



ZytoLight

SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe Kit

REF Z-2020-5 Σ 5

REF Z-2020-20 Σ 20

Para la detección cualitativa de amplificaciones del gen ERBB2 humano y satélites alfa del cromosoma 17 mediante hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH)



Producto sanitario para diagnóstico *in vitro* conforme a la Directiva europea 98/79/CE

1. Uso previsto

El kit ZytoLight SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe Kit está diseñado para la detección cualitativa de amplificaciones del gen ERBB2 humano y satélites alfa del cromosoma 17 en muestras fijadas en formol e incluidas en parafina mediante hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH).

Los resultados deben ser interpretados por un anatomopatólogo cualificado en el contexto de la historia clínica del paciente y junto con otros datos clínicos y anatomopatológicos.

2. Relevancia clínica

El gen ERBB2 (también conocido como HER2 y NEU) se encuentra en la región cromosómica 17q12 y codifica una glucoproteína transmembranaria de 185-190 kDa, p185, que actúa como receptor del factor de crecimiento celular. La proteína p185 pertenece al subgrupo de EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) de la superfamilia de RTK (tirosina-cinasa receptora), que también incluye EGFR (ERBB1), ERBB3 (HER3) y ERBB4 (HER4). La amplificación del protooncogén ERBB2, observada en alrededor del 20 % de todas las muestras de cáncer de mama, se ha relacionado con un mal pronóstico de la enfermedad. Se han obtenido resultados similares en muchas otras neoplasias malignas, p. ej., cáncer ovárico, cáncer de estómago y carcinomas de glándula salival.

3. Principio del ensayo

La técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) permite la detección y visualización de secuencias específicas de ácidos nucleicos en las preparaciones celulares. Los fragmentos de ADN marcados con fluorescencia, llamados *sondas FISH*, se desnaturalizan simultáneamente con sus cadenas diana de ADN complementario en las preparaciones y, posteriormente, se deja que se reasocien durante la hibridación. A continuación, los fragmentos inespecíficos y no unidos de la sonda se eliminan mediante pasos de lavado riguroso. Después de la contratinción del ADN con DAPI, los fragmentos de sonda hibridados se visualizan en un microscopio de fluorescencia equipado con filtros de excitación y emisión específicos para los fluorocromos con los que se han marcado directamente los fragmentos de sonda FISH.

4. Reactivos suministrados

El kit ZytoLight SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe Kit está disponible en dos tamaños y se compone de:

Código	Componente	Cantidad		Recipiente
		5	20	
PT1	Heat Pretreatment Solution Citric	150 ml	500 ml	Frasco con tapón de rosca (grande)
ES1	Pepsin Solution	1 ml	4 ml	Frasco cuentagotas, tapón blanco
WB1	Wash Buffer SSC	210 ml	560 ml	Frasco con tapón de rosca (grande)
PL8	ZytoLight SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe	0,05 ml	0,2 ml	Recipiente de reacción, tapa roja
WB2	25x Wash Buffer A	50 ml	2x50 ml	Frasco con tapón de rosca (mediano)
MT7	DAPI/DuraTect-Solution	0,2 ml	0,8 ml	Recipiente de reacción, tapa azul
	Instrucciones de uso	1	1	

Z-2020-5 (5 pruebas): Los componentes **ES1**, **PL8** y **MT7** se suministran con una cantidad suficiente para 5 reacciones. El componente **WB2** es suficiente para 5x3 cubetas de tinción de 70 ml cada una. El componente **PT1** es suficiente para 2 cubetas de tinción de 70 ml cada una. El componente **WB1** es suficiente para 3 cubetas de tinción de 70 ml cada una.

Z-2020-20 (20 pruebas): Los componentes **ES1**, **PL8** y **MT7** se suministran con una cantidad suficiente para 20 reacciones. El componente **WB2** es suficiente para 11x3 cubetas de tinción de 70 ml cada una. El componente **PT1** es suficiente para 7 cubetas de tinción de 70 ml cada una. El componente **WB1** es suficiente para 8 cubetas de tinción de 70 ml cada una.

