



FlexISH

ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe

| | |
|-----------------------|---|
| REF Z-2166-50 |  5 (0.05 ml) |
| REF Z-2166-200 |  20 (0.2 ml) |

Para a detecção qualitativa de ampliações do gene humano ERBB2 e alfa-satélites do cromossoma 17 por hibridação *in situ* por fluorescência (FISH)



Dispositivo médico de diagnóstico *In Vitro*
de acordo com a diretiva EU 98/79/CE

1. Utilização pretendida

O FlexISH ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe (PL122) destina-se a ser utilizado para a detecção qualitativa de ampliações do gene humano ERBB2, assim como dos alfa-satélites do cromossoma 17 em amostras fixadas em formalina e impregnadas em parafina, nomeadamente de carcinomas da mama ou estômago, através de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH). A sonda destina-se a ser utilizada em combinação com os FlexISH-Tissue Implementation Kit (Prod. No. Z-2182-5/-20).

A interpretação dos resultados deve ser realizada no âmbito do contexto da história clínica do paciente relativamente a outros dados clínicos e patológicos por um profissional qualificado.

2. Relevância clínica

O gene ERBB2 (HER2; NEU) está localizado na região cromossômica 17q12 e codifica uma glicoproteína transmembranar de 185-190 kDa, p185, atuando como um recetor de fator de crescimento celular. A proteína p185 pertence ao subgrupo EGFR (recetor de fator de crescimento epidérmico) da superfamília RTK (recetor tirosina quinase), também incluindo EGFR (ERBB1), ERBB3 (HER3), e ERBB4 (HER4). A amplificação do proto-oncogene ERBB2, observada em aproximadamente 20% de todos os câncros da mama, tem sido correlacionada com um pior prognóstico da doença. Resultados semelhantes têm sido obtidos numa variedade de outras neoplasias malignas, p.e., cancro do ovário, cancro do estômago e carcinomas da glândula salivar

3. Princípio de teste

A técnica de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) permite a detecção e visualização de sequências específicas de ácidos nucleicos em amostras de células. Os fragmentos de ADN marcados por fluorescência, designados sondas FISH, e as respetivas cadeias-alvo de ADN nas amostras, são codenaturados e subseqüentemente renaturados durante a hibridação. Posteriormente, os fragmentos da sonda não específicos e não ligados são removidos através de fases de lavagem de estrigência.

Após a coloração de contraste do ADN com DAPI, os fragmentos da sonda hibridados são visualizados utilizando o microscópio de fluorescência equipado com filtros de excitação e emissão específicos para os fluorocromos com os quais os fragmentos da sonda FISH foram diretamente marcados.

4. Reagentes fornecidos

O FlexISH ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe é composto por:

- Polinucleótidos (~10 ng/ μ l) com marcação ZyGreen (excitação 503 nm/emissão 528 nm), dirigidos ao mapeamento de sequências alvo em 17q12-q21.1* (chr17:37,572,531-38,181,308) contendo o gene ERBB2 (ver Fig. 1).
- Polinucleótidos (~1.0 ng/ μ l) com marcação ZyOrange (excitação 547 nm/emissão 572 nm), dirigidos ao mapeamento de sequências alvo em 17p11.1-q11.1 específicas para a região centromérica alfa satélite D17Z1 do cromossoma 17.
- Tampão de hibridação baseado em formamida

* De acordo com o Conjunto do Genoma Humano GRCh37/hg19

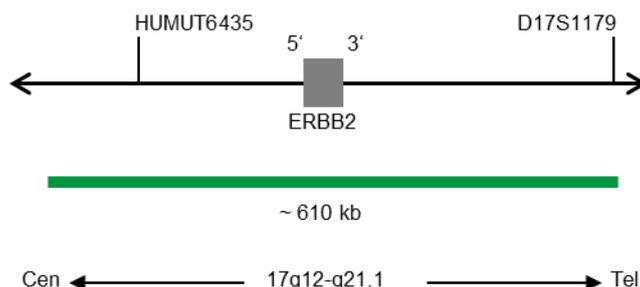


Fig. 1: ERBB2 Mapa da sonda (sem escala)

