

N. Cat. Prodotto: FP-002**Per diagnosi clinica e ricerca scientifica.**

[CND] W01060299

[RDM] Non applicable

Human ALK gene fusion detection kit
Manuale di istruzioni

[Nome del prodotto] Human ALK gene fusion detection kit.

[Specifiche del pacchetto] 10 tests

[Uso previsto]

Questo kit utilizza l'ibridazione fluorescente in situ per rilevare lo stato di fusione del gene ALK nel carcinoma polmonare non a piccole cellule in vitro. I campioni di rilevamento sono campioni di resezione chirurgica o biopsia di carcinoma polmonare non a piccole cellule inclusi in paraffina fissata con formaldeide neutra al 4%. Il prodotto non è stato clinicamente verificato in combinazione con farmaci terapeutici mirati ad ALK e le sue prestazioni di rilevamento clinico sono state confermate da test comparativi con reagenti diagnostici di accompagnamento che sono stati verificati da farmaci mirati. I risultati del test del prodotto non devono essere utilizzati come unica base per il trattamento individualizzato dei pazienti. I medici devono valutare in modo completo i risultati del test in combinazione con le condizioni del paziente, le indicazioni del farmaco, la risposta al trattamento e altri indicatori di test di laboratorio.

La chinasi del linfoma anaplastico (ALK) è stata individuata per la prima volta come sottotipo di linfoma anaplastico a grandi cellule (ALCL). Il gene ALK è localizzato nel cromosoma 2p23. Normalmente, l'ALK umano può essere trascritto per produrre 6222 mRNA BP, che è composto da 29 esoni, che codificano 1620 sequenze di amminoacidi e 200 kda di proteina transmembrana di tipo I. Questa proteina è una tirosina chinasi recettoriale (RTK) e un membro della superfamiglia dell'insulina RTK. Successivamente, è stato scoperto che molti tipi di fusione del gene ALK sono stati riscontrati nel carcinoma polmonare non a piccole cellule, nel linfoma diffuso a grandi cellule B e nel tumore infiammatorio dei miofibroblasti, il che ha dimostrato che la fusione del gene ALK era un forte gene driver cancerogeno. Attualmente, il tasso di incidenza e il tasso di mortalità del cancro al polmone sono i primi tumori maligni in Cina, di cui l'80%-85% è cancro al polmone non a piccole cellule (NSCLC). La terapia molecolare mirata individualizzata basata sul recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) e sulla chinasi del linfoma anaplastico (ALK) è diventata un punto caldo della ricerca sul NSCLC. Molti studi clinici hanno dimostrato che gli inibitori di ALK possono essere utili ai pazienti con NSCLC con gene di fusione ALK positivo. Pertanto, è di grande importanza clinica rilevare lo stato del gene ALK nei pazienti con NSCLC.

[Principio di rilevamento]

Sulla base della tecnologia di ibridazione fluorescente in situ, un nucleotide della sonda di acido nucleico viene marcato con fluoresceina. Il gene bersaglio rilevato è omologo e complementare alla sonda di acido nucleico utilizzata. Dopo denaturazione, ricottura e rinaturazione, possono formare un ibrido tra il gene bersaglio e la sonda di acido nucleico. Il gene rilevato viene analizzato qualitativamente, quantitativamente o relativamente al microscopio dal sistema di rilevamento della fluorescenza. Il kit adotta una sonda arancione marcata con fluoresceina rodamina (rho) e una sonda verde marcata con isotiocianato di fluoresceina (FITC). Le due sonde possono essere combinate con il sito di rilevamento del bersaglio tramite ibridazione in situ. In condizioni normali (il gene ALK non si fonde), viene visualizzato come segnali verdi e arancioni vicini tra loro o segnali gialli sovrapposti l'uno all'altro al microscopio a fluorescenza. Quando si verifica una fusione genica, i segnali verde e rosso vengono "interrotti" a causa della sostituzione dei geni partner di fusione ricombinanti e appaiono come segnali molto distanti. La fusione del gene ALK nei tessuti dei pazienti con carcinoma polmonare non a piccole cellule è stata rilevata in vitro mediante questo metodo di ibridazione fluorescente in situ interrotta, in modo da fornire una base di riferimento per la prognosi del trattamento e la somministrazione di farmaci ai pazienti con carcinoma polmonare non a piccole cellule.

