



ZytoDot 2C SPEC ALK Break Apart Probe

REF C-3055-100 ∇_{Σ} 10 (0,1 ml)

REF C-3055-400 ∇_{Σ} 40 (0,4 ml)

Pour la détection qualitative des translocations impliquant le gène humain ALK en 2p23.2 par hybridation *in situ* chromogénique (CISH)



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

1. Utilisation prévue

ZytoDot 2C SPEC ALK Break Apart Probe (PD35) est destiné à être utilisé pour la détection qualitative des translocations impliquant le gène humain ALK en 2p23.2 dans des échantillons fixés au formol et enrobés de paraffine par hybridation chromogène *in situ* (CISH). La sonde est destinée à être utilisée en combinaison avec le ZytoDot 2C CISH Implementation Kit (Prod. No. C-3044-10/-40).

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

2. Pertinence clinique

Le gène ALK (anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase, a.k.a. CD246) code pour un récepteur à activité tyrosine transmembranaire. Ce gène exerce des activités oncogènes caractéristiques par la fusion avec de nombreux gènes partenaires ou de mutations aussi bien dans les tumeurs solides hématopoïétiques que dans les non- hématopoïétiques. On trouve fréquemment les translocations affectant le locus du gène ALK dans le lymphome anaplasique à grandes cellules (ALCL), un lymphome non hodgkinien agressif se formant dans les lymphocytes T. La translocation la plus fréquente t(2;5) entraîne une fusion avec le gène NPM1 (nucléophosmine aussi appelé B23 phosphoprotéine nucléolaire, numatrine) situé dans le chromosome 5q35. Ce réarrangement entraîne une protéine de fusion NPM1/ALK, qui est activée de manière constitutive par l'autophosphorylation, et qui modifie ensuite la transformation en cellule maligne en activant les effecteurs en aval tels que STAT3. De plus, des inversions affectant le gène ALK situé sur 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. Les traitements ciblés de kinase ALK pourraient constituer une stratégie thérapeutique très efficace chez les patients avec CPNPC porteurs de réarrangements EML4-ALK.

3. Principe du test

La technique d'hybridation chromogénique *in situ* (CISH) permet la détection et la visualisation de séquences d'acides nucléiques spécifiques dans des préparations cellulaires. Les fragments de nucléotides marqués par des haptènes, appelés sondes CISH, et leurs séquences cibles complémentaires dans les préparations sont codénaturés et ensuite hybridés pendant l'hybridation. Les fragments de sondes non spécifiques et non liés sont éliminés par des étapes de lavage stringent. La formation de duplex de la sonde marquée peut être visualisée en utilisant des anticorps primaires (non marqués), qui sont détectés par des anticorps secondaires polymérisés conjugués à une enzyme. La réaction enzymatique avec les substrats chromogènes conduit à la formation de précipités colorés. Après avoir contre-coloré le noyau avec un colorant nucléaire, les fragments de sonde hybridés sont visualisés au microscope optique.

4. Réactifs fournis

Le ZytoDot 2C SPEC ALK Break Apart Probe est composé de :

- Polynucléotides marqués à la digoxigénine (~0,50 ng/ μ l), qui visent la cartographie des séquences dans 2p23.2* (chr2:29,460,144-29,681,581) proximale de la région des points de rupture de ALK (voir Fig. 1).
- Polynucléotides marqués aux dinitrophényles (~0,75 ng/ μ l), qui visent la cartographie des séquences dans 2p23.2* (chr2:29,174,204-29,383,335) distale de la région des points de rupture de ALK (voir Fig. 1).
- Tampon d'hybridation à base de formamide

