



ZytoMation

ERBB2/CEN 17 Dual Color FISH Probe

REF Z-2292-5.1ML

Σ Até 20 (5.1 ml)

Para a detecção qualitativa de amplificações do gene MDM2 humano e satélites alfa do cromossoma 12 por hibridação *in situ* fluorescente (FISH) em sistemas Bond automatizados

4250380P373RF



Dispositivo médico de diagnóstico in vitro

de acordo com o RIV (UE) 2017/746

1. Objectivo pretendido

A sonda ZytoMation ERBB2/CEN 17 Dual Color FISH Probe (PL246) destina-se a ser utilizada para a detecção qualitativa de amplificações que envolvam o gene humano ERBB2, bem como para a detecção de satélites alfa do cromossoma 17 em amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina, tais como cancro da mama e cancro da junção gástrica/gastroesofágica, por hibridação *in situ* por fluorescência (FISH). A sonda destina-se a ser utilizada em combinação com o Bond FISH Kit (DS9636) no sistema automatizado Bond-MAX ou Bond III da Leica Biosystems.

O produto destina-se apenas a utilização profissional. Todos os testes que utilizam o produto devem ser realizados num laboratório de patologia anatómica certificado e licenciado, sob a supervisão de um profissional humano, por pessoal qualificado.

A sonda destina-se a ser utilizada como auxiliar no diagnóstico diferencial do cancro da mama e do cancro da junção gástrica/gastroesofágica e não devem ser iniciadas medidas terapêuticas com base apenas no resultado do teste.

2. Princípio do teste

A técnica de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) permite a detecção e visualização de sequências específicas de ácidos nucleicos em preparações celulares. Os fragmentos de ADN marcados com fluorescência, designados por sondas FISH, e as suas cadeias de ADN alvo complementares nas preparações são co-desnaturados e, subsequentemente, deixados em contacto durante a hibridação. Em seguida, os fragmentos de sonda inespecíficos e não ligados são removidos através de passos de lavagem rigorosos. Após a coloração de contraste do ADN com DAPI, os fragmentos de sonda hibridizados são visualizados utilizando um microscópio de fluorescência equipado com filtros de excitação e emissão específicos para os fluorocromos com os quais os fragmentos de sonda FISH foram directamente marcados.

3. Reagentes fornecidos

A ZytoMation ERBB2/CEN 17 Dual Color FISH Probe é composto por:

- Polinucleótidos marcados com ZyGreen (excitação 503 nm/emissão 528 nm) (~5,0 ng/μl), que têm como alvo sequências mapeadas em 17q12-q21.1* (chr17:37,572,531-38,181,308) que albergam a região do gene ERBB2 (ver Fig. 1).
- Polinucleótidos marcados com ZyOrange (excitação 547 nm/emissão 572 nm) (~0,2 ng/μl), que visam sequências mapeadas em 17p11.1-q11.1 específicas para a região centromérica do satélite alfa D17Z1 do cromossoma 17 (ver Fig. 1).
- Tampão de hibridação à base de formamida

*De acordo com a montagem do genoma humano GRCh37/hg19

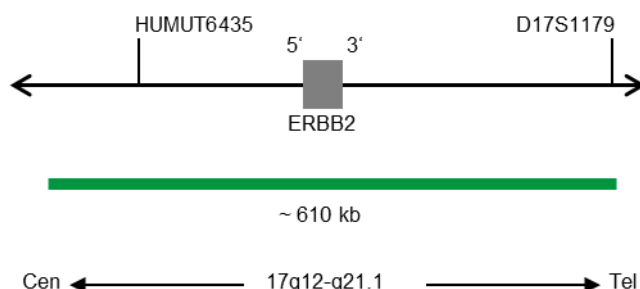


Fig. 1: SPEC ERBB2 Mapa da sonda (não à escala)

A ZytoMation ERBB2/CEN 17 Dual Color FISH Probe está disponível num único tamanho:

- Z-2292-5.1ML: 5,1 ml (até 20 reacções de 240 μl cada)

4. Materiais necessários mas não fornecidos

- Sistema Bond-MAX ou Bond-III da Leica Biosystems
- Bond FISH Kit (DS9636)
- Bond Epitope Retrieval Solution 2 (AR9640)
- Bond Enzyme Pretreatment Kit (AR9551)
- DAPI/DuraTect-Solution (MT-0007-0.8)
- Amostras de controlo positivo e negativo
- Lâminas de microscópio, carregadas positivamente
- Pipetas ajustáveis (20 μl, 1000 μl)
- Manchar frascos ou banheiras
- Temporizador
- Etanol ou álcool reagente
- Água desionizada ou destilada
- Lamelas (24 mm x 50 mm)
- Microscópio de fluorescência com manutenção adequada (400-1000x)
- Óleo de imersão aprovado para microscopia de fluorescência
- Conjuntos de filtros adequados
- Para mais informações sobre os materiais necessários mas não fornecidos, consultar as instruções de utilização do respectivo sistema de coloração totalmente automatizado.