[Componenti principali del prodotto]

Questo kit è composto dalla sonda ALK a doppio colore, come mostrato nella Tabella 1.

I reagenti non forniti nel kit sono riportati nella Tabella 2.

Tabella 1: Composizione del kit

Nome del componente	Specifiche	Quantità	Componenti principali
Sonda bicolore ALK	100µL/Provetta	1	Sonda ALK arancione; Sonda ALK verde

Tabella 2: Elenco dei reagenti non forniti

Nome del reagente	Purezza	Nome del reagente	Purezza
Cloruro di sodio	Purezza analitica AR	NP-40	Purezza analitica AR
Citrato di sodio	Purezza analitica AR	Xilene	Purezza analitica AR
Etanolo anidro	Purezza analitica AR	Proteasi K	≥40 unità/g

[Condizioni di conservazione e validità]

Conservare sigillato al riparo dalla luce a $-20^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$. Il prodotto è valido per 12 mesi. Evitare inutili ripetuti congelamenti e scongelamenti che non devono superare le 10 volte. Dopo l'apertura, entro 24 ore per la conservazione a breve termine, tenere sigillato a $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ al buio. Per una conservazione a lungo termine dopo l'apertura, tenere il coperchio sigillato a $-20^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ al riparo dalla luce. Vedere l'etichetta del kit per la data di produzione e la data di scadenza.

[Strumenti applicabili]

1. Il sistema di imaging per microscopia a fluorescenza include microscopio a fluorescenza e set di filtri. Il kit è etichettato con fluoresceina arancione e deve essere selezionato il set di filtri compatibile con il colorante etichettato con fluorescenza. Fluorescenza arancione: la lunghezza d'onda di eccitazione massima è 547nm e la lunghezza d'onda di emissione massima è 565nm. Fluorescenza verde: la lunghezza d'onda di eccitazione massima è 495nm e la lunghezza d'onda di emissione massima è 517nm. Il sistema di imaging della microscopia a fluorescenza dovrebbe utilizzare un microscopio con canali arancioni e verdi.
2. Strumento di ibridazione automatica: è richiesta una rigorosa uniformità della temperatura e la differenza di temperatura deve essere $\leq 1^{\circ}\text{C}$.

[Requisiti campione]

1. Tipi di campioni applicabili: campioni di tessuto da resezione chirurgica o biopsia inclusi in paraffina.
2. Il tessuto deve essere fissato in una soluzione di formaldeide neutra al 4% entro 1 ora dall'ex vivo. Dopo che il tessuto è stato fissato, viene di routine disidratato e incluso in paraffina.
3. Lo spessore della sezione di paraffina influenza i risultati sperimentali; è appropriato uno spessore di fetta di $4\sim 5\mu\text{m}$.
4. Si raccomanda di scegliere campioni di tessuto inclusi in paraffina per una conservazione di 5 anni.

[Metodo di prova]

1. Reagenti correlati

I seguenti reagenti sono necessari per l'esperimento ma non sono forniti in questo kit

① $20\times\text{SSC}$ (tampone citrato di sodio), pH $5,3\pm 0,2$

Cloruro di sodio	176g
Citrato di sodio	88g

Pesare 176 g di cloruro di sodio e 88 g di citrato di sodio, sciogliere in 800 ml di acqua deionizzata, regolare il pH a $5,3\pm 0,2$ a temperatura ambiente e completare a 1 L con acqua deionizzata. Sterilizzazione a vapore ad alta pressione, conservazione a $2\sim 8^{\circ}\text{C}$, la durata di conservazione della soluzione è di 6 mesi. Eliminare se il reagente appare torbido o contaminato.

