

Identificazione del prodotto

Cat. N.	Descrizione
47862	ImPath HER2 FISH

Uso previsto

ImPath HER2 FISH (cat. n. 47862) è destinato all'uso in combinazione con ImPath ISH Detection Kit (cat. n. 44996) per il rilevamento del gene umano ERBB2 (noto anche come HER2) e delle sequenze alfa-satellite del cromosoma 17 in campioni di tessuto o di cellule fissati in formalina e inclusi in paraffina tramite ibridazione *in situ* fluorescente (FISH) sul dispositivo ImPath 36 (cat. n. 43965).

L'interpretazione dei risultati deve essere eseguita da parte di un patologo qualificato nel contesto dell'anamnesi clinica del paziente in relazione a ulteriori dati clinici e patologici del paziente stesso.

Riepilogo e spiegazione

Il gene ERBB2 (noto anche come HER2-NEU) è situato nella regione cromosomica 17q12 e codifica il recettore del fattore di crescita cellulare p185.

L'amplificazione del proto-oncogene ERBB2, osservata in circa il 20% di tutti i campioni di cancro della mammella, è stata correlata a una prognosi sfavorevole della malattia. Risultati simili sono stati ottenuti per un gran numero di altre neoplasie maligne, come il cancro ovarico, il cancro dello stomaco e i carcinomi della ghiandola salivare.

Principi e procedure

La presenza di certe sequenze di acido nucleico nelle cellule o nei tessuti può essere individuata tramite ibridazione *in situ* fluorescente (FISH) utilizzando sonde di DNA marcate con coloranti fluorescenti. L'ibridazione determina la formazione di duplex di sequenze presenti tra il campione oggetto di esame e la sonda specifica che può essere visualizzata tramite microscopi a fluorescenza, utilizzando filtri idonei. ImPath HER2 FISH contiene polinucleotidi marcati con fluorescenza arancione (eccitazione a 547 nm ed emissione a 572 nm, simile al fluorocromo rodamina), che consentono la localizzazione del gene ERBB2, e polinucleotidi marcati con fluorescenza verde (eccitazione a 503 nm ed emissione a 528 nm, simile al fluorocromo FITC), che consentono la localizzazione delle sequenze alfa-satellite del centromero del cromosoma 17 (D17Z1).

Materiali e metodi

Reagenti forniti

Il prodotto sopra descritto è una sonda FISH pronta all'uso in una fiala prodotta per l'utilizzo con ImPath36. La fiala è dotata di un tag RFID che viene letto da ImPath 36 per fornire specifiche informazioni sul prodotto e sul lotto.

Ricostituzione, miscelazione, diluizione

Il prodotto è pronto all'uso. Non sono necessarie la ricostituzione, la miscelazione né la diluizione.

Le differenze in termini di processazione dei tessuti e di procedure tecniche all'interno del laboratorio possono produrre una variabilità significativa dei risultati e, di conseguenza, è necessario utilizzare regolarmente i controlli. (Si veda la sezione Procedure di controllo qualità).



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

3 novembre 2015
IT REV 1.2

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



Dispositivo medico-diagnostico in vitro
secondo la direttiva 98/79/CE

Materiali e reagenti necessari ma non forniti

Per la colorazione possono essere necessari i seguenti reagenti e materiali, che non sono forniti con la sonda FISH.

1. Tessuto di controllo positivo e negativo
2. Vetrini caricati positivamente
3. Forno per l'asciugatura dei vetrini in grado di mantenere una temperatura di 50-60 °C
4. Bagni o vaschette di colorazione
5. Timer
6. Etanolo o alcol
7. ImPath ISH Detection Kit (cat. n. 44996)
8. DAPI/Antifade*
9. Vetrino coprioggetto
10. Microscopio a fluorescenza (400-1000x)
11. Set di filtri appropriati

*Raccomandato per l'uso: ImPath DAPI (cat. n. 47861)

Conservazione e manipolazione

Conservare a 2-8 °C in posizione verticale. Conservare al riparo dalla luce.

Prima di aprire la fiala, agitarla per far scendere il liquido.

