

Numero Catalogo Prodotti FP-009 Per diagnosi clinica e ricerca scientifica

Bladder Cancer Cells chromosome and Gene Anomaly Probe Detection Kit

[Nome Prodotto] Anomalia cromosomica e genetica delle cellule del cancro alla vescica (metodo di ibridazione fluorescente in situ)

[Usi previsti] Il cancro alla vescica è il tumore maligno più comune dell'apparato urinario. Nel corso dello sviluppo del cancro alla vescica, l'espressione anomala del cariotipo cromosomico delle cellule tumorali è estremamente complessa. Studi hanno dimostrato che un numero considerevole di aberrazioni cromosomiche non casuali nel numero e nella struttura si verifica nello sviluppo, nella stadiazione, nel grading e nella risposta terapeutica del cancro alla vescica. Numerosi studi hanno dimostrato che i cromosomi 3, 7, 17 e 9p21 sono i principali marcatori diagnostici del cancro alla vescica e che l'individuazione di questi cromosomi anomali ha un'importanza fondamentale nella diagnosi e nella prognosi del cancro alla vescica. Il tasso di recidiva nei pazienti con cancro alla vescica è più elevato dopo il trattamento, pertanto è necessario monitorarlo. I protocolli di monitoraggio standard includono la cistoscopia e l'esame delle cellule esfoliate nelle urine.

La cistoscopia è invasiva e presenta una scarsa compliance. È difficile diagnosticare precocemente i tumori superficiali e il 10-30% dei casi presenta falsi negativi. Sebbene l'esame delle cellule esfoliate nelle urine non sia invasivo, presenta un'elevata sensibilità per i tumori di alto grado, ma una bassa sensibilità per i tumori di basso grado. Pertanto, trovare un metodo efficace per la diagnosi precoce della recidiva del cancro alla vescica è un problema urgente da risolvere. Numerosi studi hanno dimostrato che la tecnologia di ibridazione fluorescente in situ delle cellule esfoliate nelle urine presenta i vantaggi di essere non invasiva, sensibile e specifica, e la sensibilità aumenta con l'aumentare della stadiazione del tumore, rappresentando un mezzo ideale per diagnosticare e monitorare la recidiva del cancro alla vescica. Questo prodotto utilizza cellule del sedimento urinario di pazienti con sospetto cancro alla vescica come campione di prova e utilizza l'ibridazione fluorescente in situ per rilevare la perdita di aneuploidia e p16 (9p21) sui cromosomi 3, 7 e 17 nelle cellule esfoliate. Può essere utilizzato come misura ausiliaria per la diagnosi precoce del cancro alla vescica e la recidiva del cancro alla vescica nei pazienti con ematuria.

[Principio di rilevamento]

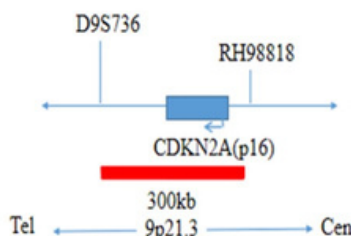
Il kit si basa sull'ibridazione fluorescente in situ e utilizza una sonda di acidi nucleici marcata con fluoresceina. Il gene target da rilevare è omologo complementare alla sonda di acidi nucleici utilizzata. Entrambi vengono denaturati, ricotti e rinaturati. Viene formato un ibrido tra il gene target e la sonda di acidi nucleici, e l'analisi qualitativa, quantitativa o relativa del posizionamento del gene da misurare al microscopio viene eseguita dal sistema di rivelazione a fluorescenza. Questo kit utilizza una sonda di colore arancione marcata con fluoresceina di rodamina (RHO) e una sonda verde marcata con isotiocianato di fluoresceina verde (FITC). Le due sonde possono essere legate al sito di rilevamento del target mediante ibridazione in situ. Questo kit fornisce due set di sonde (CEP3/CEP7, p16/CEP17). In condizioni normali, ogni set di sonde viene visualizzato come due segnali rosso-arancio e due segnali verdi al microscopio a fluorescenza. In presenza di un cromosoma o di un gene mancante nella sequenza bersaglio, il segnale verde o arancione diminuisce di conseguenza. Il rilevamento dell'aneuploidia 3, 7, 17 e della delezione di p16 (9p21) con questo metodo può essere utilizzato come metodo di rilevamento ausiliario per la diagnosi clinica e la recidiva postoperatoria del cancro alla vescica.

Composizione Kit

Il kit è composto da una sonda P16/CEP7 o da una sonda bicolore CEP3/CEP17 CEP3/CEP7, come mostrato nella Tabella 1.