*selon Human Genome Assembly GRCh37/hg19

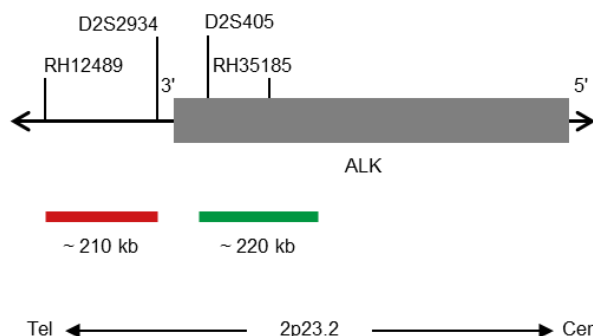


Fig. 1 : SPEC ALK Cartographie de la sonde (pas à l'échelle)

ZytoDot 2C SPEC ALK Break Apart Probe est disponible en deux tailles :

- C-3055-100 : 0,1 ml (10 réactions de 10 μ l chacune)
- C-3055-400 : 0,4 ml (40 réactions de 10 μ l chacune)

5. Matériel requis mais non fourni

- ZytoDot 2C CISH Implementation Kit (Prod. No. C-3044-10/-40)
- Échantillons de contrôle positifs et négatifs
- Lames pour microscope, chargées positivement
- Bain-marie (80°C, 98°C)
- Appareil à hybridation ou plaque chauffante
- Appareil à hybridation ou chambre humide
- Pipettes ajustable (10 μ l, 1000 μ l)
- Bocaux ou bains de coloration
- Minuteur
- Thermomètre calibré
- Ethanol ou alcool
- Xylène
- Méthanol 100%
- Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) 30%
- Eau dionisée ou distillée
- Lamelles (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Ciment caoutchouc, par exemple, Fixogum Rubber Cement (Prod. No. E-4005-50/-125) ou similaire
- Microscope lumineux correctement entretenu (400-630x)

6. Stockage et manipulation

Conserver à 2-8°C en position verticale. Remettre en conditions de stockage immédiatement après utilisation. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Le produit est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette lorsqu'il est manipulé en conséquence.

7. Avertissements et précautions

- Lisez le mode d'emploi avant utilisation !
- N'utilisez pas les réactifs après que la date d'expiration a été atteinte !
- Ce produit contient des substances (en faibles concentrations et volumes) qui sont nocives pour la santé et potentiellement infectieuses. Évitez tout contact direct avec les réactifs. Prenez les mesures de protection appropriées (utilisez des gants jetables, des lunettes de protection et des vêtements de laboratoire) !
- Signalez tout incident grave survenu en rapport avec le produit au fabricant et à l'autorité compétente conformément à la réglementation locale !
- Si les réactifs entrent en contact avec la peau, rincez immédiatement la peau avec de grandes quantités d'eau !
- Une fiche de données de sécurité est disponible sur notre site internet (www.zytovision.com).
- Ne pas réutiliser les réactifs, à moins que la réutilisation ne soit explicitement autorisée !
- Évitez toute contamination croisée et toute contamination microbactérienne des réactifs !
- Les spécimens ne doivent pas être laissés sécher pendant les étapes d'hybridation et de lavage !

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

- Pour le diagnostic *in vitro*.
- Pour un usage professionnel uniquement.
- Pour usage non automatisé uniquement.
- L'interprétation clinique de toute coloration positive, ou de son absence, doit être faite dans le contexte de l'histoire clinique, de la morphologie, d'autres critères histopathologiques ainsi que d'autres tests de diagnostic. Il incombe à un pathologiste qualifié de se familiariser avec les sondes, les réactifs, les panels de diagnostic et les méthodes utilisées pour produire la préparation colorée de CISH. La coloration doit être effectuée dans un laboratoire agréé et certifié, sous la supervision d'un pathologiste qui est chargé d'examiner les lames colorées et de s'assurer de la pertinence des contrôles positifs et négatifs

- La coloration de l'échantillon, en particulier l'intensité du signal et la coloration de fond, dépend de la manipulation et du traitement de l'échantillon avant la coloration. Une mauvaise fixation, congélation, décongélation, lavage, séchage, chauffage, sectionnement ou contamination par d'autres spécimens ou fluides peut produire des artefacts ou de faux résultats. Des résultats incohérents peuvent résulter de variations dans les méthodes de fixation et d'enrobage, ainsi que d'irrégularités inhérentes au spécimen.
- La sonde ne doit être utilisée que pour détecter les loci décrits au point 4. "Réactifs fournis".
- La performance a été validée selon les procédures décrites dans ce mode d'emploi. Les modifications apportées à ces procédures peuvent altérer les performances et doivent être validées par l'utilisateur.