② 2×SSC, pH 7,0±0,2

Prendere 100 ml del 20×SSC di cui sopra, diluire con 800 ml di acqua deionizzata, mescolare, regolare il pH a 7,0 ± 0,2 a temperatura ambiente, completare a 1 l con acqua deionizzata, conservare a 2~8°C, la durata di conservazione è di 6 mesi. Scartare se il reagente appare torbido o contaminato.

③ Soluzione di etanolo: 70% etanolo, 85% etanolo

Diluire 700 ml, 850 ml di etanolo con acqua deionizzata fino a 1 L. La durata di conservazione è di 6 mesi. Eliminare se il reagente appare torbido o contaminato.

④ Proteasi K Soluzione madre di proteasi K (20 mg/mL)

pesare 0,1 g di polvere secca di proteinasi K, sciogliere in 5 ml di 2×SSC (valore pH 7,0). Mescolare delicatamente la soluzione fino a completa dissoluzione e conservare a -20 °C. La durata di conservazione è di 6 mesi. Soluzione di lavoro di proteasi K (200 µg/mL): sciogliere 0,8 mL di soluzione madre di proteasi K in 80 mL di 2×SSC (valore pH 7,0), mescolare bene e la soluzione è pronta per l'uso immediato.

⑤ Soluzione NP-40/0,4×SSC allo 0,3%, pH 7,0 ~ 7,5

NP-40	0,6 ml
20×SSC	4 ml

Prendi 0,6 mL di NP-40 e 4 mL di 20×SSC, aggiungi 150 mL di acqua deionizzata, mescola, regola il pH a 7,0 ~ 7,5 a temperatura ambiente, con acqua deionizzata completa fino a un volume di 200 mL. Conservato a 2~8°C, la durata di conservazione è di 6 mesi.

Scartare se il reagente appare torbido o contaminato.

⑥ Soluzione NP-40/2×SSC allo 0,1%, pH 7,0 ± 0,2

NP-40	0,2 ml
20×SSC	20 ml

Prendi 0,2 mL di NP-40 e 20 mL di 20×SSC, aggiungi 150 mL di acqua deionizzata, mescola, regola il pH a 7,0±0,2 a temperatura ambiente, con acqua deionizzata completa fino a un volume di 200 mL. Conservato a 2~8 °C, la durata di conservazione è di 6 mesi.

Eliminare se il reagente appare torbido o contaminato.

⑦ Controcolorazione di diaminidinil fenilindolo (DAPI)

Utilizzare il colorante di contrasto anti-tempra DAPI disponibile in commercio.

⑧ Xilene.

2. Pretrattamento

① *Sezionamento*: le sezioni di tessuto fissate in formalina neutra e incluse in paraffina vengono posizionate su vetrini puliti.

② *Cottura*: le fette di tessuto vengono posizionate sulla macchina per la cottura 65°C durante la notte (30 min a 80°C cottura per vecchie fette).

③ *Deceratura*: le sezioni di tessuto vengono immerse per 10 minuti in una vasca di tintura in xilene per la deceratura, ripetuta una volta e quindi immediatamente immerse in etanolo al 100% per 5 minuti.

④ *Reidratazione*: a temperatura ambiente, le fette di tessuto vengono poste in etanolo al 100%, etanolo all'85% e etanolo al 70% per 2 minuti, quindi immerse in acqua deionizzata per 3 minuti. Dopo aver estratto le fette, rimuovere per assorbimento l'eccesso di umidità attorno alle fette di tessuto con carta velina sterile e pulita.

⑤ *Trattamento dell'acqua*: inferiore a 95° a bagnomaria, le fette di tessuto vengono immerse in acqua deionizzata per 30-40 minuti (l'acqua deionizzata viene preriscaldata a bagnomaria).

⑥ *Lavaggio*: a temperatura ambiente, le sezioni di tessuto vengono immerse in una soluzione 2×SSC, risciacquando due volte per 5 minuti ciascuna.

