



A Sysmex Group Company



Instrukcja użytkownika  
REF: LPS 047-S / LPS 047

## 1p36/1q25 i 19q13/19p13 Deletion Probe Kit



WYŁĄCZNIE DO UŻYTKU PROFESJONALNEGO

POLSKI

Dalsze informacje dostępne pod adresem [www.ogt.com](http://www.ogt.com)

### Przeznaczenie

Zestaw 1p36/1q25 i 19q13/19p13 Deletion Probe Kit przeznaczony jest do identyfikacji, metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (Fluorescence *In Situ* Hybridisation, FISH), delecji regionu 1p36.32 na chromosomie 1, oraz delecji regionu 19q13.33 na chromosomie 19, u pacjentów z guzami z komórek glejowych mózgu. Zestaw jest przeznaczony do użytku na utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie (FFPE) skrawkach tkanek. Ten produkt jest przeznaczony wyłącznie do użytku profesjonalnego. Produkt należy traktować jako uzupełnienie cytogenetycznych badań klinicznych.

### Informacje ogólne

Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (Fluorescence *In Situ* Hybridisation, FISH) to technika, która umożliwia wykrywanie sekwencji DNA na chromosomach metafazowych lub w jądrach interfazowych obecnych w utrwalonych próbkach cytogenetycznych. Technika ta obejmuje wykorzystanie sond DNA, które hybrydują do całych chromosomów lub pojedynczych unikalnych sekwencji, i stanowi istotne uzupełnienie klasycznych metod cytogenetycznych. Ostatnie odkrycia wskazują, że ta wartościowa technika może być obecnie wykorzystywana również do oceny próbek guzów litych pobranych w ramach biopsji i dostarcza informacji istotnych dla predykcji progresji choroby nowotworowej. Stosowane obecnie metody, takie jak badania immunohistochemiczne lub hybrydyzacja, umożliwiają uzyskanie danych na poziomie ekspresji genów. W przypadku przeprowadzania badań na skrawkach tkanek (wykonanych z użyciem kriostatu lub zatopionych w parafinie) technika FISH może jednak dostarczyć informacji na poziomie genów, *in situ*, w precyzyjnie określonym miejscu w obrębie guza. Może to ujawnić heterogeniczność między komórkami i umożliwić wykrycie małych klonów genetycznie odmiennych komórek.

### Informacje o sondzie

Delecje regionu 1p36.32 obejmujące gen TP73 (*Tumor Protein 73*) oraz delecje regionu 19q13.33 obejmujące geny GLTSCR1 i GLTSCR2 (geny *Glioma Tumor Suppressor Candidate Region 1* i 2) są często opisywane u pacjentów z guzami z komórek glejowych mózgu.

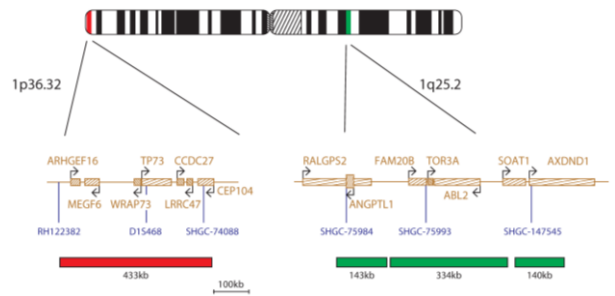
Gwiaździki i skąpodrzewiaki to najczęściej występujące glejaki, które powstają z komórek glejowych. Stanowią one około 40% wszystkich guzów OUN<sup>1</sup> i ponad 60% pierwotnych nowotworów mózgu<sup>2</sup>.

Jednoczesny ubytek (kodelecja) regionów 1p36.32 i 19q13.33 występuje w około 80% przypadków skąpodrzewiaka, dwóch trzecich przypadków anaplastycznego skąpodrzewiaka, a także w podgrupach skąpodrzewiakogwiaździków i anaplastycznych skąpodrzewiakogwiaździków<sup>3,4</sup>; wykazano, że większość tych ubytków jest spowodowana obecnością niezrównoważonej translokacji t(1;19)(q10;p10). Obecność kodelecji regionów 1p i 19q jest silnym czynnikiem prognostycznym w tych chorobach, przy czym powiązano ją z lepszym rokowaniem i odpowiedzią na terapię<sup>5</sup>.

