




**ZytoMation**

## **ROS1 Dual Color Break Apart FISH Probe**

**REF** Z-2298-5.1ML

 Jusqu'à 20  
(5.1 ml)

Pour la détection qualitative des translocations impliquant le gène humain ROS1 en 6q22.1 par Hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) sur les systèmes automatisés de Bond



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

### 1. Utilisation prévue

ZytoMation ROS1 Dual Color Break Apart FISH Probe (PL251) est prévu pour être utilisé pour la détection qualitative des translocations impliquant le gène humain ROS1 en 6q22.1 dans des échantillons en paraffine fixés au formol par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH). La sonde est destinée à être utilisée en combinaison avec le Bond FISH Kit (DS9636) sur le système automatisé Bond-MAX ou Bond III de Leica Biosystems.

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 gène ROS1 (proto-oncogène 1 ROS, récepteur à activité tyrosine kinase) se situe en 6q22.1 et code pour un récepteur à activité tyrosine. Des translocations affectant le ROS1 ont été détectées dans le glioblastome, le cholangiocarcinome et le cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC). Dans les CPNPC, de nombreux partenaires de translocation ROS1 ont été détectés, tous entraînant la fusion de formes tronquées de manière variable par exemple de TPM3, SDC4, SLC34A2, CD74, EZR, ou LRIG3 au domaine kinase de ROS1. Il a aussi été observé une fusion de GOPC avec ROS1 dans les CPNPC. Les fusions GOPC-ROS1 sont causées par une suppression interstitielle d'approximativement 240 kb en 6q22.1. Des réarrangements ROS1 sont supposés définir un sous-ensemble moléculaire des CPNPC avec des caractéristiques cliniques distinctes qui sont similaires à celles observées chez les patients avec un CPNPC ALK réarrangé. Les premiers éléments d'étude montrent que l'administration d'inhibiteurs de kinase ROS1 peut constituer une stratégie thérapeutique très efficace chez les patients avec CPNPC hébergeant des réarrangements ROS1 activateurs. Par conséquent, la détection de réarrangements ROS1 au moyen de l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) pourrait être un outil utile servant à l'identification de patients susceptibles de répondre aux traitements ciblés de kinase ROS1.

### 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 et 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

ZytoMation ROS1 Dual Color Break Apart FISH Probe est composé de:

- Polynucléotides marqués au ZyGreen (excitation 503 nm/émission 528 nm) (~6.0 ng/μl), qui ciblent une séquence de 6q22.1\* (chr6:116,912,298-117,627,255) proximale de la région des points de rupture de ROS1 (voir figure 1).
- Polynucléotides marqués au ZyOrange (excitation 547 nm/émission 572 nm) (~2.5 ng/μl), qui ciblent une séquence de 6q22.1\* (chr6:117,659,135-117,871,701) distale de la région des points de rupture de ROS1 (voir figure 1).
- Tampon d'hybridation à base de formol

\* selon Human Genome Assembly GRCh37/hg19

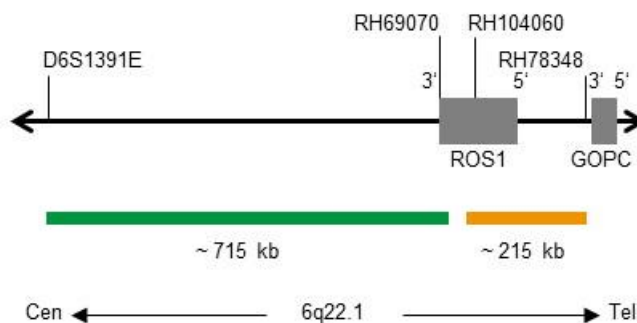


Fig. 1: Carte de la sonde ROS1 (pas à l'échelle)

ZytoMation ROS1 Dual Color Break Apart FISH Probe est disponible en une taille :

- Z-2298-5.1ML: 5.1 ml (jusqu'à 20 réactions de 10 μl chacune)

### 5. Matériel requis mais non fourni

- Un système Bond-MAX entièrement automatisé (Leica Biosystems)
- Bond FISH Kit (DS9636)
- DAPI/DuraTect-Solution (MT-0007-0.8)
- Échantillons pour les contrôles positifs et négatifs
- Lames pour microscope, chargées positivement
- Pipettes ajustables (25 μl, 1000 μl)
- Pots ou bacs de coloration
- Chronomètre
- Ethanol ou réactif à l'alcool
- Eau distillée ou déminéralisée
- Lamelles (24 mm x 60 mm)
- Microscope à fluorescence adéquatement entretenu (400-1000x)
- Huile à immersion compatible avec la microscopie à fluorescence
- Sets de filtres appropriés

Pour de plus amples informations sur le matériel requis mais non fourni, veuillez vous référer au mode d'emploi du système de coloration entièrement automatisé correspondant.

