

MDS chromosome and gene anomaly probe detection kit

Manuale di istruzioni

[Nome del prodotto] MDS chromosome and gene anomaly probe detection kit

[Confezionamento] 10 test/confezione

[Uso previsto]

Il kit utilizza l'ibridazione fluorescente in situ (FISH) per rilevare l'assenza o la delezione del braccio lungo dei cromosomi 5, 7 e 20 e le anomalie cromosomiche dei cromosomi 5, 7, 8 e Y nei pazienti con sindrome mielodisplastica. Il campione analizzato è costituito da cellule di midollo osseo. La sindrome mielodisplastica (MDS) comprende un gruppo eterogeneo di patologie generalmente considerate originarie delle cellule staminali ematopoietiche e appartenenti alle malattie clonali maligne. Gli studi mostrano che il 40-60% dei pazienti con MDS presenta anomalie cromosomiche non casuali; tra le più comuni vi sono -5/5q-, -7/7q-, +8, 20q- e -Y. Alcune di queste anomalie hanno uno specifico valore diagnostico. La terapia immunosoppressiva può essere efficace in alcuni pazienti con +8, 20q- o -Y isolate. L'analisi del cariotipo riveste inoltre un ruolo importante nella classificazione, nel trattamento e nella prognosi della MDS: i pazienti con -Y, 5q- o 20q- isolate presentano generalmente una prognosi favorevole, mentre quelli con anomalie cromosomiche complesse (≥ 3 anomalie) o alterazioni del cromosoma 7 presentano una prognosi peggiore. Le altre anomalie sono associate a una prognosi intermedia. Tali alterazioni hanno pertanto una notevole rilevanza nella diagnosi, nel trattamento e nella prognosi della MDS.

Il kit non è stato validato clinicamente in associazione a terapie a bersaglio molecolare, ma esclusivamente per le prestazioni di rilevazione genica. È destinato unicamente alla valutazione della sindrome mielodisplastica e fornisce al medico informazioni diagnostiche supplementari.

[Principio di rilevazione]

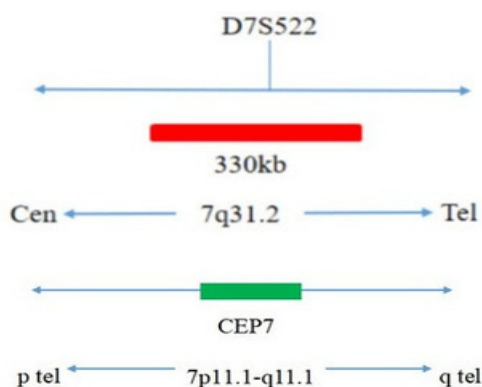
L'ibridazione fluorescente in situ è una tecnica che consente l'osservazione diretta, in vitro, di specifiche sequenze di acidi nucleici nelle cellule. In base al principio dell'appaiamento complementare delle basi, la sequenza specifica di DNA della sonda si lega alla sequenza bersaglio presente nella cellula. Poiché la sonda è marcata con fluorocromi, l'ibridazione tra sonda e DNA bersaglio può essere osservata chiaramente al microscopio a fluorescenza utilizzando la luce di eccitazione appropriata.

[Composizione del prodotto]

Il kit contiene una soluzione di ibridazione con sonda D7S522/CEP7, come riportato nella Tabella 1.

Tabella 1. Componenti del kit

Cat#	Componente	Specifiche	Quantità	Componenti principali
FP-011-2	Sonda dual color D7S522/CEP7	100 μ L/provetta	1	Sonda D7S522 arancione; sonda CEP7 verde



[Condizioni di conservazione e validità]

Conservare il prodotto sigillato, al riparo dalla luce, a $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Il periodo di validità è di 20 mesi. Evitare cicli non necessari di congelamento e scongelamento, che non devono superare complessivamente 10 ripetizioni. Dopo l'apertura, per una conservazione a breve termine entro 24 ore, mantenere il prodotto sigillato a $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ e al riparo dalla luce. Per una conservazione prolungata dopo l'apertura, mantenere il contenitore ben chiuso a $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ e al riparo dalla luce. Trasportare il kit a temperatura inferiore a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$.

