



ZytoLight

SPEC CUX1/EZH2/CEN 7

Triple Color Probe

REF Z-2214-50 Σ 5 (0.05 ml)

Per la rilevazione qualitativa delle delezioni che coinvolgono i geni umani CUX1 in 7q22.1, EZH2 in 7q36.1 e gli alfa satelliti del cromosoma 7 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 CUX1/EZH2/CEN 7 Triple Color Probe (PL172) è adibita alla rilevazione qualitativa delle delezioni che coinvolgono i geni umani CUX1 in 7q22.1 e EZH2 in 7q36.1 e alla rilevazione degli alfa satelliti del cromosoma 7 in campioni citologici come cellule leucemiche mediante ibridazione *in situ* fluorescente (FISH). La sonda va utilizzata con il kit 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

Nei disordini mieloidi, la monosomia 7 o la delezione (7q) sono tra le più comuni aberrazioni cromosomiche ricorrenti. Queste aberrazioni si riscontrano nell'8% delle leucemie mieloidi acute de novo (AML), nel 5-10% dei pazienti con sindrome mielodisplastica de novo (MDS) e in circa il 50% delle neoplasie mieloidi correlate a terapia. Le patologie maligne mieloidi con monosomia 7 o delezione (7q) rispondono poco alla chemioterapia e sono associate a prognosi sfavorevole.

Sono state identificate diverse regioni delete (CDRs) localizzate in 7q in MDS e AML, comprese CDRs in 7q22, 7q32-33 e 7q35-36.

Si pensa che la perdita di uno o più geni tumor suppressor non ancora identificati contribuisca alla crescita leucemica nelle patologie maligne con -7/del(7q). CUX1 è un fattore di trascrizione che codifica nelle CDR in 7q22 che esercita attività di soppressione tumorale regolando i geni proliferativi. La perdita di CUX1 potrebbe contribuire nella patogenesi della malattia.

La CDR in 7q35-36 codifica per nove geni, compresi CUL1 e EZH2, che sono i candidati più probabili a causa della funzione nota e dell'associazione con il tumore.

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 CUX1/EZH2/CEN 7 Triple Color Probe è composta da:

- Polinucleotidi (~4.5 ng/ μ l) marcati con ZyGreen (eccitazione 503 nm/emissione 528 nm), le cui sequenze target mappano in 7q22.1* (chr7:101,270,255-101,934,924) in cui è localizzato il gene CUX1 (vedere Fig. 1).
- Polinucleotidi (~4.5 ng/ μ l) marcati con ZyOrange (eccitazione 547 nm/emissione 572 nm), le cui sequenze target mappano in 7q36.1* (chr7:148,402,839-148,647,927) in cui è localizzato il gene EZH2 (vedere Fig. 1).
- Polinucleotidi (~37 ng/ μ l) marcati con ZyBlue (eccitazione 418 nm/emissione 467 nm), le cui sequenze target mappano in 7p11.1-q11.1 specifiche per la regione alfa-satellite D7Z1 centromerica del cromosoma 7.
- Tampone di ibridazione a base di formammide

*conformemente all'Human Genome Assembly GRCh37/hg19

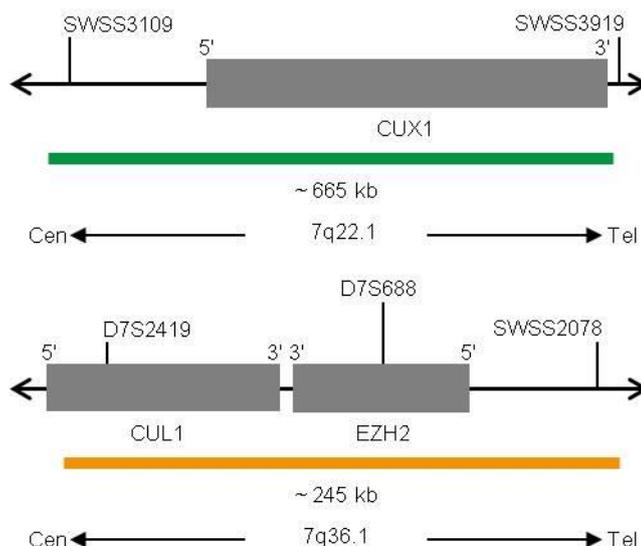


Fig. 1: In alto: Mappa della sonda SPEC CUX1; In basso: Mappa della sonda SPEC EZH2 (non in scala)