## 6. Stockage et manipulation

Conserver entre 2 et 8 °C dans une position verticale et protégée à l'abri de la lumière.

Utiliser à l'abri de la lumière. Avant d'ouvrir le flacon, agitez le liquide. 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.
- La sonde ne doit pas être utilisée dans les procédures FISH manuelles!
- 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 le système Bond-MAX (Leica) entièrement automatisé et les procédures décrites dans ce mode d'emploi. Des modifications de ces procédures peuvent altérer la performance comme CE-IVD et doivent être validées par l'utilisateur. Ce DIV est uniquement certifié CE lorsqu'il est utilisé comme décrit dans ce mode d'emploi dans le cadre de l'utilisation prévue.

## 9. Substances interférentes

Les globules rouges présents dans l'échantillon peuvent présenter une autofluorescence qui entrave la reconnaissance du signal.

Les fixateurs suivants sont incompatibles avec la FISH:

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

## 10. Préparation des échantillons

Recommandations:

- Fixation dans 10 % de formol tamponné pendant 24 h à température ambiante (18 à 25 °C)
- Taille de l'échantillon  $\leq 0,5 \text{ cm}^3$ .
- Utiliser de la paraffine de bonne qualité
- L'inclusion doit être faite à une température inférieure à 65 °C.
- Préparer des sections de 2-4  $\mu\text{m}$ .
- Utiliser des lames pour microscope chargées positivement
- Fixer pendant 2 à 16 h à 50-60 %.

## 11. Traitement préparatoire du produit

Il n'est pas nécessaire de 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 secouer brièvement.

## 12. Protocole

La ZytoMation ROS1 Dual Color Break Apart FISH Probe est destinée à être utilisée sur des systèmes de coloration entièrement automatisés en combinaison avec les kits et protocoles FISH respectifs. Veuillez vous référer au mode d'emploi respectif du système utilisé pour plus d'informations.

### Prétraitement de l'échantillon

Effectuez le prétraitement de l'échantillon (déparaffinage, protéolyse) conformément aux instructions respectives d'utilisation du système de coloration entièrement automatisé.

*En fonction de l'échantillon, des ajustements au protocole peuvent être nécessaires. Une validation des protocoles s'écartant des protocoles recommandés doit être effectuée par l'utilisateur.*

### Dénaturation et hybridation

Pour la digestion enzymatique et le prétraitement thermique, choisir un protocole selon les conditions prévalidées par l'utilisateur en fonction du spécimen.

1. Réglez la dénaturation des spécimens à 20 min à 75°C.

*Pour le protocole de dénaturation, créez un nouveau protocole comme décrit dans les instructions respectives d'utilisation du système automatisé Bond-MAX.*

2. Réglez l'hybridation des spécimens à 2 h à 45°C.

*Pour le protocole d'hybridation, créez un nouveau protocole tel que décrit dans les instructions respectives d'utilisation du système automatisé Bond-MAX.*

3. Chargez les lames, la sonde FISH, la dilution enzymatique et le kit BOND FISH sur le système conformément aux instructions d'utilisation.
4. Lorsque le cycle de coloration est terminé, retirez les lames de l'instrument. Protégez les lames de la lumière.
5. Déshydratez les lames avec de l'éthanol à 70 %, 90 % et 100 % pendant 1 minute chacune.
6. Sécher les échantillons à l'air libre dans l'obscurité.
7. Pipeter 25 µl de DAPI/DuraTect-Solution (MT7) sur les lames. En évitant les bulles piégées, recouvrir les échantillons avec une lamelle (24 mm x 60 mm). Incuber dans l'obscurité pendant 15 minutes.

*L'utilisation d'une pointe de pipette qui a été coupée pour augmenter la taille de l'ouverture, peut faciliter le processus de pipetage. Évitez une longue exposition à la lumière.*

8. Conservez la lame dans l'obscurité. Pour des périodes de stockage plus longues, il est conseillé de les conserver à 2-8°C.
9. L'évaluation de l'échantillon est effectuée par microscopie à fluorescence.