⑦ *Trattamento con proteasi*: le fette di tessuto vengono immerse nella soluzione di lavoro della proteasi, a 37°C per 5-30 minuti.

⑧ *Lavaggio*: a temperatura ambiente, le sezioni di tessuto vengono immerse in una soluzione 2×SSC, risciacquando due volte per 5 minuti ciascuna.

⑨ *Disidratazione*: le fette di tessuto vengono poste in ordine in etanolo al 70%, etanolo all'85% e etanolo al 100% per 2 minuti ciascuna, estratte e lasciate asciugare all'aria.

3. Denaturazione e ibridazione

Le seguenti operazioni devono essere eseguite in camera oscura.

- ① Prendi la sonda ALK a due colori a temperatura ambiente statica per 5 minuti. Centrifuga brevemente manualmente (non usare vortex o agitatore). Prendi una goccia da 10 µl nella cella e lasciala cadere nella zona di ibridazione, copri immediatamente l'area del vetrino di vetro da 22 mm x 22 mm; distribuisce uniformemente senza bolle la sonda sotto l'area coperta dal vetrino di vetro e sigilla i bordi con la gomma (la sigillatura dei bordi deve essere accurata per evitare che la pellicola secca influenzi i risultati del test durante l'ibridazione).
- ② Posizionare il vetrino nello strumento di ibridazione, denaturare a 83°C per 5 minuti (l'ibridizzatore deve essere preriscaldato a 83°C) e ibridare a 42°C per 2-16 ore.

4. Lavaggio

Le seguenti operazioni devono essere eseguite in camera oscura.

- ① Estrarre i vetrini ibridati, rimuovere la gomma dal coprioggetto e posizionare immediatamente i vetrini in una soluzione di NP-40 allo 0,3%/SSC 0,4x a 67°C. Agitare per 1-3 secondi, rimuovere il coprioggetto e continuare a immergere i vetrini per 1-2 minuti.
- ② A temperatura ambiente, posizionare le fette in una soluzione NP-40/2xSSC allo 0,1%, oscillare per 1-3 secondi e immergere per 1-2 minuti.
- ③ A temperatura ambiente, immergere le fette in etanolo al 70%, lasciare in ammollo per 1-3 minuti e lasciare asciugare naturalmente al buio.

5. Controcolorazione

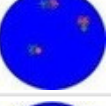
Le seguenti operazioni devono essere eseguite in camera oscura 10-15µl di colorante composto DAPI vengono versati nell'area di ibridazione del vetrino e immediatamente coperti. Viene selezionato il filtro adatto per l'osservazione del vetrino al microscopio a fluorescenza.

6. Osservazione dei risultati FISH

Posizionare i vetrini sotto il microscopio a fluorescenza dopo la controcolorazione, quindi sotto la luce naturale, utilizzare un obiettivo a bassa potenza (10x) per individuare l'area delle cellule NSCLC, quindi passare all'obiettivo 40x per individuare un'area in cui le cellule sono ben distribuite. Utilizzare un obiettivo ad alta potenza (60x, 100x) per selezionare le cellule che hanno le stesse dimensioni dei nuclei, confine completo dei nuclei, buona colorazione DAPI, nessuna sovrapposizione dei nuclei e mostrano un segnale chiaro, scegliere casualmente almeno 50 cellule tumorali, enumerare il segnale arancione e verde in questi nuclei.

Classificazione e enumerazione dei segnali

Tabella 3: Guida al conteggio dei segnali a doppio colore

● Segnale arancione singolo Segnale ● verde singolo ● Segnali arancioni verdi adiacenti o fusi	
	I singoli segnali arancioni o verdi sono considerati segnali singoli.
	I segnali diffusi possono avere un aspetto simile a quello delle fibre di DNA, ovvero sfocate o allungate.
	I segnali arancioni e verdi sono adiacenti, ovvero la distanza è inferiore a due diametri di segnale, o sono sovrapposti, il che è considerato come un segnale fuso. Possono essere osservati più segnali fusi e/o spezzati in un singolo nucleo.
	Se il segnale diffuso è adiacente o connesso a un segnale in fibra, devono essere registrati come un segnale fuso. In un singolo nucleo possono essere osservati più segnali fusi e/o spezzati.
	Due segnali dello stesso colore e della stessa dimensione sono adiacenti, separati da una distanza inferiore a due diametri del segnale, e devono essere registrati come un segnale unico (questo è un segnale diviso).