Table 1 Kit composition

Specifiche confezionamento	Nome Componente	Specifiche	Quantità	Principali Componenti
10 Tests/box	CEP3/CEP7 dual color probe	100µL/Tube	1	CEP3 Orange probe; CEP17 Green probe
	P16/CEP17 dual color probe	100µL/Tube	1	P16 Orange probe; CEP17 Green probe



[Condizioni di Conservazione & Validità]

Conservare sigillato al riparo dalla luce a $-20^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$. Il prodotto è valido per 20 mesi. Evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti non necessari, che non dovrebbero superare le 10 volte. Dopo l'apertura, entro 24 ore per la conservazione a breve termine, conservare sigillato a $2-8^{\circ}\text{C}$ al buio. Per la conservazione a lungo termine, dopo l'apertura, conservare il coperchio sigillato a $-20^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ al riparo dalla luce. Il kit è trasportabile a temperature inferiori a 0°C .

[Strumenti Applicabili]

Sistemi di imaging con microscopia a fluorescenza, inclusi microscopia a fluorescenza e set di filtri adatti per DAPI, verde e arancione.

[Requisiti Campione]

Tipi di campione applicabili: campioni di cellule di urina fresca depositate e conservate per non più di 2 ore.

[Metodo di prova]

1. Reagenti correlati

Per l'esperimento sono necessari i seguenti reagenti, che però non sono forniti nel kit.

① 20×SSC, pH 5.3 ± 0.2

Pesare 176 g di cloruro di sodio e 88 g di citrato di sodio, scioglierli in 800 ml di acqua deionizzata, regolare il pH a 5.3 ± 0.2 a temperatura ambiente e completare fino a 1 l con acqua deionizzata. Sterilizzazione a vapore ad alta pressione, conservazione a $2-8^{\circ}\text{C}$; la soluzione ha una durata di 6 mesi. Eliminare se il reagente appare torbido o contaminato.

② 2×SSC, pH 7.0 ± 0.2

Prelevare 100 ml del reagente 20×SSC sopra indicato, diluire con 800 ml di acqua deionizzata, mescolare, regolare il pH a 7.0 ± 0.2 a temperatura ambiente, portare a 1 l con acqua deionizzata e conservare a $2-8^{\circ}\text{C}$. La durata di conservazione è di 6 mesi. Eliminare se il reagente appare torbido o contaminato.

③ Soluzione di etanolo: etanolo al 70%, etanolo all'85%

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

④ Soluzione NP-40/0,4×SSC allo 0,3%, pH $7.0-7.5$

Prelevare 0,6 mL di NP-40 e 4 mL di 20×SSC, aggiungere 150 mL di acqua deionizzata, mescolare, regolare il pH a $7.0-7.5$ a temperatura ambiente, quindi aggiungere acqua deionizzata fino a raggiungere un volume di 200 mL. Conservare a $2-8^{\circ}\text{C}$ e la durata di conservazione è di 6 mesi. Eliminare se il reagente appare torbido o contaminato.

⑤ Soluzione fissativa (metanolo: acido acetico glaciale = 3:1)

Riempire il pallone con 30 ml di metanolo e 10 ml di acido acetico glaciale e mescolare accuratamente per un uso immediato..

⑥ Tampone PBS, pH 7.4 ± 0.2

Cloruro di Sodio	8g
Cloruro di potassio	0.2g
fosfato monosodico di idrogeno	3.58g
fosfato monobasico di potassio	0.27g

Sciogliere i reagenti in 800 mL di acqua deionizzata, regolare il pH a 7.4 ± 0.2 a temperatura ambiente e completare a 1 L con acqua deionizzata. Conservata a temperatura ambiente, la soluzione ha una durata di 6 mesi. Eliminare se il reagente appare torbido o contaminato.

⑦ Soluzione di KCl 0,075 M. Pesare 2,8 g di cloruro di potassio, scioglierli in 400 ml di acqua deionizzata e portare a 500 ml con acqua deionizzata. Conservata a temperatura ambiente, la soluzione ha una durata di 6 mesi. Eliminare se il reagente appare torbido o contaminato.

⑧ Soluzione di HCl: misurare 8,2 ml di HCl concentrato; mescolare con acqua deionizzata fino a ottenere 100 ml di soluzione di HCl 1 M e conservare a temperatura ambiente. Se necessario, diluire a 0,01 M utilizzando il metodo di diluizione 10x.

⑨ Agente colorante di-amindil fenil indolo (DAPI)

Utilizzare coloranti di contrasto DAPI disponibili in commercio contenenti anti-quencher.