9. Substances interférentes

Les fixateurs suivants sont incompatibles avec l'hybridation in situ :

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

10. Préparation des échantillons

Recommandations:

- Évitez la contamination croisée des échantillons à toutes les étapes de la préparation, car elle peut entraîner des résultats erronés.
- Fixation dans du formol à 10% tamponné de manière neutre pendant 24 h à température ambiante (18-25°C).
- Taille de l'échantillon $\leq 0.5 \text{ cm}^3$.
- Utiliser de la paraffine de qualité supérieure.
- L'enrobage doit être effectué à des températures inférieures à 65°C.
- Préparer des sections au microtome de 3 à 5 μm .
- Utilisez des lames de microscope à charge positive.
- Fixer les coupes de tissu pendant 2 à 16 h à 50-60°C.

11. Traitement préparatoire du produit

Le produit est prêt à l'emploi. Aucune reconstitution, mélange ou dilution n'est nécessaire. Amener la sonde à température ambiante (18-25°C) et mélanger brièvement avant utilisation.

12. Protocole

Prétraitement de l'échantillon

Effectuer le prétraitement des échantillons (par exemple, déparaffinage, protéolyse) conformément au mode d'emploi du ZytoDot 2C CISH Implementation Kit.

Dénaturation et hybridation

1. Pipeter 10 μl de la sonde sur chaque spécimen prétraité.
2. Recouvrir les spécimens d'une lamelle de 22 mm x 22 mm (éviter de piéger des bulles) et sceller la lamelle.
Nous recommandons d'utiliser du ciment caoutchouc (par exemple, Fixogum) pour l'étanchéité.
3. Placer les lames sur une plaque chauffante ou un hybrideur et dénaturer les spécimens pendant 5 min à 94-95°C.
4. Transférer les lames dans une chambre humide et les hybrider pendant la nuit à 37°C (par exemple, dans un four d'hybridation).

Il est essentiel que les spécimens ne se dessèchent pas pendant l'étape d'hybridation.

Post-hybridation

Effectuer le traitement post-hybridation (lavage, détection, contre-coloration, montage, microscopie) conformément au mode d'emploi du ZytoDot 2C CISH Implementation Kit.

13. Interprétation des résultats

En utilisant le kit *ZytoDot 2C CISH Implementation Kit*, les signaux d'hybridation des polynucléotides marqués à la digoxigénine apparaissent sous forme de points distincts de couleur vert foncé (en position proximale de la région des points de rupture de ALK) et les polynucléotides marqués au dinitrophényle apparaissent sous forme de points distincts de couleur rouge vif (en position distale de la région des points de rupture de ALK).

Situation normale : Dans les interphases de cellules normales ou de cellules une translocation impliquant la région du gène ALK, deux signaux verts distincts en forme de points et deux signaux rouges distincts en forme de points apparaissent (Voir Fig. 2).

Situation aberrante : Une région du gène ALK affectée par une translocation est indiquée par un signal vert distinct et un signal rouge distinct. L'inversion EML4-ALK avec délétion des séquences 5'-ALK est indiquée par un ou plusieurs signaux rouges isolés (Voir Fig. 2).

Les signaux qui se chevauchent peuvent apparaître sous forme de signaux bruns.

