



**ZytoLight**

**SPEC PML/RARA Dual Color**

**Dual Fusion Probe**

REF Z-2113-50  $\nabla$  5 (0.05 ml)

REF Z-2113-200  $\nabla$  20 (0.2 ml)

Per la rilevazione qualitativa delle traslocazioni t(15;17)(q24;q21.2) mediante ibridazione in situ fluorescente (FISH)



Dispositivo medico – diagnostico in vitro  
in conformità alla Direttiva UE 98/79/EC

## 1. Scopo previsto

La sonda ZytoLight SPEC PML/RARA Dual Color Dual Fusion Probe (PL70) è adibita alla rilevazione qualitativa delle traslocazioni t(15;17)(q24;q21.2) che interessano il gene PML nella regione cromosomica 15q24.1 e il gene RARA in 17q21.2 in campioni citologici come cellule leucemiche mediante ibridazione *in situ* fluorescente (FISH). La sonda va utilizzata con lo ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit (codice prodotto Z-2099-20).

L'interpretazione dei risultati deve essere eseguita da un patologo qualificato, considerando il contesto della storia clinica del paziente rispettando gli altri dati clinici e patologici.

## 2. Rilevanza clinica

Le traslocazioni che coinvolgono il gene PML (leucemia promielocitica, anche noto come MYL) e il gene RARA (recettore alfa dell'acido retinoico, anche noto come RARa) sono caratteristiche della leucemia promielocitica acuta (APL), un sottotipo di leucemia mieloide acuta. Sono stati identificati diversi partner di fusione di RARA, ma nel 95% dei casi di APL i riarrangiamenti coinvolgono il gene PML. La traslocazione t(15;17)(q24;q21) porta alla fusione del gene PML con il gene RARA. Sembra che questa fusione giochi un ruolo fondamentale nell'induzione, nello sviluppo e nella progressione dell'APL. Poiché la fusione PML/RARA influenza la risposta di queste neoplasie alla terapia con acido retinoico tutto-trans (ATRA) e con la chemioterapia convenzionale, è importante distinguere in modo accurato tra la traslocazione t(15;17) e le traslocazioni che coinvolgono altri partner di RARA.

## 3. Principio del metodo

La tecnica di ibridazione *in situ* fluorescente (FISH) consente la rilevazione e la visualizzazione di sequenze nucleotidiche specifiche in preparazioni cellulari. I frammenti di DNA marcati con fluorocromi, chiamati sonde FISH, e i loro target complementari nei preparati cellulari sono codenaturati e successivamente ibridati insieme. In seguito, i frammenti di sonda non legati e aspecifici sono rimossi con lavaggi stringenti. Dopo la controcolorazione del DNA con DAPI, i frammenti di sonde ibridate sono visualizzati utilizzando il microscopio a fluorescenza equipaggiato con filtri specifici per i fluorocromi con cui sono direttamente marcati i frammenti di sonde FISH.

## 4. Reagenti forniti

La ZytoLight SPEC PML/RARA Dual Color Dual Fusion Probe è composta da:

- Polinucleotidi (~12.0 ng/ $\mu$ l) marcati con ZyGreen (eccitazione 503 nm/emissione 528 nm), le cui sequenze target mappano in 17q12-q21.2\* (chr17:37,953,503-38,818,030) (vedere Fig. 1).
- Polinucleotidi (~6.0 ng/ $\mu$ l) marcati con ZyOrange (eccitazione 547 nm/emissione 572 nm), le cui sequenze target mappano in 15q24.1\* (chr15:73,910,690-74,699,298) (vedere Fig. 1).

