

Nr. Cat. Prodotti.: FP-011-1

Solo per uso diagnostico



MDS chromosome and gene anomaly probe detection kit Manuale d'istruzione

[Nome Prodotto] MDS chromosome and gene anomaly probe detection kit.

[CND] W01060299

[RDM] Non applicabile

[Specifiche confezionamento] 10 Tests/scatola.

[Uso previsto] Questo kit utilizza l'ibridazione fluorescente in situ per rilevare l'assenza/delezione del braccio lungo del cromosoma 7 e delle anomalie cromosomiche del cromosoma 7 in pazienti con sindrome mielodisplastica. Il campione di prova è costituito da cellule del midollo osseo. La sindrome mielodisplastica (MDS) è un gruppo di malattie eterogenee che sono generalmente considerate originanti da cellule staminali emopoietiche e appartengono a malattie clonali maligne. Studi hanno dimostrato che dal 40% al 60% dei pazienti con MDS presenta anomalie cromosomiche non randomizzate, tra cui le più comuni sono 5/5q-, -7/7q-, +8, 20q- e -Y. Tra le anomalie cromosomiche più comuni nei pazienti con SMD, alcune hanno un valore diagnostico specifico. La terapia immunosoppressiva è efficace in alcuni pazienti con sindromi mielodisplastiche semplici +8, 20q- o Y-; anche l'analisi del cariotipo ha un valore importante nella classificazione, nel trattamento e nella prognosi delle SMD, ad esempio i pazienti con sindromi mielodisplastiche singole Y-, 5q- o 20q- hanno una prognosi favorevole, mentre i pazienti con anomalie cromosomiche complesse (≥ 3 anomalie) o anomalie del cromosoma 7 hanno una prognosi peggiore. I pazienti con altre anomalie hanno una prognosi moderata. Queste anomalie sono di grande importanza nella diagnosi, nel trattamento e nella prognosi delle SMD. Questo kit non è stato clinicamente associato alla terapia genica mirata ed è stato validato solo per l'esecuzione del rilevamento genico. Questo kit è adatto solo per il rilevamento delle sindromi mielodisplastiche e fornisce ai medici informazioni diagnostiche supplementari.

[Principio di rilevamento]

L'ibridazione fluorescente in situ è una tecnica che osserva direttamente specifici acidi nucleici nelle cellule in vitro. Secondo il principio dell'appaiamento delle basi, la sequenza specifica di DNA è complementare alla sequenza bersaglio nella cellula. Poiché la sonda è fluorescente, la sonda di ibridazione e il DNA bersaglio possono essere chiaramente osservati al microscopio a fluorescenza grazie alla fluorescenza della sonda sotto l'appropriata luce di eccitazione.

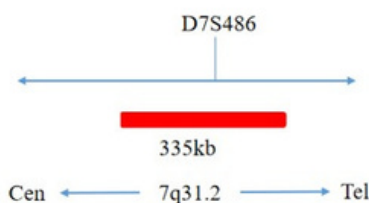
Questo kit utilizza la sonda D7S486, marcatore fluorescente arancione. Il CEP7 è marcato con fluorescenza verde e le sonde si legano al sito di rilevamento del bersaglio mediante ibridazione in situ. In condizioni normali (assenza di delezioni geniche e anomalie cromosomiche), al microscopio a fluorescenza vengono mostrati due segnali rosso-arancio e due segnali verdi. In presenza di una delezione genica, manca un segnale verde o arancione, mentre in presenza di più cromosomi, il segnale della sonda aumenta. L'individuazione di delezioni geniche e anomalie cromosomiche mediante questo metodo è di grande importanza nella diagnosi, nel trattamento e nella prognosi delle MDS.

[Composizione Prodotto]

Questo kit è costituito dalla soluzione di ibridazione della sonda D7S486/CEP7 come mostrato nella Tabella 1.

Tabella 1: Composizione Kit

Cat#	Nome Componente	Specifiche	Quantità	Principali componenti
FP-011-1	D7S486/CEP7 dual color probe	100µL/Tube	1	D7S486 orange probe, CEP7 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 $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 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 può essere trasportato a temperatura inferiore a 0°C .

[Strumenti Applicabili]

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

[Requisiti Campione]

1. Tipi di campione applicabili: campioni di midollo osseo fresco conservati a 4°C per meno di 24 ore e utilizzati per la rilevazione FISH dopo la coltura.
2. Se i campioni vengono conservati a una temperatura troppo alta o troppo bassa (ad esempio, congelati), non verranno utilizzati per i test e dovranno essere scartati.
3. Le sospensioni di cellule di midollo osseo per l'analisi del cariotipo devono essere conservate a -20°C per la rilevazione FISH.
4. Se la sospensione cellulare risulta eccessivamente volatile o contaminata durante la conservazione, il campione deve essere scartato.