5. Armazenamento e manuseamento

Armazenar a 2-8 °C numa posição vertical protegida da luz.

Utilizar ao abrigo da luz. Antes de abrir o frasco para injectáveis, agitar o líquido. Voltar às condições de armazenamento imediatamente após a utilização. Não utilizar os reagentes para além do prazo de validade indicado no rótulo. O produto é estável até ao prazo de validade indicado no rótulo quando manuseado em conformidade.

6. Avisos e precauções

- Ler o manual de instruções antes da utilização!
- Não utilizar os reagentes após o prazo de validade ter sido atingido!
- A sonda não deve ser utilizada em procedimentos FISH manuais!
- Este produto contém substâncias (em baixas concentrações e volumes) que são nocivas para a saúde e potencialmente infecciosas. Evitar qualquer contacto directo com os reagentes. Tomar as medidas de protecção adequadas (utilizar luvas descartáveis, óculos de protecção e vestuário de laboratório)!



- Comunicar qualquer incidente grave relacionado com o produto ao fabricante e à autoridade competente, de acordo com os regulamentos locais!
- Se os reagentes entrarem em contacto com a pele, lavar imediatamente a pele com água abundante!
- Está disponível uma ficha de dados de segurança a pedido do utilizador profissional.
- Não reutilizar os reagentes, excepto se a reutilização for explicitamente permitida!
- Evitar a contaminação cruzada das amostras, uma vez que tal pode conduzir a resultados erróneos.
- A sonda não deve ser exposta à luz, especialmente à luz forte, durante um longo período de tempo, ou seja, todos os passos devem ser efectuados, sempre que possível, no escuro e/ou utilizando recipientes à prova de luz.

Indicações de perigo e de precaução:

O componente determinante para o perigo é a formamida.



Perigo

H351	Suspeito de provocar cancro.
H360FD	Pode afectar a fertilidade. Pode afectar o feto.
H373	Pode afectar os órgãos após exposição prolongada ou repetida.
P201	Obter instruções especiais antes da utilização.
P202	Não manusear até que todas as precauções de segurança tenham sido lidas e compreendidas.
P260	Não respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/spray.
P280	Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial.
P308+P313	Em caso de exposição ou preocupação: Obter aconselhamento/atenção médica.
P405	Loja fechada.

7. Limitações

- Para utilização *em diagnóstico in vitro*.
- Apenas para uso profissional.
- Apenas para utilização no sistema Bond-MAX ou Bond-III totalmente automatizado (Leica).
- A interpretação clínica de qualquer coloração positiva, ou da sua ausência, deve ser efectuada no contexto da história clínica, da morfologia, de outros critérios histopatológicos, bem como de outros testes de diagnóstico. É da responsabilidade de um profissional qualificado estar familiarizado com as sondas FISH, os reagentes, os painéis de diagnóstico e os métodos utilizados para produzir a preparação corada. A coloração deve ser efectuada num laboratório certificado e licenciado, sob a supervisão de um profissional responsável pela revisão das lâminas coradas e pela garantia da adequação dos controlos positivos e negativos.
- A coloração de amostras, especialmente a intensidade do sinal e a coloração de fundo, depende do manuseamento e processamento da amostra antes da coloração. A fixação, congelação, descongelação, lavagem, secagem, aquecimento, seccionamento ou contaminação com outras amostras ou fluidos inadequados podem produzir artefactos ou resultados falsos. Os resultados inconsistentes podem resultar de variações nos métodos de fixação e incorporação, bem como de irregularidades inerentes à amostra.
- A sonda deve ser utilizada apenas para a detecção dos loci descritos no capítulo 3. "Reagentes fornecidos".
- O desempenho foi validado utilizando o sistema Bond-MAX totalmente automatizado (Leica) e os procedimentos descritos nas presentes instruções de utilização. As modificações a estes procedimentos podem alterar o desempenho como IVD-CE e têm de ser validadas pelo utilizador. Este IVD só é certificado como CE quando utilizado de acordo com as instruções descritas neste manual para utilização no âmbito da utilização prevista.