Wykazano również, że kodelecja regionów 1p i 19q występuje w podgrupie nerwiaków komórkowych pozakomorowych i może być związana z agresywnym charakterem histologicznym tych guzów<sup>6</sup>.

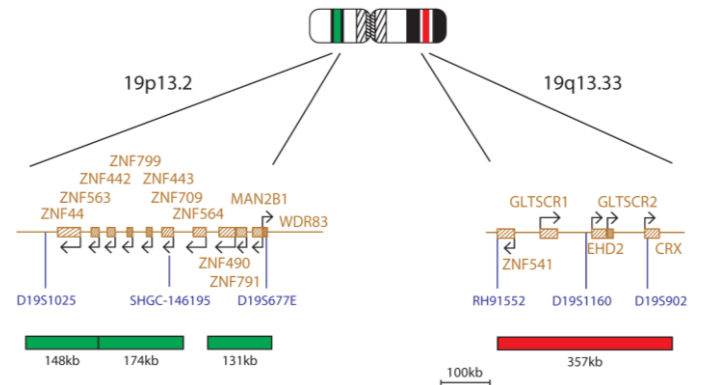
### Specyfikacja sondy

**Sonda 1:**  
1p36.32, kolor czerwony  
1q25.2, kolor zielony



Sonda 1p36.32, wyznakowana czerwonym fluoroforem, ma długość 433 kb i obejmuje region między markerami RH122382 i SHGC-74088. Sonda 1q25.2, wyznakowana zielonym fluoroforem, składa się z trzech sond (143 kb, 334 kb i 140 kb), które obejmują regiony markerów SHGC-75984 i SHGC-147545.

**Sonda 2:**  
19p13.2, kolor zielony  
19q13.33, kolor czerwony



Sonda 19p13.2, wyznakowana zielonym fluoroforem, składa się z trzech sond (148 kb, 174 kb i 131 kb), które obejmują regiony markerów D19S1025 i D19S677E. Sonda 19q13.33, wyznakowana czerwonym fluoroforem, ma długość 357 kb i obejmuje region między markerami RH91552 i D19S902.

### Dostarczone materiały

50 µl na fiolkę (5 testów) lub 100 µl na fiolkę (10 testów)

#### Sonda 1:

Ilość sondy 1p36.32 wyznakowanej czerwonym fluoroforem: 80–100ng/test  
Ilość sondy 1q25.2 wyznakowanej zielonym fluoroforem: 240–300ng/test

#### Sonda 2:

Ilość sondy 19q13.33 wyznakowanej czerwonym fluoroforem: 60–75ng/test  
Ilość sondy 19p13.2 wyznakowanej zielonym fluoroforem: 264–330ng/test

Sondy są dostarczane we wstępnie wymieszanym roztworze hybrydyzacyjnym (formamid; siarczan dekstranu; SSC) i są gotowe do użycia.

**Barwnik kontrastowy:** 150 µl na fiolkę (15 testów) lub 300 µl na fiolkę (30 testów)  
Barwnikiem kontrastowym jest odczynnik DAPI antifade (ES: 0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidyno-2-fenylindol)).

### Ostrzeżenia i środki ostrożności

- Do diagnostyki *in vitro*. Wyłącznie do użytku profesjonalnego.
- Podczas pracy z sondami DNA i barwnikiem kontrastowym DAPI należy nosić rękawiczki.
- Mieszanki sond zawierają formamid, który wykazuje działanie teratogenne; nie wdychać oparów i nie dopuszczać do kontaktu ze skórą. Nosić rękawiczki oraz fartuch laboratoryjny i pracować pod wyciągiem. Przy usuwaniu spłukać dużą ilością wody.
- DAPI jest potencjalnym czynnikiem rakotwórczym. Zachować ostrożność podczas pracy z tym produktem; nosić rękawiczki i fartuch laboratoryjny. Przy usuwaniu spłukać dużą ilością wody.
- Wszystkie materiały stwarzające zagrożenie należy wyrzucać zgodnie z wytycznymi placówki dotyczącymi usuwania odpadów stwarzających zagrożenie.
- Operatorzy muszą być w stanie rozróżniać czerwony, niebieski i zielony kolor.