\*conformemente all'Human Genome Assembly GRCh37/hg19

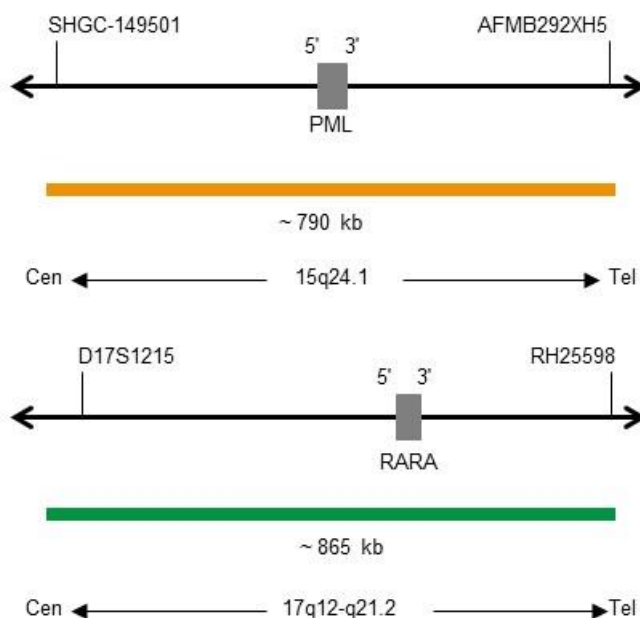


Fig. 1: In alto: Mappa della sonda SPEC PML; In basso: Mappa della sonda SPEC RARA (non in scala)

La ZytoLight SPEC PML/RARA Dual Color Dual Fusion Probe è disponibile nei seguenti due formati:

- Z-2113-50: 0.05 ml (5 test da 10  $\mu$ l ciascuno)
- Z-2113-200: 0.2 ml (20 test da 10  $\mu$ l ciascuno)

## 5. Materiali richiesti ma non forniti

- ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit (codice prodotto Z-2099-20)
- Campioni di controllo positivo e negativo
- Vetrini portaoggetto, non a carica positiva
- Bagno termostato (70°C)
- Ibridizzatore o piastra calda
- Ibridizzatore o camera umida in stufa da ibridazione
- Pipette a volume variabile (10  $\mu$ l, 25  $\mu$ l)
- Vaschette di colorazione
- Timer
- Termometro calibrato
- Etanolo o altro reagente alcolico
- Formaldeide 37%, acid-free, o formalina 10% neutra tamponata

- 2x Saline-Sodium Citrate (SSC), per esempio, da 20x SSC Solution (codice prodotto WB-0003-50)
- Acqua deionizzata o distillata
- Vetrini coprioggetto (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Colla per vetrini, per esempio, Fixogum Rubber Cement (codice prodotto E-4005-50/-125) o simili
- Microscopio a fluorescenza (400-1000x)
- Olio a immersione per fluorescenza
- Set di filtri appropriato

## 6. Conservazione e stoccaggio

Conservare a 2-8°C in posizione verticale e protetta dalla luce.

Utilizzare proteggendo dalla luce. Riportare alle condizioni di stoccaggio indicate subito dopo l'utilizzo. Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza indicata in etichetta. Il prodotto è stabile fino alla data di scadenza indicata in etichetta, se correttamente conservato.

## 7. Avvertenze e precauzioni

- Leggere le istruzioni prima dell'utilizzo.
- Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza
- Questo prodotto contiene sostanze (in bassa concentrazione e volume) che sono nocive per la salute e potenzialmente infette. Evitare qualsiasi contatto diretto con i reagenti. Prendere le adeguate misure di precauzione (utilizzare i guanti, gli occhiali di protezione e il camice da laboratorio). Se il reagente dovesse entrare in contatto con la pelle, risciacquare subito abbondantemente.
- La scheda di sicurezza è disponibile su richiesta per usi professionali.
- Non riutilizzare i reagenti.
- Evitare la cross-contaminazione dei campioni, in quanto questo potrebbe portare a risultati sbagliati.
- La sonda non deve essere esposta alla luce, in particolare modo a luci intense, per lunghi periodi di tempo; per esempio, tutti i passaggi dovrebbero essere svolti, se possibile, al buio o utilizzando contenitori scuri.

### Fraasi di pericolo e prudenza:

Il componente pericoloso è la formammide.



### Pericolo

H351	Sospettato di provocare il cancro.
H360FD	Può nuocere alla fertilità. Può nuocere al feto.
H373	Può provocare danni agli organi in caso di esposizione prolungata o ripetuta.
P201	Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso.
P202	Non manipolare prima di avere letto e compreso tutte le avvertenze.
P260	Non respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol.
P280	Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/ il viso.
P308+P313	In caso di esposizione o di possibile esposizione, consultare un medico.
P405	Conservare sotto chiave.

