



ZytoLight

SPEC ERG/TMPRSS2 TriCheck Probe

REF Z-2135-200

Σ 20 (0.2 ml)

Per la rilevazione qualitativa dei riarrangiamenti dei geni ERG-TMPRSS2 mediante ibridazione *in situ* fluorescente (FISH)



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

1. Scopo previsto

La sonda ZytoLight SPEC ERG/TMPRSS2 TriCheck Probe (PL92) è adibita alla rilevazione qualitativa dei riarrangiamenti che coinvolgono il gene umano ERG in 21q22.2 e il gene umano TMPRSS2 in 21q22.3 in campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina mediante ibridazione *in situ* fluorescente (FISH). La sonda va utilizzata in combinazione con il kit ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (codice prodotto Z-2028-5/-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

I riarrangiamenti a carico di ERG (ETS transcription factor ERG) sono stati osservati nel 40-60% dei tumori alla prostata identificati attraverso lo screening del PSA (prostate-specific antigen). L'aberrazione più comune che colpisce ERG, che si riscontra nel 90% dei casi, è la delezione interstiziale di circa 3 Mb della regione cromosomica 21q22. Questa delezione porta alla fusione del gene promotore TMPRSS2 (transmembrane serine protease 2), a regolazione ormonale, con la regione codificante di ERG, e ha, come risultato, l'overespressione del fattore di trascrizione ERG. I frammenti deleti si osservano a volte come inserzioni in altri cromosomi. Ad ogni modo, circa il 10% di casi di tumore alla prostata con ERG riarrangiato mostra fusioni alternative, come ad esempio SLC45A3-ERG. Dall'altro lato, in queste patologie maligne, è stata individuata anche una piccola percentuale di altre traslocazioni non-ERG con fusione di TMPRSS2 ad altri membri della famiglia ETS, come ad esempio TMPRSS2-ETV1. Numerosi studi hanno rilevato associazioni di riarrangiamenti ERG con caratteristiche istomorfologiche, con variazioni tipiche del numero di copie cromosomiche e con segni distintivi di espressione genica che definiscono una sottoclasse distinta di tumori della prostata con prognosi sfavorevole. Di conseguenza, la valutazione dello stato dei riarrangiamenti di TMPRSS2-ERG in campioni di tessuto o urine, utilizzando la FISH (fluorescence *in situ* hybridization) potrebbe avere una rilevanza dal punto di vista diagnostico e prognostico.

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 contro colorazione 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 ZytoLight SPEC ERG/TMPRSS2 TriCheck Probe è composta da:

- Polinucleotidi (~10 ng/μl) marcati con fluorocromo ZyGreen (eccitazione 503 nm/emissione 528) le cui sequenze target mappano in 21q22.2* (chr21:40,078,039-40,850,582) distale alla regione di rottura di ERG (vedere Fig. 1).
- Polinucleotidi (~4.5 ng/μl) marcati con fluorocromo ZyOrange (eccitazione 547 nm/emissione 572 nm) le cui sequenze target mappano in 21q22.13-q22.2* (chr21:39,171,790-39,733,849) prossimale alla regione di rottura di ERG (vedere Fig. 1).
- Polinucleotidi (~37.0 ng/μl) marcati con fluorocromo ZyBlue (eccitazione 418 nm/emissione 467 nm) le cui sequenze target mappano in 21q22.3* (chr21:43,301,411-44,195,531) distale alla regione di rottura di TMPRSS2 (vedere Fig. 1).

• Tampone di ibridazione a base di formammide

*conformemente all'Human Genome Assembly GRCh37/hg19

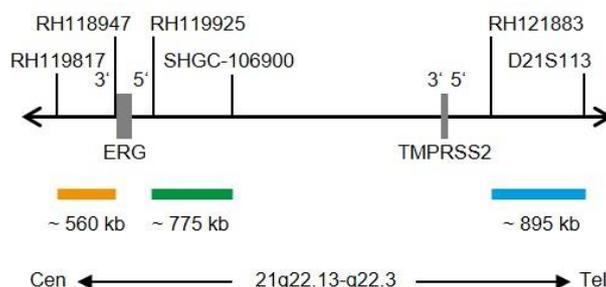


Fig. 1: Mappa della sonda ERG/TMPRSS2 (non in scala)

La sonda ZytoLight SPEC ERG/TMPRSS2 TriCheck Probe è disponibile nel seguente formato:

- Z-2135-200: 0.2 ml (20 test da 10 μl ciascuno)

5. Materiali richiesti ma non forniti

- ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Codice prodotto Z-2028-5/-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

- 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.
- 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.