8. Substâncias interferentes

Os glóbulos vermelhos presentes na amostra podem apresentar autofluorescência, o que dificulta o reconhecimento do sinal.

Os seguintes fixadores são incompatíveis com o FISH:

- Fixador de Bouin
- Fixador B5
- Fixadores ácidos (por exemplo, ácido pícrico)
- Fixador de Zenker
- Álcoois (quando utilizados isoladamente)
- Cloreto de mercúrio
- Fixador de formaldeído/zinco
- fixador de Hollande
- Formalina não tamponada

9. Preparação de amostras

Recomendações:

- Fixação em formalina tamponada neutra a 10% durante 24 horas à temperatura ambiente (18-25 °C).
- Tamanho da amostra ≤ 0,5 cm³.
- Utilizar parafina de qualidade superior.
- A incorporação deve ser efectuada a temperaturas inferiores a 65 °C.
- Preparar secções de micrótomo de 2-4 µm.
- Utilizar lâminas de microscópio com carga positiva.
- Fixar durante 2-16 h a 50-60 °C.

10. Tratamento de preparação do dispositivo

Não é necessária qualquer reconstituição, mistura ou diluição. Colocar a sonda à temperatura ambiente (18-25 °C) antes de utilizar, proteger da luz. Antes de abrir o frasco, misturar em vórtex e agitar brevemente.

11. Procedimento do teste

A ZytoMation ERBB2/CEN 17 Dual Color FISH Probe destina-se a ser utilizado num sistema Bond-MAX ou Bond-III totalmente automatizado, em combinação com os respectivos kits e protocolos de FISH. Para mais informações, consultar as respectivas instruções de utilização do sistema utilizado.

11.1 Configuração de lâminas no sistema Bond-MAX ou Bond-III totalmente automatizado

Definir os seguintes passos do protocolo no menu de configuração de lâminas:

Coloração:	*FISH Protocol D
Preparação:	*Dewax
HIER:	set up as described in step 1 below
Enzima:	set up as described in step 2 below
Desnaturação:	*Denaturation (10min)
Hibridização:	*ISH Hybridization (12Hr)

Pré-tratamento de amostras

Efectuar o pré-tratamento das amostras (desparafinagem, proteólise) de acordo com as respectivas instruções de utilização do sistema de coloração totalmente automatizado.

Dependendo da amostra, poderão ser necessários ajustamentos ao protocolo. O utilizador deve efectuar uma validação dos protocolos que se desviam dos protocolos recomendados.

1. Pré-tratar as amostras com a Bond Epitope Retrieval Solution 2 durante 25 min a 100°C.

Para o protocolo *HIER*, criar um novo protocolo conforme descrito nas respectivas instruções de utilização do sistema automatizado Bond-MAX/Bond-III. Selecionar o protocolo para o passo de protocolo "HIER" em Slide Setup..

2. Pré-tratar as amostras com BOND Enzyme Dilution (Diluição de enzimas BOND) a 37°C.

Para a digestão enzimática, escolha um protocolo de acordo com as condições pré-validadas pelo utilizador, dependendo da amostra e das condições para *HIER*, desnaturação e hibridização. Seleccione o protocolo para o passo de protocolo "Enzyme" (Enzima) em Slide Setup (Configuração de lâminas).



Desnaturação e hibridação

1. Definir a desnaturação das amostras para 10 min a 95°C.

Selecione o protocolo predefinido *“Denaturation (10min)”* para o passo do protocolo *“Desnaturação”* em *Slide Setup*.

2. Definir a hibridação das amostras para 12 h a 37°C.

Selecione o protocolo predefinido *“ISH Hybridization (12Hr)”* para o passo do protocolo *“Hybridization”* em *Slide Setup*.

11.2 Corrida de coloração

1. Carregar as lâminas, a sonda de FISH, a diluição da enzima e o **BOND FISH Kit** no sistema de acordo com as instruções de utilização.
2. Quando a coloração estiver concluída, retirar as lâminas do aparelho. Proteger as lâminas da luz.