Per garantire una corretta erogazione del reagente e la stabilità della sonda FISH, il reagente deve tornare alle condizioni di conservazione sopra indicate immediatamente dopo l'uso.

Se correttamente conservato, il reagente rimane stabile fino alla data indicata sull'etichetta. Non utilizzare il reagente dopo la data di scadenza per il metodo di conservazione prescritto.

Raccolta e preparazione dei campioni per l'analisi

I campioni di tessuto regolarmente processati, fissati in formalina neutra tamponata, inclusi in paraffina sono adatti all'uso con la sonda FISH. Il fissativo tissutale raccomandato è la formalina 10% neutra tamponata.

Ciascuna sezione deve essere tagliata con uno spessore idoneo (circa 3-5 µm) e collocata su un vetrino caricato positivamente. I vetrini contenenti la sezione tissutale devono essere asciugati in stufa per almeno 2 ore (ma per non oltre 16 ore) alla temperatura di 50-60 °C.

Avvertenze e precauzioni

1. Utilizzare i reagenti adottando le precauzioni necessarie. Durante la manipolazione di materiali che si sospetta siano cancerogeni o tossici, utilizzare guanti monouso e camici.
2. Evitare che i reagenti entrino in contatto con gli occhi e con le membrane mucose. Se i reagenti entrano in contatto con zone sensibili, risciacquare con abbondante acqua.
3. I campioni di tessuto e di cellule e tutti i materiali che entrano in contatto con essi devono essere manipolati come materiali a rischio biologico e smaltiti con le dovute precauzioni. Non pipettare mai con la bocca.
4. Evitare la contaminazione microbica dei reagenti in quanto potrebbe produrre risultati non corretti.
5. L'utente deve ottimizzare i tempi e le temperature di incubazione della soluzione di pepsina.
6. Il reagente, prediluito e pronto all'uso, possiede una diluizione ottimale, e un'ulteriore diluizione potrebbe causare la perdita di qualità della colorazione.

7. Questo prodotto è classificato come sostanza pericolosa. Per maggiori dettagli si rimanda alla scheda di sicurezza corrispondente.
8. L'utente deve convalidare qualsiasi condizione di conservazione diversa da quelle specificate nel foglio illustrativo.
9. Come con qualsiasi prodotto derivato da fonti biologiche, devono essere seguite le procedure di manipolazione corrette.

Istruzioni per l'uso

ImPath HER2 FISH (cat. n. 47862) è destinato all'uso in combinazione con ImPath ISH Detection Kit (cat. n. 44996) sul dispositivo ImPath 36 (cat. n. 43965).

Protocollo ImPath ISH:

ImPath ISH Detection Kit (cat. n.: 44996)

Fasi del protocollo:

Procedura fase per fase

1. Seguire le istruzioni per l'uso di ImPath 36 per impostare il reagente per l'uso sullo strumento.
2. Caricare i vetrini, la sonda FISH e ImPath ISH Detection Kit su ImPath 36 seguendo le istruzioni per l'uso di ImPath 36.

Impostare il tempo di digestione con pepsina secondo le condizioni prevalidate dall'utente

3. Avviare il ciclo.
4. Quando il ciclo di colorazione è completo, rimuovere i vetrini dallo strumento e disidratare ciascun vetrino con etanolo al 70%, 90% e 100% per 1 minuto.
5. Lasciare asciugare all'aria in un luogo buio.
6. Aggiungere una soluzione di montaggio DAPI/Antifade (si raccomanda l'uso di ImPath DAPI (cat. n. 47861)). Coprire i campioni con un vetrino coprioggetto e lasciare riposare al buio per 15 minuti.
7. Conservare al buio a una temperatura di 2-8 °C.

Procedure di controllo qualità

Tessuto di controllo positivo

Con l'esecuzione di ciascuna procedura di colorazione deve sempre essere analizzato un tessuto di controllo positivo. Tale tessuto può contenere sia le cellule amplificate (positive) sia non amplificate (negative) e serve da tessuto di controllo sia positivo che negativo.

I controlli positivi devono essere utilizzati per validare le prestazioni dei tessuti processati e dei reagenti e non come aiuto nella formulazione di una specifica diagnosi dei campioni del paziente. Se i controlli tissutali positivi non dimostrano una colorazione positiva appropriata, i risultati ottenuti dai campioni del paziente devono essere considerati non validi.

