4-ALK est indiquée par un signal vert séparé, un signal orange séparé et un signal bleu supplémentaire. Les signaux vert et orange séparés sont chacun colocalisés avec un signal bleu. Une translocation de ALK n'affectant pas EML4 est indiquée par des signaux orange et verts séparés sans signal bleu supplémentaire. Une inversion EML4-ALK avec une suppression des séquences 5'- ALK est indiquée par la perte d'un signal vert et la colocalisation du signal orange isolé avec un signal bleu supplémentaire (voir figure 2).

Des signaux se chevauchant peuvent apparaître comme étant des signaux jaunes.

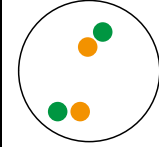
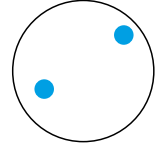
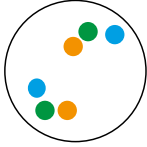
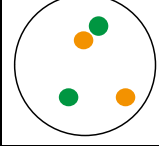
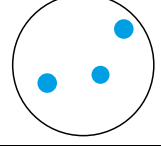
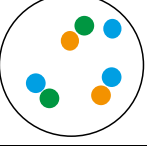
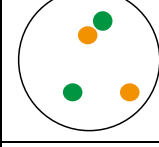
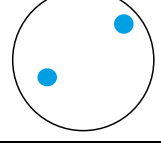
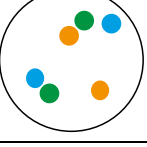
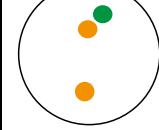
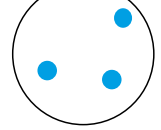
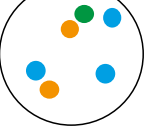
	Set de filtres à bande double verts/orange	Set de filtres à bande simple bleu	Image combinée ou set de filtres à bande triple
Cellules normales			
Inversion EML4 – ALK			
Translocation ALK – n'impliquant pas EML4			
Inversion EML4 – ALK avec suppression des séquences 5' ALK			

Fig. 2 : Résultats attendus dans les noyaux en interphase normale et présentant une aberration

Une autre distribution de signal peut être observée dans certains échantillons anormaux qui pourraient entraîner un motif de signal différent de ceux décrits ci-dessus, ce qui indique des variations de réarrangements. Les modèles de signaux inattendus devraient être étudiés de manière plus approfondie.

Veillez noter :

- En raison de la chromatine décondensée, les signaux FISH simples peuvent apparaître comme de petits groupes de signaux. Ainsi, deux ou trois signaux de même taille, séparés par une distance ≤ 1 au diamètre de signal, doivent être comptés comme un seul signal.
- Ne pas prendre en compte les chevauchements de noyaux.
- Ne pas compter les noyaux trop digérés (reconnaissables par des zones noires visibles dans le noyau).
- Ne pas compter des noyaux ayant une forte auto-fluorescence, ce qui entrave la reconnaissance du signal.
- Un résultat négatif ou équivoque peut être causé par différents facteurs (voir chapitre 17).
- Afin d'interpréter correctement les résultats, l'utilisateur doit valider ce produit avant de l'utiliser dans des procédures de diagnostic conformément aux directives nationales et/ou internationales.

14. Procédures de contrôle qualité recommandées

Afin de surveiller les performances correctes des spécimens traités et des réactifs d'essai, chaque dosage doit être accompagné de contrôles internes et externes. Si les contrôles internes et/ou externes n'indiquent pas une coloration appropriée, les résultats avec les échantillons de patients doivent être considérés comme invalides.

Contrôle interne: Cellules non néoplasiques dans l'échantillon qui présentent un motif de signal normal, par exemple des fibroblastes.

Contrôle externe: Échantillons contrôles négatifs et positifs validés.

15. Caractéristiques de performances

Précision : La localisation de l'hybridation de la sonde a été évaluée sur des étalements de métaphase d'hommes normaux du point de vue du caryotype. Dans tous les échantillons testés, la sonde s'est hybridée uniquement aux loci attendus. Il n'a été observé aucun signal supplémentaire et aucune hybridation croisée supplémentaire. Par conséquent, l'exactitude calculée était de 100 %.

Sensibilité analytique : Pour l'évaluation de la sensibilité analytique, la sonde a été évaluée sur des étalements de métaphase d'hommes normaux du point de vue du caryotype. Tous les noyaux ont présenté un modèle de signaux normaux attendus dans tous les échantillons testés. Par conséquent, la sensibilité analytique calculée était de 100 %.

Spécificité analytique : Pour l'évaluation de la spécificité analytique, la sonde a été évaluée sur des étalements de métaphase d'hommes normaux du point de vue du caryotype. Dans tous les échantillons testés, tous les signaux se sont hybridés uniquement aux loci cibles attendus et pas d'autres loci. Par conséquent, la spécificité analytique calculée était de 100 %.

16. Elimination

L'élimination des réactifs doit être effectuée conformément à la réglementation locale.

17. Assistance

Tout écart par rapport au mode d'emploi peut conduire à des résultats de coloration inférieurs ou à aucune coloration du tout.