La sonda ZytoLight SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe (PL8) se compone de:

- Polinucleótidos marcados en verde (excitación a 503 nm/emisión a 528 nm) ZyGreen (~10 ng/μl), dirigidos a secuencias localizadas en 17q12-q21.1* (chr17:37,572,531-38,181,308) que albergan la región del gen ERBB2 (ver Fig. 1).
- Polinucleótidos marcados en naranja (excitación a 547 nm/emisión a 572 nm) ZyOrange (~1,5 ng/μl), dirigidos a secuencias localizadas en 17p11.1-q11.1 específicas para la región centromérica satélite alfa D17Z1 del cromosoma 17.
- Tampón de hibridación basado en formamida

*de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano GRCh37/hg19

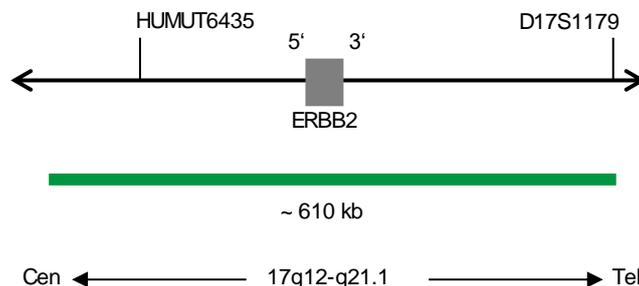


Fig. 1: SPEC ERBB2 Mapa de la sonda (no está a escala)

5. Material necesario no suministrado

- Muestras de control positivas y negativas
- Portaobjetos para microscopio, con carga positiva
- Baño María (37 °C, 98 °C)
- Hibridador o placa térmica
- Hibridador o cámara húmeda en horno de hibridación
- Pipetas ajustables (10 μl, 25 μl)
- Cubetas o baños de tinción
- Cronómetro
- Termómetro calibrado

- Alcohol reactivo o etanol
- Xileno
- Agua desionizada o destilada
- Cubreobjetos (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Adhesivo de caucho, p. ej., Fixogum Rubber Cement (Ref. E-4005-50/-125) o similar
- Microscopio de fluorescencia debidamente mantenido (400-1000x)
- Aceite de inmersión aprobado para microscopía de fluorescencia
- Juego de filtros adecuado

6. Almacenamiento y manipulación

Los componentes del kit se deben almacenar a una temperatura de 2-8 °C. Además, la solución DAPI/DuraTect-Solution (MT7) y la sonda (**PL8**) se deben almacenar protegidas de la luz. Volver a guardar los componentes de inmediato en las condiciones indicadas tras su uso. Si se cumplen estas condiciones, el kit funcionará, sin pérdida de rendimiento, al menos hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

7. Advertencias y precauciones

- Leer las instrucciones del producto antes del uso.
- No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad.
- Este producto contiene sustancias (en concentraciones y volúmenes bajos) que son perjudiciales para la salud y potencialmente infecciosas. Evitar cualquier contacto directo con los reactivos. Tomar las medidas de protección adecuadas (utilizar guantes desechables, gafas de protección e indumentaria de laboratorio).
- Si los reactivos entran en contacto con la piel, lavar inmediatamente con agua abundante.
- La ficha de datos de seguridad para el usuario profesional está disponible previa solicitud.
- No reutilizar los reactivos.
- Evitar la contaminación cruzada de las muestras, ya que esto puede generar resultados erróneos.
- No se debe permitir que las muestras se sequen durante los pasos de hibridación y lavado.
- La sonda (**PL8**) y la solución DAPI/DuraTect-Solution (MT7) no deben exponerse a la luz, especialmente la luz intensa, durante un período de tiempo prolongado, es decir, se deben realizar todos los pasos, en la medida de lo posible, en la oscuridad o empleando recipientes opacos.

Indicaciones de peligro y consejos de prudencia para PL8:

El componente que determina el peligro es la formamida.