[Metodo di Prova]**1. Reagenti Correlati**

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

①. 20×SSC (sodium citrate buffer), pH 5.3±0.2

Cloruro di sodio	176g
Citrato di sodio	88g

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 $5,3\pm 0,2$ a temperatura ambiente e completare fino a 1 l con acqua deionizzata. Sterilizzazione a vapore ad alta pressione, conservazione a $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$; la soluzione ha una durata di conservazione 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 $7,0\pm 0,2$ a temperatura ambiente, completare a 1 l con acqua deionizzata, conservare a $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$; la durata di conservazione è di 6 mesi. Eliminare se il reagente appare torbido o contaminato.

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

NP-40	0.6mL
20×SSC	4mL

Prelevare 0,6 mL di NP-40 e 4 mL di 20×SSC, aggiungere 150 mL di acqua deionizzata, mescolare, regolare il pH a $7,0\sim 7,5$ a temperatura ambiente, con acqua deionizzata completare fino a un volume di 200 mL. Conservare a $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$, la durata di conservazione è di 6 mesi. Eliminare se il reagente appare torbido o contaminato.

④. 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.

⑤. PBS buffer, pH 7.4±0.2

Cloruro di sodio	8g
Cloruro di potassio	0.2g
Fosfato monosodico di idrogeno	3.58g
Fosfato monosodico di potassio	0.27g

Sciogliere i componenti sopra indicati in 800 ml di acqua deionizzata, regolare il pH a $7,4\pm 0,2$ a temperatura ambiente e completare a 1 l con acqua deionizzata. Sterilizzazione a vapore ad alta pressione, conservazione a $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$; la soluzione ha una durata di conservazione di 6 mesi. Eliminare se il reagente appare torbido o contaminato.

⑥. Soluzione di Etanolo: Etanolo 70%, Etanolo 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.

⑦. Soluzione KCL 0.075M

Pesare 2,8 g di cloruro di potassio, scioglierlo in 400 ml di acqua deionizzata e completare 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 HCL

Misurare 8,2 ml di HCl concentrato, mescolare con acqua deionizzata e portare a 100 ml, conservare a temperatura ambiente per ottenere HCl 1 M. In base alle esigenze, diluire a 0,01 M con il metodo di diluizione 10x.

⑨ Agente colorante di-amiindil 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*: midollo osseo anticoagulante con eparina.

②. *Raccolta delle cellule*: il campione di cellule del midollo osseo, coltivato o non coltivato, viene pipettato sulla punta della provetta da centrifuga e centrifugato a 1000 giri al minuto per 10 minuti per rimuovere il surnatante.

③. *Bassa permeabilità*: Lavare le cellule una volta con PBS, centrifugare a 1000 giri/min per 10 minuti e pipettare il surnatante. Aggiungere una soluzione di KCl 0,075 mol/L (6~8 mL) preriscaldata a 37 °C, mescolare con una pipetta e conservare in un incubatore a 37 °C per 20-30 minuti.

④. *Pre-fissazione*: Aggiungere 2 ml di soluzione fissativa di metanolo 3:1 e acido acetico glaciale e mescolare uniformemente. Centrifugare a 1000 giri/min per 10 minuti.

⑤. *Fissazione*: Aspirare il surnatante; aggiungere 5 ml di soluzione fissativa di metanolo e acido acetico glaciale 3:1 appena preparata, mescolare uniformemente, fissare per 10 minuti, centrifugare a 1000 giri al minuto per 10 minuti.

⑥. Ripeti lo step ⑤ due volte.

⑦. *Preparazione della sospensione cellulare*: Pipettare il surnatante e aggiungere la quantità appropriata di soluzione fissativa per preparare la concentrazione appropriata di sospensione cellulare.

⑧. *Preparazione dei vetrini*: Utilizzare una pipetta per mescolare delicatamente la sospensione cellulare, quindi tamponarla e posizionarla su un vetrino pulito e privo di grassi, imbevuto di etanolo. Applicare 1 o 2 gocce per vetrino e conservare a 56 °C per 30 minuti.

I vetrini preparati possono essere conservati in frigorifero a 4 °C o in frigorifero a -20 °C per circa 1-4 settimane.

3. Elaborazione vetrini

①. A temperatura ambiente, sciacquare i vetrini due volte con la soluzione SSC (pH 7,0) per 5 minuti ogni volta.

②. Immergere i vetrini in etanolo al 70%, etanolo all'85% e etanolo al 100% e lasciarli asciugare per 2 minuti.