La ZytoLight SPEC CUX1/EZH2/CEN 7 Triple Color Probe è disponibile nel seguente formato:

- Z-2214-50: 0.05 ml (5 test da 10 μ 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 rivestiti
- Bagno termostato (70°C)
- Ibridizzatore o piastra calda
- Ibridizzatore o camera umida in stufa da ibridazione
- Pipette a volume variabile (10 μ l, 25 μ 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.

Frasì 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, 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 particolar 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 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. Trasferire i vetrini in camera umida e ibridare overnight a 37°C (per esempio in una stufa da 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 CUX1), arancioni (regione del gene EZH2) e blu (CEN 7).

Situazione normale: Nelle interfasi di cellule normali o di cellule senza la delezione a carico delle rispettive regioni geniche, appaiono due segnali verdi, due segnali arancioni e due segnali blu (vedere Fig. 1).

Situazione aberrante: In una cellula con delezione a carico della regione del gene CUX1 e/o della regione del gene EZH2, si osserva un ridotto numero di segnali verdi e/o arancioni. Le delezioni che coinvolgono solo parti delle rispettive regioni geniche potrebbero avere un pattern di segnali normale con segnali di dimensioni ridotte. La monosomia 7 è caratterizzata dalla perdita di un segnale verde, uno arancione e uno blu (vedere Fig. 2).

I segnali sovrapposti possono apparire come segnali gialli.

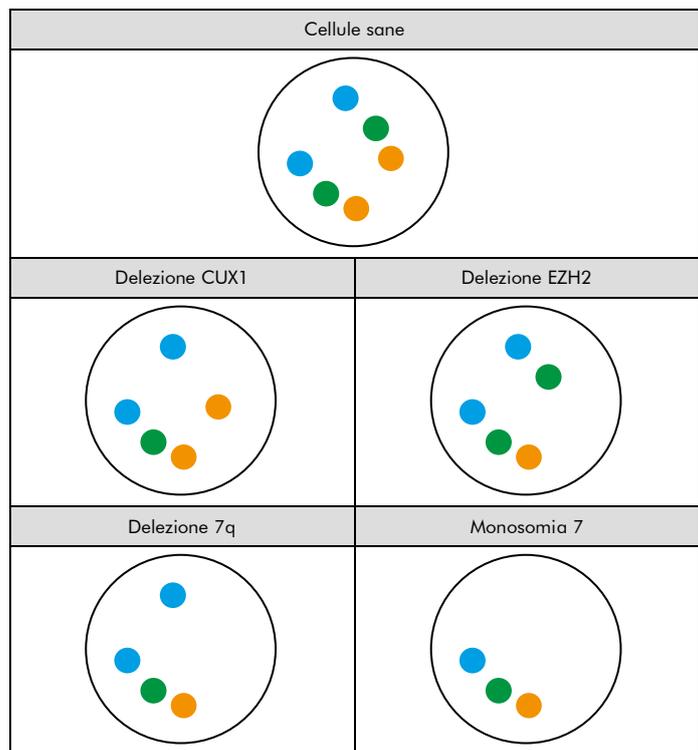


Fig. 2: Risultati attesi in situazione normale e aberrante

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 ≤ 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

Accuratezza: La localizzazione del segnale di ibridazione della sonda è stato valutato 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 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 mediante 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

- Aventín A, et al. (2002) *Cancer Genet Cytogenet* 134: 142-4.
- Dierlamm J, et al. (1998) *Genes Chromosomes and Cancer* 22: 87-94.
- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Krauter J, et al. (2001) *Genes Chromosomes and Cancer* 30: 342-8.
- Le Beau MM, et al. (1983) *N Engl J Med* 309: 630-6.
- Li MM, et al. (2013) *Curr Genet Med Rep* 1: 99-112.
- 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



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

Marchi registrati:

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