11.3 Pós-hibridação e detecção

1. Desidratar as lâminas com etanol a 70%, 90% e 100% durante 1 min
2. Secar as amostras ao ar livre no escuro.
3. Pipetar 20 µl de **DAPI/DuraTect-Solution (MT7)** para as lâminas. Para evitar a formação de bolhas, cobrir as amostras com uma lamela (24 mm x 50 mm). Incubar no escuro durante 15 minutos.

A utilização de uma ponta de pipeta que tenha sido cortada para aumentar o tamanho da abertura pode facilitar o processo de pipetagem. Evitar a exposição prolongada à luz.

4. Armazenar a lâmina no escuro. Para períodos de armazenamento mais longos, isto deve ser efectuado a 2-8 °C.
5. A avaliação do material da amostra é efectuada por microscopia de fluorescência.

12. Interpretação dos resultados

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

Situação normal: Nas interfases de células normais ou de células sem uma amplificação que envolva a região do gene ERBB2, aparecem dois sinais verdes e dois sinais cor-de-laranja (ver Fig. 2).

Situação anormal: Nas células com uma amplificação da região do gene ERBB2, observa-se um aumento do número de sinais verdes ou de aglomerados de sinais verdes (ver Fig. 2).

Os sinais que se sobrepõem podem aparecer como sinais amarelos.

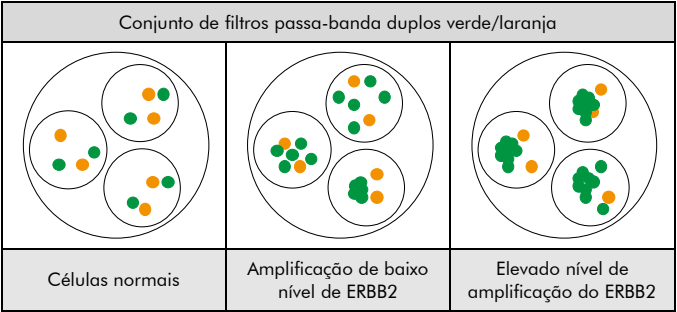


Fig. 2: Resultados esperados em núcleos normais e anormais.

Nalgumas amostras anormais podem ser observados outros padrões de sinais para além dos acima descritos. Estes padrões de sinais inesperados devem ser objecto de uma investigação mais aprofundada.

Atenção:

- Devido à cromatina descondensada, os sinais individuais de FISH podem aparecer como pequenos grupos de sinais. Assim, dois ou três sinais do mesmo tamanho, separados por uma distância ≤ 1 diâmetro de sinal, devem ser contados como um sinal.
- Não avaliar núcleos sobrepostos.
- Não contar os núcleos demasiado digeridos (reconhecidos por áreas escuras visíveis no interior dos núcleos).

- Não contar núcleos com forte auto-fluorescência, que dificulta o reconhecimento do sinal.
- Um resultado negativo ou inespecífico pode ser causado por vários factores (ver capítulo 16 "Resolução de problemas").
- Para interpretar correctamente os resultados, o utilizador deve validar este produto antes de o utilizar em procedimentos de diagnóstico, de acordo com as directrizes nacionais e/ou internacionais.

13. Procedimentos de controlo de qualidade recomendados

A fim de monitorizar o desempenho correcto das amostras processadas e dos reagentes de teste, cada ensaio deve ser acompanhado de controlos internos e externos. Se os controlos internos e/ou externos não demonstrarem uma coloração adequada, os resultados com espécimes de doentes devem ser considerados inválidos.

Controlo interno: Células não neoplásicas dentro da amostra que exibem um padrão de sinal normal, por exemplo, fibroblastos.

Controlo externo: Amostras de controlo positivo e negativo validados.

14. Características de desempenho

14.1 Desempenho analítico

O desempenho da sonda foi determinado por comparação com a sonda FISH correspondente aprovada pelo IVD.

Sensibilidade analítica:	100% (95% CI 98.5 – 100.0)
Especificidade analítica:	100% (95% CI 97.0 – 100.0)

14.2 Desempenho clínico

Sensibilidade diagnóstico:	Cancro da mama: 93% (95% CI 91.0 – 95.0) based on a bivariate model Cancro gástrico e cancro da junção gastroesofágica: 88% (95% CI 74.0 – 95.0) based on a bivariate model
Especificidade diagnóstico:	Cancro da mama: 98% (95% CI 97.0 – 99.0) based on a bivariate model Cancro gástrico e cancro da junção gastroesofágica: 95% (95% CI 92.0 – 97.0) based on a bivariate model

15. Eliminação

A eliminação dos reagentes deve ser efectuada de acordo com os regulamentos locais.

