

F_{lex}ISH**ALK/ROS1 DistinguISH Probe**

REF	Z-2203-50	▽	5 (0.05 ml)
-----	-----------	---	-------------

REF	Z-2203-200	▽	20 (0.2 ml)
-----	------------	---	-------------

Per la rilevazione qualitativa di traslocazioni che coinvolgono il gene umano ALK in 2p23.1-p23.2 e il gene umano ROS1 in 6q22.1 mediante ibridazione *in situ* fluorescente (FISH).



Dispositivo medico – diagnostico in vitro
in conformità alla Direttiva UE 98/79/EC

1. Scopo previsto

La sonda F_{lex}ISH ALK/ROS1 DistinguISH Probe (PL161) è adibita alla rilevazione qualitativa di traslocazioni che coinvolgono il gene umano ALK in 2p23.1-p23.2 e il gene umano ROS1 in 6q22.1 in campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina come tessuti affetti da tumore polmonare non a piccole cellule (NSCLC) mediante ibridazione *in situ* fluorescente (FISH). La sonda va utilizzata in combinazione con il kit F_{lex}ISH-Tissue Implementation Kit (codice prodotto Z-2182-5/-20).

L'interpretazione dei risultati deve essere eseguita da un patologo qualificato, considerando il contesto della storia clinica del paziente rispettando gli altri dati clinici e patologici.

2. Rilevanza clinica

Sia il gene ALK che il gene ROS1 codificano per recettori tirosino chinasi transmembrana. I riarrangiamenti che coinvolgono il locus del gene ALK o del gene ROS1 sono stati riscontrati frequentemente nel tumore del polmone non a piccole cellule (NSCLC). Il riarrangiamento più frequente di ALK nel tumore NSCLC è l'inversione che coinvolge i geni ALK e EML4, entrambi localizzati sul cromosoma 2 [inv(2)(p21p23)]. Il risultato di questa inversione è una proteina di fusione che è costitutivamente attivata per autofosforilazione e che a sua volta media la trasformazione delle cellule maligne attivando gli effettori a valle. Nel NSCLC sono stati identificate diverse traslocazioni che coinvolgono il gene ROS1, il cui risultato finale è la fusione di parti più o meno tronche di geni, come ad esempio TPM3, SDC4, SLC34A2, CD74, EZR o LRIG3, con il dominio chinasi di ROS1. Inoltre nei NSCLC è stata osservata anche una possibile fusione del gene GOPC con ROS1. Le fusioni GOPC-ROS1 derivano da una delezione interstiziale di circa 240 kb nella regione 6q22.1. Il gene ROS1 è evolutivamente strettamente correlato alla famiglia di ALK e questa è una delle basi scientifiche secondo cui gli inibitori di ALK vengono utilizzati anche come inibitori di ROS1. I pazienti affetti da NSCLC positivi ad ALK e ROS1 traggono beneficio da una terapia "tyrosine kinase targeted therapy", come per esempio crizotinib. Quindi, la rilevazione dei riarrangiamenti di ALK e ROS1, utilizzando l'ibridazione *in situ* fluorescente, potrebbe avere un significato terapeutico.

3. Principio del metodo

La tecnica di ibridazione in situ fluorescente (FISH) consente la rilevazione e la visualizzazione di sequenze nucleotidiche specifiche in preparazioni cellulari. I frammenti di DNA marcati in modo fluorescente, chiamati sonde FISH, e i loro frammenti di DNA complementare nelle preparazioni sono co-denaturati e riuniti durante l'ibridazione. Successivamente, i frammenti di sonda non specifici e non legati, sono rimossi con lavaggi stringenti. Dopo la controcolorazione del DNA con DAPI, i frammenti di sonda ibridati sono visualizzati utilizzando il microscopio a fluorescenza equipaggiato con filtri specifici per i fluorocromi con cui sono direttamente marcati i frammenti di sonde FISH.