[Strumentazione applicabile]

Sistemi di microscopia a fluorescenza, comprendenti microscopio a fluorescenza e set di filtri idonei per DAPI, verde e arancione.

[Requisiti del campione]

1. Campioni freschi di midollo osseo conservati a 4 °C per meno di 24 ore e utilizzati per l'analisi FISH dopo coltura.
2. I campioni conservati a temperature eccessivamente alte o basse, ad esempio congelati, non devono essere utilizzati e devono essere eliminati.
3. Le sospensioni cellulari di midollo osseo destinate all'analisi del cariotipo devono essere conservate a -20 °C per la successiva analisi FISH.
4. Eliminare il campione se la sospensione cellulare presenta un'eccessiva evaporazione o contaminazione durante la conservazione.

[Metodo di analisi]**1. Reagenti correlati**

I seguenti reagenti sono necessari per l'esecuzione del test, ma non sono forniti nel kit.

- ①. 20x SSC (tampone citrato di sodio), 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, sciogliere in 800 mL di acqua deionizzata, regolare il pH a 5,3 ± 0,2 a temperatura ambiente e portare a 1 L con acqua deionizzata. Sterilizzare in autoclave. Conservare a 2-8 °C per un massimo di 6 mesi. Eliminare il reagente se appare torbido o contaminato.

- ②. 2xSSC, pH 7.0±0.2

Prelevare 100 mL della soluzione 20x SSC descritta sopra, diluire con 800 mL di acqua deionizzata, miscelare, regolare il pH a 7,0 ± 0,2 a temperatura ambiente e portare a 1 L con acqua deionizzata. Conservare a 2-8 °C per un massimo di 6 mesi. Eliminare il reagente se appare torbido

o contaminato.

NP-40	0.6mL
20xSSC	4mL

- ③. 0.3% NP-40/0.4xSSC solution, pH 7.0 ~ 7.5

Miscelare 0,6 mL di NP-40 e 4 mL di 20x SSC con 150 mL di acqua deionizzata, regolare il pH a 7,0-7,5 a temperatura ambiente e portare a 200 mL con acqua deionizzata. Conservare a 2-8 °C per un massimo di 6 mesi. Eliminare il reagente se appare torbido o contaminato.

- ④. Soluzione fissativa (metanolo:acido acetico glaciale = 3:1)

Miscelare accuratamente 30 mL di metanolo e 10 mL di acido acetico glaciale. Preparare immediatamente prima dell'uso.

- ⑤. Tampone PBS, pH 7,4 ± 0,2

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

Sciogliere i componenti in 800 mL di acqua deionizzata, regolare il pH a 7,4 ± 0,2 a temperatura ambiente e portare a 1 L. Sterilizzare in autoclave. Conservare a 2-8 °C per un massimo di 6 mesi. Eliminare il reagente se appare torbido o contaminato.

- ⑥. Soluzioni di etanolo al 70% e all'85%

Diluire rispettivamente 700 mL e 850 mL di etanolo con acqua deionizzata fino a un volume finale di 1 L. Validità: 6 mesi. Eliminare se la soluzione appare torbida o contaminata.

- ⑦. Soluzione di KCl 0,075 M

Pesare 2,8 g di cloruro di potassio, sciogliere in 400 mL di acqua deionizzata e portare a 500 mL. Conservare a temperatura ambiente per un massimo di 6 mesi. Eliminare se la soluzione appare torbida o contaminata.

- ⑧ Soluzione di HCl

Misurare 8,2 mL di HCl concentrato, miscelare con acqua deionizzata e portare a 100 mL per ottenere HCl 1 M. Se necessario, diluire fino a 0,01 M mediante diluizioni seriali 1:10.

- ⑨ Controcolorante DAPI

Utilizzare un controcolorante DAPI disponibile in commercio contenente un agente anti-fading.

2. Raccolta del campione e preparazione dei vetrini

- ① Raccolta del campione: midollo osseo anticoagulato con eparina.

- ② Raccolta delle cellule: trasferire il campione di cellule di midollo osseo, coltivate o non coltivate, in una provetta da centrifuga e centrifugare a 1000 rpm per 10 minuti. Eliminare il surnatante.

