



A Sysmex Group Company



Instrukcja użytkownika
REF: LPS 049-S / LPS 049

FOXO1 Breakpart Probe



WYŁĄCZNIE DO UŻYTKU PROFESJONALNEGO

POLSKA

Dalsze informacje dostępne pod adresem www.ogt.com

Przeznaczenie

Ten produkt przeznaczony jest do identyfikacji, metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (Fluorescence *In Situ* Hybridisation, FISH), rearanżacji obejmujących region FOXO1 na chromosomie 13. w obrębie regionu 13q14.1 u pacjentów z litymi nowotworami tkanek. Produkt 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 dostarczać 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 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

Translokacje obejmujące gen FOXO1 (*forkhead box O1*) zlokalizowany w regionie 13q14.1 i gen PAX3 (*paired box 3*) zlokalizowany w regionie 2q36.1 lub gen PAX7 (*paired box 7*) zlokalizowany w regionie 1p36.1 są często obserwowane w przypadkach mięśniakomięśaka prądkowanokomórkowego pęcherzykowego^{1,2}. Mięśniakomięśak prądkowanokomórkowy to najczęściej występujący mięsák tkanek miękkich u dzieci i młodych dorosłych, w przypadku którego wyróżniane są dwa podtypy histologiczne: mięśniakomięśak prądkowanokomórkowy pęcherzykowy (alveolar rhabdomyosarcoma, ARMS) i mięśniakomięśak prądkowanokomórkowy zarodkowy (embryonal rhabdomyosarcoma, ERMS)³. Rearanżacje genu FOXO1 są znanymi, powtarzającymi się nieprawidłowościami obserwowanymi u pacjentów z ARMS, jednak nie są one obserwowane u pacjentów z ERMS^{1,2}.

Około 55% przypadków ARMS wiąże się z obecnością rearanżacji PAX3-FOXO1 w wyniku translokacji t(2;13)(q36.1;q14), a 22% przypadków ARMS wiąże się z obecnością rearanżacji PAX7-FOXO1 w wyniku translokacji t(1;13)(p36;q14)⁴. Translokacje te prowadzą do fuzji genu FOXO1 kodującego czynnik transkrypcyjny z genami PAX3 i PAX7 kodującymi czynniki transkrypcyjne zlokalizowanymi odpowiednio w regionach 2q36.1 i 1p36.13².

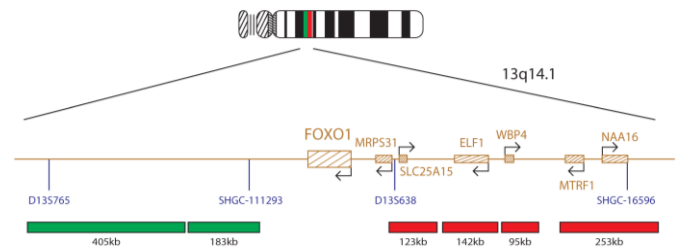
Badania wykazały, że pacjenci z ARMS z rearanżacją PAX-FOXO1 uzyskują gorsze wyniki leczenia w porównaniu do pacjentów z ERMS, natomiast wyniki leczenia pacjentów z ARMS bez rearanżacji PAX-FOXO1 są zbliżone do wyników pacjentów z ERMS^{2,5}.

W podgrupie pacjentów z ARMS może być obserwowana amplifikacja genu fuzyjnego. Amplifikacja ta jest najczęściej związana z obecnością rearanżacji PAX7-FOXO1. Wykazano, że wiąże się ona z istotnie lepszymi wynikami leczenia w porównaniu z pacjentami z ARMS z rearanżacją PAX-FOXO1 bez amplifikacji genu fuzyjnego⁶.

Konstrukt produktu Breakpart Probe umożliwia wykrycie rearanżacji genu FOXO1, niezależnie od partnera genowego biorącego w niej udział.

Specyfikacja sondy

FOXO1, 13q14.1, kolor czerwony
FOXO1, 13q14.1, kolor zielony



Produkt FOXO1 Breakpart Probe zawiera dwie sondy (405 kb i 183 kb), wyznakowane zielonym fluoroforem, umiejscowione proksymalnie względem genu FOXO1 i obejmujące markery D13S765 i SHGC-111293, oraz cztery sondy (123 kb, 142 kb, 95 kb i 253 kb), wyznakowane czerwonym fluoroforem, umiejscowione dystalnie względem genu FOXO1 i obejmujące markery D13S638 i SHGC-16596.

Dostarczone materiały

Sonda: 50 µl na fiolkę (5 testów) lub 100 µl na fiolkę (10 testów)
Ilość sondy FOXO1 wyznakowanej czerwonym fluoroforem: 34–59ng/test
Ilość sondy FOXO1 wyznakowanej zielonym fluoroforem: 342,5–512,5ng/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)

Barwnikiem kontrastowym jest odczynnik DAPI antifade (ES: 0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidyno-2-fenylindol)).

