

Nr. di catalogo prodotti FP-011-6

Per la diagnosi clinica e la ricerca scientifica.

MDS Chromosome and Gene Anomaly Probe Detection Kit

[Nome del prodotto] MDS Chromosome and Gene Anomaly Probe Detection Kit (Fluorescence In Situ Hybridization Method).

[CND] W01060299

[RDM] Non Applicabile

[Destinazione d'uso]

Questo kit utilizza l'ibridazione fluorescente in situ per rilevare l'assenza/delezione di anomalie cromosomiche del cromosoma Y 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 originate da cellule staminali ematopoietiche e appartengono a malattie clonali maligne. Gli studi hanno dimostrato che dal 40% al 60% dei pazienti con MDS presenta anomalie cromosomiche non randomizzate, di cui le più comuni sono 5/5q-, -7/7q-, +8, 20q- e -Y. Tra le anomalie cromosomiche più comuni nei pazienti affetti da SMD, alcune anomalie cromosomiche hanno un valore diagnostico specifico. La terapia immunosoppressiva è efficace in alcuni pazienti con +8, 20q- o Y-; L'analisi del cariotipo ha anche un valore importante nella classificazione, nel trattamento e nella prognosi delle MDS, come i pazienti con singolo Y, 5q o 20q hanno una buona prognosi, mentre i pazienti con anomalie cromosomiche complesse (anomalie ≥3) 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 MDS. Questo kit non è stato clinicamente combinato con la terapia di targeting genico ed è stato convalidato solo per l'esecuzione del rilevamento genico. Questo kit è adatto solo per il rilevamento di 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 di 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 la luce di eccitazione appropriata.

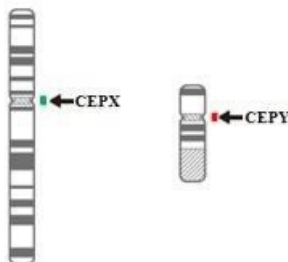
Questo kit utilizza un pennarello fluorescente arancione per etichettare CEPY. Il CEPX è marcato con fluorescenza verde e le sonde sono legate al sito di rilevamento target mediante ibridazione in situ. In condizioni normali (assenza di delezioni geniche e anomalie cromosomiche), un segnale rosso-arancione e un segnale verde vengono visualizzati al microscopio a fluorescenza. Quando c'è una delezione di un gene, manca il segnale arancione e quando ci sono più cromosomi, il segnale della sonda aumenta. L'individuazione delle delezioni geniche e delle anomalie cromosomiche con questo metodo è di grande importanza nella diagnosi, nel trattamento e nella prognosi delle MDS.

[Composizione del prodotto]

Questo kit è costituito dall'ibridazione della sonda CEPY/CEPX come mostrato nella Tabella 1.

Tabella 1 Composizione del kit

Size	Cat#	Nome	Specifiche	Quantità	Componenti principali
10 Tests/box	FP-011-6	CEPY/CEPX dual color probe	100µL/Tube	1	CEPY orange probe, CEPX green probe



[Condizioni di conservazione e validità]

Tenere sigillato al riparo dalla luce a $-20^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$. Il prodotto ha una validità di 20 mesi. Evitare inutili e ripetuti congelamenti e scongelamenti che dovrebbero non superare le 10 volte. Dopo l'apertura, entro 24 ore per la conservazione a breve termine, conservare 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. Il kit viene trasportato a una temperatura inferiore a 0°C .

[Strumenti applicabili] Sistemi di imaging per microscopia a fluorescenza, compresa la microscopia a fluorescenza e set di filtri adatti per DAPI, Green e Orange.

[Requisiti del campione]

1. Tipi di campioni applicabili: campioni di midollo osseo fresco conservati a 4°C per meno di 24 ore e utilizzati per il rilevamento di FISH dopo la coltura.
2. Quando i campioni sono conservati a una temperatura troppo alta o troppo bassa (ad esempio congelati), il campione non sarà utilizzato per la prova e dovrebbe essere scartato.
3. Le sospensioni di cellule del midollo osseo per l'analisi del cariotipo devono essere conservate a -20°C per il rilevamento di FISH.
4. Se la sospensione cellulare è 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 e non sono forniti in questo kit.

(1) 20×SSC (tampone citrato di sodio), pH 5,3±0,2

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 completare a 1L con acqua deionizzata. Sterilizzazione a vapore ad alta pressione, conservata a $2\sim 8^{\circ}\text{C}$, la durata di conservazione della soluzione è di 6 mesi. Scartare se il reagente appare torbido (torbido) o contaminato.

(2) 2×SSC, pH 7,0±0,2

Prendere 100 ml dei 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 litro con acqua deionizzata, conservata a $2\sim 8^{\circ}\text{C}$, la durata di conservazione è di 6 mesi. Scartare se il reagente appare torbido (torbido) o contaminato.

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

Prendere 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, con acqua deionizzata completo fino a un volume di 200 ml. Conservato a $2\sim 8^{\circ}\text{C}$, la durata di conservazione è di 6 mesi. Scartare se il reagente appare torbido (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 l'uso immediato.