4. Reagenti forniti

La F_{lex}ISH ALK/ROS1 DistinguISH Probe è composta da:

- Polinucleotidi (~10.0 ng/μl) marcati con ZyGreen (eccitazione 503 nm/emissione 528 nm), le cui sequenze target mappano in 2p23.1-p23.2* (chr2:29,460,144-30,095,822) prossimali al punto di rottura di ALK e in 6q22.1* (chr6:116,912,298-117,627,255) prossimali al punto di rottura di ROS1 (vedere Fig. 1 & Fig. 2).
- Polinucleotidi (~2.5 ng/μl) marcati con ZyOrange (eccitazione 547 nm/emissione 572 nm), le cui sequenze target mappano in 2p23.2* (chr2:29,174,204-29,383,335) distali al punto di rottura di ALK e in 6q22.1* (chr6:117,659,135-117,871,701) distali al punto di rottura di ROS1 (vedere Fig. 1 & Fig. 2).
- Polinucleotidi (~70.0 ng/μl) marcati con ZyBlue (eccitazione 418 nm/emissione 467 nm), le cui sequenze target mappano in 6q22.1* (chr6:116,671,642-117,260,761) prossimali al punto di rottura di ROS1 che co-localizzano con il segnale verde dei polinucleotidi di ROS1 e in 6q22.1-q22.2* (chr6:117,765,211-118,444,005) distali al punto di rottura di ROS1 che co-localizzano con il segnale arancione dei polinucleotidi di ROS1 (vedere Fig. 2).
- Tampone di ibridazione a base di formammide

*conformemente al Human Genome Assembly GRCh37/hg19

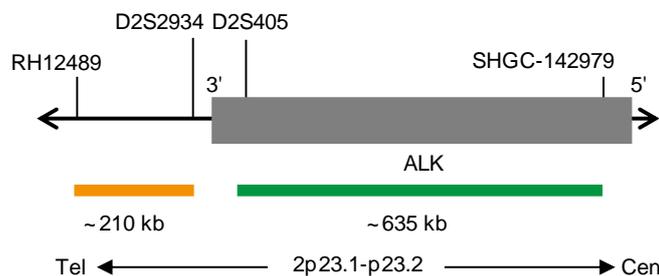


Fig. 1: ALK Mappa della sonda (non in scala)

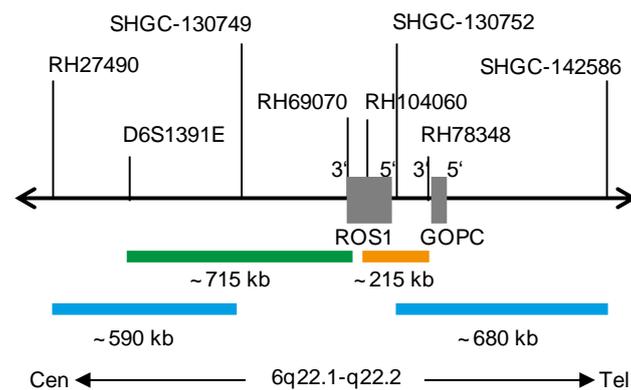


Fig. 1: ROS1 Mappa della sonda (non in scala)

La sonda F_{lex}ISH ALK/ROS1 DistinguISH Probe è disponibile nei seguenti due formati:

- Z-2203-50: 0.05 ml (5 test da 10 μl ciascuno)
- Z-2203-200: 0.2 ml (20 test da 10 μl ciascuno)

5. Materiali richiesti ma non forniti

- F/exSH -Tissue Implementation Kit (Codice prodotto Z-2182-5/-20)
- Campione controllo positivo e negativo
- Vetrini portaoggetto a carica positiva
- Bagno termostato (37°C, 98°C)
- Ibridizzatore o piastra calda
- Ibridizzatore o camera umida in stufa di ibridazione
- Pipette a volume variabile (10 µl, 25 µl)
- Vaschette di colorazione
- Timer
- Termometro calibrato
- Etanolo o reagente alcolico
- Xilene
- Acqua deionizzata o distillata
- Vetrini coprioggetto (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Colla per vetrini, per esempio Fixogum Rubber Cement (codice prodotto E-4005-50/-125) o simili
- Microscopio a fluorescenza (400-1000x)
- Olio a immersione per fluorescenza
- Set di filtri appropriato

6. Conservazione e stoccaggio

Conservare a 2-8°C in posizione verticale e protetta dalla luce. Utilizzare proteggendo dalla luce. Riportare alle condizioni di stoccaggio indicate subito dopo l'utilizzo. Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza indicata in etichetta. Il prodotto è stabile fino alla data di scadenza indicata in etichetta, se correttamente conservato.