Enumerare 50 cellule tumorali, registrare il numero di segnali fusi o adiacenti, singolo segnale arancione e singolo segnale verde in ogni cellula. Enumerare una volta per ogni cellula tumorale e registrare le cellule con segnale di ibridazione (sia segnale arancione che verde), ma queste cellule senza segnale, solo segnale di colore singolo, segnale debole o segnale estremamente diffuso non devono essere contate.

Determinazione dei risultati

Tabella 4: Criteri per giudicare la rottura positiva e negativa del gene ALK

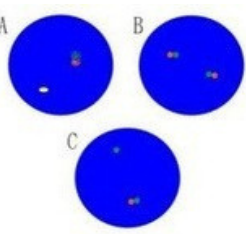
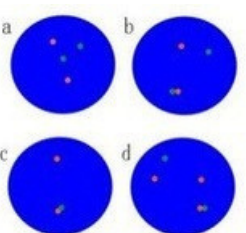
Segnale negativo (nessuna fusione genica)	
	A. e B. Questi nuclei contengono segnali arancioni e verdi fusi. I segnali sono sovrapposti, adiacenti o distanti meno di due diametri di segnale. C. Un singolo segnale verde senza un corrispondente segnale arancione oltre a segnali fusi e/o spezzati indica una cancellazione della porzione arancione della sonda ALK ed è considerato negativo. L'area bersaglio del farmaco si trova all'interno dell'area bersaglio della sonda arancione.
Segnale positivo (fusione genica)	
	Segnale positivo: questi nuclei contengono segnali riorganizzati o "spezzati", distanti 2 o più diametri del segnale. Figura a. Un nucleo può avere più di un set di segnali spezzati. Figura b. Un nucleo può avere segnali fusi e segnali spezzati. Figura c. Un nucleo può avere un singolo segnale arancione (segnale verde cancellato) oltre a segnali fusi e/o spezzati. Nota: un nucleo con segnali di un solo colore non dovrebbe essere enumerato. Figura d. Lo stesso nucleo ha segnali fusi, segnali spezzati e delezioni.

Tabella 4: Determinazione delle cellule come positive o negative

Tipo di segnale	Numero di adiacenti o segnali fusi	Numero di segnali arancioni singoli	Numero di segnali verdi singoli	Determinazione delle cellule
A,B	≥1	0	0	Negativo
C	≥1	0	≥1	Negativo
a,b,d	≥0	≥1	≥1	Positivo
c	≥1	≥1	0	Positivo

Enumerare le cellule positive e negative in base ai metodi di determinazione descritti nelle Tabelle 4 e 5, calcolare il valore del rapporto, Rapporto = numero di cellule positive / numero totale di cellule enumerate × 100%.

① Risultati positivi

Il campione di tessuto è considerato positivo per ALK Gene Break Apart se il rapporto è > 50%.

② Risultati negativi

Il campione di tessuto è considerato negativo per ALK Gene Break Apart se il rapporto è < 10%.

③ Risultati indeterminati

Se Ratio è compreso tra 10%-50%, scegliere un'altra area cellulare per enumerare ancora una volta 50 cellule, sommare le letture del primo e del secondo conteggio cellulare e calcolare il Ratio finale. Se Ratio < 15%, il campione di tessuto è considerato negativo, se Ratio ≥ 15%, il campione di tessuto è considerato positivo.