- ③ Trattamento ipotonico:

lavare una volta le cellule con PBS, centrifugare a 1000 rpm per 10 minuti ed eliminare il surnatante. Aggiungere 6-8 mL di soluzione KCl 0,075 mol/L preriscaldata a 37 °C, miscelare con una pipetta e incubare a 37 °C per 20-30 minuti.

④ Prefissazione:

aggiungere 2 mL di soluzione fissativa metanolo/acido acetico glaciale 3:1, miscelare uniformemente e centrifugare a 1000 rpm per 10 minuti.

⑤ Fissazione:

aspirare il surnatante, aggiungere 5 mL di soluzione fissativa metanolo/acido acetico glaciale 3:1 appena preparata, miscelare, fissare per 10 minuti e centrifugare a 1000 rpm per 10 minuti.

⑥ Ripetere due volte il passaggio ⑤.**⑦ Preparazione della sospensione cellulare:**

eliminare il surnatante e aggiungere una quantità adeguata di fissativo per ottenere la concentrazione cellulare desiderata.

⑧ Preparazione dei vetrini:

miscelare delicatamente la sospensione cellulare con una pipetta e depositare 1-2 gocce su vetrini puliti, sgrassati e precedentemente immersi in etanolo. Incubare a 56 °C per 30 minuti.

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

3. Trattamento dei vetrini

① A temperatura ambiente, lavare i vetrini due volte con soluzione SSC, pH 7,0, per 5 minuti ciascuna.

② Immergere i vetrini in etanolo al 70%, 85% e 100% per 2 minuti ciascuno, quindi asciugare.

③ Perform the hybridization experiment according to the hybridization procedure.

4. Denaturazione e ibridazione

Le operazioni seguenti devono essere eseguite al riparo dalla luce.

① Estrarre la sonda, miscelarla e centrifugarla brevemente affinché il contenuto si raccolga sul fondo della provetta. Depositare 10 µL di sonda sull'area di ibridazione del vetrino. Applicare immediatamente un coprioggetto da 22 × 22 mm, assicurandosi che la sonda si distribuisca uniformemente senza bolle, quindi sigillare accuratamente i bordi con colla per ibridazione per evitare l'essiccamento durante l'incubazione.

② Inserire i vetrini nell'ibridatore, precedentemente preriscaldato a 88 °C. Denaturare a 88 °C per 2 minuti e ibridare a 45 °C per 2-16 ore.

5. Lavaggio

Le operazioni seguenti devono essere eseguite al riparo dalla luce.

① Rimuovere con cautela il sigillante intorno al coprioggetto utilizzando una pinzetta, evitando di spostarlo. Immergere il vetrino in 2x SSC per circa 5 secondi, estrarlo, spingere delicatamente un angolo del coprioggetto verso il bordo e rimuoverlo con la pinzetta.

② Immergere il vetrino in 2x SSC a temperatura ambiente per 1 minuto.

③ Immergere il vetrino in soluzione 0,3% NP-40/0,4x SSC preriscaldata a 68 °C e lavare per 2 minuti. Per preparare 1 L di soluzione: miscelare 3 mL di NP-40 con 20 mL di 20x SSC, sciogliere completamente, miscelare accuratamente e regolare il pH a 7,2 con NaOH 1 M.

④ Immergere il vetrino in acqua deionizzata preriscaldata a 37 °C per 1 minuto, quindi lasciarlo asciugare naturalmente al buio.

6. Controcolorazione

Le operazioni seguenti devono essere eseguite al riparo dalla luce.

Depositare 10-15 µL di controcolorante DAPI sull'area di ibridazione, applicare immediatamente il coprioggetto e osservare il preparato al microscopio a fluorescenza utilizzando i filtri appropriati.

7. Osservazione dei risultati FISH

Posizionare il vetrino controcolorato al microscopio a fluorescenza. Identificare inizialmente l'area cellulare con l'obiettivo 10x; passare quindi all'obiettivo 40x per individuare una zona con distribuzione cellulare uniforme. Con gli obiettivi 60x o 100x selezionare cellule con contorni nucleari integri, colorazione DAPI uniforme, nuclei non sovrapposti e segnali chiari. Selezionare casualmente almeno 200 cellule e contare i segnali arancioni, verdi e gialli presenti nei nuclei.