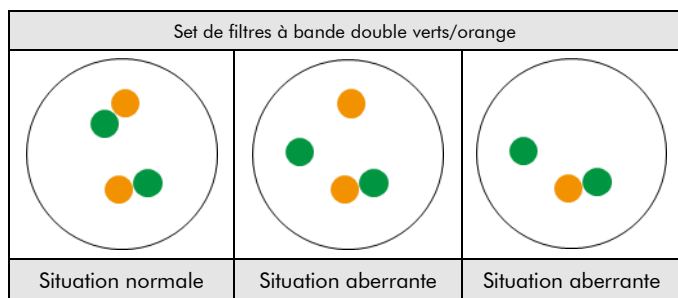
### 13. Interprétation des résultats

Au moyen de l'utilisation de sets de filtres appropriés, les signaux d'hybridation de la sonde apparaissent en vert (en position proximale de la région des points de rupture de ROS1) et en orange (en position distale de la région des points de rupture de ROS1).

**Situation normale :** Dans les interphases de cellules normales ou de cellules sans une translocation impliquant la région du gène ROS1, deux signaux verts et deux signaux orange apparaissent (voir figure 2).

**Situation aberrante :** Une région du gène ROS1 affectée par une translocation est indiquée par un signal vert séparé et un signal orange séparé. Des signaux verts isolés sont la conséquence de suppressions distales de région des points de rupture de ROS1 ou sont causés par des translocations déséquilibrées affectant cette région chromosomique (voir figure 2).

*Des signaux se chevauchant peuvent apparaître comme étant des signaux jaunes.*



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

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

Une autre distribution de signal peut être observée dans certains échantillons anormaux qui pourraient entraîner un motif de signal différent de ceux décrits 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, par exemple des fibroblastes.

**Contrôle externe :** Echantillons contrôles négatifs et positifs validés.

### 15. Caractéristiques de performances

La performance de la sonde a été déterminée par comparaison avec la sonde FISH correspondante approuvée par l'IVD. 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 aucune coloration du tout.

#### Faible signal ou aucun signal

Cause possible	Action
Pas de séquence cible disponible	Utiliser les contrôles appropriés
L'échantillon de cellules ou de tissu n'est pas correctement fixé	Optimiser le temps de fixation et le fixateur utilisé
Le prétraitement protéolytique n'est pas effectué correctement	Optimiser la concentration de l'enzyme et le temps d'incubation, l'augmenter ou le diminuer si nécessaire
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 la concentration d'enzyme ou le temps d'incubation

**Morphologie dégradée**

Cause possible	Action
Les échantillons de cellules ou de tissus n'ont pas été fixés correctement	Optimiser le temps de fixation et le fixateur
Le prétraitement protéolytique n'est pas effectué correctement	Optimiser la concentration de l'enzyme ou le temps d'incubation, diminuer si nécessaire
Le prétraitement thermique n'est pas effectué correctement	Optimiser le prétraitement thermique

**Noyaux chevauchants**

Cause possible	Action
Epaisseur inappropriée des sections de tissu	Préparer des coupes au microtome de 2-4 $\mu\text{m}$ d'épaisseur

**Echantillon glissant sur la lame**

Cause possible	Action
Revêtement antidérapant inadéquat	Utiliser des lames appropriées
Séchage insuffisant de la section de tissu	Adaptez le temps pour sécher suffisamment les tissus avant la coloration
Fixation dans du formol qui n'était pas correctement tamponné neutre	Utilisez du formol tamponné neutre approprié et de haute qualité

**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**

- Bergethon K, et al. (2012) *J Clin Oncol* 30: 863-70.
- Birchmaier C, et al. (1987) *Proc Natl Acad Sci* 84: 9270-74.
- Bos M, et al. (2013) *Lung Cancer* 81: 142-3.
- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Lee SE, et al. (2015) *Mod Pathol* 28: 468-79.
- Rikova K, et al. (2007) *Cell* 131: 1190-203.
- Rimkunas VM, et al. (2012) *Clin Cancer Res* 18: 4449-57.
- Suehara Y, et al. (2012) *Clin Cancer Res* 18: 6599-608.
- Takeuchi K, et al. (2012) *Nat Med* 18: 378-81.
- 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](mailto:helptech@zytovision.com)



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

**Marques déposées:**

ZytoVision® et ZytoMation® sont des marques déposées de ZytoVision GmbH.