[Interpretazione dei risultati dei test]

1. In questo kit, una sonda bicolore viene utilizzata per rilevare lo stato di fusione del gene ALK. Quando ≥ 75% dei nuclei nel tessuto mostrano segnali bicolori, si considera che l'ibridazione sia riuscita e i segnali bicolori vengono confrontati tra loro, e le cellule cancerose e quelle non cancerose vengono confrontate tra loro.

2. Il test sui pesci sarà considerato fallito nei seguenti casi e dovrà essere ritestato, tra cui:

- ① il campione di controllo positivo o negativo non mostra i risultati previsti;
- ② il focolaio tumorale è troppo piccolo per osservare e contare due aree tumorali;
- ③ cellule con segnali conteggiabili < 75%;
- ④ più del 10% dei segnali di fluorescenza erano localizzati all'esterno del nucleo;
- ⑤ la struttura nucleare è difficile da distinguere;
- ⑥ ha una forte fluorescenza spontanea

3. I fattori comuni che influenzano i risultati del test e i metodi di trattamento nell'esperimento sono mostrati nella Tabella 6:

Tabella 6: Problemi frequenti e metodi di gestione

Problema	Probabile causa	Soluzione consigliata
Forte sfondo di diapositive	Lavaggio inadeguato del vetrino prima della preparazione dei campioni	Lavare il vetrino con alcol etilico assoluto.
	Inadeguato lavare dopo ibridazione	Assicurarsi che il tampone di lavaggio sia preparato in conformità alle istruzioni per l'uso, verificare che il valore del pH e la temperatura del tampone di lavaggio siano corretti, rimuovere il coprioggetto e ripetere i passaggi di lavaggio
	Uso improprio dei set di filtri	Sostituire con set di filtri adatti per ridurre la luce di fondo.
	Condizione di ibridazione non corretta	Assicurarsi che la temperatura dello strumento di ibridazione sia impostata a 42°C.
	La temperatura è troppo bassa durante il lavaggio	Assicurarsi che il tampone di lavaggio raggiunga la temperatura richiesta durante il lavaggio dei vetrini.
	L'intensità di lavaggio del tampone di lavaggio è troppo bassa	Assicurarsi che il tampone di lavaggio sia preparato in conformità alle istruzioni per l'uso. (Una bassa concentrazione di SSC o un'alta concentrazione di NP-40 aiuterebbero a migliorare l'intensità del lavaggio del tampone).
Debole controcolorazione	Debole controcolorazione	Rimuovere il coprioggetto, a temperatura ambiente, immergere i vetrini nel tampone di lavaggio contenente 2 × SSC/0,1%NP-40 per 5 minuti. Quindi immergere sequenzialmente i vetrini in una soluzione di etanolo al 70%, 85% e 100% rispettivamente per 1 minuto, quindi eseguire la controcolorazione.
	La macchia di contrasto è stata conservata a lungo o esposta a luce eccessiva	Per garantirne l'efficacia, assicurarsi che la tinta di contrasto venga conservata a -20°C e al riparo dalla luce.
Nessun segnale o segnali deboli	Inadeguata denaturazione degli esemplari	Assicurarsi che la temperatura dello strumento di ibridazione sia impostata a 83°C; sono necessari almeno 10 minuti di anticipo per preriscaldare lo strumento di ibridazione.
	La miscela di sonda e il tampone di ibridazione non sono stati miscelati a sufficienza prima dell'uso	Soffiare la miscela della sonda e mescolare sufficientemente la sonda, quindi centrifugare per un breve periodo.
	La miscela di sonda sui vetrini dei tessuti si asciuga troppo velocemente	Dopo aver versato la miscela della sonda, l'area bersaglio deve essere immediatamente coperta con il coprioggetto; quando si lavano i vetrini, è possibile rimuovere solo un coprioggetto alla volta e immergerlo nel tampone di lavaggio immediatamente prima di rimuovere il coprioggetto successivo.
	Bolle d'aria formate sotto il coprioggetto durante l'ibridazione	Il coprioggetto deve coprire la miscela della sonda in modo da eliminare delicatamente le bolle d'aria.
	Inappropriate condizioni di ibridazione	Assicurarsi di rispettare il tempo e la temperatura richiesti dall'ibridazione e non lasciare spazi vuoti quando si sigillano i vetrini con cemento di gomma. Il tempo di ibridazione deve essere regolato in base alla situazione.
	Tampone di lavaggio non idoneo o condizioni di lavaggio non idonee	Assicurarsi di seguire i requisiti delle Istruzioni per l'uso per formulare il tampone di lavaggio. Assicurarsi che la temperatura del tampone di lavaggio raggiunga la temperatura predeterminata nella fase di lavaggio. Il termometro e il pHmetro devono essere calibrati accuratamente. Rimuovere il coprioggetto prima di immergere il vetrino nel tampone di lavaggio.
	Conservazione inappropriata delle sonde o dei vetrini dei campioni	Assicurarsi che la miscela di sonda sia conservata a -20°C e protetta dalla luce. Collocare i vetrini senza ibridazione a -20°C per la conservazione a lungo termine o a temperatura ambiente per la conservazione a breve termine. Collocare i vetrini ibridati a -20°C, al riparo dalla luce, e conservare per meno di 6 mesi.
	Uso non corretto della tinta di contrasto DAPI, luminosità eccessivamente elevata della tinta di contrasto	Rimuovere il coprioggetto, immergere i vetrini in 2 × SSC/0,1%NP-40 per 5 minuti a temperatura ambiente. Immergere sequenzialmente i vetrini in una soluzione di etanolo al 70%, 85% e 100% rispettivamente per 1 minuto, quindi eseguire la controcolorazione dopo aver asciugato i vetrini all'aria.
	Sono stati selezionati set di filtri non appropriati per l'osservazione	Utilizzare set di filtri corretti per osservare la fluorescenza della sonda. Per informazioni dettagliate, consultare il reparto di assistenza tecnica di Wuhan HealthCare Biotechnology Co., Ltd.