O FlexISH ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe está disponível em duas apresentações:

- Z-2166-50: 0.05 ml (5 reações de 10 μ l cada)
- Z-2166-200: 0.2 ml (20 reações de 10 μ l cada)

5. Materiais necessários mas não fornecidos

- FlexISH-Tissue Implementation Kit (Prod. No. Z-2182-5/-20)
- Amostras de controlo positivo e negativo
- Lâminas de microscópio, com carregamento positivo
- Banho-maria (37°C, 98°C)
- Hibridador ou placa quente
- Hibridador ou câmara de humidade na estufa de hibridação
- Pipetas ajustáveis (10 μ l, 25 μ l)
- Tinas de coloração
- Temporizador
- Termómetro calibrado
- Etanol ou álcool
- Xilol
- Água desionizada ou destilada
- Lamelas (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Cola, por ex.: Fixogum Rubber Cement (Prod. N.º. E-4005-50/-125) ou similar
- Microscópio de fluorescência devidamente calibrado (400-1000x)
- Óleo de imersão aprovado para microscopia de fluorescência
- Conjuntos de filtros adequados

6. Armazenamento e manuseamento

Armazenar a 2-8°C na posição vertical, protegido da luz solar. Utilizar protegido da luz. Repor as condições de armazenamento imediatamente após a utilização. Não utilizar reagentes após terminar a data de validade indicada no rótulo. O produto é estável até à data de validade indicada no rótulo, quando manuseado em conformidade.

7. Avisos e precauções

- A sonda não deve ser exposta à luz, especialmente luz forte, por um período prolongado de tempo, ou seja, todos os passos devem ser realizados, quando possível, numa sala escura e/ou utilizando recipientes resistentes à luz!
- Ler as instruções antes de utilizar!
- Não utilizar reagentes após terminar a data de validade!
- Este produto contém substâncias (em concentrações e volume reduzidos) que são nocivas para a saúde e potencialmente infecciosas. Evitar qualquer contacto direto com os reagentes. Tomar as medidas de proteção adequadas (utilizar luvas descartáveis, óculos de proteção e vestuário de laboratório)!
- Caso os reagentes entrem em contacto com a pele, lavar imediatamente com água abundante!
- Está disponível a ficha de dados de segurança, se solicitada, para utilização profissional.
- Não reutilizar os reagentes.
- Evitar a contaminação cruzada das amostras dado que poderá conduzir a resultados incorretos.
- Avoid cross-contamination of samples as this may lead to erroneous results.

Frases de risco e de aviso:

O componente que determina o risco é a formamida.



Perigo

| | |
|----------------|---|
| H319 | Provoca irritação ocular grave. |
| H351 | Suspeito de provocar cancro. |
| H360FD | Pode afetar a fertilidade. Pode afetar o nascituro |
| H373 | Pode afetar os órgãos após exposição prolongada ou repetida. |
| P201 | Pedir instruções específicas antes da utilização. |
| P260 | Não respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis. |
| P280 | Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. |
| P305+P351+P338 | SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: Enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar. |
| P308+P313 | EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: consulte um médico. |
| P337+P313 | Caso a irritação ocular persista: consulte um médico. |