Peligro

H351	Susceptible de provocar cáncer.
H360FD	Puede perjudicar a la fertilidad. Puede dañar al feto.
H373	Puede provocar daños en los órganos tras exposiciones prolongadas o repetidas.
P201	Solicitar instrucciones especiales antes del uso.
P202	No manipular antes de haber leído y comprendido todas las precauciones de seguridad.
P260	No respirar polvos/humos/gases/nieblas/vapores/aerosoles.
P280	Usar guantes/ropa de protección/equipo de protección para los ojos/la cara.
P308+P313	EN CASO DE exposición demostrada o supuesta: consultar a un médico.
P405	Guardar bajo llave.

Indicaciones de peligro y consejos de prudencia para PT1, WB1 y WB2:

El componente que determina el peligro es una mezcla de: 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona [N.º CE 247-500-7] y 2-metil-2H-isotiazol-3-ona [N.º CE 220-239-6] (3:1).



Atención

H317	Puede provocar una reacción cutánea alérgica.
P261	Evitar respirar polvos/humos/gases/nieblas/vapores/aerosoles.
P272	La ropa de trabajo contaminada no debe salir del lugar de trabajo.
P280	Usar guantes/ropa de protección/equipo de protección para los ojos/la cara.
P302+P352	EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante agua.
P333+P313	En caso de irritación cutánea o sarpullido: consultar a un médico.
P362+P364	Quitar la ropa contaminada y lavarla antes de volverla a usar.

8. Limitaciones

- Para uso diagnóstico *in vitro*.
- Solo para uso profesional.
- La interpretación clínica de cualquier tinción positiva, o su ausencia, debe realizarse en el contexto de la historia clínica, la morfología, otros criterios histopatológicos, así como otras pruebas diagnósticas. Es responsabilidad de un anatomopatólogo cualificado familiarizarse con las sondas FISH, los reactivos, los grupos de pruebas diagnósticas y los métodos utilizados para obtener la preparación teñida. La tinción se debe llevar a cabo en un laboratorio certificado y autorizado, bajo la supervisión de un anatomopatólogo que sea responsable de examinar los portaobjetos teñidos y de garantizar la idoneidad de los controles positivos y negativos.
- La tinción de muestras, en particular la intensidad de la señal y la tinción de fondo, depende de la manipulación y el procesamiento de la muestra antes de la tinción. La fijación, congelación, descongelación, lavado, secado, calentamiento o corte inadecuados, o la contaminación con otras muestras o líquidos, pueden producir artefactos o resultados falsos. Los resultados incoherentes pueden deberse a variaciones en los métodos de fijación e inclusión, así como a irregularidades inherentes a la propia muestra.
- La sonda solo debe utilizarse para detectar los locus descritos en 4. "Reactivos suministrados".
- El rendimiento se validó utilizando los procedimientos descritos en estas instrucciones de uso. Cualquier modificación de estos procedimientos podría variar el rendimiento, por lo que debe validarla el usuario.

9. Sustancias interferentes

Los eritrocitos presentes en la muestra podrían presentar autofluorescencia, lo que dificulta el reconocimiento de señales.

Los siguientes fijadores son incompatibles con FISH:

- Fijador de Bouin
- Fijador B5
- Fijadores de ácidos (p. ej., ácido pícrico)
- Fijador de Zenker
- Alcoholes (cuando se usan solos)
- Cloruro de mercurio
- Fijador de formaldehído/zinc
- Fijador de Hollande
- Formol no tamponado

10. Preparación de muestras

Recomendaciones:

- Fijación en formol tamponado neutro al 10 % durante 24 horas a temperatura ambiente (18-25 °C).
- Tamaño de muestra $\leq 0,5 \text{ cm}^3$.
- Utilizar parafina de calidad superior.
- La inclusión se debe realizar a temperaturas inferiores a 65 °C.
- Preparar cortes de micrótomo de 2-4 μm .
- Utilizar portaobjetos de microscopio cargados positivamente.
- Fijar durante 2-16 h a 50-60 °C.