2. Raccolta dei campioni e preparazione dei vetrini

① Raccolta del campione: raccogliere 200 ml di urina del mattino (entro 2 ore) e inserirla in una provetta da centrifuga con punta da 50 ml e centrifugare a temperatura ambiente a 1800 giri al minuto per 10 minuti.

② Raccolta di Cellule: eliminare con cura il surnatante (spesso si forma del precipitato e, se il precipitato è piccolo, utilizzare una pipetta per aspirarlo con cura), aggiungere 2 mL di soluzione ipotonica preriscaldata (0,075 M KCl) lungo la parete della provetta, soffiare con cautela il sedimento pesante e continuare ad aggiungere soluzione ipotonica per un volume finale di 10 mL, in soluzione ipotonica per 20 minuti a 37°C a bagnomaria.

③ Dopo il trattamento ipotonico, si aggiungono delicatamente 2 mL di soluzione fissativa alla preparazione, agitando durante l'aggiunta.

- ④ Centrifugare immediatamente a temperatura ambiente a 1800 giri/min per 10 minuti e scartare il surnatante.
- ⑤ Utilizzare una soluzione di fissazione fresca per risospendere il precipitato e lasciare per 10 minuti a temperatura ambiente.
- ⑥ A temperatura ambiente centrifugare a 1800 giri al minuto per 5 minuti e scartare il surnatante.
- ⑦ Risospendere il pellet con 1 mL di soluzione di fissazione fresca e raccogliere la risospensione in una provetta EP da 1,5 mL. Centrifugare su una centrifuga palmare per 3 minuti e scartare il surnatante.
- ⑧ In base alla quantità di precipitazione, aggiungere la quantità idonea di soluzione di fissazione fresca per risospendere la precipitazione (pellet).
- ⑨ Le gocce vengono esaminate al microscopio per regolare la concentrazione cellulare.
- ⑩ Lascia cadere i pezzi.

3. Elaborazione diapositive

- ① I vetrini vengono cotti a 56°C per 30 minuti.
- ② Immergere per 5 minuti × 2 volte nel tampone 2×SSC.
- ③ 37°C pepsin solution (0.04%) and digest for 10-15 min. Immergere per 5 minuti × 2 volte in tampone SSC 2x.
- ④ Disidratare in alcol a gradiente al 70%, 85%, 100%.

4. Denaturazione & Ibridazione

Le seguenti operazioni devono essere eseguite in una camera oscura.

- ① Estrarre le sonde CEP3/CEP7 e p6/CEP17 e lasciarle a temperatura ambiente per 5 minuti. Mescolare e centrifugare brevemente (non agitare). Prelevare una goccia da 10 µl dalla cella e depositarla nella zona di ibridazione, coprire immediatamente un'area del vetrino di 22 mm x 22 mm; distribuire uniformemente e senza bolle la sonda sotto l'area coperta dal vetrino e sigillare i bordi con della gomma (la sigillatura dei bordi deve essere accurata per evitare che la pellicola secca influisca sui risultati del test durante l'ibridazione).
- ② Posizionare i vetrini nello strumento di ibridazione, denaturare a 88 °C per 2 minuti (l'ibridizzatore deve essere preriscaldato a 88 °C) e ibridare a 45 °C per 2-16 ore.

5. Pulizia

Le seguenti operazioni devono essere eseguite in una camera oscura

- ① Estrarre i vetrini ibridati, rimuovere la gomma dal coprioggetto e immergere immediatamente i vetrini in una soluzione 2xSSC per 5 secondi, quindi rimuovere il coprioggetto.
- ② Posizionare i vetrini in un contenitore 2xSSC a temperatura ambiente per 1 minuto.
- ③ Estrarre i vetrini e immergerli in una soluzione NP-40/0,4xSSC allo 0,3% preriscaldato a 68°C e lavare per 2 minuti.
- ④ Rimuovere i vetrini e immergerli in acqua deionizzata preriscaldato a 37°C, lavare per 1 minuto e asciugare i vetrini naturalmente al buio.

6. Controcolorazione

Le seguenti operazioni devono essere eseguite in camera oscura.

Immergere 10-15 µL di colorante di contrasto DAPI nell'area di ibridazione del vetrino, coprire immediatamente e quindi utilizzare il filtro appropriato per osservare le sezioni al microscopio a fluorescenza.

7. Osservazione dei risultati FISH

Posizionare la pellicola controcolorata al microscopio a fluorescenza e prima posizionarla sotto l'obiettivo a basso ingrandimento (10 ×).

