

Identification du produit

Cat. n°	Description
47862	ImPath HER2 FISH

Utilisation prévue

ImPath HER2 FISH (cat. n° 47862) est conçu pour être utilisé en association avec le kit de détection ImPath ISH (cat. n° 44996) afin de relever la présence du gène humain ERBB2 (HER2) et du chromosome 17 alpha satellite dans des échantillons de tissus ou de cellules fixés formol et enrobés de paraffine par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) sur ImPath 36 (cat. n° 43965).

L'interprétation des résultats doit être effectuée par un pathologiste qualifié, dans le contexte des antécédents cliniques du patient et en tenant compte d'autres données cliniques et pathologiques du patient.

Récapitulatif et principe

Le gène ERBB2 (HER2 et NEU) est situé dans la région chromosomiale 17q12 et code le récepteur du facteur de croissance cellulaire p185.

L'amplification du proto-oncogène ERBB2, observée dans 20% environ de tous les échantillons de cancer du sein, a été rattachée à un mauvais pronostic de la maladie. Des résultats semblables ont été obtenus par un ensemble de néoplasmes malins, comme le cancer des ovaires, le cancer de l'estomac et les carcinomes des glandes salivaires.

Principes et procédures

La présence de certaines séquences d'acides nucléiques dans les cellules ou tissus peut être relevée par l'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH) à l'aide de sondes d'ADN marquées par des colorants fluorescents. L'hybridation est la formation double des séquences présentes dans l'objet de l'essai et la sonde spécifique qui peut être affichée à l'aide de la microscopie par fluorescence, en utilisant des filtres adéquats. ImPath HER2 FISH contient des polynucléotides marqués en orange (excitation à 547 nm et émission à 572 nm, semblables à la rhodamine), qui ciblent le gène ERBB2, et des polynucléotides marqués en vert (excitation à 503 nm et émission à 528 nm, semblable au FITC), qui ciblent les séquences alpha satellites du centromère du chromosome 17 (D17Z1).

Matériel et méthodes

Réactifs fournis

Le produit indiqué est une sonde FISH prête à l'emploi conçue pour être utilisée avec ImPath 36. Le flacon est doté d'une étiquette RFID qui sera lue par ImPath 36 afin de fournir les informations liées au produit et au lot.

Reconstitution, mélange, dilution

Le produit est prêt à l'emploi. Aucune reconstitution, aucun mélange ni aucune dilution ne sont nécessaires.

Les différences de traitement du tissu et de procédures techniques au sein du laboratoire peuvent produire des variations significatives et donc requérir un usage régulier des contrôles (voir le chapitre consacré aux procédures de contrôle qualité).



42 life sciences GmbH & Co. KG
Fischkai 1
27572 Bremerhaven
Allemagne

N° DOC

3^e novembre 2015
FR REV 1.2

Distribué par :
A.Menarini Diagnostics S.r.l.
Via Sette Santi, 3
50131 Firenze
Italia

France :
MENARINI Diagnostics France
S.A.R.L.
3 - 5, rue du Jura
BP 70531
94633 RUNGIS CEDEX

Belgique :
Menarini Diagnostics Benelux S.A.
Belgicastraat,4,
1930 Zaventem



Dispositif de diagnostic médical *in vitro*
en vertu de la directive UE 98/79/CE

Matériel et réactifs nécessaires non fournis

Les réactifs et le matériel suivants peuvent être nécessaires pour la coloration, mais ils ne sont pas fournis avec la sonde FISH.

1. Tissus de contrôle positif et négatif
2. Lames de microscope à charge positive
3. Etuve de séchage en mesure de maintenir une température de 50-60 °C
4. Cuvettes ou bains de coloration
5. Compteur horaire
6. Éthanol ou alcool réactif
7. ImPath ISH Detection Kit (cat. n° 44996)
8. DAPI/Antifade*
9. Lame de couverture en verre
10. Microscope par fluorescence (400-1000x)
11. Jeu de filtres adéquats

*Recommandé pour l'usage : ImPath DAPI (cat. n° 47861)

Conservation et manipulation

Conserver à 2-8 °C en position verticale. Conserver à l'abri de la lumière.

Agiter le liquide avant d'ouvrir le flacon.