16. Resolução de problemas

Qualquer desvio das instruções de funcionamento pode conduzir a resultados de coloração inferiores ou à ausência de coloração. Para mais informações, consultar www.zytovision.com.

Sinais fracos ou ausência de sinais

Causa possível	Ação
Amostra de célula ou tecido não fixada correctamente	Optimizar o tempo de fixação e o fixador
Pré-tratamento proteolítico não efectuado correctamente	Optimizar a concentração da enzima e o tempo de incubação, aumentar ou diminuir se necessário
Utilização de conjuntos de filtros inadequados	Utilizar conjuntos de filtros adequados para os fluorocromos da sonda. <i>Os conjuntos de filtros de passagem de banda tripla fornecem menos luz do que os conjuntos de filtros de passagem de banda simples ou dupla. Consequentemente, os sinais podem parecer mais fracos utilizando estes conjuntos de filtros de passagem de banda tripla</i>

Sinais de hibridação cruzada; perturbações de fundo

Causa possível	Acção
Pré-tratamento proteolítico demasiado forte	Reduzir a concentração da enzima ou o tempo de incubação

Morfologia degradada

Causa possível	Acção
A amostra de células ou tecidos não foi fixada correctamente	Optimizar o tempo de fixação e o fixador
Pré-tratamento proteolítico não efectuado correctamente	Optimizar a concentração da enzima ou o tempo de incubação, diminuir se necessário
O pré-tratamento térmico não foi efectuado correctamente	Optimizar o pré-tratamento térmico

Núcleos sobrepostos

Causa possível	Acção
Espessura inadequada das secções de tecido	Preparar secções de micrótomo de 2-4 µm

A amostra flutua para fora da lâmina

Causa possível	Acção
Secagem insuficiente da secção de tecido	Ajustar o tempo para secar suficientemente os tecidos antes da coloração
Fixação em formalina que não foi correctamente tamponada com neutro	Utilizar formalina neutra tamponada adequada de elevada qualidade

Contracoloração fraca

Causa possível	Acção
Solução DAPI pouco concentrada	Em vez disso, utilizar <u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (N.º de produto MT-0008-0.8)
Tempo de incubação do DAPI demasiado curto	Ajustar o tempo de incubação do DAPI

17. Literatura

- Brockhoff G, et al. (2016) *Histopathology* 69: 635-646.
- Gajaria PK, et al. (2020) *Indian J Pathol Microbiol* 63: 1
- Hwang CC, et al. (2011) *Histopathology* 59: 984-992.
- Holten-Rossing H, et al. (2015) *Breast Cancer Res Treat* 152: 367-375.
- Jensen SG, et al. (2020) *Apmis* 128: 573-582.
- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Köseoglu RD, et al. (2019) *Eur J Breast Health* 15: 43.
- Nielsen SL, et al. (2017) *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 25: 320-328.
- Pfarr N, et al. (2017) *Genes Chromosomes Cancer* 56: 255-265.
- Schindlbeck C, et al. (2010) *J Cancer Res Clin Oncol* 136: 1029-1037.
- Staněk L, et al. (2014) *Mol Med Rep* 10: 2669-2674.
- Tabarestani S, et al. (2015) *Asian Pac J Cancer Prev* 16: 7997-8002.
- Wilkinson DG: In Situ Hybridization, A Practical Approach, *Oxford University Press* (1992) ISBN 0 19 963327 4.

18. Revisão
www.zytovision.com

Consultar www.zytovision.com para obter as instruções de utilização mais recentes, bem como as instruções de utilização em diferentes línguas.

Os nossos especialistas estão disponíveis para responder às suas perguntas.

Contactar helptech@zytovision.com

Para um resumo da segurança e do desempenho, consultar www.zytovision.com.



ZytoVision GmbH

Fischkai 1

27572 Bremerhaven/ Alemanha

Telefone: +49 471 4832-300

Fax: +49 471 4832-509

www.zytovision.com

Correio electrónico: info@zytovision.com

Marcas registadas:

ZytoVision® e ZytoMation® são marcas comerciais da ZytoVision GmbH.