## 8. Limitazioni

- Per uso diagnostico *in vitro*.
- Solo per usi professionali.
- L'interpretazione clinica di qualsiasi colorazione positiva, o la sua assenza, deve essere condotta considerando il contesto della storia clinica, la morfologia e altri criteri istopatologici come altri test diagnostici. È di responsabilità di un patologo qualificato avere familiarità con le sonde FISH, con i reagenti, i pannelli diagnostici e i metodi usati per produrre il preparato. Le colorazioni devono essere eseguite in un laboratorio certificato e competente sotto la supervisione di un patologo che è responsabile della rivalutazione dei vetrini e che garantisce l'adeguatezza dei controlli positivi e negativi utilizzati.
- La colorazione, in particolare modo l'intensità del segnale e il rumore di fondo, dipende da come il campione è stato gestito e processato prima della colorazione stessa. Una fissazione impropria, il congelamento, lo scongelamento, il lavaggio, l'asciugatura, il riscaldamento, il sezionamento o la contaminazione con un altro campione o fluido può produrre artefatti o falsi risultati. Risultati incoerenti possono derivare da variazioni nei metodi di fissazione e inclusione.
- La sonda dovrebbe essere usata solo per identificare i loci descritti nella sezione 4 "Reagenti forniti".
- La performance è stata validata utilizzando le procedure descritte in queste istruzioni per l'uso. Modifiche a queste procedure potrebbero alterare la performance e devono pertanto essere validate dall'utilizzatore.

## 9. Sostanze interferenti

I globuli rossi presenti nel campione potrebbero esibire auto fluorescenza che disturba l'identificazione dei segnali.

## 10. Preparazione dei campioni

Allestire i campioni come descritto nelle istruzioni per l'uso del ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit.

## 11. Trattamento preparatorio del prodotto

Il prodotto è pronto all'uso. Non deve essere ricostituito, mescolato o diluito. Portare la sonda a temperatura ambiente (18-25°C) prima dell'uso, proteggere dalla luce. Prima di aprire la vial, vortexare e centrifugare brevemente.

## 12. Procedura di lavoro

### Pretrattamento del campione

Pretrattare il campione conformemente a quanto indicato nelle istruzioni d'uso del kit ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit.

### Denaturazione e ibridazione

1. Pipettare 10 µl di sonda su ciascun campione pretrattato.
2. Coprire i campioni con un vetrino coprioggetto (22 x 22) mm (evitare di creare bolle) e sigillare il coprioggetto.  
*Raccomandiamo di utilizzare una colla per vetrini (per esempio, Fixogum).*
3. Porre i vetrini su piastra calda o su ibridizzatore e denaturare i campioni per 5 min. a 72°C.
4. Ibridare per un tempo da 2 a 16 ore (per esempio, overnight) a 37°C trasferendo i vetrini in un ibridizzatore o in una camera umida e poi in stufa di ibridazione.

*È essenziale che i campioni non si asciughino durante la fase di ibridazione.*

### Post-ibridazione

Procedere coi passaggi post-ibridazione (lavaggio, controcolorazione e microscopia fluorescente) come indicato nelle istruzioni d'uso del kit ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kits.

### 13. Interpretazione dei risultati

Con l'uso di filtri appropriati, i segnali di ibridazione della sonda appaiono verdi (regione del gene RARA) e arancioni (regione del gene PML).

**Situazione normale:** nelle interfasi di cellule normali o di cellule senza una traslocazione che coinvolge le rispettive regioni geniche, si vedono due segnali separati verdi e due arancioni (vedere Fig. 2).

**Situazione aberrante:** Una fusione è indicata da un segnale separato arancione, un segnale separato verde e due segnali di fusione arancione/verde (vedere Fig. 2).