Pour assurer la bonne libération du réactif et la stabilité de la sonde FISH, le réactif doit être conservé dans les conditions définies ci-dessus immédiatement après l'utilisation.

Lorsqu'il est conservé correctement, le réactif est stable jusqu'à la date indiquée sur l'étiquette. Ne pas utiliser le réactif au-delà de cette date de péremption pour la méthode de conservation prescrite.

Récolte de l'échantillon et préparation à l'analyse

Les tissus employés lors des procédures habituelles, fixés par du formol neutre tamponné et enrobés de paraffine, peuvent être utilisés avec la sonde FISH. Il est recommandé d'utiliser un fixateur de formol neutre tamponné à 10%.

Chaque élément doit être coupé à l'épaisseur appropriée (3-5 µm environ) et placé sur une lame de verre à charge positive. Chauffer les lames contenant les échantillons de tissu pendant 2 heures au moins (mais pas plus de 16 heures) dans un four à 50-60 °C.

Mises en garde et précautions

1. Adopter toutes les précautions raisonnables lors de la manipulation des réactifs. Utiliser des gants jetables et une blouse de laboratoire lors de la manipulation de matériaux qui pourraient être cancérigènes ou toxiques.
2. Éviter que les réactifs n'entrent en contact avec les yeux et les muqueuses. Si les réactifs entrent en contact avec des régions sensibles, rincer abondamment à l'eau.
3. Manipuler tous les échantillons de tissu et de cellule, ainsi que tout le matériel qui entre en contact avec ceux-ci, comme s'ils comportaient un danger biologique. Adopter les précautions de rigueur lors de leur mise au rebut. Ne jamais pipeter avec la bouche.
4. Éviter la contamination microbienne des réactifs, car cela pourra provoquer des résultats erronés.
5. L'utilisateur doit optimiser les temps et températures d'incubation de la solution de pepsine.

6. Le réactif prêt à l'emploi est prédilué de manière optimale. Une dilution supplémentaire pourrait porter préjudice à la qualité de la coloration.
7. Ce produit est classé comme une substance dangereuse. Pour de plus amples détails, veuillez consulter la fiche des données de sécurité du matériel.
8. L'utilisateur doit s'assurer que toutes les conditions de stockage autres que celles qui sont indiquées dans l'opuscule fourni dans l'emballage sont adéquates.
9. Comme pour tous les produits d'origine biologique, appliquer les procédures de manipulation de rigueur.

Mode d'emploi

ImPath HER2 FISH (cat. n° 47862) est conçu pour être utilisé en association avec le kit de détection ImPath ISH (cat. n° 44996) sur ImPath 36 (cat. n° 43965).

Protocole ISH ImPath :

ImPath ISH Detection Kit (cat. n° 44996)

Étapes du protocole :

Procédure pas à pas

1. Suivre les instructions de ImPath 36 afin de préparer le réactif à l'utilisation sur l'instrument.
2. Placer les lames, la sonde FISH et le kit de détection ImPath ISH sur l'instrument ImPath 36 en suivant les consignes d'utilisation de ImPath 36.
Régler le temps de digestion de la pepsine selon les conditions validées au préalable par l'utilisateur.
3. Commencer le cycle.
4. Au terme du cycle de coloration, retirer les lames de l'instrument et les déshydrater à l'aide de bains successifs de 1 minute dans des solutions d'éthanol à 70 %, 90 % et 100 %.
5. Sécher les échantillons à l'air dans l'obscurité.
6. Monter une solution DAPI/Antifade (il est recommandé d'utiliser ImPath DAPI (cat. n° 47861)). Poser la lamelle et incuber dans l'obscurité pendant 15 min.
7. Conserver les lames dans l'obscurité à 2-8 °C.

Procédures de contrôle qualité

Contrôle de tissu positif

Toujours examiner un contrôle de tissu positif à chaque cycle de procédure de coloration. Ce tissu peut contenir des cellules de coloration amplifiées (positives) et non amplifiées (négatives). Il sert de tissu de contrôle positif et négatif.