7. Avvertenze e precauzioni

- Evitare la cross-contaminazione dei campioni, in quanto questo potrebbe portare a risultati sbagliati. La sonda non deve essere esposta alla luce, in particolare modo a luci intense, per lunghi periodi di tempo; per esempio, tutti i passaggi dovrebbero essere svolti, se possibile, al buio o utilizzando contenitori scuri! Leggere le istruzioni prima dell'utilizzo!
- Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza!
- Questo prodotto contiene sostanze (in bassa concentrazione e volume) che sono nocive per la salute e potenzialmente infette. Evitare qualsiasi contatto diretto con i reagenti. Prendere le adeguate misure di precauzione (utilizzare i guanti, gli occhiali di protezione e il camice da laboratorio)!
- Se il reagente dovesse entrare in contatto con la pelle, risciacquare subito abbondantemente!
- La scheda di sicurezza è disponibile su richiesta per usi professionali.
- Non riutilizzare i reagenti.

Frase di pericolo e prudenza:

Il componente pericoloso è la formammide.



Pericolo

H319	Provoca grave irritazione oculare.
H351	Sospettato di provocare il cancro.
H360FD	Può nuocere alla fertilità. Può nuocere al feto.
H373	Può provocare danni agli organi in caso di esposizione prolungata o ripetuta.
P201	Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso.
P260	Non respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol.
P280	Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.
P305+P351+P338	IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.
P308+P313	IN CASO di esposizione o di possibile esposizione, consultare un medico.
P337+P313	Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico.

8. Limitazioni

- Per uso diagnostico *in vitro*.
- Solo per usi professionali.
- L'interpretazione clinica di qualsiasi colorazione positiva, o la sua assenza, deve essere condotta considerando il contesto della storia clinica, la morfologia e altri criteri istopatologici come altri test diagnostici. E' di responsabilità di un patologo qualificato avere familiarità con le sonde FISH, reagenti, pannelli diagnostici e metodi usati per produrre il preparato. Le colorazioni devono essere eseguite in un laboratorio certificato e competente sotto la supervisione di un patologo che è responsabile della rivalutazione dei vetrini e che garantisce l'adeguatezza dei controlli positivi e negativi utilizzati.
- La colorazione, in particolar modo l'intensità del segnale e il rumore di fondo, dipende da come il campione è stato gestito e processato prima della colorazione stessa. Una fissazione impropria, il congelamento, lo scongelamento, il lavaggio, l'asciugatura, il riscaldamento, il sezionamento o la contaminazione con un altro campione o fluido può produrre artefatti o falsi risultati. Risultati incoerenti possono derivare da variazioni nei metodi di fissazione e inclusione.
- La sonda dovrebbe essere usata solo per identificare i loci descritti nella sezione 4 "Reagenti forniti".
- La performance è stata validate utilizzando le procedure descritte in queste istruzioni per l'uso. Modifiche a queste procedure potrebbero alterare la performance e devono pertanto essere validate dall'utilizzatore.

9. Sostanze interferenti

I globuli rossi presenti nel campione potrebbero esibire auto fluorescenza che disturba l'identificazione dei segnali.

I seguenti fissativi non sono compatibili con la FISH:

- Fissativo di Bouin
- Fissativo B5
- Fissativi acidi (per esempio, acido picrico)
- Fissativo di Zenker
- Alcoli (quando utilizzati da soli)
- Mercurio cloruro
- Formaldeide zincata
- Fissativo di Hollande
- Formalina non tamponata

10. Preparazione dei campioni

Allestire i campioni come descritto nelle istruzioni per l'uso del F/exSH-Tissue Implementation Kit.

