

Identificação do Produto

N.º Ref.	Descrição
47862	ImPath HER2 FISH

Utilização Prevista

O ImPath HER2 FISH (N.º Ref. 47862) destina-se a ser utilizado em combinação com o ImPath ISH Detection Kit (N.º Ref. 44996) para a detecção do gene humano ERBB2 (também designado por HER2), bem como de alfa-satélites do cromossoma 17 em amostras de tecidos ou células fixadas em formol e embebidas em parafina, através de Hibridação *in situ* por Fluorescência (FISH) no ImPath 36 (N.º Ref. 43965).

A interpretação dos resultados deve ser efectuada por um patologista qualificado, no contexto do historial clínico do paciente no que respeita a dados clínicos e patológicos adicionais do paciente.

Resumo e Explicação

O gene ERBB2 (também designado por HER2 e NEU) encontra-se na região cromossómica 17q12 e codifica o receptor do factor de crescimento celular p185. A amplificação do proto-oncogene ERBB2, observada em cerca de 20% de todas as amostras de cancro da mama, tem sido correlacionada com um mau prognóstico da doença. Foram obtidos resultados semelhantes para uma série de outras neoplasias malignas, tais como cancro dos ovários, cancro do estômago e carcinomas das glândulas salivares.

Princípios e Procedimentos

A presença de determinadas sequências de ácidos nucleicos em células ou tecidos pode ser detectada através da Hibridação *In Situ* por Fluorescência (FISH), utilizando sondas de DNA marcadas com corantes fluorescentes. A hibridação resulta na formação de cadeias duplas entre as sequências de ácidos nucleicos presentes na amostra em análise e na sonda específica, podendo ser visualizada por microscopia de fluorescência utilizando filtros adequados.

A sonda ImPath HER2 FISH é constituída por polinucleotídeos marcados a laranja (excitação a 547 nm e emissão a 572 nm, semelhante à Rodamina), dirigidos contra o gene ERBB2, e polinucleotídeos marcados a verde (excitação a 503 nm e emissão a 528 nm, semelhante ao FITC), dirigidos contra sequências alfa-satélite do centrómero do cromossoma 17 (D17Z1).

Materiais e Métodos

Reagentes Fornecidos

O produto referido é uma sonda de FISH, pronta a utilizar, num frasco feito para ser utilizado com o ImPath 36. O frasco está equipado com um rótulo RFID (Identificação por Radiofrequência), que é lido pelo ImPath 36 para fornecer informações específicas sobre o produto e o lote.

Reconstituição, Homogeneização, Diluição

O produto está pronto a utilizar. Não é necessária qualquer reconstituição, homogeneização ou diluição.

As diferenças no processamento dos tecidos e nos procedimentos técnicos no laboratório podem dar origem a uma variabilidade significativa nos resultados e, por conseguinte, requerer a utilização regular de controlos. (Consultar a secção Procedimentos de Controlo de Qualidade)



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

3 de novembro de 2015
PT REV 1.2

Distribuído por:
A.Menarini Diagnostics S.r.l.
Via Sette Santi, 3
50131 Florença
Itália



Dispositivo médico de diagnóstico in vitro

de acordo com a Directiva Europeia
98/79/CE

Materiais e Reagentes Necessários mas não Fornecidos

Poderão ser necessários os seguintes reagentes e materiais para a marcação, mas não são fornecidos com a sonda de FISH.

1. Tecido de controlo positivo e negativo
2. Lâminas de microscópio, com carga positiva
3. Estufa de secagem com capacidade para manter uma temperatura de 50-60 °C
4. Copos ou banhos de coloração
5. Cronómetro
6. Etanol ou álcool de grau reagente
7. ImPath ISH Detection Kit (N.º Ref. 44996)
8. DAPI/Antifade*
9. Lamelas
10. Microscópio de fluorescência (400-1000x)
11. Conjuntos de filtros adequados

*Recomendado para utilização: ImPath DAPI (N.º Ref. 47861)

Conservação e Manuseamento

Conservar a 2-8 °C na posição vertical. Conservar ao abrigo da luz.

Antes de abrir o frasco, agitar o líquido.

