



ZytoLight

Bladder Cancer Quadruple Color Probe

REF Z-2305-50 Σ 5 (0.05 ml)

REF Z-2305-200 Σ 20 (0.2 ml)

Pour la détection qualitative du gène humain CDKN2A ainsi que des alpha-satellites des chromosomes 3, 7 et 17 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 Bladder Cancer Quadruple Color Probe (PL259) est prévu pour être utilisé pour la détection qualitative du gène humain CDKN2A ainsi que des alpha-satellites des chromosomes 3, 7 et 17 dans des spécimens cytologiques tels que des échantillons d'urine par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH). La sonde est prévue pour être utilisée avec le kit d'implémentation ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit (Prod. No. Z-2099-20).

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

Le cancer de la vessie (BC) est le neuvième cancer le plus répandu dans le monde. Environ 430 000 nouveaux cas de CB et 165 000 décès de CB sont survenus en 2012. La plupart de ces tumeurs sont non invasives, bien différenciées, papillaires (pTa, grade bas) et peuvent être soignées par résection endoscopique transurétrale. Cependant, jusqu'à 70 % des pTa et des tumeurs superficiellement invasives (pT1) réapparaissent et parmi celles-ci, 15 à 30 % sont caractérisées par une progression tumorale. Il est donc nécessaire d'assurer un suivi à long terme des patients atteints de BC. Les deux méthodes standard utilisées dans le suivi sont soit invasives (cystoscopie), soit peu sensibles (cytologie). Les cellules BC sont caractérisées par des changements cytogénétiques typiques. La délétion homozygote du gène CDKN2A à 9p21.3 et la polysomie des chromosomes 3, 7 et/ou 17 sont des anomalies courantes observées dans le carcinome des cellules urothéliales, qui peuvent toutes être détectées par FISH. Il a été démontré que le FISH sur des cellules provenant de l'urine est très sensible et spécifique pour la détection de cellules tumorales dans l'urine.

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 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 Bladder Cancer Quadruple Color Probe est composé de :

- Polynucléotides marqués au ZyGold (excitation 532 nm/émission 553 nm) (~5,5 ng/ μ l), qui ciblent une séquence de 9p21.3* (chr9:21,742,619-22,056,863) hébergeant la région du gène CDKN2A (voir figure 1).
- Polynucléotides marqués au ZyRed (excitation 580 nm/émission 599 nm) (~0,5 ng/ μ l), qui ciblent une séquence de 3p11.1-q11.1 particulière pour la région centromérique alpha satellite D3Z1 du chromosome 3.
- Polynucléotides marqués au ZyGreen (excitation 503 nm/émission 528 nm) (~4,5 ng/ μ l), qui ciblent une séquence de 7p11.1-q11.1 particulière pour la région centromérique alpha satellite D7Z1 du chromosome 7.
- Polynucléotides marqués au ZyBlue (excitation 418 nm/émission 467 nm) (~12 ng/ μ l), qui ciblent une séquence de 17p11.1-q11.1 particulière pour la région centromérique alpha satellite D17Z1 du chromosome 17.

- Tampon d'hybridation à base de formol

* selon Human Genome Assembly GRCh37/hg19

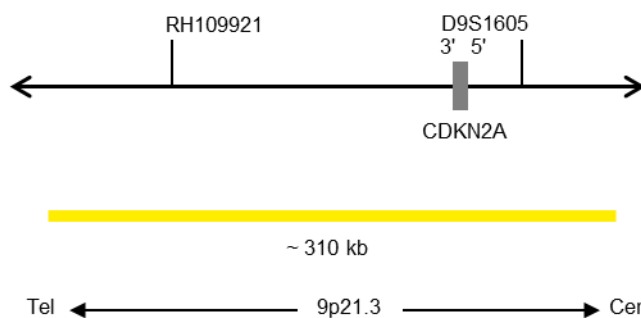


Fig. 1 : Carte de la sonde SPEC CDKN2A (pas à l'échelle)

ZytoLight Bladder Cancer Quadruple Color Probe est disponible en deux tailles :

- Z-2305-50 : 0,05 ml (5 réactions de 10 μ l chacune)
- Z-2305-200 : 0,2 ml (20 réactions de 10 μ l chacune)