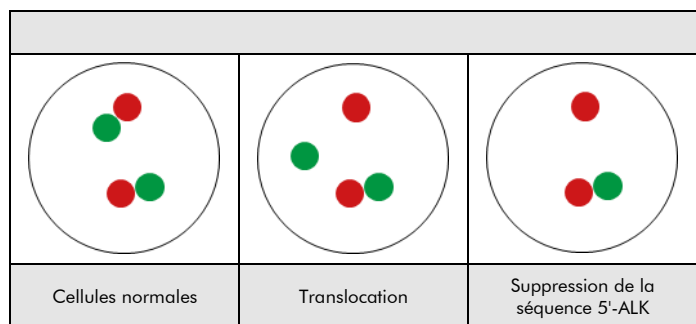


Fig. 2: Résultats attendus pour les noyaux normaux et aberrants

Des aberrations génomiques en raison de petites suppressions, duplications ou inversions pourraient entraîner des motifs de signaux imperceptibles.

D'autres schémas de signaux que ceux décrits ci-dessus peuvent être observés dans certains échantillons anormaux. Ces signaux inattendus doivent être étudiés plus en détail.

Veillez noter :

- En raison de la chromatine décondensée, les signaux CISH individuels peuvent apparaître sous forme de petits groupes de signaux. Ainsi, deux ou trois signaux de même taille, séparés par une distance ≤ 1 diamètre de signal, doivent être comptés comme un seul signal.
- Avant le dénombrement des signaux, l'échantillon doit être scanné pour détecter toute hétérogénéité intratumorale éventuelle à un grossissement de 100 à 200 fois.
- La visualisation des signaux doit être effectuée avec un grossissement d'au moins 400 fois, afin que les signaux soient facilement visibles. Un grossissement de 630 fois est recommandé pour les sondes détectant des cassures chromosomiques. N'utilisez pas de lentilles à filtre améliorant le contraste, car cela pourrait déformer la couleur du signal. Pour obtenir des signaux de couleurs vives, ouvrez le diaphragme d'ouverture. Veillez à faire la mise au point de haut en bas lorsque vous évaluez un noyau, car les signaux rouge et vert peuvent être superposés..
- Ne pas évaluer les zones de nécrose, les noyaux chevauchants, les noyaux surdigérés et les noyaux à faible intensité de signal.
- En raison de la mitose, des signaux supplémentaires peuvent être visibles même dans un faible pourcentage de cellules non néoplasiques. Parfois, des noyaux avec des signaux manquants peuvent être observés dans des spécimens enrobés de paraffine en raison d'artefacts de coupe.
- Un résultat négatif ou non spécifique peut être causé par de multiples facteurs (voir chapitre 17. "Assistance").
- 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 contrôler la bonne performance des échantillons traités et des réactifs d'essai, chaque essai doit être accompagné de contrôles internes et externes. Si les contrôles internes et/ou externes ne parviennent pas à démontrer une coloration appropriée, les résultats obtenus avec les échantillons des patients doivent être considérés comme non valables.

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

Contrôle externe: Échantillons de contrôle positifs et négatifs validés.

15. Caractéristiques de performances

La performance de la sonde a été déterminée par comparaison avec la sonde FISH correspondante, approuvée par le DIV. La concordance était de 100%.

Précision : La précision a été calculée à 100%.

Sensibilité analytique : La sensibilité analytique a été calculée à 100 %.

Spécificité analytique : La spécificité analytique a été calculée à 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 l'absence totale de coloration.