*I segnali sovrapposti possono apparire come segnali gialli.*

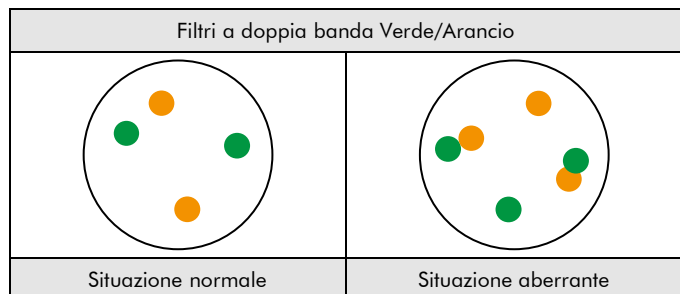


Fig. 2: Risultati attesi in situazione normale e aberrante

Altri pattern di segnali possono essere osservati in campioni anormali che possono dare combinazioni di segnali differenti rispetto a quelli sopradescritti. Pattern di segnali inattesi dovrebbero essere studiati/approfonditi ulteriormente.

#### Note:

- A causa della cromatina decondensata, il singolo segnale FISH può apparire come un piccolo cluster. Due o tre segnali della stessa misura, separati da una distanza  $\leq 1$  del diametro di un segnale, dovrebbero essere contati come un singolo segnale.
- Non valutare i nuclei sovrapposti.
- Non contare nuclei over-digeriti (identificabili da una regione scura all'interno del nucleo).
- Non contare i nuclei con una forte auto fluorescenza, che impedisce l'identificazione dei segnali.
- Un risultato negativo o inatteso può essere causato da fattori multipli (vedi capitolo 17).
- Al fine di una corretta interpretazione dei risultati, l'utilizzatore deve validare questo prodotto prima del suo utilizzo in procedure diagnostiche secondo le linee guida nazionali e internazionali.

### 14. Procedure di Controllo qualità raccomandate

Al fine di monitorare la corretta performance del campione processato e testare i reagenti, ogni test dovrebbe essere associato a controlli interni e esterni. Se i controlli interni e/o esterni non forniscono colorazioni appropriate, i risultati con i campioni dei pazienti devono essere considerati non validi.

**Controllo interno:** Cellule non neoplastiche all'interno di un campione che mostra un pattern normale di segnali.

**Controllo esterno:** Campioni di controlli positivi e negativi validati.

### 15. Caratteristiche di performance

#### Ibridazione in due ore

**Accuratezza:** La localizzazione del segnale di ibridazione della sonda è stata valutata in metafasi di maschio con cariotipo normale. In tutti i campioni testati la sonda si è ibridata unicamente con i loci previsti. Non sono stati osservati ulteriori segnali o ibridazioni incrociate. Pertanto, l'accuratezza è pari al 100%.

**Sensibilità analitica:** Per l'analisi della sensibilità analitica, la sonda è stata valutata su metafasi di cellule normali di maschio con cariotipo normale. Tutti i nuclei hanno mostrato il normale pattern di segnali previsto in tutti i campioni testati. Pertanto, la sensibilità analitica è pari al 100%.

**Specificità analitica:** Per l'analisi della specificità analitica, la sonda è stata valutata in metafasi di cellule di maschio con cariotipo normale. In tutti i campioni testati, tutti i segnali si sono ibridati esclusivamente con i loci target e con nessun altro locus. Pertanto, la specificità analitica è pari al 100%.

#### Ibridazione overnight

**Accuratezza:** La localizzazione del segnale di ibridazione della sonda è stata valutata in metafasi di maschio con cariotipo normale. In tutti i campioni testati la sonda si è ibridata unicamente con i loci previsti. Non sono stati osservati ulteriori segnali o ibridazioni incrociate. Pertanto, l'accuratezza è pari al 100%.

**Sensibilità analitica:** Per l'analisi della sensibilità analitica, la sonda è stata valutata su metafasi di cellule normali di maschio con cariotipo normale. Tutti i nuclei hanno mostrato il normale pattern di segnali previsto in tutti i campioni testati. Pertanto, la sensibilità analitica è pari al 100%.

**Specificità analitica:** Per l'analisi della specificità analitica, la sonda è stata valutata in metafasi di cellule di maschio con cariotipo normale. In tutti i campioni testati, tutti i segnali si sono ibridati esclusivamente con i loci target e con nessun altro locus. Pertanto, la specificità analitica è pari al 100%.

### 16. Smaltimento

Lo smaltimento dei reagenti deve avvenire in accordo alle regolamentazioni locali.