5. Matériel requis mais non fourni

- ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit (Prod. No. Z-2099-20)
- Échantillons pour les contrôles positifs et négatifs
- Lames pour microscope, non coatées
- Bain-marie (70 °C)
- Système d'hybridation ou plaque chauffante
- Système d'hybridation ou chambre humide dans un four à hybridation
- Pipettes ajustables (10 μ l, 25 μ l)
- Pots ou bacs de coloration
- Chronomètre
- Thermomètre calibré
- Ethanol ou réactif à l'alcool
- Formaldéhyde 37 % sans acide ou formol 10 % tamponné (pH neutre)
- Citrate de sodium salin 2x (SSC), par exemple: 20x SSC Solution (Référence WB-0003-50)
- Eau distillée ou déminéralisée
- Lamelles (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Ciment caoutchouc, 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 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 auto fluorescence qui entrave la reconnaissance du signal.

10. Préparation des échantillons

Préparer les échantillons en suivant les instructions d'utilisation du [ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit](#).

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 selon les instructions d'utilisation du [ZytoLight FISH-Cytology 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 5 min à 72 °C.
4. Procéder à l'hybridation pendant 2 à 16 heures (toute la nuit) à 37 °C, soit en transférant les lames dans un système d'hybridation soit dans une chambre humide et 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-Cytology 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 doré (région du gène CDKN2A), en rouge (CEN 3), en vert (CEN 7) et en bleu (CEN 17).

Situation normale : Dans les interphases de cellules normales ou de cellules sans une suppression impliquant la région du gène CDKN2A, deux signaux dorés, deux signaux rouges, deux signaux verts et deux signaux bleus apparaissent (voir figure 2).

Situation aberrante : Dans une cellule avec une suppression affectant la région du gène CDKN2A, on observera une diminution du nombre de signaux doré. Les suppressions affectant uniquement des parties de la région du gène CDKN2A peuvent entraîner un motif de signaux normaux avec des signaux doré de taille réduite. Dans les cellules présentant une aneusomie du chromosome 3, 7 ou 17, le nombre de signaux visibles de la couleur respective sera inférieur ou supérieur (voir figure 2).

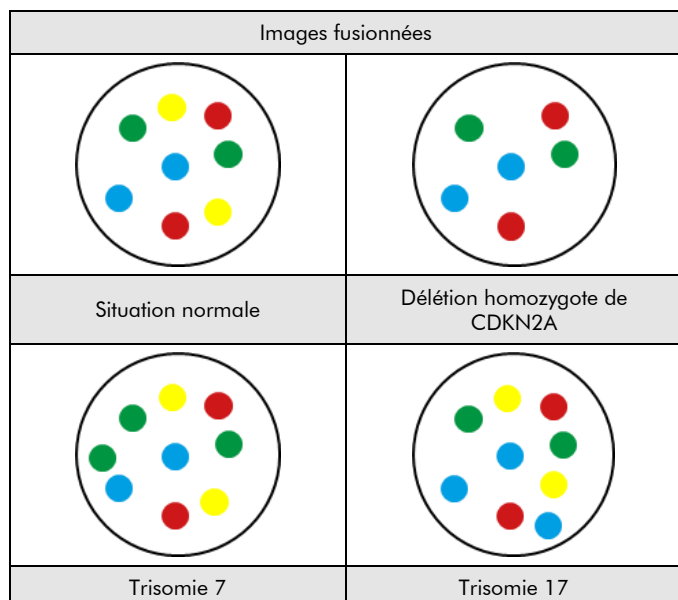


Fig. 2 : Résultats attendus dans les noyaux en interphase normale et présentant une aberration

Une autre distribution de signal peut être observée dans certains échantillons anormaux qui pourraient entraîner un motif de signal différent de celui décrit 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.

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. Élimination

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 |
| 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 |
|--|--|
| 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 dégradée

| Cause possible | Action |
|--|---|
| 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 |

Contre coloration faible

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

18. Bibliographie

- Antoni S, et al. (2017) *Eur Urol* 71: 96-108.
- Dimashkieh H, et al. (2013) *Cancer Cytopathol* 121: 591-7.
- Junker K, et al. (2006) *Cytogenet Genome Res* 114: 279-83.
- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Placer J, et al. (2002) *Eur Urol* 42: 547-52.
- Sokolova IA, et al. (2000) *J Mol Diagn* 2: 116-23.
- 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.