



ZytoLight

SPEC TP53/CEN 17 Dual Color Probe

REF Z-2153-50 ∇ 5 (0.05 ml)

REF Z-2153-200 ∇ 20 (0.2 ml)

Per la rilevazione qualitativa delle delezioni del gene umano TP53 e della regione alfa-satellite del cromosoma 17 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 TP53/CEN 17 Dual Color Probe (PL109) è adibita alla rilevazione qualitativa delle delezioni del gene umano TP53 e della regione alfa-satellite del cromosoma 17 in campioni citologici o in campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina come cellule leucemiche mediante ibridazione *in situ* fluorescente (FISH). La sonda va utilizzata in combinazione con il kit ZytoLight FISH Implementation Kits (codice prodotto Z-2028-5/-20, o 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

Il gene TP53 (tumor protein 53) è localizzato nella regione cromosomica 17p13.1 e codifica per un fattore di trascrizione di 53 kDa che regola la proliferazione, la differenziazione e l'apoptosi cellulare e che agisce come soppressore tumorale attivando l'espressione di geni che inibiscono la crescita cellulare. Le delezioni a carico del braccio corto del cromosoma 17 (17p), dove è situato il gene TP53, sono spesso associate a mutazioni dell'allele rimanente e hanno come risultato la perdita dell'attività di soppressione tumorale di TP53. Le delezioni del gene TP53 sono state rilevate nella leucemia linfocitica cronica (CLL), nel mieloma multiplo (MM), nella leucemia mieloide acuta (AML) e sono molto frequenti anche in tumori solidi primari di differente origine istologica. La presenza della delezione di TP53 è stato dimostrato essere correlata a patologie più aggressive, a riduzione della sopravvivenza e a risposta inferiore ai trattamenti standard. Pazienti affetti da CLL con delezione di 17p rispondono meglio al trattamento con l'anticorpo monoclonale anti-CD52 alemtuzumab rispetto alla chemioterapia convenzionale. La FISH è un metodo efficace di screening per le delezioni che coinvolgono il locus del gene TP53 per identificare pazienti candidati al trattamento alternativo e per evitare la somministrazione di terapie non efficaci.

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 in modo fluorescente, chiamati sonde FISH, e i loro frammenti di DNA complementare nelle preparazioni sono co-denaturati e riuniti durante l'ibridazione. Successivamente, i frammenti di sonda non specifici e non legati, sono rimossi con lavaggi stringenti. Dopo la controcolorazione del DNA con DAPI, i frammenti di sonda ibridati 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 TP53/CEN 17 Dual Color Probe è composta da:

- Polinucleotidi (~4.5 ng/ μ l), marcati con ZyOrange (eccitazione 547 nm/emissione 572 nm), le cui sequenze target mappano in 17p13.1* (chr17:7,495,749-7,663,022) in cui è localizzato il gene TP53 (vedere Fig. 1).
- Polinucleotidi (~4.5 ng/ μ l), marcati con ZyGreen (eccitazione 503 nm/emissione 528 nm), le cui sequenze target mappano in 17p11.1-q11.1 specifiche per la regione alfa-satellite D17Z1 centromerica del cromosoma 17.

• Tampone di ibridazione a base di formammide

*conformemente al Human Genome Assembly GRCh37/hg19

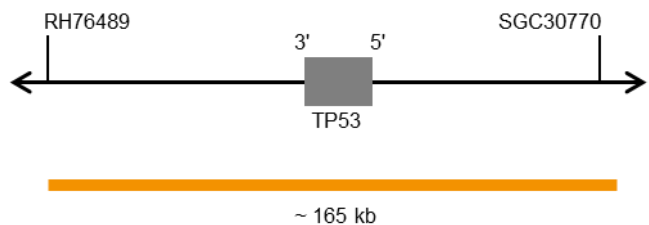


Fig. 1: SPEC TP53 Mappa della sonda (non in scala)

La sonda ZytoLight SPEC TP53/CEN 17 Dual Color Probe è disponibile nei seguenti formati:

- Z-2153-50: 0.05 ml (5 test da 10 μ l ciascuno)
- Z-2153-200: 0.2 ml (20 test da 10 μ l ciascuno)

5. Materiali richiesti ma non forniti

- Campione controllo positivo e negativo
- Ibridizzatore o piastra calda
- Ibridizzatore o camera umida in stufa di ibridazione
- Timer
- Vaschette di colorazione
- Termometro calibrato
- Pipette a volume variabile (10 μ l, 25 μ l)
- Etanolo or reagente alcolico
- 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

Campioni citologici

- ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit (codice prodotto Z-2099-20)
- Vetrini portaoggetto non rivestiti
- Bagno termostato (70°C)
- Formaldeide 37%, acid-free, o formalina 10% neutral tamponata
- 2x Saline-Sodium Citrate (SSC), per esempio dalla soluzione 20x SSC Solution (codice prodotto WB-0003-50)

Campioni FFPE

- ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (codice prodotto Z-2028-5/-20)
- Vetrini portaoggetto a carica positiva
- Bagno termostato (37°C, 98°C)
- Xilene

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!

Frase di pericolo e prudenza:

Il componente pericoloso è la formamide.



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. E' di responsabilità di un patologo qualificato avere familiarità con le sonde FISH, reagenti, pannelli diagnostici e 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.

I seguenti fissativi non sono compatibili con la FISH:

- Fissativo di Bouin
- Fissativo B5
- Fissativi acidi (per esempio, acido picrico)
- Fissativo di Zenker
- Alcoli (quando utilizzati da soli)
- Mercurio cloruro
- Formaldeide zincata
- Fissativo di Hollande
- Formalina non tamponata

10. Preparazione dei campioni

Campioni citologici

- Preparare i campioni come indicato nelle istruzioni d'uso del kit ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit.

