



**ZytoLight**

## **SPEC ALK Dual Color Break Apart Probe**

|     |            |   |             |
|-----|------------|---|-------------|
| REF | Z-2124-50  | ∇ | 5 (0.05 ml) |
| REF | Z-2124-200 | ∇ | 20 (0.2 ml) |

Per la rilevazione qualitativa delle traslocazioni che coinvolgono il gene umano ALK nella regione 2p23.1-p23.2 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 ALK Dual Color Break Apart Probe (PL81) è adibita alla rilevazione qualitativa delle traslocazioni che coinvolgono il gene umano ALK nella regione 2p23.1-p23.2 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

Il gene ALK (recettore tirosino-chinasico ALK) codifica per un recettore transmembrana tirosino-chinasico. Questo gene ha attività oncogeniche che manifesta attraverso la fusione di diversi geni partner o mutazioni sia in tumori ematopoietici che in tumori solidi non-ematopoietici. Traslocazioni che interessano il locus del gene ALK si osservano frequentemente nel linfoma anaplastico a grandi cellule (ALCL), un linfoma non Hodgkin aggressivo che coinvolge le cellule T. La traslocazione più frequente t(2; 5) consiste in una fusione con il gene NPM1 (nucleofosmina a.k.a fosfoproteina B23 nucleolare, numatrina) situato sul cromosoma 5q35. Questo riarrangiamento porta alla formazione di una proteina di fusione NPM1-ALK (analoga EML4-MK), che è costitutivamente attivata tramite autofosforilazione, e che a sua volta media la trasformazione maligna delle cellule attivando gli effettori a valle come per esempio STAT3. Inoltre, le inversioni che coinvolgono il gene ALK localizzato sul braccio corto del cromosoma 2 [inv(2)(p21p23)] sono state frequentemente rilevate nel carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) e portano alla formazione di trascritti di fusione EML4-ALK. Le terapie ALK chinasi mirate possono rappresentare una strategia terapeutica molto efficace nei pazienti NSCLC portatori di riarrangiamenti EML4-ALK.

### 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 ZytoLight SPEC ALK Dual Color Break Apart Probe è composta da:

- Polinucleotidi (~10 ng/μl) marcati con fluorocromo ZyGreen (eccitazione 503 nm/emissione 528) le cui sequenze target mappano in 2p23.1-p23.2\* (chr2:29,460,144-30,095,822) prossimali al punto di rottura di ALK (vedere Fig. 1).
- Polinucleotidi (~4.5 ng/μl) marcati con fluorocromo 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 (vedere Fig. 1).
- Tampone di ibridazione a base di formammide

\*conformemente al Human Genome Assembly GRCh37/hg19

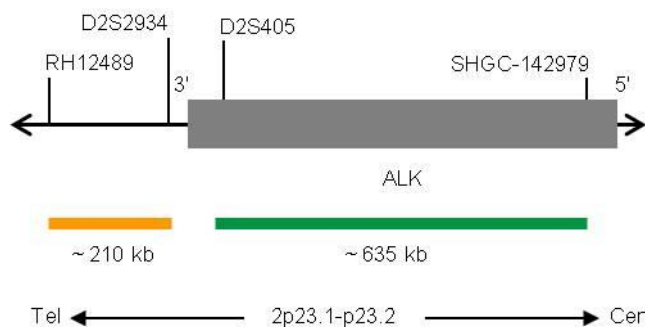


Fig. 1: Mappa della sonda SPEC ALK (non in scala)

La sonda ZytoLight SPEC ALK Dual Color Break Apart Probe è disponibile nei seguenti due formati:

- Z-2124-50: 0.05 ml (5 test da 10 μl ciascuno)
- Z-2124-200: 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. 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

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  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{l}$  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).

*E' fondamentale che i campioni non si asciughino 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 [ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit](#).

### 13. Interpretazione dei risultati

Con l'uso di filtri appropriati, i segnali di ibridazione della sonda appaiono verdi (prossimale al punto di rottura di ALK) e arancioni (distale al punto di rottura di rottura di ALK).

**Situazione normale:** nelle interfasi di cellule normali o cellule senza una traslocazione che coinvolge la regione del gene ALK, compaiono due segnali di fusione verdi/arancioni (vedere Fig. 2).

**Situazione aberrante:** Una regione del gene ALK interessata da una traslocazione è evidenziata da un segnale verde separato e da un segnale arancione separato. Un'inversione EML4-ALK con delezione di sequenze 5'-ALK è evidenziata da uno o più segnali arancioni isolati (vedere Fig. 2).

*I segnali sovrapposti possono apparire come segnali gialli.*

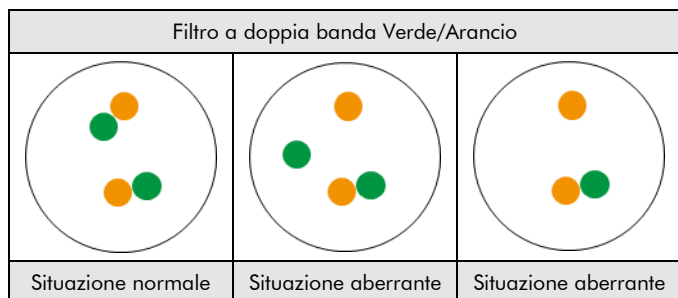


Fig. 2: Risultati attesi in situazione normale e aberrante

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  $\leq 1$  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 negativo 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 fissati   | 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 <a href="#">Zyto Light FISH-Tissue Implementation Kit</a>  |
| 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 <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</u> |
| 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 $\mu\text{m}$ |

**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**

- Inamura K, et al. (2009) *Mod Pathol* 22: 508-15.
- 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.
- Palmer RH, et al. (2009) *Biochem J* 420: 345-61.
- Perner S, et al. (2008) *Neoplasia* 10: 298-302.
- Rodig SJ, et al. (2009) *Clin Cancer Res* 15: 5216-23.
- Sasaki T, et al. (2010) *Eur J Cancer* 46: 1773-80.
- Von Laffert M, et al. (2013) *Lung Cancer* 81: 200-6.
- Wilkinson DG: *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.
- Zhang Q, et al. (2007) *Nat Med* 11:1341-8.

I nostri esperti sono disponibili per rispondere alle vostre domande. Contattare per cortesia [helptech@zytovision.com](mailto:helptech@zytovision.com)



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

**Marchi registrati:**

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