Para garantir a correcta distribuição e estabilidade do reagente da sonda de FISH, o reagente deve ser reposto nas condições de conservação acima identificadas imediatamente após a sua utilização.

Quando devidamente conservado, o reagente permanece estável até à data indicada no rótulo. Não utilizar o reagente depois de ultrapassada a data de validade para o método de conservação indicado.

Recolha de Amostras e Preparação para Análise

Os tecidos processados regularmente, fixados em formol neutro tamponado e embebidos em parafina, são adequados para utilização com esta sonda de FISH. O fixador de tecidos recomendado é o formol neutro tamponado a 10%.

Cada secção deve ser cortada com a espessura apropriada (aproximadamente 3-5 µm) e colocada numa lâmina de vidro com carga positiva. As lâminas que contêm a secção de tecido podem ser aquecidas durante pelo menos 2 horas (mas não mais de 16 horas) numa estufa a 50-60 °C.

Advertências e Precauções

1. Tomar as precauções razoáveis ao manusear os reagentes. Usar luvas descartáveis e batas de laboratório ao manusear substâncias que se suspeite serem cancerígenas ou materiais tóxicos.
2. Evitar o contacto dos reagentes com os olhos e as membranas mucosas. Se os reagentes entrarem em contacto com áreas sensíveis, lavar com água abundante.
3. As amostras de tecidos e células e todos os materiais que entrem em contacto com as mesmas deverão ser manuseados como materiais de risco biológico e devem ser eliminados com as devidas precauções. Nunca pipetar com a boca.
4. Evitar a contaminação microbiana dos reagentes, pois tal poderia gerar resultados incorrectos.
5. O utilizador deverá otimizar os tempos e temperaturas de incubação com a solução de pepsina.
6. O reagente pré-diluído e pronto a utilizar foi diluído de forma ideal e uma nova diluição pode resultar na perda de qualidade da marcação.

7. Este produto está classificado como substância perigosa. Para mais detalhes, consultar a respectiva ficha de dados de segurança.
8. O utilizador deverá validar quaisquer outras condições de conservação que não as especificadas no folheto informativo incluído na embalagem.
9. Tal como com qualquer produto derivado de origem biológica, devem ser utilizados procedimentos de manuseamento adequados.
- 10.

Instruções de Utilização

O ImPath HER2 FISH (N.º Ref. 47862) destina-se a ser utilizado em combinação com o ImPath ISH Detection Kit (N.º Ref. 44996) no ImPath 36 (N.º Ref. 43965).

Protocolo ImPath ISH:

ImPath ISH Detection Kit (N.º Ref. 44996)

Passos do Protocolo:

Procedimento Passo a Passo

1. Seguir as instruções de utilização do ImPath 36 no que diz respeito à configuração do reagente para utilizar no instrumento.
2. Carregar as lâminas, a sonda de FISH e o ImPath ISH Detection Kit no ImPath 36, de acordo com as instruções de utilização do ImPath 36.

Definir o tempo de digestão com a pepsina de acordo com as condições pré-validadas pelo utilizador

3. Iniciar o ciclo de marcação.
4. Quando o ciclo de marcação estiver concluído, remover as lâminas do instrumento, desidratar com etanol a 70%, 90% e 100%, durante 1 minuto cada.
5. Deixar as amostras a secar ao ar, ao abrigo da luz.
6. Montar com uma solução DAPI/Antifade (recomenda-se a utilização da solução ImPath DAPI (N.º Ref. 47861)). Cobrir com uma lamela e incubar no escuro durante 15 min.
7. Conservar as lâminas num local escuro, a uma temperatura entre 2 °C e 8 °C.

Procedimentos de Controlo de Qualidade

Controlo de Tecido Positivo

Com cada procedimento de marcação efectuado deverá ser sempre executado um controlo de tecido positivo. Este tecido poderá conter células com marcação amplificada (positiva) e não amplificada (negativa) e serve como tecido de controlo positivo e negativo.