Les contrôles de tissu positif doivent être utilisés pour surveiller les bonnes performances des tissus examinés et des réactifs de l'essai, non pas comme aide à la définition d'un diagnostic spécifique des échantillons des patients. Si les contrôles de tissu positifs n'affichent pas la coloration positive correcte, les résultats des échantillons du patient doivent être considérés non valables.

Contrôle de tissu négatif

Utiliser le tissu qui a été utilisé pour le contrôle de tissu positif afin de procéder au contrôle de tissu négatif.

Les cellules non néoplasiques de la lame/section tumorale, comme par exemple les fibroblastes, cellules épithéliales et/ou lymphocytes, servent de contrôle interne et doivent afficher le pattern de signal normal attendu. Ils peuvent alors servir de contrôle de tissu négatif. Si ces cellules n'affichent pas la coloration correcte, les résultats de l'échantillon correspondants doivent être considérés non valables.

Divergences inexplicables

Si des divergences inexplicables des contrôles surviennent, informer immédiatement le service clientèle A. Menarini Diagnostics. Si le contrôle de la qualité ne répond pas aux spécifications, les résultats obtenus pour le patient ne sont pas valables. Se reporter au chapitre Résolution des problèmes de l'opuscule présent. Identifier et résoudre le problème, puis recommencer la procédure depuis le début.

Interprétation des résultats

Lorsqu'ils sont employés avec les jeux de filtres adéquats, les signaux d'hybridation du gène ERBB2 sont oranges et les signaux d'hybridation des séquences satellites alpha du centromère du chromosome 17 sont verts. Dans les interphases des cellules normales ou des cellules sans aberration du chromosome 17, deux signaux ERBB2 et deux signaux du chromosome 17 sont affichés. Dans les cellules comportant une amplification du gène, un plus grand nombre de signaux spécifiques du gène ou des ensembles de signaux sont visibles.

Veiller à ne pas tenir compte des cellules qui se chevauchent afin d'éviter les résultats erronés, par exemple une amplification des gènes. La chromatine décondensée provoque des signaux FISH qui peuvent ressembler à de petits ensembles de signaux. Ainsi, deux ou trois signaux de la même taille, séparés par une distance égale ou inférieure au diamètre d'un signal, doivent être considérés comme un seul signal.

Les artefacts de tissu, comme la présence de tissu sur la limite, de tissu rétracté ou écrasé, doivent être exclus de l'examen. Ne pas analyser le tissu du patient si les contrôles ne correspondent pas aux attentes. Si l'objet présente une forte autofluorescence, le rejeter. Une digestion excessive est reconnaissable par les zones foncées visibles dans les noyaux. Dans ce cas, ne pas procéder à l'évaluation.

Un résultat négatif ou non spécifique peut être provoqué par différents facteurs (voir le chapitre Résolution des problèmes de cet opuscule).

Limites

1. Le réactif est conçu « exclusivement pour un usage professionnel », car l'hybridation *in situ* par fluorescence est un processus constitué de différentes phases qui requièrent une formation spécialisée afin de sélectionner de manière appropriée les réactifs, les tissus, la fixation, l'analyse, la préparation de la lame FISH et l'interprétation des résultats de la coloration.
2. Uniquement pour usage en laboratoire.
3. Uniquement pour usage diagnostique *in vitro*.
4. La coloration du tissu, en particulier l'intensité du signal et la coloration de fond, dépendent de la manipulation et du traitement du tissu avant la coloration. Une fixation inadéquate, la congélation, la décongélation, le lavage, le séchage, la chauffe, le sectionnement ou la contamination avec d'autres tissus ou fluides peuvent produire des artefacts ou des résultats erronés. Les résultats incohérents peuvent être dus à des variations de la fixation et des méthodes d'enrobage, ainsi qu'à des irrégularités du tissu.
5. Une contre-coloration excessive ou incomplète peut compromettre la bonne interprétation des résultats.
6. La qualité des signaux dépend du bon positionnement du tissu sur la moitié inférieure de la lame. Pour de plus amples informations quant à la bonne mise en place du tissu, veuillez consulter votre représentant A. Menarini Diagnostics.