(5) Tampone PBS, pH 7,4±0,2

Prendi cloruro di sodio (8 g), cloruro di potassio (0,2 g), fosfato acido monosodico (3,58 g), fosfato monobasico di potassio (0,27 g). Sciogliere i suddetti componenti 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. Sterilizzazione a vapore ad alta pressione, conservata a $2\sim 8^{\circ}\text{C}$, la durata di conservazione della soluzione è di 6 mesi. Scartare se il reagente appare torbido (torbido) o contaminato.

(6) Soluzione di etanolo: etanolo al 70%, etanolo all'85%

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

(7) Soluzione KCL 0,075 M Pesare 2,8 g di cloruro di potassio, sciogliere in 400 ml di acqua deionizzata e completare a 500 ml con acqua deionizzata. Conservato a temperatura ambiente, la durata di conservazione della soluzione è di 6 mesi. Scartare se il reagente appare torbido (torbido) o contaminato.

(8) Soluzione HCL

Misurare 8,2 ml di HCL concentrato, mescolare con acqua deionizzata e completare a 100 ml, conservare a temperatura ambiente per ottenere 1M di HCL. In caso di necessità diluire a 0,01 M con il metodo di diluizione 10 volte.

(9) Agente colorante di-amiindil fenil-indolo (DAPI)

Si prega di 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 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 - acido acetico glaciale 3:1 appena preparata, mescolare uniformemente, fissare per 10 min, centrifugare a 1000 rpm per 10 min

(6) Ripetere il passaggio (5) due volte.

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

(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. Gocciolare 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 una soluzione di SSC (pH 7,0) per 5 minuti ogni volta.

(2) Mettere i vetrini in etanolo al 70%, etanolo all'85% e etanolo al 100% e asciugare per 2 minuti.

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

4. Denaturazione e ibridazione Le seguenti operazioni devono essere eseguite in camera oscura.

(1) Estrarre i 6 vetrini prepreparati e contrassegnarli. Estrarre la sonda CEPY/CEPX, centrifugare brevemente dopo la miscelazione. La sonda è affondata fino al fondo del tubo, e prendere 10µL di ciascuno e lasciar cadere sulla zona di ibridazione dei sette vetrini. Coprire immediatamente l'area del vetrino di 22 mm x 22 mm; Stendere uniformemente senza bolle la sonda sotto l'area coperta dei vetrini e sigillare i bordi con gomma (la sigillatura dei bordi deve essere accurata per evitare che il film secco influisca sui risultati del test durante l'ibridazione).

(2) Posizionare i vetrini nell'ibridatore, denaturare a 88°C per 2 minuti (l'ibridatore deve essere preriscaldata a 88°C) e ibridare a 45°C da 2 a 16 ore.

5. Lavaggio

Le seguenti operazioni devono essere eseguite in camera oscura.

(1) Usa una pinzetta per strappare con cura la colla di copertura attorno ai vetrini. Evitare di sporgere o spostare il vetro di copertura. Immergi le diapositive in 2xSSC per circa 5 secondi. Estrarre e spingere delicatamente il vetro di copertura verso il bordo dei vetrini con una pinzetta. Usa una pinzetta per rimuovere delicatamente il vetrino del coperchio.

(2) Mettere i vetrini in 2xSSC a temperatura ambiente per 1 minuto.

(3) Estrarre i vetrini e immergerli in una soluzione preriscaldata a 68°C 0,3% NP-40/0,4xSSC, lavare per 2 minuti.

(4) Rimuovere i vetrini e immergerli in acqua deionizzata preriscaldata a 37°C per 1 min. Asciugare i vetrini in modo naturale al buio.

6. Controcolorazione

Le seguenti operazioni devono essere eseguite in camera oscura.

Immergere 10 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 in controvetro sotto il microscopio a fluorescenza e sotto la luce naturale, prima sotto la lente dell'obiettivo a bassa potenza (10x) per confermare l'area cellulare al microscopio; Vai a 40x Sotto la lente dell'obiettivo, trova una posizione in cui le cellule sono distribuite uniformemente; A obiettivi ad alta potenza (60x, 100x) selezionare le cellule con confine nucleare completo, colorazione DAPI uniforme, assenza di nuclei sovrapposti e segnali chiari. Almeno 200 cellule dovrebbero essere selezionate in modo casuale per contare i segnali arancioni, verdi e gialli nel nucleo.

[Determinazione del valore positivo o intervallo di riferimento]

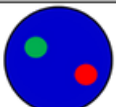
1. Classificazione e conteggio dei segnali

(1) *Segnale delle cellule normali*: ci sono un segnale rosso-arancione e un segnale verde nei nuclei a interfase singola dopo l'ibridazione CEPY/CEPX.

(2) *Segnali di anomalia*: CEPY/CEPX c'è un solo segnale verde in un singolo nucleo interfase e manca il cromosoma Y.