### Przechowywanie i postępowanie z produktem

Zestaw należy przechowywać w zamrażarce w temperaturze od -25°C do -15°C do daty ważności wskazanej na etykiecie zestawu. Fiolki z sondami i barwnikiem kontrastowym należy przechowywać w ciemności.

### Sprzęt wymagany, ale niedostarczany

- Płyta grzewcza (ze stabilną płytą i możliwością dokładnej kontroli temperatury do 80°C).
- Mikropipety i końcówki umożliwiające przenoszenie cieczy o różnych objętościach w zakresie 1–200 µl.
- Łaźnia wodna z możliwością dokładnej kontroli temperatury na poziomie 72°C.

4. Probówki mikrowirówkowe (0,5 ml).
5. Mikroskop fluorescencyjny (patrz część „Zalecenia dotyczące mikroskopu fluorescencyjnego”).
6. Barwiacze Coplina z tworzywa sztucznego lub szklane.
7. Szczypczyki.
8. Olejek imersyjny odpowiedni do obiektów mikroskopowych klasy fluorescencyjnej.
9. Wirówka laboratoryjna.
10. Szkiełka mikroskopowe.
11. Szkiełka nakrywkowe o wymiarach 24x24 mm.
12. Stoper.
13. Inkubator nastawiony na temperaturę 37°C.
14. Klej kauczukowy.
15. Zestaw Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

#### Zalecenia dotyczące mikroskopu fluorescencyjnego

W celu optymalnej wizualizacji sondy zalecane jest używanie 100-watowej lampy rtęciowej i obiektów planapochromatycznych przy powiększeniu x63 lub x100. Do jednoczesnej obserwacji zielonego i czerwonego fluoroforu oraz barwnika DAPI optymalnie nadaje się potrójny filtr pasmowo-przepustowy DAPI/FITC/Texas Red. Przed użyciem mikroskopu fluorescencyjnego należy sprawdzić, czy działa on prawidłowo. Należy stosować olejek imersyjny odpowiedni do mikroskopii fluorescencyjnej o składzie odpowiednim do niskiej autofluorescencji. Należy przestrzegać zaleceń producenta dotyczących okresu żywotności lampy i wieku filtrów.

#### Przygotowanie próbki

Zestaw zaprojektowano do użytku na utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie (FFPE) skrawkach tkanek lub mikromacierzach tkankowych (TMA), które należy przygotować zgodnie z wytycznymi obowiązującymi w laboratorium lub placówce. Do procedury FISH należy używać skrawków tkanek FFPE o grubości 4–6 µm.

#### Wstępna obróbka próbek tkanek

Próbki tkanek należy poddać wstępnej obróbce zgodnie z wytycznymi obowiązującymi w laboratorium lub placówce. W celu uzyskania optymalnych wyników należy użyć zestawu Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

#### Protokół FISH

(Uwaga: Należy możliwie ograniczać ekspozycję sondy na światło w laboratorium)

#### Denaturacja wstępna

1. Wyjąć roztwór sond z zamrażarki i pozostawić go do ogrzania do temperatury pokojowej. Przed użyciem roztworu należy krótko odwirować probówki
2. Wymieszać roztwór sond pipetą w celu zapewnienia jego jednorodności.
3. Pobrać 10–15 µl roztworu sond na test i przenieść pobraną objętość do probówki mikrowirówkowej. Bezwzględnie włożyć pozostały roztwór sond z powrotem do zamrażarki.
4. Umieścić roztwór sond i szkiełko z próbką na płycie grzewczej o temperaturze 37°C (+/-1°C) na 5 minut w celu ich wstępnego ogrzania.
5. Wkropić 10–15 µl mieszaniny sond na próbkę i ostrożnie nanieść szkiełko nakrywkowe. Zakleić szkiełko klejem kauczukowym i poczekać na jego całkowite wyschnięcie.