Signaux faibles ou pas de signal

Cause possible	Action
L'échantillon de cellule ou de tissu n'a pas été correctement fixé	Optimiser le temps de fixation et le fixatif
Prétraitement thermique, protéolyse, hybridation, dénaturation, lavage de stringence ou température d'incubation des anticorps incorrecte	Vérifiez la température de tous les appareils techniques utilisés, à l'aide d'un thermomètre étalonné. Utiliser toujours le même nombre de lames dans les solutions à température critique
Le prétraitement protéolytique n'est pas effectué correctement	En fonction de multiples facteurs, par exemple la nature et la durée de la fixation, l'épaisseur des coupes et la nature des tissus/cellules, différentes durées d'incubation peuvent être nécessaires. Déterminer le moment optimal d'incubation de la pepsine lors des tests préliminaires
Temps d'hybridation trop court	Hybridation pendant au moins 12 h ; prolonger le temps d'hybridation si nécessaire
Anciennes solutions de déshydratation	Préparer des solutions de déshydratation fraîches
Évaporation des sondes	En cas d'utilisation d'un appareil d'hybridation, l'utilisation des bandes humides/réservoirs remplis d'eau est obligatoire. Lors de l'utilisation d'un four d'hybridation, l'utilisation d'une chambre humide est obligatoire. En outre, la lamelle de couverture doit être complètement scellée, par exemple avec du Fixogum, pour éviter que l'échantillon ne sèche pendant l'hybridation
Incubation avec un substrat chromogène trop courte	Prolonger la durée d'incubation

Temps de contre coloration trop long	Le temps de contre-coloration dépend de la nature du spécimen et doit être optimisé en conséquence. Évitez la contre-coloration sombre, car elle peut masquer les signaux de coloration positive
Le bleuissement de la contre-coloration n'a pas été effectué correctement	Utilisez l'eau courante froide du robinet ; n'utilisez pas d'eau chaude ou tiède, ni de réactifs

Des signaux trop forts

Cause possible	Action
Prétraitement protéolytique effectué trop longtemps	En fonction de multiples facteurs, par exemple la nature et la durée de la fixation, l'épaisseur des coupes et la nature des tissus/cellules, différentes durées d'incubation peuvent être nécessaires. Déterminer le moment optimal d'incubation de la pepsine lors des tests préliminaires
La durée d'incubation de AP-Red Solution n'est pas correcte	Si nécessaire, la durée d'incubation peut être réduite à 5 min. Ne pas chauffer la solution de substrat à plus de 25°C ; incubé uniquement à température ambiante
Le temps d'incubation de HRP-Green solution n'est pas correct	Si nécessaire, la durée d'incubation peut être réduite à 7 min. Ne pas chauffer la solution de substrat à plus de 25°C ; incubé uniquement à température ambiante

Seuls les signaux rouges sont trop faibles

Cause possible	Action
AP-Red Solution a été exposée à une forte lumière directe	Préparer et utiliser AP-Red Solution à l'abri d'une forte lumière directe
AP-Red Solution a été préparée trop tôt	Préparer avant l'utilisation immédiate
La durée d'incubation de AP-Red Solution n'est pas correcte	Si nécessaire, la durée d'incubation peut être prolongée jusqu'à 15 min
Préparation insuffisante du substrat chromogène	Ne pas augmenter le volume de la solution A

Seuls les signaux verts sont trop faibles

Cause possible	Action
Temps d'incubation des étapes de lavage après une coloration trop longue avec le HRP-Green	Ne pas dépasser les temps d'incubation donnés
Le temps d'incubation de HRP-Green solution n'est pas correct	Si nécessaire, la durée d'incubation peut être prolongée jusqu'à 15 min
Insufficient preparation of chromogenic substrate	Do not increase volume of Solution A

Les signaux s'estompent ou fusionnent

Cause possible	Action
Une solution de montage inadaptée a été utilisée	Utilisez uniquement la solution de montage fournie avec le kit ou des solutions de montage à base de xylène exemptes de toute impureté ; n'utilisez pas de ruban adhésif pour couvrir l'objet
Les sections n'ont pas été correctement déshydratées	Utiliser des solutions d'éthanol et de xylène frais ; n'utiliser que du xylène de qualité "pure".