③. Eseguire l'esperimento di ibridazione secondo la procedura di ibridazione.

4. Denaturazione & Ibridazione

The following operations should be performed in a darkroom.

①. Estrarre il vetrino preparato e contrassegnarlo. Estrarre la sonda bicolore D7S486/CEP7 e centrifugare brevemente dopo la miscelazione. La sonda si è depositata

sul fondo della provetta, prelevare 10 µL di ciascuna e depositarla sulla zona di ibridazione del vetrino. Coprire immediatamente l'area del vetrino da 22 mm x 22 mm; distribuire uniformemente la sonda senza bolle sotto l'area coperta dal vetrino e sigillare i bordi con gomma (la sigillatura dei bordi deve essere

accurata per evitare che la pellicola secca influenzi i risultati del test durante l'ibridazione).

②. Posizionare i vetrini nell'ibridatore, denaturare a 88 °C per 2 minuti (l'ibridatore 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 Utilizzare una pinzetta per staccare con cautela la colla di copertura attorno ai vetrini. Evitare di staccare o spostare il vetrino coprioggetti. Immergere i vetrini in 2×SSC per circa 5 secondi. Estrarre e spingere delicatamente il vetrino coprioggetti verso il bordo dei vetrini con una pinzetta. Utilizzare una pinzetta per rimuovere delicatamente il vetrino coprioggetti.
- ② Posizionare i vetrini in 2×SSC a temperatura ambiente per 1 minuto.
- ③ Estrarre i vetrini e immergerli in una soluzione NP-40/0,4×SSC allo 0,3% preriscaldata a 68°C, lavare per 2 minuti. (Preparazione di NP-40/0,4×SSC allo 0,3%: Per la preparazione di 1 L, prendere 3 mL di NP-40 e 20 mL di 20×SSC, sciogliere completamente, mescolare bene e utilizzare 1 M di NaOH per regolare il pH a 7,2).
- ④ Rimuovere i vetrini e immergerli in acqua deionizzata preriscaldata a 37°C per 1 minuto. Lasciare 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 adatto per osservare le sezioni al microscopio a fluorescenza.

7. Osservazione dei risultati FISH

Posizionare il vetrino di controcolorazione al microscopio a fluorescenza e alla luce naturale, prima sotto l'obiettivo a basso ingrandimento (10x) per confermare l'area cellulare al microscopio; passare a 40x sotto l'obiettivo, trovare una posizione in cui le cellule siano distribuite uniformemente;

con l'obiettivo ad alto ingrandimento (60x, 100x) selezionare le cellule con confine nucleare completo, colorazione DAPI uniforme, nuclei senza sovrapposizioni e segnali chiari. Almeno 200 cellule devono essere selezionate casualmente per contare i segnali arancioni, verdi e gialli nel nucleo.

[Determinazione del valore positivo o intervallo di riferimento]

1. Classificazione e conteggio dei segnali

- ① *Segnale delle cellule normali*: ci sono 2 segnali rosso-arancio e 2 segnali verdi nei nuclei a singola interfase (un segnale rosso-arancio e un segnale verde nei nuclei a singola interfase dopo l'ibridazione).
 - ② *Segnali di anomalia*: D7S486/CEP7: 1 segnale rosso-arancio, 2 segnali verdi e delezione 7q nel nucleo in interfase singola; 1 segnale rosso-arancio e 1 segnale verde nel nucleo in interfase singola e il cromosoma 7 è mancante;
- Contare casualmente 200 cellule e contare il numero di cellule segnale normali e due diverse cellule segnale anomale. Ogni cellula viene contata una volta e vengono contate solo le cellule con un segnale di ibridazione (entrambi i segnali colorati). Nessun segnale o un solo segnale colorato non vengono contati e le cellule deboli o sovradisperse non vengono contate.

2. Determinazione dei risultati FISH

Abnormal results detection requires anomaly threshold establishment.

- ① *Soglia di anomalia* Si raccomanda di selezionare 20 pazienti con campioni di midollo osseo umano non leucemico o normale come controlli negativi. Utilizzare il metodo sopra descritto per preparare i vetrini per gli esperimenti FISH. Impostazione della soglia di anomalia: ogni campione viene analizzato per 200 cellule. Viene conteggiata la percentuale di segnali anomali in ciascun gruppo di sonde. Vengono calcolate la media e la deviazione standard della percentuale di cellule che mostrano pattern di segnale anomali. La soglia di anomalia è definita come media + 3 x deviazione standard.

$$\text{Soglia anomala} = \text{Media (M)} + 3 \times \text{Deviazione standard (DS)}$$

Esempio: Tabella 2: 20 pazienti non affetti da leucemia o soggetti normali sono stati selezionati come controlli negativi per il rilevamento FISH.