Confermare l'area cellulare al microscopio; passare a 40 ×. Sotto l'obiettivo, trovare una posizione in cui le cellule siano distribuite uniformemente; quindi nell'obiettivo ad alto ingrandimento (100 ×). Sono stati osservati i risultati FISH dei nuclei.

[Determinazione del tipo di segnale delle cellule FISH]

Determine the signal type of each group of probes in interphase cells.

Determinare il tipo di segnale di ciascun gruppo di sonde nelle cellule in interfase.

Combinazione di sonde 1: p16/CEP17 Colore marcatore: Arancione/Verde

Tipi anomali comuni: delezione o amplificazione di p16; aneuploidia del cromosoma 17

Modalità segnale normale: 2 Arancione / 2 Verde

Modalità segnale anomala: 1 Arancione rosso / 2 Verde; 0 Arancione / 2 Verde; 2 Arancione / 3 Verde; 3 Arancione / 3 Verde; altro

Combinazione di sonde 2: CEP3/CEP7 Colore marcatore: Arancione/Verde

Tipi anomali comuni: aneuploidia sui cromosomi 3 e 7

Modalità segnale normale: 2 Arancione / 2 Verde

Modalità segnale anomala: 3 Arancione / 2 Verde; 2 Arancione / 3 Verde; 3 Arancione / 3 Verde; altro.

[Determinazione del valore positivo o intervallo di riferimento]

- È stato raccolto un campione di cellule esfoliate dell'epitelio della vescica urinaria da 20 pazienti affetti da tumore non vescicale o da soggetti di controllo normali.
 - Utilizzando i passaggi del metodo sopra descritti per preparare le diapositive ed eseguire gli esperimenti FISH;
 - Determinazione della soglia: sono state osservate 100 cellule per ogni combinazione di campioni di ciascuna sonda e sono state calcolate la media e la deviazione standard della percentuale di cellule che mostravano tipi di segnale anomali. La soglia anomala è stata definita come media + 3 volte la deviazione standard. Soglia anomala = media (M) + 3 x deviazione standard (DS).
- Ad esempio: determinazione della delezione o amplificazione di p16.
- Sono stati selezionati venti (20) casi di pazienti non affetti da tumore alla vescica o di soggetti umani normali per i campioni di urina al fine di stabilire una soglia. Dopo il trattamento cellulare, è stata eseguita la FISH di p16. Sono state osservate 100 cellule in ciascun campione e sono stati contati i tipi cellulari e la corrispondente percentuale cellulare.
- Ad esempio, determinazione della soglia anomala per il rilevamento del gene p16.

Tabella 2 Stabilimento della soglia anomala

No	Campione1	Campione 2		Campione 20	Valore medio	SD	Soglia (%)
Conteggio delle cellule	100	100		100			
Cellule anomale (zero copie%)	1	1		3	2	1.500	6.5
Cellule anomale (% di copie singole)	2	1		0	1.35	1.492	5.8
Cellule anomale (≥3 copie)	1	0		0	0.4	0.821	2.9

Per ogni campione, analizzare 100 cellule per sonda e utilizzare la soglia per determinare il risultato:

- L'indice di rilevamento è maggiore della soglia e il risultato è positivo;
- L'indice di rilevamento è inferiore alla soglia e il risultato è negativo;
- L'indice di rilevamento è uguale alla soglia: aumentare il numero di cellule nel campione di prova per determinare il risultato finale;
- La presenza di anomalie su due o più cromosomi o anomalie multiple sullo stesso cromosoma indica la presenza di cellule tumorali della vescica.

[Limiti dei metodi di prova]

Questo kit utilizza l'ibridazione fluorescente in situ per rilevare anomalie cromosomiche o genetiche nelle cellule CEP7/CEP3 e p16/CEP17 e non può essere utilizzato per il rilevamento di mutazioni a base singola

[Indice di prestazione del prodotto]

1.Intensità del segnale di fluorescenza

Dopo l'efficace ibridazione della sonda con il materiale di riferimento del cariotipo, la sonda dovrebbe emettere segnali di fluorescenza che possono essere identificati a occhio nudo al microscopio a fluorescenza.