Fraasi di pericolo e prudenza:

Il componente pericoloso è la formammide.



Pericolo

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.
P202	Non manipolare prima di avere letto e compreso tutte le avvertenze.
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.
P308+P313	In caso di esposizione o di possibile esposizione, consultare un medico.
P405	Conservare sotto chiave.

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. È di responsabilità di un patologo qualificato avere familiarità con le sonde FISH, i reagenti, i pannelli diagnostici e i 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

Raccomandazioni:

- Fissazione in formalina 10% neutra tamponata per 24 h a temperatura ambiente (18-25°C).
- Dimensioni del campione $\leq 0.5 \text{ cm}^3$.
- Utilizzare paraffina di qualità.
- L'inclusione dovrebbe essere effettuata a una temperatura inferiore ai 65°C.
- Allestire sezioni al microtomo di 2-4 μm di spessore.
- Utilizzare vetrini a carica positiva.
- Fissare per 2-16 h a 50-60°C.

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 [ZytoLight FISH-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 su ibridizzatore e denaturare i campioni per 10 min. a 75°C.
 4. Trasferire i vetrini in camera umida e ibridare overnight a 37°C (per esempio in una stufa da ibridazione).

È fondamentale che i campioni non si asciughino durante la fase di ibridazione.

Post-ibridazione

Procedere coi passaggi post-ibridazione (lavaggio, contro colorazione e microscopia fluorescente) come indicato nelle istruzioni d'uso del kit [ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit](#).

13. Interpretazione dei risultati

Con l'uso di filtri appropriati, i segnali di ibridazione della sonda appaiono verdi (distali alla regione di rottura di ERG), arancione (prossimali alla regione di rottura di ERG) e blu (distali alla regione di rottura di TMRSS2).

Situazione normale: Nelle interfasi di cellule normali o di cellule senza riarrangiamenti a carico delle rispettive regioni geniche, si vedono due segnali di fusione arancione/verde e due segnali blu in prossimità dei rispettivi segnali di fusione (vedere Fig. 2).

Situazione aberrante: Un locus 21q22 con delezione 21q22.2 che ha come risultato una fusione TMPRSS2-ERG è indicato da un segnale arancione separato co-localizzato con un segnale blu e dalla perdita del segnale verde. Una traslocazione ERG senza coinvolgimento di TMPRSS2 è indicata da un segnale separato arancione e da un segnale blu co-localizzato con un segnale separato verde. Una traslocazione non-ERG che colpisce TMPRSS2 è indicata da un segnale separato blu che non è co-localizzato con il segnale di fusione ERG (vedere Fig. 2).

I segnali verdi e arancioni sovrapposti possono apparire come segnali gialli.

	Filtro a doppia banda verde/arancio	Filtro a singola banda blu	Unione delle immagini o filtro a tripla banda verde/arancio/blu
Cellule sane			
Delezione associate a fusione ERG-TMPRSS2			
Traslocazione ERG che non coinvolge TMPRSS2			
Traslocazione TMPRSS2 che non coinvolge ERG			

Fig. 2: Risultati attesi in situazione normale e aberrante

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 attesi 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 fissati non correttamente	Ottimizzare il tempo di fissazione e il fissativo o aggiungere un passaggio di post-fissazione come descritto in "procedure" del manuale d'uso del kit Zyto Light FISH-Tissue Implementation Kit
Temperatura di pretrattamento, proteolisi, denaturazione, ibridazione o temperatura di lavaggio di stringenza non corretta	Controllare la temperatura 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
---	--

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

Morfologia degradata

Possibile causa	Azione
Il campione cellulare o tissutale non è stato fissato correttamente	Ottimizzare il tempo di fissazione e il fissativo o aggiungere un passaggio di post-fissazione come descritto in "procedure" nel manuale d'uso del kit <i>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</i>
Pretrattamento proteolitico non condotto correttamente	Ottimizzare il tempo di incubazione in pepsina, aumentandolo o diminuendolo se necessario
Asciugatura insufficiente prima dell'applicazione della sonda	Aumentare i tempi di asciugatura

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

Contro colorazione debole

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

18. Letteratura

- Esgueva R, et al. (2010) *Mod Pathol* 23: 539-46.
- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Nam RK, et al. (2007) *Br J Cancer* 97: 1690-5.
- Perner S, et al. (2006) *Cancer Res* 66: 8337-41.
- Tomlins SA, et al. (2005) *Science* 310: 644-8.
- 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 helptech@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 ZytoLight® sono marchi registrati da ZytoVision GmbH.