#### Denaturacja

6. Denaturować jednocześnie próbkę i mieszaninę sond, ogrzewając szkiełko na płycie grzewczej o temperaturze 75°C (+/-1°C) przez 5 minut.

#### Hybrydyzacja

7. Umieścić szkiełko w wilgotnym, światłoszczelnym pojemniku w temperaturze 37°C (+/-1°C) na noc.

#### Płukania po hybrydyzacji

8. Ostrożnie zdjąć szkiełko nakrywkowe i usunąć wszelkie pozostałości kleju.
9. Zanurzyć szkiełko w 0,4x stężonym roztworze SSC (pH 7,0) w temperaturze 72°C (+/-1°C) na 2 minuty; nie wstrząsać.
10. Pozwolić, aby szkiełko ociekło, a następnie zanurzyć je w 2x stężonym roztworze SSC ze środkiem Tween-20 w stężeniu 0,05% (pH 7,0) w temperaturze pokojowej na 30 sekund; nie wstrząsać.
11. Pozwolić, aby szkiełko ociekło, a następnie nanieść 10–15 µl barwnika DAPI antifade na każdą próbkę.
12. Przykryć szkiełkiem nakrywkowym, usunąć wszelkie pęcherzyki powietrza i pozostawić szkiełko w ciemności na 10 minut, aby umożliwić rozwój barw.
13. Obejrzeć pod mikroskopem fluorescencyjnym.

#### Uwagi

Wydajność hybrydyzacji i morfologia tkanek zazwyczaj są ujemnie skorelowane. Agresywne procedury wstępnej obróbki (np. wydłużony czas trawienia enzymatycznego), które poprawiają wydajność hybrydyzacji, zwykle prowadzą do zniszczenia struktur komórkowych i morfologii tkanek. Łagodne procedury wstępnej obróbki, które oszczędzają struktury tkankowe, mogą jednak nie być wystarczające do penetracji sond i uzyskania akceptowalnych wyników metodą FISH.

Optymalna długość wstępnej obróbki cieplnej i czas trawienia enzymatycznego będą zależały od wieku białka, składu tkanki i jakości utrwalenia tkanki. Czas trawienia enzymatycznego należy skrócić w przypadku próbek uzyskanych w ramach biopsji grubościennej oraz wszelkich skrawków, które zawierają niewiele komórek nowotworowych lub zawierają duże obszary tkanki martwiczej. Podczas pracy z takimi próbkami należy zachować szczególną ostrożność, aby nie dopuścić do nadmiernego trawienia.

#### Stabilność wykonanych preparatów

Preparaty poddane procedurze FISH nadają się do analizy przez maksymalnie 1 miesiąc, o ile są przechowywane w ciemności w temperaturze poniżej 4°C.

#### Zalecenia dotyczące procedury

1. Stosowanie odczynników innych niż dostarczone lub zalecane przez firmę CytoCell Ltd może mieć negatywny wpływ na warunki hybrydyzacji.

2. Na potrzeby pomiaru temperatury roztworów, łaźni wodnych i inkubatorów należy używać skalibrowanego termometru, ponieważ temperatury te są kluczowe dla optymalnego działania produktu.
3. Stężenia, wartości pH i temperatury roztworów wykorzystywanych do płukania są istotne, gdyż mało surowe warunki mogą doprowadzić do nieswoistego wiązania sondy, a zbyt surowe warunki mogą spowodować brak sygnału.
4. Niecałkowita denaturacja może spowodować brak sygnału, a nadmierna denaturacja może również doprowadzić do nieswoistego wiązania.
5. Nadmierna hybrydyzacja może spowodować otrzymanie dodatkowych lub nieoczekiwanych sygnałów.
6. Przed użyciem testu do celów diagnostycznych użytkownicy powinni zoptymalizować protokół dla własnych próbek.