8. Limitações

- Apenas para utilização em diagnóstico in vitro.
- Apenas para utilização profissional.
- A interpretação clínica de qualquer coloração positiva, ou a ausência desta, deve ser efetuada no contexto da histórica clínica, morfologia e outros critérios histopatológicos, assim como outros testes de diagnóstico. É da responsabilidade do patologista qualificado estar familiarizado com as sondas FISH, reagentes, painéis de diagnóstico e métodos utilizados para produzir a preparação da coloração. A coloração deve ser realizada num laboratório certificado e licenciado, sob a supervisão de um patologista responsável pela revisão das lâminas de coloração e que garanta a adequação dos controlos positivos e negativos.
- A coloração de amostras, especialmente, a intensidade do sinal e a coloração de fundo, depende do manuseamento e do processamento da amostra antes da coloração. A fixação, congelamento, descongelamento, lavagem, secagem, aquecimento ou microtomia inadequada ou a contaminação com outras amostras ou fluidos pode produzir perturbações ou falsos resultados. Os resultados inconsistentes podem resultar de variações nos métodos de fixação e inclusão, assim como de irregularidades inerentes à amostra.

- A sonda deve ser utilizada apenas para deteção dos loci descritos em 4 "Reagentes fornecidos"
- O desempenho foi validado utilizando os procedimentos descritos nestas instruções de utilização. As alterações a estes procedimentos podem afetar o desempenho e devem ser validadas pelo utilizador

9. Substâncias que podem interferir

Os eritrócitos presentes na amostra podem apresentar autofluorescência, o que afeta o reconhecimento do sinal.

Os seguintes fixadores são incompatíveis com o equipamento FISH:

- Fixador de Bouin
- Fixador B5
- Fixadores ácidos (ex.: ácido pírco)
- Fixador de Zenker
- Álcoois (quando utilizados individualmente)
- Cloreto de mercúrio
- Fixador de formaldeído/zinco
- Fixador de Hollande
- Formalina não tamponada

10. Preparação de amostras

Preparar as amostras de acordo com as instruções de utilização do [FlexISH-Tissue Implementation Kit](#).

11. Tratamento de preparação do dispositivo

O produto está pronto a usar. Não requer reconstituição, mistura ou diluição. Permitir que a sonda atinja a temperatura ambiente (18-25°C) antes de a utilizar, protegida da luz. Antes de abrir o frasco, misturar por vórtex e rotação invertida durante alguns instantes.

12. Procedimento do teste

Pré-tratamento da amostra

Efetuar o pré-tratamento da amostra de acordo com as instruções de utilização do [FlexISH-Tissue Implementation Kit](#).

Desnaturação e hibridação

1. Pipetar 10 µl da sonda para cada amostra pré-tratada.
2. Tapar a amostras com uma lamela de 22 mm x 22 mm (evitar bolhas de ar) e selar a lamela.

Recomendamos a utilização de cola (ex.: Fixogum) para a selagem.

3. Colocar as lâminas numa placa quente ou hibridador e desnaturar as amostras 10 min a 75°C.
4. Realizar a hibridação durante 2 h a 16 h (*overnight*) a 37°C, colocando as lâminas num hibridador ou numa estufa em câmara húmida.

É essencial que as amostras não sequem durante a etapa de hibridação.

Pós-hibridação

Realizar o processamento pós-hibridação (lavagem, coloração de contraste, microscopia de fluorescência) de acordo com as instruções de utilização do [FlexISH-Tissue Implementation Kit](#).

13. Interpretação dos resultados

Com a utilização dos filtros adequados, os sinais de hibridação da sonda surgem a verde (região gene ERBB2) e laranja (CEN 17).

Situação normal: Em interfases de células normais ou em células sem amplificação envolvendo a região do gene ERBB2, são visíveis dois sinais verdes e dois sinais laranja (ver Fig. 2).

Situação anormal: Em células com amplificação da região do gene ERBB2 é visível um aumento dos sinais específicos verdes ou aglomerados de sinais verdes (ver Fig. 2).

Sinais sobrepostos podem surgir como sinais amarelos.

