

F/*ex*ISH**ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe**

REF	Z-2166-50	▽	5 (0.05 ml)
-----	-----------	---	-------------

REF	Z-2166-200	▽	20 (0.2 ml)
-----	------------	---	-------------

Per la rilevazione qualitativa delle amplificazioni del gene umano ERBB2 e della regione alfa-satellite del cromosoma 17 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/*ex*ISH ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe (PL122) è adibita alla rilevazione qualitativa delle amplificazione del gene umano ERBB2 e alla rivelazione della regione alfa-satellite del cromosoma 17 in campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina di tumori umani mammari o del tessuto gastrico mediante ibridazione *in situ* fluorescente (FISH). La sonda va utilizzata in combinazione con il kit F/*ex*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**

Il gene ERBB2 (a.k.a. HER2 e NEU) è localizzato nella regione cromosomica 17q12 e codifica per una glicoproteina transmembrana di 185-190 kDa, la p185, che agisce come recettore dei fattori di crescita cellulari. La proteina p185 appartiene al sottogruppo EGFR (epidermal growth factor receptor) della superfamiglia degli RTK (recettori tirosino chinasi) che comprende anche EGFR (ERBB1), ERBB3 (HER3) e ERBB4 (HER4). L'amplificazione del proto-oncogene ERBB2, osservata in circa il 20% dei campioni di tumore mammario, è stata correlata con una prognosi infausta della malattia. Sono stati riscontrati simili risultati con una varietà di altre neoplasie maligne, come ad esempio il tumore dell'ovaio, il tumore dello stomaco e i carcinomi delle ghiandole salivari.

**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/*ex*ISH ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe è composta da:

- Polinucleotidi (~10.0 ng/μl) marcati con ZyGreen (eccitazione 503 nm/emissione 528 nm), le cui sequenze target mappano in 17q12-q21.1\* (chr17:37,572,531-38,181,308) in cui è localizzato il gene ERBB2 (vedere Fig. 1).
  - Polinucleotidi (~1.0 ng/μl) marcati con ZyOrange (eccitazione 547 nm/emissione 572 nm), le cui sequenze target mappano in 17p11.1-q11.1 specifiche per la regione alfa-satellite D17Z1 centromerica del cromosoma 17 (vedere Fig. 1).
  - Tampone di ibridazione a base di formammide
- \*conformemente al Human Genome Assembly GRCh37/hg19

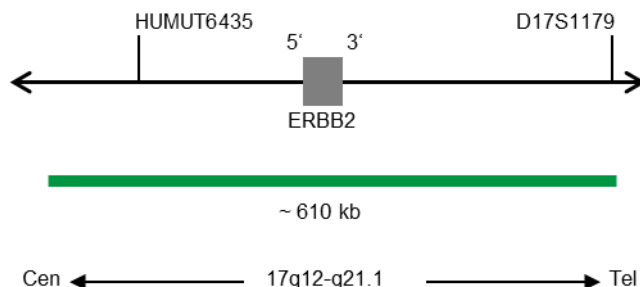


Fig. 1: ERBB2 Mappa della sonda (non in scala)

La sonda F/*ex*ISH ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe è disponibile nei seguenti due formati:

- Z-2166-50: 0.05 ml (5 test da 10 μl ciascuno)
- Z-2166-200: 0.2 ml (20 test da 10 μl ciascuno)

**5. Materiali richiesti ma non forniti**

- F/*ex*ISH -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

- 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.
- Evitare la cross-contaminazione dei campioni, in quanto questo potrebbe portare a risultati sbagliati.

### 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 [FlexISH-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/exISH -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 una piastra calda o ibridizzatore e denaturare i campioni per 10 minuti a 75°C.
  4. Ibridare i vetrini per un tempo variabile da 2 a 16 ore (per esempio, overnight) a 37°C, utilizzando o in un ibridizzatore o una camera umida posizionata in una stufa per 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/exISH -Tissue Implementation Kit](#).

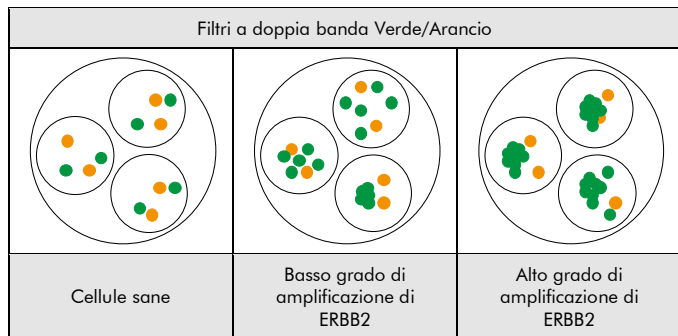
## 13. Interpretazione dei risultati

Con l'uso di filtri appropriati, i segnali di ibridazione della sonda appaiono verdi (regione del gene ERBB2) e arancioni (CEN 17).

**Situazione normale:** nelle interfasi di cellule normali o di cellule senza amplificazioni che coinvolgono la regione del gene ERBB2, compaiono due segnali verdi e due segnali arancioni (vedere Fig. 2).

**Situazione aberrante:** nelle cellule con un'amplificazione della regione del gene ERBB2 si osserverà un aumento del numero di segnali verdi o di cluster di segnali verdi (vedere Fig. 2).

*I segnali sovrapposti possono apparire come segnali gialli.*



**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  $\leq 1$  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 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
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

##### 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 temperature; 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 $\mu\text{m}$

**Morfologia degradata**

Possibile causa	Azione
Il campione cellulare o tissutale non è stato fissato correttamente	Ottimizzare il tempo di fissazione e 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

**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**

- Baselga J, et al. (1999) *Semin Oncol* 26: 78-83.
- Brockhoff G, et al. (2016) *Histopathology* 69: 635-46.
- Brunello E, et al. (2012) *Histopathology* 60: 482-8.
- Brunner K, et al. (2010) *Anal Quant Cytol Histol* 32: 78-89.
- Coussens L, et al. (1985) *Science* 230: 1132-9.
- Ettl T, et al. (2012) *Br J Cancer* 106: 719-26.
- Hwang CC, et al. (2011) *Histopathology* 59: 984-92.
- Hynes NE & Stern DF (1994) *Biochim Biophys Acta* 1198: 165-84.
- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Moelans CB, et al. (2011) *Crit Rev Oncol Hematol* 80: 380-92.
- Park JB, et al. (1989) *Cancer Res* 49: 6605-9.
- Popescu NC, et al. (1989) *Genomics* 4: 362-6.
- Sassen A, et al. (2008) *Breast Cancer Res* 10: R2.
- Slamon DJ, et al. (1987) *Science* 235: 177-82.
- Voutsas IF, et al. (2013) *Int J Radiat Biol* 89: 319-25.
- Wilkinson DG: *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.
- Wolff AC, et al. (2013) *J Clin Oncol* 31: 3997-4013.

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 F/exSH® sono marchi registrati da ZytoVision GmbH.