11. Preparación previa del producto

El tampón 25x Wash Buffer (WB2) se debe tratar previamente de acuerdo con las instrucciones del punto 12. "Procedimiento de ensayo". Los demás reactivos del kit están listos para usar; no precisan reconstitución, mezcla ni dilución. Llevar la sonda a temperatura ambiente (18-25 °C) antes del uso; proteger de la luz. Antes de abrir el frasco, mezclar en agitadora vortical y centrifugar brevemente.

12. Procedimiento de ensayo

12.1 Día 1

Pasos preparatorios

- (1) *Preparar dos series de etanol (soluciones de etanol al 70 %, 90 % y 100 %):* Diluir etanol al 100 % con agua desionizada o destilada. Estas soluciones se pueden conservar en recipientes adecuados y pueden reutilizarse.
- (2) *Heat Pretreatment Solution Citric (PT1):* Calentar a 98 °C.
- (3) *Wash Buffer SSC (WB1):* Dejar que alcance la temperatura ambiente (TA).
- (4) *ZyLight FISH probe:* Dejar que alcance la TA antes del uso; proteger de la luz.

Opcional, al realizar el paso posterior a la fijación:

(muy recomendado si la fijación de tejidos no es óptima)
Preparar una solución de formaldehído al 1 % con el juego de tampón de dilución de formaldehído (PT-0006-100)

Tratamiento previo (desparafinación/proteólisis)

- (1) Incubar los portaobjetos durante 10 minutos a 70 °C (p. ej., en una placa térmica).
- (2) Incubar los portaobjetos 2 veces durante 10 minutos en xileno.
- (3) Incubar en etanol al 100 %, el 90 % y el 70 %, cada uno durante 5 min.
- (4) Lavar 2 veces durante 2 minutos en agua desionizada o destilada.
- (5) Incubar durante 15 minutos en Heat Pretreatment Solution Citric (PT1) precalentada a 98 °C.

Se recomienda no utilizar más de ocho portaobjetos por cubeta de tinción.

- (6) Transferir los portaobjetos inmediatamente a agua desionizada o destilada, lavar 2 veces durante 2 minutos y drenar o dejar secar el agua.
- (7) Aplicar (gota a gota) Pepsin Solution (ES1) a las muestras e incubar durante 15 minutos a 37 °C en una cámara húmeda.

Dependiendo de múltiples factores, p. ej., la naturaleza y la duración de la fijación, el grosor de los cortes y la naturaleza del tejido o las células, se pueden necesitar diferentes tiempos de incubación. Como guía de incubación, recomendamos un tiempo de incubación de 2 a 30 minutos para muestras de tejido y de 2 a 15 minutos para muestras de células. Como norma general, recomendamos determinar el momento óptimo para la proteólisis en las pruebas previas.

- (8) Lavar durante 5 minutos en Wash Buffer SSC (WB1).

Opcional, al realizar el paso posterior a la fijación:

Incubar los portaobjetos durante 15 minutos en una solución de formaldehído al 1 % y lavar posteriormente durante 5 minutos en un Wash Buffer SSC (WB1)

- (9) Lavar durante 1 minuto en agua desionizada o destilada
- (10) Deshidratación: etanol al 70 %, 90 % y 100 %, cada uno durante 1 minuto
- (11) Dejar secar los cortes.

Nota: Asegurarse de secar completamente los cortes antes de aplicar la sonda, ya que la humedad residual puede reducir la intensidad de la señal o afectar a la morfología del tejido.

Desnaturalización e hibridación

- (1) Pipetear 10 μl de la ZyLight SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe (PL8) en cada muestra pretratada.
- (2) Cubrir las muestras con un cubreobjetos de 22 mm x 22 mm (evitando que queden burbujas) y sellarlo.
Se recomienda utilizar adhesivo de caucho (p. ej., Fixogum) para el sellado.
- (3) Colocar los portaobjetos en una placa térmica o un hibridador y desnaturalizar las muestras durante 10 minutos a 75 °C.
- (4) Transferir los portaobjetos a una cámara húmeda y dejar hibridar toda la noche a 37 °C (p. ej., en un horno de hibridación).

Es imprescindible que las muestras no se sequen durante la etapa de hibridación.