[Indice di prestazione del prodotto]

1. La confezione esterna del kit deve essere completa e senza danni e i segni devono essere completi e chiari; ogni reagente liquido deve essere chiaramente contrassegnato senza perdite.

2. Dopo che la sonda si è ibridata efficacemente con i linfociti del sangue periferico (o del suo mezzo di coltura), dovrebbe inviare segnali di fluorescenza che possono essere riconosciuti a occhio nudo al microscopio a fluorescenza.
3. Sono state rilevate le sezioni di paraffina (riferimento negativo) di 5 pazienti con carcinoma polmonare non a piccole cellule con fusione genica ALK negativa e sono stati analizzati i segnali di fluorescenza. I risultati sono stati negativi.
4. Sono state rilevate sezioni di paraffina (riferimento positivo) di 5 pazienti con carcinoma polmonare non a piccole cellule con fusione genica ALK positiva e sono stati analizzati i segnali di fluorescenza. I risultati sono stati tutti positivi.
5. Rilevare il riferimento di sensibilità (riferimento del cariotipo), analizzare 100 cromosomi 2 di 50 cellule in metafase e almeno 98 cromosomi 2 mostrano un segnale di fluorescenza verde e un segnale di fluorescenza rossa.
6. Rilevare il riferimento specifico (riferimento del cariotipo), analizzare 100 cromosomi 2 di 50 cellule in fase di divisione in metafase e almeno 98 cromosomi 2 mostrano un segnale di fluorescenza verde specifico e un segnale di fluorescenza rossa specifico nell'area bersaglio.

Lo studio clinico di questo kit adotta il design sperimentale del metodo cieco sincrono e utilizza il reagente diagnostico concomitante (il "kit di rilevamento della ricombinazione genica ALK (ibridazione fluorescente in situ)" di Abbott molecular (certificato di registrazione n.: gxzz 20143405183) che è stato verificato da farmaci mirati come reagente di confronto. Sono stati testati un totale di 1189 campioni efficaci e il tasso di coincidenza positiva di questo kit Il tasso di coincidenza negativa e il tasso di coincidenza complessivo erano del 100% e il valore kappa era 1,000 (P = 0,00).