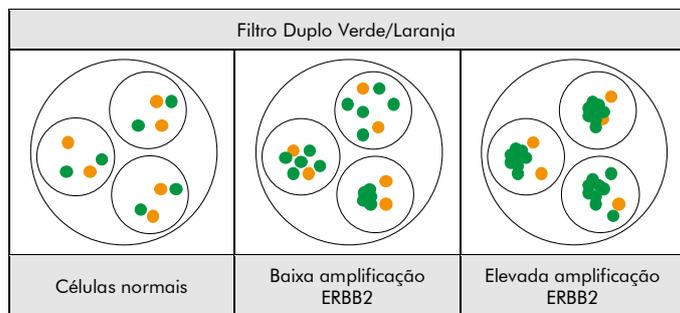


Fig. 2: Resultados esperados em núcleos normais e anormais

Poderá ser observada outra distribuição de sinal em algumas amostras anormais, que poderá resultar num padrão de sinal diferente do referido acima, indicando reorganizações variantes. Os padrões de sinal inesperados devem ser investigados.

Nota:

- Devido à cromatina descondensada, os sinais FISH individuais podem surgir como pequenos conjuntos de sinais. Assim, dois ou três sinais da mesma dimensão, separados por uma distância ≤ 1 ao diâmetro de um sinal, deverão ser considerados como um sinal.
- Não avaliar núcleos sobrepostos.
- Não contabilizar núcleos sobre-digeridos (reconhecidos pelas áreas escuras visíveis no interior dos núcleos)
- Não contabilizar núcleos com autofluorescência forte, o que afeta o reconhecimento de sinais.
- Um resultado negativo ou não específico pode ser causado por vários fatores (ver Capítulo 17).
- De forma a interpretar corretamente os resultados, o utilizador deve validar este produto antes da utilização em procedimentos de diagnóstico, de acordo com as diretivas nacionais e/ou internacionais.

14. Procedimentos do controlo da qualidade recomendados

De forma a monitorizar o desempenho correto das amostras processadas e dos reagentes, cada teste deve ser acompanhado de controlos internos e externos. Caso os controlos internos e/ou externos não demonstrem uma coloração adequada, os resultados das amostras dos pacientes devem ser considerados inválidos.

Controlo interno: células não neoplásicas na amostra que apresentem um padrão de sinal normal, por ex.: fibroblastos.

Controlo externo: amostras validadas de controlo positivo e negativo.

15. Características de desempenho

Precisão: a localização de hibridação da sonda foi avaliada em proliferações de metáfase de um indivíduo do género masculino de cariótipo normal. Em todas as amostras testadas a sonda hibridou somente nos loci esperados. Não foram observados sinais adicionais ou hibridações cruzadas. Assim, a precisão foi calculada como sendo de 100%.

Sensibilidade analítica: para avaliação da sensibilidade analítica, a sonda foi avaliada em proliferações de metáfase de indivíduos do género masculino de cariótipo normal. Todos os núcleos mostraram o padrão de sinais esperado em todas as amostras testadas. Assim, a sensibilidade analítica foi calculada como sendo de 100%.

Especificidade analítica: para avaliação da especificidade analítica, a sonda foi avaliada em proliferações de metáfase de indivíduos do género masculino de cariótipo normal. Em todas as amostras testadas, todos os sinais hibridaram apenas nos loci alvo esperados e em nenhum outro loci. Assim, a especificidade analítica foi calculada como sendo de 100%.

16. Eliminação

A eliminação de reagentes deve ser realizada de acordo com as normas locais.

17. Resolução de problemas

Qualquer desvio relativamente às instruções de utilização pode conduzir a resultados de coloração inferiores ou a ausência total de coloração.