11. Trattamento preparatorio del prodotto

Il prodotto è pronto all'uso. Non deve essere ricostituito, mescolato o diluito. Portare la sonda a temperatura ambiente (18-25°C) prima dell'uso, proteggere dalla luce. Prima di aprire la vial, vortexare e centrifugare brevemente.

12. Procedura di lavoro

Pretrattamento del campione

Pretrattare il campione (sparaffinatura, proteolisi) conformemente alle istruzioni per l'uso del kit F/exSH-Tissue Implementation Kit.

Denaturazione e ibridazione

1. Pipettare 10 µl di sonda su ciascun campione pretrattato.
2. Coprire i campioni con un vetrino coprioggetto (22 x 22) mm (evitare la formazione di bolle) e sigillare il coprioggetto.
Raccomandiamo di utilizzare una colla per vetrini (per esempio, Fixogum).
3. Porre i vetrini su piastra calda o ibridizzatore e denaturare i campioni per 10 minuti a 75°C.
4. Ibridare per un tempo compreso tra 2 e 16 ore (per esempio, overnight) a 37°C utilizzando un ibridizzatore o una camera umida in stufa di ibridazione.

E' fondamentale che i campioni non si asciugano durante la fase di ibridazione.

Post-ibridazione

Procedure coi passaggi post-ibridazione (lavaggio, controcolorazione e microscopia fluorescente) come indicato nelle istruzioni d'uso del kit *F/exSH -Tissue Implementation Kit*.

13. Interpretazione dei risultati

Utilizzando il set di filtri idoneo, i segnali di ibridazione della sonda appaiono verdi (prossimali al punto di rottura di ALK e ROS1), arancioni (distali al punto di rottura di ALK e ROS1) e blu (prossimali e distali al punto di rottura di ROS1).

Situazione normale: Nelle interfasi di cellule normali o in cellule con riarrangiamenti che non coinvolgono le regioni dei geni ALK o ROS1, utilizzando i filtri opportuni a doppia banda, si ottengono quattro segnali di fusione verde/arancione e, utilizzando l'appropriato filtro a singola banda, due segnali blu (vedere Fig. 3).

Situazione aberrante: una traslocazione che coinvolge la regione del gene ALK è evidenziata da un segnale verde separato da un segnale arancione che non co-localizzano con i segnali blu. La perdita di un segnale verde con un singolo segnale arancione isolato è indice di una delezione che coinvolge le sequenze 5'-ALK. Una traslocazione che coinvolge la regione del gene ROS1 è evidenziata da un segnale verde separato da un segnale arancione, entrambi che co-localizzano con un segnale blu. La perdita di un segnale arancione con un segnale verde isolato che co-localizza con un segnale blu è indice di una delezione distale al punto di rottura di ROS1 o di una traslocazione sbilanciata che coinvolge questa regione cromosomica (vedere Fig. 3).

I segnali sovrapposti possono apparire come segnali gialli.

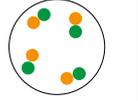
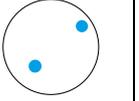
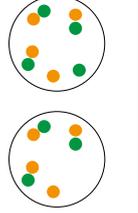
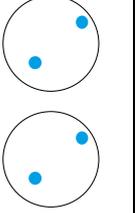
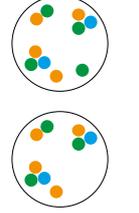
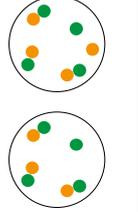
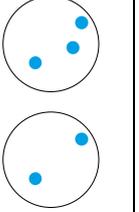
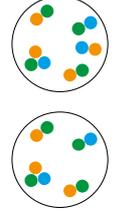
	Filtri a doppia banda Verde/Arancio	Filtri a singola banda blu	Unione delle immagini o filtro a tripla banda
Cellule sane			
Riarrangiamento di ALK			
Riarrangiamento di ROS1			

Fig. 3: Risultati attesi in nuclei normali e in nuclei in interfase riarrangiati

Le aberrazioni genomiche dovute a piccole delezioni, duplicazioni o inversioni potrebbero dare luogo a segnali scarsamente visibili.