Tabella 2: Impostazione della soglia anomala

No.	Cellule anormali (%)
Campione 1	5
Campione 2	3
.....	
Campione 20	4
Valore medio	3
Soglia SD	0.3
Valore	(Soglia di anomalia = Valore medio + 3 x DS) =

② *Determinazione dei risultati* Se il valore di rilevamento del numero di cellule che mostrano un segnale anomalo è superiore alla soglia di anomalia, il risultato è positivo.

Se il valore di rilevamento del numero di cellule che mostrano un segnale anomalo è inferiore alla soglia di anomalia, il risultato è negativo.

Se il valore di rilevamento del numero di cellule che mostrano un segnale anomalo è uguale alla soglia di anomalia, aumentare il conteggio a 500 cellule per ogni numero di osservazioni delle cellule campione, per determinare il risultato finale.

[Limiti del metodo di prova]

Questo kit è destinato all'uso su cellule fresche di midollo osseo e non è raccomandato per l'uso su altre cellule. Qualsiasi modifica potrebbe alterare i risultati del test; questo kit è esclusivamente per la rilevazione della delezione del braccio lungo del cromosoma 7. La rilevazione del cromosoma 7 non può essere utilizzata per la rilevazione di una singola mutazione di base e non può essere utilizzata come unica base per il trattamento, la prognosi o altre modalità di gestione clinica dei pazienti con sindromi mielodisplastiche. È necessaria una valutazione completa basata sull'anamnesi del paziente e su altri risultati diagnostici.

[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 identificabili a occhio nudo al microscopio a fluorescenza.

2. *Sensitività*:

2.1 La sensibilità della sonda del locus D7S486 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 rosso-arancio.

2.2 La sensibilità della sonda del locus 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.

3. *Specificità*:

3.1 La specificità della sonda del locus D7S486 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.

3.2 La specificità della sonda del locus 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.

[Precauzioni]

1. Si prega di leggere attentamente questo manuale prima di eseguire il test. Il personale addetto al test deve ricevere una formazione tecnica professionale e il personale addetto al conteggio dei segnali deve essere in grado di osservare e distinguere i segnali arancioni e verdi.

2. Quando si testano campioni clinici, se è difficile contare il segnale di ibridazione e il campione non è sufficiente per ripetere il test, il test non fornirà alcun risultato. Se il numero di cellule è insufficiente per l'analisi, il test non fornirà risultati.

3. La formammide e l'agente di controcolorazione DAPI utilizzati in questo esperimento presentano potenziale tossicità o cancerogenicità, pertanto devono essere utilizzati sotto cappa aspirante e indossare maschere e guanti per evitare il contatto diretto.

4. I risultati di questo kit saranno influenzati da vari fattori legati al 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 rilevanti anomalie cromosomiche o genetiche. Gli utenti devono comprendere i potenziali errori e i limiti di accuratezza che possono esistere nel processo di rilevazione.

5. Tutte le sostanze chimiche sono potenzialmente pericolose. Evitare il contatto diretto. I kit usati sono rifiuti clinici e devono essere smaltiti correttamente.

[Riferimenti]

- [1]. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: myelodysplastic syndromes. Journal of the National Comprehensive Cancer Network Jccn, 2011, 9(1):30-56.
- [2]. Chinese Medical Association Hematology Branch - China Experts Consensus on Diagnosis and Treatment of Myelodysplastic Syndrome, Chinese Journal of Hematology, 2014,11,35 (11).
- [3]. Nagarajan L, Zhao L, et al. 5q- chromosome. Evidence for complex interstitial breaks in a case of refractory anemia with excess blasts. Cancer Genet Cytogenet, 1994;74(1):8-12.
- [4]. Fujita K, Mori H, et al. Chromosome abnormalities in myelodysplastic syndrome. Rinsho Byori, 1990;38(8):911-6.
- [5]. Kawankar N, Vundinti BR. Cytogenetic abnormalities in myelodysplastic syndrome: an overview. Hematology, 2011;16(3):131-8.

[Informazioni di base]

Nome del Registrante/ Produttore: Wuhan HealthCare Biotechnology Co., Ltd.

Indirizzo: Building #8, Optics Valley Precision Medicine Industry Base Phase I, #9 Gaokeyuan 3rd Road, East Lake High-Tech Zone, Wuhan City, Hubei Province, People's Republic of China. Tel#: +86(027)8757-0662 E-mail: cs@healthcare-biotech.com | Website: www.healthcare-biotech.com

[Data approvazione manuale & Data revisione]

V1. 0: Data approvazione: 2 Novembre 2018.

V1. 6: Data revisione: 07 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