Tessuto di controllo negativo

Lo stesso tessuto utilizzato per il controllo positivo può essere utilizzato per il controllo negativo.

Le cellule non neoplastiche sul vetrino/nella sezione tumorale come i fibroblasti, le cellule epiteliali e/o i linfociti servono da controllo interno e devono mostrare il normale

pattern di segnale previsto, e possono quindi servire da controlli negativi. Se tali cellule non dimostrano una colorazione appropriata, i risultati ottenuti dal rispettivo campione devono essere considerati non validi.

Discrepanze immotivate

Discrepanze immotivate nei controlli devono essere immediatamente riferite all'assistenza clienti di A.Menarini Diagnostics. Se i risultati del controllo qualità non soddisfano le specifiche, i risultati per il paziente non sono validi. Si veda la sezione Guida alla risoluzione dei problemi, del presente foglio. Individuare e risolvere il problema, poi ripetere l'intera procedura con i campioni del paziente.

Interpretazione dei risultati

Con l'uso di set di filtri appropriati, i segnali di ibridazione del gene ERBB2 marcato appaiono di colore arancione, mentre i segnali di ibridazione delle sequenze alfa-satellite del centromero del cromosoma 17 marcate appaiono di colore verde.

Nell'interfase di cellule normali o di cellule senza aberrazioni del cromosoma 17, appaiono due segnali ERBB2 e due segnali del cromosoma 17. In cellule con un'amplificazione genica è visibile un numero aumentato di segnali gene specifici o di cluster di segnali.

Assicurarsi di non valutare le cellule sovrapposte, per evitare falsi risultati, come un'amplificazione dei geni. A causa della decondensazione della cromatina, singoli segnali FISH possono apparire come piccoli cluster. Quindi, due o tre segnali delle stesse dimensioni, separati da uno spazio pari o inferiore alle dimensioni di un segnale, devono essere considerati come un unico segnale.

Artefatti tissutali come tessuto periferico, represso o compresso, devono essere esclusi dalla valutazione. Non valutare il tessuto del paziente se i controlli non sono come ci si attendeva. Scartare l'oggetto se mostra una forte autofluorescenza. Una sovra-digestione può essere riconosciuta tramite aree scure visibili all'interno dei nuclei; in questo caso non si deve procedere con la valutazione.

Un risultato negativo o aspecifico può essere causato da molteplici fattori (si veda la sezione Guida alla risoluzione dei problemi, del presente foglio).

Limitazioni

1. Il reagente è "solo per uso professionale", in quanto l'ibridazione *in situ* fluorescente è un processo a più fasi che richiede una specifica formazione nella scelta dei reagenti appropriati, dei tessuti, della fissazione, dell'elaborazione, della preparazione dei vetrini FISH e dell'interpretazione dei risultati della colorazione.
2. Solo per impiego in laboratorio.
3. Solo per uso diagnostico in vitro.
4. La colorazione del tessuto, specialmente l'intensità del segnale e la colorazione di fondo, dipende dalla gestione e processamento del tessuto prima della colorazione. Una cattiva fissazione, un improprio congelamento e/o scongelamento, un lavaggio e/o un'asciugatura non corretta, un riscaldamento e/o un sezionamento non propriamente riuscito così come la contaminazione con altri tessuti o liquidi possono produrre artefatti o falsi risultati. Risultati incoerenti possono derivare da variazioni nella fissazione e nei metodi di inclusione, così come dalle irregolarità intrinseche del tessuto.
5. Una colorazione di contrasto eccessiva o incompleta può inficiare la corretta interpretazione dei risultati.
6. La qualità dei segnali dipende dal corretto posizionamento del tessuto sulla metà inferiore del vetrino. Per ulteriori informazioni sul posizionamento corretto del tessuto, contattare il proprio rappresentante di vendita di A.Menarini Diagnostics.