### 17. Risoluzione dei problemi

Qualsiasi modifica dalle istruzioni operative può comportare risultati di colorazione inferiori o a nessuna colorazione.

#### Segnali deboli o mancanti

Possibile causa	Azione
Sequenza target non disponibile	Utilizzare controlli appropriati
Temperatura di proteolisi, denaturazione, ibridazione o di lavaggio di stringenza non corrette	Controllare la temperatura di tutti i dispositivi utilizzati, utilizzando un termometro calibrato
Trattamento proteolitico non condotto in modo adeguato	Ottimizzare il tempo di incubazione in pepsina, aumentandolo o diminuendolo, se necessario
Evaporazione della sonda	Se si utilizza l'ibridatore, è obbligatorio l'utilizzo di strisce umide o di taniche preriempite d'acqua. Se si utilizza una stufa d'ibridazione, usare una camera umida. Inoltre il coprioggetto deve essere completamente sigillato, per esempio con Fixogum, per prevenire che il campione si asciughi durante l'ibridazione
Concentrazione troppo bassa di tampone di stringenza	Controllare la concentrazione del tampone di stringenza
Soluzione disidratante vecchia	Preparare una soluzione disidratante fresca
Microscopio a fluorescenza impostato in modo non corretto	Regolare il microscopio
Utilizzo di set di fluorescenza non corretto	Utilizzare un set di filtri appropriato per i fluorocromi della sonda. <i>Il filtro triplo fornisce meno luce rispetto al filtro singolo o doppio. I segnali possono quindi apparire più tenui utilizzando il filtro triplo.</i>
Sonde o fluorofori danneggiati a causa della luce	Effettuare i passaggi di ibridazione e di lavaggio al buio

#### Segnali di cross ibridazione; rumori di fondo

Possibile causa	Azione
Pretrattamento proteolitico troppo forte	Ridurre il tempo di incubazione in pepsina

Volume di sonda per area troppo elevato	Ridurre il volume di sonda per area/campione, dispensare la sonda goccia a goccia per evitare che si concentri localmente
Vetrini raffreddati a temperature ambiente prima dell'ibridazione	Trasferire i vetrini rapidamente a 37°C
Concentrazione troppo elevata del tampone di stringenza	Controllare la concentrazione del tampone di stringenza
Temperatura di lavaggio post ibridazione troppo bassa	Controllare la temperatura; aumentarla, se necessario
Disidratazione dei campioni tra i diversi passaggi di incubazione	Prevenire la disidratazione sigillando i vetrini e incubandoli in un ambiente umido

**Morfologia degradata**

Possibile causa	Azione
Pretrattamento proteolitico non condotto correttamente	Ottimizzare il tempo di incubazione in pepsina, aumentandolo o diminuendolo se necessario
Asciugatura insufficiente prima dell'applicazione della sonda	Aumentare i tempi di asciugatura

**Controcolorazione debole**

Possibile causa	Azione
Bassa concentrazione di soluzione DAPI	Utilizzare <u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (codice prodotto MT-0008-0.8)
Tempo di incubazione in DAPI troppo breve	Aggiustare il tempo di incubazione in DAPI

**18. Letteratura**

- Abe S, et al. (2008) *Cancer Genet and Cytogenet* **184**: 44-7.
- Brockmann SR, et al. (2003) *Cancer Genet and Cytogenet* **145**: 144-51.
- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* **53**: 134-6.
- Reiter A, et al. (2004) *Acta Hematol* **112**: 55-67.
- Sanz MA, et al. (2009) *Blood* **113**: 1875-91.
- Wilkinson DG: *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.

I nostri esperti sono disponibili per rispondere alle vostre domande. Contattare per cortesia [helptech@zytovision.com](mailto:helptech@zytovision.com)



ZytoVision GmbH  
Fischkai 1  
27572 Bremerhaven/ Germania  
Tel.: +49 471 4832-300  
Fax: +49 471 4832-509  
[www.zytovision.com](http://www.zytovision.com)  
Email: [info@zytovision.com](mailto:info@zytovision.com)

**Marchi registrati:**

ZytoVision® e ZytoLight® sono marchi registrati da ZytoVision GmbH.