[Determinazione del valore positivo o intervallo di riferimento]**1. Classificazione e conteggio dei segnali****① Pattern normale:**

in ciascun nucleo in interfase sono presenti 2 segnali arancio-rossi e 2 segnali verdi. Dopo ibridazione con CEPY/CEPX, il pattern normale è costituito da 1 segnale arancio-rosso e 1 segnale verde.

② Pattern anomali per D7S522/CEP7: 1 segnale arancio-rosso e 2 segnali verdi indicano una delezione 7q; 1 segnale arancio-rosso e 1 segnale verde indicano perdita del cromosoma 7.

Contare casualmente 200 cellule e registrare il numero di cellule con pattern normale e con i due diversi pattern anomali. Ogni cellula deve essere conteggiata una sola volta e devono essere incluse soltanto le cellule che presentano segnali di entrambi i colori. Le cellule prive di segnale o con un solo colore non devono essere conteggiate, ad eccezione delle sonde CEPY/CEPX e Yq12/CEPX. Non conteggiare cellule con segnali deboli o eccessivamente dispersi.

2. Determinazione del risultato FISH

La rilevazione di un risultato anomalo richiede la definizione di una soglia di anomalia.

1) Soglia di anomalia

Si raccomanda di selezionare 20 campioni di midollo osseo provenienti da soggetti non leucemici o sani come controlli negativi.

Preparare i vetrini ed eseguire l'analisi FISH secondo la procedura descritta sopra.

Per ciascun campione analizzare 200 cellule, calcolare la percentuale di pattern anomali per ogni gruppo di sonde e determinare media e deviazione standard. La soglia di anomalia è definita come $\text{media} + 3 \times \text{deviazione standard}$.

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

Esempio: 20 soggetti non leucemici o normali selezionati come controlli negativi per l'analisi FISH.

Table 2: Configurazione della soglia anomala

No.	Cellule anomali (%)
Campione 1	5
Campione 2	3
.....	
Campione 20	4
Media	3
SD	0.3
Valore di soglia	(Soglia anomala = Media + 3 x SD)

② Interpretazione dei risultati

Se la percentuale di cellule che mostrano un pattern di segnale anomalo è superiore alla soglia di anomalia, il risultato viene considerato positivo. Se tale percentuale è inferiore alla soglia di anomalia, il risultato viene considerato negativo. Se invece la percentuale di cellule con pattern anomalo è uguale alla soglia, il conteggio deve essere esteso a 500 cellule per determinare il risultato finale.

Prendendo come esempio la Tabella 2, se nel test FISH del gene CSF1R la percentuale di cellule con segnale anomalo è superiore alla soglia del 3,9%, ad esempio pari all'8%, il risultato è compatibile con una delezione di 5q. Se invece la percentuale di cellule con segnale anomalo è inferiore alla soglia del 3,9%, ad esempio pari al 2%, il risultato non indica la presenza di una delezione di 5q. I risultati relativi agli altri loci genici vengono interpretati secondo lo stesso criterio.

[Limiti del metodo di analisi]

Il kit è destinato a cellule fresche di midollo osseo e non è raccomandato per altri tipi cellulari. Qualsiasi modifica della procedura può alterare i risultati. Il kit è destinato esclusivamente alla rilevazione di delezioni del braccio lungo dei cromosomi 5, 7 e 20. L'analisi dei cromosomi 5, 7, 8 e Y non consente di rilevare mutazioni puntiformi e non deve essere utilizzata come unico criterio per il trattamento, la prognosi o altre decisioni cliniche nei pazienti con sindrome mielodisplastica. È necessaria una valutazione complessiva che tenga conto dell'anamnesi e degli altri risultati diagnostici.

[Indici di prestazione del prodotto]

1. Intensità del segnale fluorescente: dopo un'ibridazione efficace della sonda con il materiale di riferimento cariotipico, i segnali fluorescenti devono essere chiaramente identificabili a occhio nudo al microscopio a fluorescenza.