Os controlos de tecido positivos conhecidos deverão ser utilizados apenas para monitorizar o correcto desempenho dos tecidos processados e dos reagentes de teste, e não como auxiliar na determinação de um diagnóstico específico das amostras dos pacientes. Se os controlos de tecido positivos não demonstrarem uma marcação positiva adequada, os resultados das amostras do paciente devem ser considerados inválidos.

Controlo de Tecido Negativo

O mesmo tecido utilizado para o controlo de tecido positivo pode ser utilizado para o controlo de tecido negativo.

As células não neoplásicas na lâmina/secção do tumor, tais como fibroblastos, células epiteliais e/ou linfócitos, servem como controlo interno e têm de exibir o padrão de

sinais normal esperado e podem, por isso, servir como controlo de tecido negativo. Se estas células não demonstrarem uma marcação adequada, os resultados da respectiva amostra devem ser considerados inválidos.

Discrepâncias Inexplicáveis

Quaisquer discrepâncias inexplicáveis nos controlos deverão ser imediatamente comunicadas ao Serviço de Apoio ao Cliente da A.Menarini Diagnostics. Se os resultados do controlo de qualidade não cumprirem as especificações, os resultados do paciente são inválidos. Consultar a secção Resolução de Problemas deste folheto. Identificar e corrigir o problema e, em seguida, repetir todo o procedimento com as amostras do paciente.

Interpretação dos Resultados

Com a utilização de conjuntos de filtros adequados, os sinais de hibridação do gene ERBB2 marcado aparecem a laranja e os sinais de hibridação das sequências alfa-satélite marcadas do centrómero do cromossoma 17 aparecem a verde. Nas células interfásicas normais ou células sem aberrações do cromossoma 17 aparecem dois sinais do ERBB2 e dois sinais do cromossoma 17. Nas células com amplificação génica, é visível um maior número de sinais específicos do gene ou clusters de sinais. Deverá ter-se o cuidado de não avaliar células sobrepostas, de forma a evitar resultados falsos como, por exemplo, uma amplificação de genes. Devido à descondensação da cromatina, sinais de FISH individuais podem aparecer como pequenos clusters de sinais. Assim, dois ou três sinais do mesmo tamanho, separados por uma distância igual ou inferior ao diâmetro de um sinal, devem ser contabilizados como um único sinal.

Os artefactos de tecidos, como tecido no limite ou tecido retraído ou comprimido, devem ser excluídos da avaliação. Não avaliar tecido do paciente se os controlos não forem os esperados. Rejeitar a amostra se esta apresentar uma forte autofluorescência. A sobredigestão pode ser reconhecida através de áreas escuras visíveis no interior dos núcleos e devem ser excluídas da avaliação.

Um resultado negativo ou inespecífico pode ser causado por vários factores (consultar o capítulo Resolução de Problemas deste folheto).

Limitações

1. Este reagente destina-se “apenas para uso profissional”, uma vez que a hibridação *in situ* por fluorescência é um processo de várias etapas que requer uma formação especializada na selecção adequada de reagentes, tecidos, fixação, processamento, preparação da sonda de FISH e interpretação dos resultados da marcação.
2. Apenas para uso laboratorial.
3. Para uso diagnóstico *in vitro*.
4. A marcação dos tecidos, em particular a intensidade do sinal e a marcação de fundo, depende do manuseamento e do processamento dos tecidos antes da marcação. Uma incorrecta fixação, congelação, descongelação, lavagem, secagem, aquecimento, seccionamento ou contaminação com outros tecidos ou fluidos podem produzir artefactos ou resultados falsos. Os resultados inconsistentes podem resultar de variações nos métodos de fixação e impregnação, bem como de irregularidades inerentes ao tecido.
5. Uma contra-coloração (coloração de contraste) excessiva ou insuficiente pode comprometer a interpretação correcta dos resultados.
6. A qualidade dos sinais depende do correcto posicionamento do tecido na metade inferior da lâmina. Para mais informações sobre a correcta colocação dos tecidos, contacte o seu representante de vendas da A.Menarini Diagnostics.