#### Wyniki oczekiwane

##### Sonda 1:

W prawidłowej komórce powinny być widoczne: 2 sygnały czerwone i 2 sygnały zielone (2C, 2Z). W komórkach z delecją 1p36 powinny być widoczne: 1 sygnał czerwony i 2 sygnały zielone (1C, 2Z).

##### Sonda 2:

W prawidłowej komórce powinny być widoczne: 2 sygnały czerwone i 2 sygnały zielone (2C, 2Z). W komórkach z delecją 19q13 powinny być widoczne: 1 sygnał czerwony i 2 sygnały zielone (1C, 2Z).

#### Znana reaktywność krzyżowa

Brak znanej reaktywności krzyżowej.

#### Ograniczenia

Raportowanie i interpretacja wyników metody FISH powinny być zgodne z profesjonalnymi standardami praktyki i dokonywane z uwzględnieniem innych informacji klinicznych i diagnostycznych. Zestaw ten należy traktować jako uzupełnienie innych diagnostycznych testów laboratoryjnych. Z tego względu nie należy inicjować żadnych działań terapeutycznych wyłącznie na podstawie wyniku uzyskanego metodą FISH.

Nieprzestrzeganie protokołu może wpłynąć na skuteczność oznaczenia i doprowadzić do uzyskania błędnych wyników.

Ten zestaw nie został zatwierdzony do stosowania w celach innych niż określone w części dotyczącej przeznaczenia.

Ten wyrób jest przeznaczony do wykrywania ubytków genomowych większych niż regiony, do których wiążą się czerwone klony zawarte w tym zestawie sond, a które obejmują regiony 1p36.32 i 19q13.33. Produkt ten może nie umożliwić wykrycia ubytków genomowych, do których doszło poza tymi regionami, lub częściowych ubytków, do których doszło w tych regionach.

#### Dodatkowe informacje

W celu uzyskania dodatkowych informacji na temat produktu należy skontaktować się z działem wsparcia technicznego firmy CytoCell.









Tel.: +44 (0)1223 294048

E-mail: techsupport@cytoCELL.com

Strona WWW: www.ogt.com

#### Piśmiennictwo

1. CBTRUS (2004). Statistical Report: Primary Brain Tumors in the United States, 1997-2001. Central Brain Tumor Registry of the United States.
2. Thompson L. World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of head and neck tumours. Ear Nose Throat J. 2006 Feb;85(2):74.
3. Vogazianou AP, Chan R, Bäcklund LM, Pearson DM, Liu L, Langford CF, et al. Distinct patterns of 1p and 19q alterations identify subtypes of human gliomas that have different prognoses. Neuro Oncol. 2010 Jul;12(7):664–78.
4. Bromberg JEC. et al., Oncol. 2009. 14:155-163.
5. Jenkins RB et al., Cancer Res 2006;66(20):9852-61.
6. Rodriguez FJ et al., Brain Pathol 2009;19(4):623-9.

REF	PL: Numer katalogowy
	PL: Wyrób medyczny do diagnostyki <i>in vitro</i>
	PL: Kod partii
	PL: Zajrzyj do instrukcji używania
	PL: Wytwórca
	PL: Użyj do daty
	PL: Dopuszczalna temperatura
	PL: Zawartość wystarczająca do <n> testów
	PL: Zawartość

**Patenty i znaki towarowe**

CytoCell jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy CytoCell Ltd.  
Ten produkt zawiera technologię na licencji firmy Life Technologies Corporation i jest dostępny do użytku wyłącznie na potrzeby diagnostyki człowieka lub badań z zakresu nauk przyrodniczych.

**CytoCell Ltd.**

Oxford Gene Technology,  
418 Cambridge Science Park,  
Milton Road,  
Cambridge, CB4 0PZ, UK  
Tel.: +44(0)1223 294048  
Faks.: +44(0)1223 294986  
E: probes@cytoCell.com  
Strona WWW: [www.ogt.com](http://www.ogt.com)