Ostrzeżenia i środki ostrożności

1. Do diagnostyki *in vitro*. Wyłącznie do użytku profesjonalnego.
2. Podczas pracy z sondami DNA i barwnikiem kontrastowym DAPI należy nosić rękawiczki.
3. Mieszaniny 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 słupek dużą ilością wody.
4. DAPI jest potencjalnym czynnikiem rakotwórczym. Zachować ostrożność podczas pracy z tym produktem; nosić rękawiczki i fartuch laboratoryjny. Przy usuwaniu słupek dużą ilością wody.
5. Wszystkie materiały stwarzające zagrożenie należy wyrzucać zgodnie z wytycznymi placówki dotyczącymi usuwania odpadów stwarzających zagrożenie.
6. Operatorzy muszą być w stanie rozróżnić czerwony, niebieski i zielony kolor.
7. Nieprzestrzeganie protokołu może wpłynąć na skuteczność testu i doprowadzić do uzyskania wyników fałszywie pozytywnych/negatywnych.

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. Należy możliwie ograniczać ekspozycję sondy i barwnika kontrastowego na światło w laboratorium.

Sprzęt wymagany, ale niedostarczany

1. Płyta grzewcza (ze stabilną płytą i możliwością dokładnej kontroli temperatury do 80°C).
2. Mikropipety i końcówki umożliwiające przenoszenie cieczy o różnych objętościach w zakresie 1–200 µl.
3. Łażnia 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 ręciennej 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. Alternatywnie do obserwacji czerwonego i zielonego fluoroforu można użyć podwójnego filtra pasmowo-przepustowego 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, 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 ograniczyć ekspozycję sondy i barwnika kontrastowego na światło w laboratorium)

Denaturacja wstępna

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

Denaturacja

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

Hybrydyzacja

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

Płukania po hybrydyzacji

- Ostrożnie zdjąć szkiełko nakrywkowe i usunąć wszelkie pozostałości kleju.
- Zanurzyć szkiełko w 0,4x stężonym roztworze SSC (pH 7,0) w temperaturze 72°C (+/-1°C) na 2 minuty; nie wstrząsać.
- 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.
- Pozwolić, aby szkiełko ociekło, a następnie nanieść 10–15 µl barwnika DAPI antifade na każdą próbkę.
- Przykryć szkiełkiem nakrywkowym, usunąć wszelkie pęcherzyki powietrza i pozostawić szkiełko w ciemności na 10 minut, aby umożliwić rozwój barw.
- 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 gruboigłowej 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

- Stosowanie odczynników innych niż dostarczone lub zalecane przez firmę CytoCell Ltd może mieć negatywny wpływ na warunki hybrydyzacji.
- Na potrzeby pomiaru temperatury roztworów, łaźni wodnych i inkubatorów należy używać skalibrowanego termometru, ponieważ temperatury te są kluczowe dla optymalnego działania produktu.
- 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.
- Niecałkowita denaturacja może spowodować brak sygnału, a nadmierna denaturacja może również doprowadzić do nieswoistego wiązania.
- Nadmierna hybrydyzacja może spowodować otrzymanie dodatkowych lub nieoczekiwanych sygnałów.
- Przed użyciem testu do celów diagnostycznych użytkownicy powinni zoptymalizować protokół dla własnych próbek.

Wyniki oczekiwane

W komórce prawidłowej oczekiwane są dwa fuzyjne sygnały czerwone/zielone (2F). Oczekiwany wzorec sygnału w komórce ze zrównoważoną rearanżacją genu FOXO1 to 1 sygnał fuzyjny, 1 sygnał czerwony i 1 sygnał zielony (1C, 1Z, 1F). Oczekiwany wzorec sygnału w komórce z amplifikacją proksymalnego regionu genu FOXO1 to 1 sygnał fuzyjny, 1 sygnał czerwony i zamplifikowany sygnał zielony. W przypadku próbek aneuploidalnych/z rearanżacją niezrównoważoną mogą wystąpić inne wzorce sygnału.

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 testu i doprowadzić do uzyskania wyników fałszywie pozytywnych/negatywnych.

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

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

- Anderson *et al.*, Am J Pathol. 2001 Sep;159(3):1089-96
- Jothi *et al.*, Mol Cancer Ther. 2013 Dec;12(12):2663-74
- Ognjanovic *et al.*, Cancer 2009; 115(18): 4218–4226.
- Sorensen *et al.*, J Clin Oncol. 2002;20(11):2672-9
- Skapek *et al.*, Pediatr Blood Cancer. 2013 Sep;60(9):1411-7
- Duan *et al.*, Genes Chromosomes Cancer. 2012 Jul; 51(7):662-674

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

Patenty i znaki towarowe

CytoCell jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy CytoCell Ltd.

Ten produkt zawiera technologię na licencji firmy Life Technologies Corporation, która jest dostępna 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