[Precauzioni]

1. Si prega di leggere attentamente questo manuale prima di effettuare il test. Il personale addetto al test riceverà una formazione tecnica professionale e il conteggio del segnale il personale deve essere in grado di osservare e distinguere i segnali arancioni e verdi.
2. Quando si testano campioni clinici, quando è difficile contare il segnale di ibridazione e i campioni non sono sufficienti per ripetere il nuovo test, il test non fornirà alcun risultato. Se la quantità di cellule è insufficiente per l'analisi, il test non fornirà risultati.
3. Xilene, formammide e colorante DAPI re utilizzati in questo esperimento hanno potenziale tossicità o cancerogenicità. È necessario operare sotto cappa aspirante e indossare maschere e guanti per evitare il contatto diretto. I risultati di questo kit saranno influenzati da vari fattori del campione stesso, ma anche limitati dal tempo di digestione enzimatica, dalla temperatura e dal tempo di ibridazione, dall'ambiente operativo e dalle limitazioni dell'attuale tecnologia di biologia molecolare, che potrebbero portare a risultati errati sulla fusione del gene ALK. Gli utenti devono comprendere i potenziali errori e le limitazioni di accuratezza che potrebbero esistere nel processo di rilevamento.

[Riferimenti]

- [1] Zhang Xuchao, Lu Shun, Zhang Tension, ecc. Consenso degli esperti sulla diagnosi di linfoma anaplastico chinasi (ALK) - positivo non a piccole cellule cancro polmonare a cellule T in Cina (edizione 2013) [J] Chinese Journal of pathology 2013, 42(6):402-406.
- [2] Linee guida cinesi del 2014 per la diagnosi e il trattamento della mutazione sensibile al gene EGFR e del gene di fusione alk positivo al NSCLC [J] Rivista cinese di oncologia duemilaquattordici
- [3] Chen Jiayan, gene di fusione EML4-ALK di fan min e cancro polmonare non a piccole cellule [J] Chinese Journal of cancer 2010, 20(6):474-478.
- [4] Tian Hongxia, Zhang Xuchao, Wu Yilong Progressi nella ricerca sui geni di fusione nel cancro polmonare non a piccole cellule [J] Chinese Journal of cancer 2013, 23(2):149-154.
- [5] Zheng qiuqing, Mao Weimin, Xie Fajun Gene di fusione EML4-ALK: un nuovo bersaglio per il trattamento del cancro polmonare non a piccole cellule [J] Journal of molecular diagnosis and therapy 2015, 7(1):50-54. [6] Hua Hongwei, Ding Gang Progressi nella ricerca del gene di fusione EML4-ALK nel cancro polmonare non a piccole cellule [J] Journal of practical cancer 2012, 27(4):425-428.

[Informazioni di base]

Nome del registrante/Produttore: Wuhan HealthCare Biotechnology Co., Ltd. Indirizzo: Piano 1-4, Edificio n. 8, Optics Valley Precision Medicine Industry Base Fase I, #9 Gaokeyuan 3rd Road, East Lake High-Tech Zone, Città di Wuhan, Provincia di Hubei, Repubblica Popolare Cinese.

Numero di telefono:+86(027)8757-0662 **E-mail:**e-mail: cs@healthcare-biotech.com | **Sito web:**www.healthcare-biotech.com

[Data di approvazione del manuale e data di revisione]

V1.0: Data di approvazione: 3 gennaio 2018.

V1.1: Data di revisione: 24 dicembre 2021



Via dei Colli S.Paolo 3/D – 00072 ARICCIA (RM)- Italy

Tel.: (+39)0693955058 – Fax.: (+39)0693955059

E-mail: servizioclienti@resnovaweb.it – PEC mail: resnova@pec.it

Per invio ordini: ordini@resnovaweb.it – Web site: www.resnovaweb.com