Altri pattern di segnali possono essere osservati in campioni anormali che possono dare combinazioni di segnali differenti rispetto a quelli sopradescritti. Pattern di segnali inattesi dovrebbero essere studiati/approfonditi ulteriormente.

Note:

- A causa della cromatina decondensata, il singolo segnale FISH può apparire come un piccolo cluster. Due o tre segnali della stessa misura, separate da una distanza ≤ 1 del diametro di un segnale, dovrebbero essere contati come un singolo segnale.
- Non valutare i nuclei sovrapposti.
- Non contare nuclei over-digeriti (identificabili da una regione scura all'interno del nucleo).
- Non contare i nuclei con una forte auto fluorescenza, che impedisce l'identificazione dei segnali.
- Un risultato negative o inatteso può essere causato da fattori multipli (vedi capitolo 17).

- Al fine di una corretta interpretazione dei risultati, l'utilizzatore deve validare questo prodotto prima del suo utilizzo in procedure diagnostiche secondo le linee guida nazionali e internazionali.

14. Procedure di Controllo qualità raccomandate

Al fine di monitorare la corretta performance del campione processato e testare i reagenti, ogni test dovrebbe essere associato a controlli interni e esterni. Se i controlli interni e/o esterni non forniscono colorazioni appropriate, i risultati con i campioni dei pazienti devono essere considerati non validi.

Controllo interno: Cellule non neoplastiche all'interno di un campione che mostra un pattern normale di segnali, ad esempio, i fibroblasti.

Controllo esterno: Campioni di controlli positivi e negativi validati.

15. Caratteristiche di performance

Accuratezza: La localizzazione del segnale di ibridazione della sonda è stato valutato in metafasi di maschio con cariotipo normale. In tutti i campioni testati la sonda si è ibridata unicamente con i loci previsti. Non sono stati osservati ulteriori segnali o ibridazioni incrociate. Pertanto, l'accuratezza è pari al 100%.

Sensibilità analitica: Per l'analisi della sensibilità analitica, la sonda è stata valutata su metafasi di cellule normali di maschio con cariotipo normale. Tutti i nuclei hanno mostrato il normale pattern di segnali previsto in tutti i campioni testati. Pertanto, la sensibilità analitica è pari al 100%.

Specificità analitica: Per l'analisi della specificità analitica, la sonda è stata valutata in metafasi di cellule di maschio con cariotipo normale. In tutti i campioni testati, tutti i segnali si sono ibridati esclusivamente con i loci target e con nessun altro locus. Pertanto, la specificità analitica è pari al 100%.

16. Smaltimento

Lo smaltimento dei reagenti deve avvenire in accordo alle regolamentazioni locali.

17. Risoluzione dei problemi

Qualsiasi modifica dalle istruzioni operative può comportare risultati di colorazione inferiori o a nessuna colorazione.

Segnali deboli o mancanti

Possibile causa	Azione
Sequenza target non disponibile	Utilizzare controlli appropriati
Campioni cellulari o tissutali non correttamente fissati	Ottimizzare il tempo di fissazione o il fissativo
Temperatura di pretrattamento, proteolisi, denaturazione, ibridazione o temperatura di lavaggio di stringenza non corretta	Controllare la temperature di tutti I dispositivi utilizzati, utilizzando un termometro calibrato
Trattamento proteolitico non condotto in modo adeguato	Ottimizzare il tempo di incubazione in pepsina, aumentandolo o diminuendolo, se necessario
Evaporazione della sonda	Se si utilizza l'ibridatore, è obbligatorio l'utilizzo di strisce umide o di taniche preriempite d'acqua. Se si utilizza una stufa d'ibridazione, usare una camera umida. Inoltre il coprioggetto deve essere completamente sigillato, per esempio con Fixogum, per prevenire che il campione si asciughi durante l'ibridazione
Concentrazione troppo bassa di tampone di stringenza	Controllare la concentrazione del tampone di stringenza