12.2 Día 2

Pasos preparatorios

- (1) *Preparación de 1x Wash Buffer A:* Diluir 1 parte de 25x Wash Buffer A (WB2) con 24 partes de agua desionizada o destilada. Llenar tres cubetas de tinción con 1x Wash Buffer A y precalentarlo a 37 °C.
- (2) DAPI/DuraTect-Solution (MT7): Dejar que alcance la temperatura ambiente antes de usar, proteger de la luz.

Post-hibridación y detección

- (1) Retirar con cuidado el pegamento o el adhesivo de caucho.
- (2) Retirar el cubreobjetos sumergiéndolo en 1x Wash Buffer A a 37 °C durante 1-3 minutos.
- (3) Lavar con Tampón de lavado A 1x 2 veces durante 5 minutos a 37 °C.

El 1x Wash Buffer A se debe precalentar. Comprobar con un termómetro si es necesario.

- (4) Incubar los portaobjetos en etanol al 70 %, 90 % y 100 %, cada uno durante 1 minuto.
- (5) Dejar secar las muestras protegidas de la luz.
- (6) Pipetear 25 μl de DAPI/DuraTect-Solution (MT7) sobre los portaobjetos. Evitando que queden burbujas, cubrir las muestras con un cubreobjetos (24 mm x 60 mm). Incubar en la oscuridad durante 15 minutos.

El uso de una punta de pipeta cortada para aumentar el tamaño de la abertura puede facilitar el proceso de pipeteo. Evitar la exposición prolongada a la luz.

- (7) Guardar los portaobjetos en la oscuridad. Para períodos de almacenamiento más prolongados, almacenar entre 2 y 8 °C.
- (8) La evaluación del material de muestra se realiza mediante microscopía de fluorescencia. Se requieren juegos de filtros para los siguientes intervalos de longitud de onda:

Tinte fluorescente	Excitación	Emisión
ZyGreen	503 nm	528 nm
ZyOrange	547 nm	572 nm

13. Interpretación de los resultados

Con el uso de juegos de filtros adecuados, las señales de hibridación de la sonda aparecen en color verde (región del gen ERBB2) y naranja (CEN 17).

Situación normal: En las interfases de células normales o células sin una amplificación que implique la región del gen ERBB2, aparecen dos señales verdes y dos naranjas (ver Fig. 2).

Situación anómala: En células con una amplificación de la región del gen ERBB2 se observará un aumento del número de señales verdes o grupos de señales verdes (ver Fig. 2).

Las señales superpuestas pueden aparecer como señales en color amarillo.

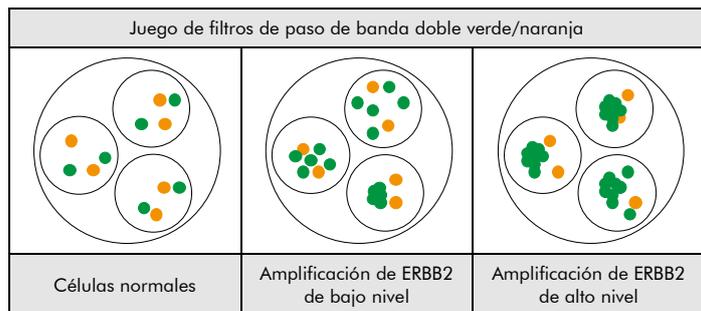


Fig. 2: Resultados previstos en núcleos normales y anómalos

Se puede observar otra distribución de señales en algunas muestras anómalas que podría dar lugar a un patrón de señal diferente al descrito anteriormente, lo que indica diferentes reordenaciones. Los patrones de señales no previstos se deben estudiar más a fondo.

Nota:

- Debido a la cromatina descondensada, las señales individuales de FISH pueden aparecer como pequeños grupos de señales. Por tanto, dos o tres señales del mismo tamaño, separadas por una distancia ≤ al diámetro de una señal, deben contarse como una sola señal.
- No evaluar los núcleos superpuestos.
- No contar los núcleos sobredigeridos (que se reconocen por áreas oscuras visibles en el interior de los núcleos).
- No contar los núcleos con fuerte autofluorescencia, la cual dificulta el reconocimiento de señales.
- Un resultado negativo o inespecífico puede deberse a múltiples factores (ver el apartado 17).