2.Sensibilità:

- La sensibilità della sonda arancione CEP3 è stata analizzata in 100 cromosomi del cromosoma 3 in divisione metafase di 50 cellule, e almeno 98 cromosomi del cromosoma 3 hanno mostrato 1 segnale di fluorescenza rosso-arancio.
- La sensibilità della sonda verde CEP7 è stata analizzata in 100 cromosomi del cromosoma 7 in divisione metafase di 50 cellule, e almeno 98 cromosomi del cromosoma 7 hanno mostrato 1 segnale di fluorescenza verde.
- La sensibilità della sonda genica verde CEP7 è stata analizzata in 100 cromosomi del cromosoma 17 in divisione metafase di 50 cellule, e almeno 98 cromosomi del cromosoma 17 hanno mostrato 1 segnale di fluorescenza verde.
- La sensibilità della sonda p16 arancione è stata analizzata in 100 cromosomi del cromosoma 9 in divisione metafase di 50 cellule, e almeno 98 cromosomi del cromosoma 9 hanno mostrato 1 segnale di fluorescenza rosso-arancio.

3. Specificità

- La specificità della sonda arancione CEP3 è stata analizzata in 100 cromosomi del cromosoma 3 in divisione metafase di 50 cellule, e almeno 98 cromosomi del cromosoma 3 hanno mostrato 1 segnale di fluorescenza rosso-arancio specifico nell'area bersaglio.
- La specificità della sonda verde CEP7 è stata analizzata in 100 cromosomi del cromosoma 7 in divisione metafase di 50 cellule, e almeno 98 cromosomi del cromosoma 7 hanno mostrato 1 segnale di fluorescenza verde specifico nell'area bersaglio.
- La specificità della sonda verde CEP17 è stata analizzata in 100 cromosomi del cromosoma 17 in divisione metafase di 50 cellule, e almeno 98 cromosomi del cromosoma 17 hanno mostrato 1 segnale di fluorescenza verde specifico nell'area bersaglio.
- La specificità della sonda p16 arancione è stata analizzata in 100 cromosomi del cromosoma 9 durante la divisione in metafase di 50 cellule, e almeno 98 cromosomi del cromosoma 9 hanno mostrato 1 segnale di fluorescenza rosso-arancio specifico nell'area bersaglio.

[Precauzioni]

1. Leggere attentamente questo manuale prima di eseguire il test. Il personale addetto al test deve ricevere una formazione tecnica professionale. Il personale addetto al conteggio dei segnali deve essere in grado di osservare e distinguere i segnali arancione, rosso e verde.
2. Quando si analizzano campioni clinici, se è difficile contare i segnali di ibridazione e i campioni non sono sufficienti per ripetere il test, il test non fornirà alcun risultato. Anche se la quantità di cellule è insufficiente per l'analisi, il test non fornirà risultati.
3. La formamide e l'agente di controcolorazione DAPI utilizzati in questo esperimento presentano potenziale tossicità o cancerogenicità, pertanto è necessario utilizzarli sotto cappa aspirante e indossare maschere e guanti per evitare il contatto diretto.
4. I risultati di questo kit saranno influenzati da vari fattori del campione stesso, ma anche 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.
- L'utente deve comprendere i potenziali errori e i limiti di accuratezza che possono esistere nel processo di rilevamento.
5. Tutte le sostanze chimiche sono potenzialmente pericolose. Evitare il contatto diretto. I kit usati sono rifiuti clinici e devono essere smaltiti correttamente.
6. Questo prodotto è destinato alla diagnosi clinica e alla ricerca scientifica.

[Spiegazioni dei Simboli]

	Usi previsti		Dispositivo medico diagnostico in vitro
	Codice Lotto		marchio CE
	Produttore		Segnale di avvertimento
	Numero Catalogo		Rappresentante autorizzato per l'Europa
	Limiti di Temperatura		Consultare le istruzioni per l'uso
	Contiene sufficiente per <n> test		

[Referenze]

- [1]. Williamson MP et al. p16 (CDKN2) is a major deletion target at 9p21 in bladder cancer. Hum Mol Genet. 1995 Sep. 4(9):1569-77.
- [2]. Li Li, Ding Zhaoxing. Distortion of chromosomes 3, 7, 17 and 9p21 in bladder urothelial carcinoma and its clinical significance, [J] Diagnostic Theory and Practice 2012, 11(1).
- [3]. Hu Yu-an, Chen Yong. Disturbed chromosomes 3, 7, 17 and 9p21 in urine-exfoliated cells predict recurrence of urothelial carcinoma [J] Clinical Laboratory 2012, 7, 30(7).
- [4]. Dun Wenchao, Gu. Shenyang Research advances in the detection of chromosomal aberrations in bladder cancer [J] Modern Medicine 2013, 8, 41(8).

[Versione manoscritto e data d'approvazione]

Versione Manuale: [V1.6 rivisto il 7 Dicembre 2021](#)

Data d'approvazione: [02 Novembre 2018 \(v.1.0\)](#)



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