7. L'interprétation clinique de toute coloration positive, ou de son absence, doit être effectuée dans le contexte des antécédents cliniques, de la morphologie et autres critères histopathologiques, ainsi que d'autres analyses diagnostiques. Le pathologiste qualifié doit connaître les sondes FISH, les réactifs, les panels de diagnostic et les méthodes employées pour produire la préparation colorée. La coloration doit être effectuée dans un laboratoire certifié et homologué, sous la supervision d'un pathologiste chargé de revoir les lames colorées et d'assurer que les contrôles positifs et négatifs sont adéquats.
8. Les sondes FISH prêtes à l'emploi et les réactifs sont fournis selon une dilution optimale pour l'utilisation telle qu'elle est décrite ici. Toute déviation des procédures d'analyse recommandées peut annuler les résultats attendus. Utiliser et documenter les contrôles appropriés. Les utilisateurs doivent toujours accepter la responsabilité de l'interprétation des résultats des patients.
9. Les réactifs peuvent afficher des réactions inattendues dans les tissus non testés au préalable. La possibilité que des réactions inattendues se produisent, même dans les groupes de tissus testés, ne peut pas être totalement éliminée car les néoplasmes ou d'autres tissus pathologiques peuvent varier. En cas de réaction douteuse et inattendue documentée, contacter le service clientèle A. Menarini Diagnostics.

Résultats attendus

Le tableau suivant illustre les performances de la sonde FISH ImPath HER2 comparées à celles de la sonde FISH manuelle HER2 marquée CE sur le tissu d'un carcinome mammaire fixé par du formol et enrobé de paraffine. En vertu des directives ASCO (2013) un ratio de HER2/CEN 17 $\geq 2,0$ est considérée positive.

		ImPath HER2 FISH		
		négatif (ratio HER2/CEN 17 < 2,0)	positif (ratio HER2/CEN 17 $\geq 2,0$)	Total
Standard de réfé- rence	négatif (ratio HER2/CEN 17 < 2,0)	14	0	14
	positif (ratio HER2/CEN 17 $\geq 2,0$)	0	5	5
	Total	14	5	19

Une correspondance élevée de 100%, une spécificité de 100% et une sensibilité de 100% sur un tissu de carcinome mammaire sont donnés pour la sonde FISH ImPath HER2 lorsqu'elle est employée avec ImPath 36.

Résolution des problèmes

1. Si les signaux sont faibles ou absents, le prétraitement protéolytique n'a peut-être pas été effectué correctement et le temps d'incubation de la pepsine doit être optimisé.
2. De plus, un tampon de nettoyage trop peu concentré peut provoquer des signaux faibles. La concentration du tampon de nettoyage doit donc être vérifiée.
3. La faible intensité des signaux peut également être due à un mauvais réglage du microscope par fluorescence. Veiller à utiliser un microscope par fluorescence correctement réglé et en bon état, ainsi que des jeux de filtres adéquats.
4. Un faisceau lumineux trop fort durant la manipulation de la sonde/des lames peut également provoquer des signaux faibles ou absents. La manipulation de la sonde et des lames colorées doit être effectuée à l'abri des rayons du soleil directs.
5. Si des signaux d'hybridation croisés ou une coloration de fond forte se produisent, le prétraitement protéolytique était peut-être trop fort et la durée d'incubation de la pepsine doit être optimisée.
6. De plus, un tampon de nettoyage trop concentré peut provoquer une hybridation croisée ou une coloration de fond forte. La concentration de tampon de nettoyage doit donc être vérifiée.
7. Si les échantillons de tissu glissent de la lame, vérifier la charge positive de la lame. Parmi les autres éléments qui peuvent porter préjudice à l'adhésion du tissu, notons le séchage insuffisant de l'échantillon de tissu sur la lame avant la coloration ou la fixation à l'aide de formol mal tamponné au neutre. L'épaisseur du tissu peut également contribuer à cette situation.

Pour connaître les mesures correctives, consultez le chapitre Procédure pas à pas ou contactez le service clientèle A.Menarini Diagnostics.

Références

1. Kievits T, *et al.* Rapid subchromosomal localization of cosmids by nonradioactive in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6. (1990)
2. Wilkinson DG: *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, Oxford University Press ISBN 0 19 963327 4. (1992)
3. Wolff AC, *et al.* Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol.* 31(31):3997-4013 (2013)