2. Sensibilità:

2.1 La sensibilità della sonda CEP7 è valutata su 100 cromosomi 7 in metafase, ottenuti da 50 cellule; almeno 98 cromosomi devono mostrare un segnale fluorescente verde.

2.2 La sensibilità della sonda D7S22 è valutata su 100 cromosomi 7 in metafase, ottenuti da 50 cellule; almeno 98 cromosomi devono mostrare un segnale fluorescente arancio-rosso.

3. Specificità:

3.1 La specificità della sonda CEP7 è valutata su 100 cromosomi 7 in metafase, ottenuti da 50 cellule; almeno 98 cromosomi devono mostrare un segnale fluorescente verde specifico nella regione bersaglio.

3.2 La specificità della sonda D7S22 è valutata su 100 cromosomi 7 in metafase, ottenuti da 50 cellule; almeno 98 cromosomi devono mostrare un segnale fluorescente arancio-rosso specifico nella regione bersaglio.

[Precauzioni]

1. Il prodotto è destinato esclusivamente alla diagnosi in vitro.
2. Leggere attentamente il presente manuale prima dell'uso. Il personale addetto al test deve aver ricevuto una formazione tecnica professionale; il personale incaricato del conteggio deve essere in grado di osservare e distinguere i segnali arancioni e verdi.
3. Qualora i segnali di ibridazione siano difficili da contare e il campione non sia sufficiente per ripetere il test, non deve essere emesso alcun risultato. Analogamente, se il numero di cellule è insufficiente per l'analisi, non deve essere fornito alcun risultato.
4. La formammide e il controcolorante DAPI utilizzati nell'esperimento sono potenzialmente tossici o cancerogeni. Manipolare sotto cappa aspirante e indossare mascherina e guanti per evitare il contatto diretto.
5. I risultati possono essere influenzati da fattori intrinseci al campione, dal tempo di digestione enzimatica, dalla temperatura e durata dell'ibridazione, dalle condizioni operative e dai limiti delle attuali tecnologie di biologia molecolare. Tali fattori possono determinare risultati errati relativi ad anomalie cromosomiche o geniche. L'utilizzatore deve conoscere i possibili errori e i limiti di accuratezza del processo analitico.
6. Tutte le sostanze chimiche devono essere considerate potenzialmente pericolose. Evitare il contatto diretto. I kit utilizzati costituiscono rifiuti clinici e devono essere smaltiti correttamente.

[Riferimenti bibliografici]

- [1]. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: myelodysplastic syndromes. Journal of the National Comprehensive Cancer Network Jncn, 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]

Fabbricante/registrante: Wuhan HealthCare Biotechnology Co., Ltd.

Indirizzo: Building #8, Optics Valley Precision Medicine Industry Park Phase 1, #9 Gaokeyuan 3rd Road, East Lake High-Tech Zone, 430206 Wuhan, Hubei, REPUBBLICA POPOLARE CINESE

Contatto: 027-87570662

Unità di assistenza post-vendita: Wuhan HealthCare Biotechnology Co., Ltd.

Sede produttiva: Building #8, Optics Valley Precision Medicine Industry Park Phase 1, #9 Gaokeyuan 3rd Road, East Lake High-Tech Zone, 430206 Wuhan, Hubei, REPUBBLICA POPOLARE CINESE

[Numero del certificato di registrazione del dispositivo medico / numero dei requisiti tecnici del prodotto]

Numero del certificato di registrazione del dispositivo medico: ehxb20180035

[Data di approvazione e data di revisione del manuale di istruzioni]

Versione 1.0 - data di approvazione: 2 novembre 2018

Versione 1.7 - data di revisione: 22 luglio 2024

Fabbricante

Wuhan HealthCare Biotechnology Co., Ltd.

Building #8, Optics Valley Precision Medicine Industry Park Phase 1, #9 Gaokeyuan 3rd. Road, East Lake High-Tech Zone, 430206 Wuhan City, Hubei Province, PEOPLE'S REPUBLIC OF CHINA

E-mail: cs@healthcare-bio.com; Website: www.healthcare-biotech.com

**Rappresentante europeo del
fabbricante**

Kingsmead Service B.V. Zonnehof
36, 2632 BE, Nootdorp, Netherland



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