7. A interpretação clínica de qualquer marcação positiva, ou da sua ausência, deve ser avaliada no contexto do historial clínico, morfologia, outros critérios histopatológicos e ainda outros testes de diagnóstico. É da responsabilidade de um patologista qualificado estar familiarizado com as sondas de FISH, os reagentes, os painéis de diagnóstico e os métodos utilizados para produzir a preparação marcada. A marcação deve ser executada num laboratório certificado e autorizado, sob a supervisão de um patologista responsável pela revisão das lâminas marcadas que garanta a adequação dos controlos positivos e negativos.
8. As sondas de FISH e reagentes prontos a utilizar são fornecidos na diluição ideal para utilização de acordo com as instruções. Qualquer desvio dos procedimentos de teste recomendados pode invalidar os resultados esperados. Devem ser utilizados e documentados os controlos adequados. Os utilizadores devem, em qualquer circunstância, assumir a responsabilidade pela interpretação dos resultados dos pacientes.
9. Os reagentes podem apresentar reacções inesperadas em tecidos não previamente testados. A possibilidade de ocorrência de reacções inesperadas, mesmo em grupos de tecidos testados, não pode ser completamente excluída devido à variabilidade biológica em neoplasias ou noutros tecidos patológicos. Contactar o serviço de apoio ao cliente da A.Menarini Diagnostics para comunicar quaisquer reacções suspeitas inesperadas documentadas.

Resultados Esperados

A tabela que se segue demonstra o desempenho da sonda ImPath HER2 FISH, comparado com uma sonda manual HER2 FISH com certificação CE, em tecidos de carcinoma mamário fixados em formol e embebidos em parafina. De acordo com as Orientações da ASCO (Sociedade Americana de Oncologia Clínica) de 2013, um rácio de HER2/CEN 17 $\geq 2,0$ é considerado positivo.

		ImPath HER2 FISH		
		negativo (rácio HER2/CEN 17 <2,0)	positivo (rácio HER2/CEN 17 $\geq 2,0$)	Total
referência	negativo (rácio HER2/CEN 17 <2,0)	14	0	14
	positivo (rácio HER2/CEN 17 $\geq 2,0$)	0	5	5
	Total	14	5	19

Quando utilizada no ImPath 36, a sonda ImPath HER2 FISH permite obter uma elevada concordância de 100%, especificidade de 100% e sensibilidade de 100% em tecido de carcinoma mamário.

Resolução de Problemas

1. Se forem observados sinais fracos ou inexistentes, o pré-tratamento proteolítico pode não ter sido correctamente executado e o tempo de incubação com a pepsina deverá ser optimizado.
2. Para além disso, um tampão de lavagem de concentração muito baixa pode dar origem a sinais fracos. Por conseguinte, a concentração do tampão de lavagem deve ser verificada.
3. Uma outra razão para a fraca intensidade dos sinais pode ser um microscópio de fluorescência incorrectamente configurado. Deve-se assegurar que se utiliza um

microscópio de fluorescência devidamente configurado e mantido, com conjuntos de filtros adequados.

4. A excessiva exposição à luz durante o manuseamento da sonda/lâminas também pode resultar em sinais fracos ou inexistentes. O manuseamento da sonda e das lâminas marcadas deve ser efectuado em local protegido da luz solar directa.
5. Se ocorrerem sinais de hibridação cruzada ou uma intensa marcação de fundo, o pré-tratamento proteolítico pode ter sido demasiado forte e o tempo de incubação com a pepsina deverá ser otimizado.
6. Para além disso, um tampão de lavagem de concentração muito elevada pode levar à hibridação cruzada ou a uma intensa marcação de fundo. Por conseguinte, a concentração do tampão de lavagem deve ser verificada.
7. Se as secções de tecido se destacarem ou escorrerem da lâmina, as lâminas deverão ser verificadas para assegurar que têm carga positiva. Outras possibilidades que podem ter efeitos adversos na aderência dos tecidos incluem a secagem insuficiente da secção de tecido na lâmina antes da marcação ou a fixação em formol que não tenha sido devidamente neutralizado com tampão. A espessura do tecido também pode ser um factor contribuinte.

Para acções correctivas, consultar a secção “Procedimento Passo a Passo” ou contactar o serviço de apoio ao cliente da A.Menarini Diagnostics.

Referências

- 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)