Coloration inégale ou, dans certaines parties, très légère

Cause possible	Action
Déparaffinage incomplet	Utiliser des solutions fraîches ; vérifier la durée des temps de déparaffinage
Volume de réactifs trop faible	Veiller à ce que le volume du réactif soit suffisamment important pour couvrir la zone du tissu
Bulles d'air capturées avant l'hybridation ou pendant le montage	Éviter les bulles d'air

Des résultats incohérents

Cause possible	Action
Séchage insuffisant avant l'application de la sonde	Prolonger le séchage à l'air libre
Trop d'eau/tampon de lavage sur les tissus avant l'application de pepsine, d'anticorps et/ou de substrats colorés	Veillez à ce que l'excès de liquide soit retiré de la section de tissu en l'essuyant ou en le secouant sur la lame. De petites quantités d'eau résiduelle/tampon de lavage n'interfèrent pas avec l'essai
Variations des méthodes de fixation et d'incrustation des tissus	Optimiser les méthodes de fixation et d'encastrement
Variations de l'épaisseur de la coupe de tissu	Optimiser le découpage en sections

La morphologie s'est dégradée

Cause possible	Action
L'échantillon de cellule ou de tissu n'a pas été correctement fixé	Optimiser le temps de fixation et le fixateur
Le prétraitement protéolytique n'est pas effectué correctement	Optimiser la durée d'incubation de la pepsine ; l'augmenter ou la diminuer si nécessaire

Signaux d'hybridation croisée ; bruit de fond

Cause possible	Action
La température de lavage n'est pas correcte	Vérifiez la température des appareils techniques utilisés, à l'aide d'un thermomètre étalonné. Utilisez toujours le même nombre de lames dans le bocal. Nous recommandons de ne pas utiliser plus de huit lames par bocal pour les étapes d'incubation à la chaleur
Les lames ne sont pas bien rincées	Utiliser un tampon de lavage frais et suffisant et de l'eau déionisée ou distillée lorsque cela est indiqué
Sections desséchées à tout moment pendant ou après l'hybridation	Éviter que les sections ne s'assèchent ; utiliser une chambre d'humidité ; sceller correctement les couvercles
Temps d'incubation prolongé du substrat	Réduire la durée d'incubation du substrat
Déparaffinage incomplet	Utiliser des solutions fraîches ; vérifier la durée du déparaffinage
Prétraitement protéolytique trop fort	Optimiser le temps d'incubation de la pepsine
Lames refroidies à température ambiante avant l'hybridation	Transférer rapidement les lames à la température d'hybridation

Des signaux qui se chevauchent

Cause possible	Action
Épaisseur inappropriée des coupes de tissus	Préparer des sections de microtome de 3 à 5 μm

Le spécimen flotte sur la lame

Cause possible	Action
Couche de glissement de la lame inappropriée	Utiliser des lames appropriées (à charge positive)
Prétraitement protéolytique trop fort	Réduire le temps d'incubation de la pepsine

18. Bibliographie

- Inamura K, et al. (2009) *Mod Pathol* 22: 508-15.
- Koivunen JP, et al. (2008) *Clin Cancer Res* 14: 4275-83.
- Martelli MP, et al. (2009) *Am J Pathol* 174: 661-70.
- Palmer RH, et al. (2009) *Biochem J* 420: 345-61.
- Perner S, et al. (2008) *Neoplasia* 10: 298-302.
- Rodig SJ, et al. (2009) *Clin Cancer Res* 15: 5216-23.
- Sasaki T, et al. (2010) *Eur J Cancer* 46: 1773-80.
- Schildhaus HU, et al. (2013) *Mod Pathol* 26: 1468-77.
- von Laffert M, et al. (2014) *J Thorac Oncol* 9: 1464-9.
- Wagner F, et al. (2014) *J Clin Pathol* 67: 403-7.
- Zhang Q, et al. (2007) *Nat Med* 11:1341-8.
- Wilkinson DG: In Situ Hybridization, A Practical Approach, *Oxford University Press* (1992) ISBN 0 19 963327 4.

19. Révision

Veuillez consulter le site www.zytovision.com pour les instructions d'utilisation les plus récentes ainsi que pour les instructions d'utilisation dans les différentes langues.

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 ZytoDot® sont des marques déposées de ZytoVision GmbH.