Faible signal ou aucun signal

Cause possible	Action
Pas de séquence cible disponible	Utiliser les contrôles appropriés
L'échantillon de cellules ou de tissu n'est pas correctement fixé	Optimiser le temps de fixation et le fixateur utilisé ou ajouter une étape de post-fixation en suivant le « Protocole » du manuel du <i>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</i>
Le prétraitement à la chaleur, la protéolyse, la dénaturation, l'hybridation ou le lavage stringent ont été faits à une mauvaise température	Vérifier la température de tous vos instruments utilisés, en utilisant un thermomètre calibré
Le prétraitement protéolytique n'est pas effectué correctement	Optimiser le temps d'incubation de la pepsine, l'augmenter ou le diminuer si nécessaire
Evaporation de la sonde	Lors de l'utilisation d'un système d'hybridation, l'utilisation des bandes humides/réservoirs remplis d'eau est obligatoire. Lors de l'utilisation d'un four à hybridation, il faut utiliser une chambre humide. En outre, la lamelle doit être complètement scellée, par exemple avec du Fixogum, afin d'empêcher le séchage de l'échantillon lors de l'hybridation
Le tampon de lavage stringent a une concentration trop basse	Vérifier la concentration du tampon de lavage stringent
Anciennes solutions de déshydratation	Préparer des nouvelles solutions de déshydratation
Microscope à fluorescence mal réglé	Régler correctement
Mauvais sets de filtres utilisés	Utiliser les sets de filtres appropriés aux fluorochromes de la sonde. <i>Les sets de filtres à triple bande passante offrent moins de luminosité par rapport aux sets de filtres à simple ou double bande passante. Par conséquent, les signaux peuvent sembler plus faibles en utilisant les sets de filtres à triple bande passante</i>
Sondes/fluorochromes endommagés par la lumière	Effectuer les étapes d'hybridation et de lavage dans l'obscurité.

Signaux d'hybridation croisée ; bruit de fond

Cause possible	Action
Déparaffinage incomplet	Utiliser de nouvelles solutions ; vérifier le temps de déparaffinage
Prétraitement protéolytique trop important	Réduire le temps d'incubation de la pepsine
Volume de sonde par zone trop important	Réduire le volume de sonde par coupe/zone, distribuer la sonde en gouttelettes pour éviter la concentration locale
Les lames sont refroidies à température ambiante avant l'hybridation	Transférer les lames rapidement à 37 °C
Concentration du tampon de lavage stringent trop élevée	Vérifier la concentration du tampon de lavage stringent
Température de l'étape de lavage suivant l'hybridation trop basse	Vérifier la température et l'augmenter si nécessaire
Déshydratation des échantillons entre les différentes étapes d'incubation	Eviter la déshydratation en scellant les lames et en effectuant les étapes d'incubation dans un environnement humide

Morphologie tissulaire dégradée

Cause possible	Action
Les échantillons de cellules ou de tissus n'ont pas été fixés correctement	Optimiser le temps de fixation et le fixateur ou ajouter une étape de post-fixation en suivant le « Protocole » du manuel <i>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</i>
Le prétraitement protéolytique n'est pas effectué correctement	Optimiser le temps d'incubation de la pepsine, l'augmenter ou le diminuer si nécessaire
Séchage insuffisant avant l'application de la sonde	Prolonger le séchage à l'air

Noyaux chevauchants

Cause possible	Action
Epaisseur inappropriée des sections de tissu	Préparer des coupes au microtome de 2-4 µm d'épaisseur

Echantillon glissant sur la lame

Cause possible	Action
Revêtement antidérapant inadéquat	Utiliser des lames appropriées
Prétraitement protéolytique trop fort	Réduire le temps d'incubation de la pepsine

Contre coloration faible

Cause possible	Action
Solution DAPI faiblement concentrée	Utiliser à la place le produit <i>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</i> (Prod. No. MT-0008-0.8)
Temps d'incubation avec le DAPI trop court	Ajuster le temps d'incubation avec le DAPI

18. Bibliographie

- Inamura K, et al. (2009) *Mod Pathol* 22: 508-15.
- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Koivunen JP, et al. (2008) *Clin Cancer Res* 14: 4275-83.
- Lawce HJ & Olson S (2013) *J Assoc Genet Technol* 39: 66-71.
- Martelli MP, et al. (2009) *Am J Pathol* 174: 661-70.
- Perner S, et al. (2008) *Neoplasia* 10: 298-302.
- Preusser M, et al. (2013) *Lung Cancer* 80: 278-83.
- Rodig SJ, et al. (2009) *Clin Cancer Res* 15: 5216-23.
- Sasaki T, et al. (2010) *Eur J Cancer* 46: 1773-80.
- Schildgen V, et al. (2012) *Per Med* 9: 801-3.
- Schildhaus HU, et al. (2013) *Mod Pathol* 26: 1468-77.
- Schoppmann SF, et al. (2013) *Eur J Cancer* 49: 1876-81.
- Thunnissen E, et al. (2012) *Virchows Arch* 461: 245-57.
- Von Laffert M, et al. (2013) *Lung Cancer* 81: 200-6.
- Wilkinson DG: *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.

Nos experts sont disponibles pour répondre à vos questions.
Merci de nous contacter à helptech@zytovision.com



ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/Allemagne
Téléphone: +49 471 4832-300
Fax: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
Courriel: info@zytovision.com

Marques déposées:

ZytoVision® et ZytoLight® sont des marques déposées de ZytoVision GmbH.