Soluzione disidratante vecchia	Preparare una soluzione disidratante fresca
Microscopio a fluorescenza impostato in modo non corretto	Regolare il microscopio
Utilizzo di set di fluorescenza non corretto	Utilizzare un set di filtri appropriato per i fluorocromi della sonda. <i>Il filtro triplo fornisce meno luce rispetto al filtro singolo o doppio. I segnali possono quindi apparire più tenui utilizzando il filtro triplo.</i>
Sonde o fluorofori danneggiati a causa della luce	Effettuare i passaggi di ibridazione e di lavaggio al buio

Morfologia degradata

Possibile causa	Azione
Il campione cellulare o tissutale non è stato fissato correttamente	Ottimizzare il tempo di fissazione o il fissativo
Pretrattamento proteolitico non condotto correttamente	Ottimizzare il tempo di incubazione in pepsina
Asciugatura insufficiente prima dell'applicazione della sonda	Aumentare i tempi di asciugatura

Segnali di cross ibridazione; rumori di fondo

Possibile causa	Azione
Sparaffinatura incompleta	Utilizzare soluzioni fresche; controllare la durata della sparaffinatura
Pretrattamento proteolitico troppo forte	Ridurre il tempo di incubazione in pepsina
Volume di sonda per area troppo elevato	Ridurre il volume di sonda per area/campione, dispensare la sonda goccia a goccia per evitare che si concentri localmente
Vetrini raffreddati a temperature ambiente prima dell'ibridazione	Trasferire i vetrini rapidamente a 37°C
Concentrazione troppo elevata del tampone di stringenza	Controllare la concentrazione del tampone di stringenza
Temperatura di lavaggio post ibridazione troppo bassa	Controllare la temperatura; aumentarla, se necessario
Disidratazione dei campioni tra i diversi passaggi di incubazione	Prevenire la disidratazione sigillando i vetrini e incubandoli in un ambiente umido

Nuclei sovrapposti

Possibile causa	Azione
Inadeguato spessore della sezione di tessuto	Preparare sezioni al microto dello spessore di 2-4 µm

Campione galleggiante sul vetrino

Possibile causa	Azione
Rivestimento inadatto del vetrino	Utilizzare vetrini idonei
Pretrattamento proteolitico troppo forte	Ridurre il tempo di incubazione in pepsina

Controcolorazione debole

Possibile causa	Azione
Bassa concentrazione di soluzione DAPI	Utilizzare <u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (Codice prodotto MT-0008-0.8)
Tempo di incubazione in DAPI troppo breve	Aggiustare il tempo di incubazione in DAPI

18. Letteratura

- Bergethon K, et al. (2012) *J Clin Oncol* 30: 863-70.
- Birchmeier C, et al. (1987) *Proc Natl Acad Sci* 84: 9270-74.
- Bos M, et al. (2013) *Lung Cancer* 81: 142-3.
- Brockhoff G, et al. (2016) *Histopathology* 69: 635-46.
- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Koivunen JP, et al. (2008) *Clin Cancer Res* 14: 4275-83.
- Martelli MP, et al. (2009) *Am J Pathol* 174: 661-70.
- Morris SW, et al. (1994) *Science* 263: 1281-4.
- Ou SH, et al. (2012) *Exp Rev Anticancer Ther* 12: 447-56.
- Palmer RH, et al. (2009) *Biochem J* 420: 345-61.
- Sasaki T, et al. (2010) *Eur J Cancer* 46: 1773-80.
- Selinger CI, et al. (2017) *Histopathology* 70: 402-411.
- Shaw AT, et al. (2014) *N Engl J Med* 371: 1963-71.
- Wilkinson DG: *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.

I nostri esperti sono disponibili per rispondere alle vostre domande. Contattare per cortesia help@zytovision.com



ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/ Germania
Tel.: +49 471 4832-300
Fax: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
Email: info@zytovision.com

Marchi registrati:

ZytoVision® e FlexISH® sono marchi registrati da ZytoVision GmbH.