Campioni FFPE

- Fissazione in formalina 10% neutra tamponata per 24 h a temperatura ambiente (18-25°C).
- Dimensioni del campione ≤ 0.5 cm³.
- Utilizzare paraffina di qualità.
- L'inclusione dovrebbe essere effettuata a una temperatura inferiore ai 65°C.
- Allestire sezioni al microtomo di 2-4 µm di spessore.
- Utilizzare vetrini a carica positiva.
- Fissare per 2-16 h a 50-60°C.

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

Campioni citologici

Pretrattamento del campione

Pretrattare il campione conformemente a quanto riportato 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 mm x 22 mm (evitare la formazione di 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).

E' fondamentale che i campioni non si asciugano durante la fase di ibridazione.

Post-ibridazione

Procedure coi passaggi post-ibridazione (lavaggio, controcolorazione e microscopia fluorescente) come indicato nelle istruzioni d'uso del kit [ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit](#).

Campioni FFPE**Pretrattamento del campione**

Pretrattare il campione (sparaffinatura, proteolisi) conformemente alle istruzioni per l'uso del kit [ZytoLight FISH-Tissue 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 la formazione di 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 10 min. a 75°C.
 4. Trasferire i vetrini in camera umida e ibridare overnight a 37°C (per esempio in una stufa da ibridazione).

E' fondamentale che i campioni non si asciugano durante la fase di ibridazione.

Post-ibridazione

Procedure coi passaggi post-ibridazione (lavaggio, controcolorazione e microscopia fluorescente) come indicato nelle istruzioni d'uso del kit [ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit](#).

13. Interpretazione dei risultati

Con l'uso di filtri appropriati, i segnali di ibridazione della sonda appaiono arancioni (regione del gene TP53) e verdi (CEN 17).

Situazione normale: Nelle interfasi di cellule normali o cellule senza la delezione a carico della regione del gene TP53, appaiono due segnali arancioni e due segnali verdi (vedere Fig. 2).

Situazione aberrante: In cellule con delezione a carico della regione del gene TP53, si osserva un ridotto numero di segnali arancioni. Le delezioni a carico della sola regione di TP53 potrebbero avere un pattern di segnali normale con segnali arancioni di dimensioni ridotte (vedere Fig. 2).

I segnali sovrapposti possono apparire come segnali gialli.

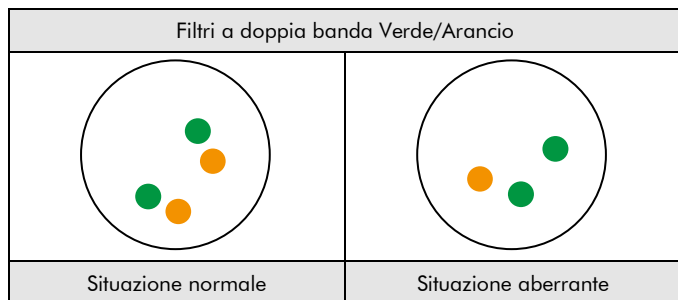


Fig. 2: Risultati attesi in situazione normale e aberrante

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, separate 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, ad esempio, i fibroblasti.

Controllo esterno: Campioni di controlli positivi e negativi validati.

15. Caratteristiche di performance**Campioni citologici**

Le performance sono state valutate in conformità alle istruzioni d'uso del kit [ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit](#).

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%.

Campioni FFPE

Le performance sono state valutate in conformità alle istruzioni d'uso del kit [ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit](#).

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 a nessuna colorazione. Alcuni dei punti di questa sezione sono applicabili solo utilizzando il kit [ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit](#).

Segnali deboli o mancanti

Possibile causa	Azione
Sequenza target non disponibile	Utilizzare controlli appropriati
Campioni cellulari o fissutali non correttamente fissati	Ottimizzare il tempo di fissazione e il fissativo o aggiungere un passaggio di post-fissazione come descritto in "procedure" del manuale d'uso del kit <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</u>
Temperatura di pretrattamento, proteolisi, denaturazione, ibridazione o di lavaggio di stringenza non corretta	Controllare la temperature 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
Sparaffinatura incompleta	Utilizzare soluzioni fresche; controllare la durata della sparaffinatura
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 temperature; 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
Il campione cellulare o fissutale non è stato fissato correttamente	Ottimizzare il tempo di fissazione e il fissativo o aggiungere un passaggio di post-fissazione come descritto in "procedure" nel manuale d'uso del kit <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</u>
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

Nuclei sovrapposti

Possibile causa	Azione
Inadeguato spessore della sezione di tessuto	Preparare sezioni al microto dello spessore di 2-4 µm

Campione galleggiante sul vetrino

Possibile causa	Azione
Rivestimento inadatto del vetrino	Utilizzare vetrini idonei
Pretrattamento proteolitico troppo forte	Ridurre il tempo di incubazione in pepsina

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

- Amiel A, et al. (1997) *Cancer Genet Cytogenet* 97: 97-100.
- Chang H, et al. (2005) *Blood* 105: 358-60.
- Chang H, et al. (2010) *Am J Clin Pathol* 133: 70-4.
- Herrera JC, et al. (2010) *Biomedica* 30: 390-400.
- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Lozanski G, et al. (2004) *Blood* 103: 3278-81.
- Tavor S, et al. (2011) *Leuk Lymphoma* 52: 642-7.
- 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.