Conta in modo casuale 200 celle e vengono contate il numero di celle segnale normali e diverse celle segnale anormale. Ogni cella viene contata una volta e vengono contate solo le celle con un segnale di ibridazione (entrambi i segnali di colore). Nessun segnale o solo un singolo segnale di colore viene conteggiato per CEPY/CEPX e le celle deboli o troppo disperse non vengono conteggiate.

Tabella 1: Classificazione del segnale comune CEPX/CEPY e giudizio di cellula negativa e positiva

CEPY signal	CEPX signal
	 Negativo: 1 Orange; 1 Green
	Positive: 1 Green

2. Determinazione dei risultati FISH

Il rilevamento di risultati anormali richiede la definizione di una soglia di anomalia.

(1) Threshold di anomalia

Si raccomanda di selezionare 20 pazienti con campioni di midollo osseo umano non affetti da leucemia o normali come controlli negativi. Utilizzare il metodo di cui sopra per preparare i vetrini per gli esperimenti FISH. Impostazione della soglia di anomalia: ogni campione viene analizzato per 200 celle. Viene conteggiata la percentuale di segnali anormali in ciascun gruppo di sonde.

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

Viene calcolata la media e la deviazione standard della percentuale di cellule che mostrano modelli di segnale anormali. La soglia anomala è definita come media + 3 x deviazione standard.

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

Tabella 2: Impostazione della soglia anomala

No.	Cellule anormali (%)
Campione 1	5
Campione 2	3
.....	
Campione 20	4
Media	3
SD	0.3
Threshold	(Anomaly threshold = Mean value + 3 x SD) = 3.9

(2) Determinazione dei risultati

Se il valore di rilevamento del numero di celle che mostrano un segnale anormale è maggiore della soglia di anomalia, viene determinato come risultato positivo. Se il valore di rilevamento del numero di celle che mostra il segnale anormale è inferiore alla soglia di anomalia, viene determinato come risultato negativo. Se il valore di rilevamento del numero di celle che mostrano un segnale anormale è uguale alla soglia di anomalia, aumentare il conteggio a 500 celle il numero di osservazioni delle celle campione, per determinare il risultato.

[Limiti del metodo di prova]

Questo kit è per cellule fresche del midollo osseo e non è raccomandato per l'uso in altre cellule. Qualsiasi modifica può alterare i risultati del test. Il rilevamento del cromosoma Y non può essere utilizzato per l'individuazione di una singola mutazione di base e non può essere utilizzato come unica base per il trattamento, la prognosi o altre forme 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. Sensibilità:

2.1 La sensibilità della sonda CEPY è stata analizzata su 100 cromosomi del cromosoma Y in divisione metafase di 50 cellule, e almeno 98 cromosomi del cromosoma Y hanno mostrato 1 segnale di fluorescenza rosso-arancio.

2.2 La sensibilità della sonda CEPX è stata analizzata su 100 cromosomi del cromosoma X in divisione metafase di 50 cellule, e almeno 98 cromosomi del cromosoma X hanno mostrato 1 segnale di fluorescenza verde.

3. Specificità:

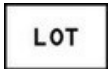
3.1 La specificità della sonda centromerica CEPY è stata analizzata in 100 cromosomi del cromosoma Y in divisione metafase di 50 cellule, e almeno 98 cromosomi del cromosoma Y hanno mostrato 1 segnale di fluorescenza specifico rosso-arancio nell'area bersaglio.

3.2 La specificità della sonda centromerica CEPX è stata analizzata in 100 cromosomi del cromosoma X in divisione metafase di 50 cellule, e almeno 98 cromosomi del cromosoma X hanno mostrato 1 segnale di fluorescenza specifico verde nell'area bersaglio.

[Precauzioni]

1. Si prega di leggere attentamente questo manuale prima del test. Il personale addetto alle prove deve ricevere una formazione tecnica professionale. Il personale addetto al conteggio dei segnali deve essere in grado di osservare e distinguere i segnali arancioni, rossi e verdi.
2. Quando si testano campioni clinici, se è difficile contare i segnali di ibridazione e i campioni non sono sufficienti per ripetere il retest, il test non fornirà alcun risultato del test. Se la quantità di cellule è insufficiente per l'analisi, il test non fornirà i risultati del test.
3. La formamide e l'agente controcolorante DAPI utilizzati in questo esperimento hanno una potenziale tossicità o cancerogenicità; quindi, devono essere azionati nella 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 limitati dal tempo di digestione dell'enzima, dall'ibridazione, temperatura e tempo, ambiente operativo e limiti dell'attuale tecnologia di biologia molecolare, che possono portare a risultati errati. L'utente deve comprendere i potenziali errori e le limitazioni di precisione 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 per la diagnosi clinica e la ricerca scientifica.

[Spiegazione dei Simboli]

	Da utilizzare per		Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Codice lotto		Marcatura
	Fabbricante		Segnale di avvertimento
	Numero di catalogo		Mandatario Europeo

	Limitazione della temperatura		Consultare le istruzioni per l'uso
	Contiene una quantità sufficiente per <n> test		

[Riferimenti]

- [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.

[Versione Manuale e data approvazione]

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

Data Approvazione: [08 Novembre 2018](#)



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