7. L'interpretazione clinica delle eventuali colorazioni positive, o dell'assenza di colorazione positiva, deve essere eseguita nel contesto dell'anamnesi clinica, della morfologia, di altri criteri istopatologici e di altri test diagnostici. È responsabilità di un patologo qualificato conoscere le sonde FISH, i reagenti, i pannelli diagnostici e i metodi utilizzati per ottenere la colorazione dei campioni. La colorazione deve essere eseguita in un laboratorio certificato e autorizzato, sotto la supervisione di un patologo, che ha la responsabilità di revisionare i vetrini colorati e garantire l'adeguatezza dei controlli positivi e negativi.
8. I reagenti e le sonde FISH pronte all'uso sono fornite a una diluizione ottimale per l'uso come da istruzioni. Qualsiasi deviazione dalle procedure del test raccomandate può invalidare i risultati attesi. Devono essere utilizzati e documentati i controlli appropriati. Gli utenti in qualsiasi circostanza devono accettare la responsabilità dell'interpretazione dei risultati dei pazienti.
9. I reagenti possono dimostrare reazioni inaspettate in tessuti non testati in precedenza. La possibilità di reazioni inaspettate anche in gruppi di tessuto testati non può essere completamente esclusa a causa delle variabilità biologiche delle neoplasie o altri tessuti patologici. In caso di reazioni inaspettate sospette e documentate di qualsiasi tipo, contattare l'assistenza clienti di A.Menarini Diagnostics.

Risultati attesi

La seguente tabella mostra le prestazioni della sonda ImPath HER2 FISH rispetto a una sonda manuale HER2 FISH certificata CE su tessuto tumorale mammario fissato in formalina e incluso in paraffina. In base alle linee guida ASCO (2013), un rapporto HER2/CEN 17 $\geq 2,0$ è considerato positivo.

		ImPath HER2 FISH		
		negativo (rapporto HER2/CEN 17 <2,0)	positivo (rapporto HER2/CEN 17 $\geq 2,0$)	Totale
Riferimento	negativo (rapporto HER2/CEN 17 <2,0)	14	0	14
	positivo (rapporto HER2/CEN 17 $\geq 2,0$)	0	5	5
	Totale	14	5	19

La sonda ImPath HER2 FISH presenta un'elevata concordanza del 100%, una specificità del 100% e una sensibilità del 100% sul tessuto tumorale mammario se il procedimento avviene su ImPath 36.

Guida alla risoluzione dei problemi

1. Se si osservano segni deboli o se non è osservabile alcun segnale, il pretrattamento proteolitico potrebbe non essere stato eseguito correttamente e il tempo di incubazione della pepsina deve essere ottimizzato.
2. Inoltre, un tampone di lavaggio con una concentrazione troppo bassa può determinare segnali deboli. La concentrazione del tampone di lavaggio deve di conseguenza essere controllata.
3. Un'ulteriore causa di intensità di segnale debole può essere un microscopio a fluorescenza regolato in modo scorretto. Assicurarsi di utilizzare un microscopio a fluorescenza in buono stato e configurato in modo corretto con i set di filtri appropriati.

4. Anche un fascio di luce troppo forte durante la manipolazione della sonda/dei vetrini può determinare segnali deboli o nulli. La manipolazione della sonda e dei vetrini colorati deve avvenire al riparo dalla luce diretta del sole.
5. In presenza di segnali di ibridazione crociata o di forte colorazione di fondo, il pretrattamento proteolitico potrebbe essere stato troppo forte e il tempo di incubazione della pepsina deve essere ottimizzato.
6. Inoltre, un tampone di lavaggio con una concentrazione troppo alta può determinare ibridazione crociata o forte colorazione di fondo. La concentrazione del tampone di lavaggio deve di conseguenza essere controllata.
7. Se durante il lavaggio le sezioni di tessuto scivolano via dal vetrino, i vetrini devono essere controllati per assicurarsi che siano caricati positivamente. Altre possibilità che potrebbero avere effetti avversi sull'adesione del tessuto includono asciugatura insufficiente della sezione tissutale sul vetrino prima della colorazione o fissazione in formalina non pronta all'uso (neutro tamponata). Anche lo spessore del tessuto può contribuire.

Per le azioni correttive si rimanda alla sezione Procedura fase per fase; in alternativa, contattare l'assistenza clienti di A.Menarini Diagnostics.

Bibliografia

- 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)