Sinais fracos ou ausência de sinais

| Causa possível | Ação |
|--|---|
| Sem sequências-alvo disponíveis | Utilizar os controlos adequados |
| Amostra não fixada devidamente | Otimizar fixador e tempo de fixação |
| Pré-tratamento de calor, proteólise, desnaturação, hibridação ou temperatura de lavagem de estringência incorretas | Verificar a temperatura de todos os dispositivos técnicos utilizados com um termómetro calibrado |
| Pré-tratamento proteolítico executado de forma incorreta | Otimizar o tempo de incubação da pepsina, aumentar ou reduzir conforme necessário |
| Evaporação da sonda | Quando utiliza um hibridador, a utilização de faixas húmidas/tanques com água é obrigatória. Quando utiliza uma estufa de hibridação, é necessária a utilização de uma câmara de humidade. Adicionalmente, as lamelas devem estar perfeitamente seladas, por ex.: com Fixogum, para evitar a secagem da amostra durante a hibridação |
| Tampão de lavagem de estringência com concentração demasiado baixa | Verificar a concentração do tampão de lavagem de estringência |
| Soluções de desidratação antigas | Preparar soluções de desidratação novas |
| Microscópio de fluorescência incorretamente ajustado | Ajustar corretamente |
| Conjuntos de filtros inadequados | Utilizar conjuntos de filtros adequados para os fluorocromos da sonda. <i>Os conjuntos de filtros de passagem de banda tripla permitem menos luz, comparados com os conjuntos de filtros de passagem de banda dupla ou passagem simples. Consequentemente, os sinais podem surgir mais fracos utilizando os conjuntos de filtros de passagem de banda tripla</i> |
| Dano causado por exposição das sondas/fluoróforos | Realizar a hibridação e as fases de lavagem numa sala escura |

Sinais de hibridação cruzada; perturbações de fundo

| Causa possível | Ação |
|--|--|
| Desparafinação incompleta | Utilizar soluções novas; verificar a duração da desparafinação |
| Pré-tratamento proteolítico demasiado forte | Reduzir o tempo de incubação da pepsina |
| Volume da sonda por área demasiado elevado | Reduzir o volume da sonda por secção/área, distribuir a sonda por gotas para evitar a concentração local |
| Lâminas arrefecidas à temperatura ambiente antes da hibridação | Transferir rapidamente as lâminas para 37°C |
| Tampão de lavagem de estringência demasiado concentrado | Verificar a concentração do tampão de lavagem de estringência |
| Temperatura de lavagem após a hibridação demasiado baixa | Verificar a temperatura; aumentar se necessário |

| | |
|--|---|
| Desidratação das amostras entre as fases de incubação individual | Evitar a desidratação selando as lâminas e realizando a incubação num ambiente húmido |
|--|---|

Núcleos sobrepostos

| | |
|--|---|
| Causa possível | Ação |
| Espessura inadequada das secções de tecido | Efetuar secções de micrótomo de 2-4 μm . |

Morfologia do tecido degradada

| | |
|--|---|
| Causa possível | Ação |
| Amostra não fixada devidamente | Otimizar fixador e tempo de fixação |
| Pré-tratamento proteolítico executado de forma incorreta | Otimizar o tempo de incubação da pepsina, aumentar ou reduzir conforme necessário |
| Secagem insuficiente antes da aplicação da sonda | Prolongar a secagem ao ar |

Amostra desliza da lâmina

| | |
|---|---|
| Causa possível | Ação |
| Revestimento inadequado da lâmina | Utilizar lâminas adequadas |
| Pré-tratamento proteolítico demasiado forte | Reduzir o tempo de incubação da pepsina |

Coloração de contraste fraca

| | |
|--|--|
| Causa possível | Ação |
| Solução DAPI de baixa concentração | Utilizar <u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (Prod. No. MT-0008-0.8) |
| Tempo de incubação da solução DAPI demasiado curto | Ajustar o tempo de incubação da solução DAPI |

18. Literatura

- 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.

Os nossos especialistas estão disponíveis para responder às suas questões.

Contacte helptech@zytovision.com



ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/ Alemanha
Telefone: +49 471 4832-300
Fax: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
E-mail: info@zytovision.com

Marcas registadas:

ZytoVision® e F/exSH® são marcas registadas da ZytoVision GmbH.