Para interpretar correctamente los resultados, el usuario debe validar este producto antes de utilizarlo en los procedimientos diagnósticos de acuerdo con las directrices nacionales o internacionales.

14. Procedimientos de control de calidad recomendados

Para controlar el correcto rendimiento de las muestras procesadas y los reactivos analíticos, cada ensayo debe ir acompañado de controles internos y externos. Si los controles internos o externos no revelan una tinción adecuada, los resultados de las muestras del paciente deben considerarse no válidos.

Control interno: Células no neoplásicas en la muestra que presentan un patrón de señal normal, por ejemplo, los fibroblastos.

Control externo: Muestras de control positivas y negativas validadas.

15. Características de rendimiento

Consultar las instrucciones de uso de la sonda correspondiente.

16. Eliminación

La eliminación de los reactivos debe llevarse a cabo de acuerdo con las normativas locales.

17. Resolución de problemas

Cualquier desviación de las instrucciones de uso puede producir resultados de tinción inferiores o ausencia de tinción.

Señales débiles o ausencia de señales

Posible causa	Medida
No hay secuencias objetivo disponibles	Uso de los controles apropiados
Muestra celular o tisular no fijada correctamente	Optimizar el tiempo de fijación y el fijador o aplicar un paso posterior a la fijación como se describe en "Procedimiento de ensayo"

Pretratamiento con calor, proteólisis, desnaturalización, hibridación o temperatura de lavado riguroso incorrecta	Comprobar la temperatura de todos los aparatos técnicos utilizados mediante un termómetro calibrado
Pretratamiento proteolítico no realizado correctamente	Optimizar el tiempo de incubación con pepsina, aumentar o disminuir si es necesario
Evaporación de la sonda	Cuando se utiliza un hibridador, es obligatorio el uso de bandas húmedas/tanques llenos de agua. Cuando se utiliza un horno de hibridación, se requiere el uso de una cámara húmeda. Además, el cubreobjetos se debe sellar completamente, por ejemplo, con Fixogum, para evitar que la muestra se seque durante la hibridación
Tampón de lavado riguroso con una concentración demasiado baja	Comprobar la concentración de <u>Wash Buffer A</u>
Soluciones de deshidratación antiguas	Preparar soluciones de deshidratación recientes
Microscopio de fluorescencia mal ajustado	Ajustar correctamente
Se han utilizado juegos de filtros inadecuados	Utilizar juegos de filtros adecuados para los fluorocromos de la sonda. <i>Los juegos de filtros de paso de banda triple proporcionan menos luz en comparación con los juegos de filtros de paso de banda simple o doble. Por consiguiente, las señales pueden ser más débiles con estos juegos de filtros de paso de banda triple</i>
Fotodaño de las sondas/fluoróforos	Realizar los pasos de hibridación y lavado en la oscuridad

Señales de hibridación cruzada; ruido de fondo

Posible causa	Medida
Desparafinación incompleta	Utilizar soluciones recién preparadas; comprobar la duración de la desparafinación
Tratamiento proteolítico previo demasiado intenso	Reducir el tiempo de incubación con pepsina
Volumen de sonda por área demasiado alto	Reducir el volumen de sonda por corte/área; distribuir la sonda gota a gota para evitar la concentración local
Los portaobjetos se enfriaron a temperatura ambiente antes de la hibridación	Transferir los portaobjetos rápidamente a 37 °C
Tampón de lavado riguroso con una concentración demasiado alta	Comprobar la concentración de <u>Wash Buffer A</u>
Temperatura de lavado después de la hibridación demasiado baja	Comprobar la temperatura; aumentar si es necesario
Deshidratación de las muestras entre los distintos pasos de incubación	Sellar los portaobjetos y realizar la incubación en un ambiente húmedo para evitar la deshidratación

Morfología tisular degradada

Posible causa	Medida
La muestra celular o tisular no se ha fijado correctamente	Optimizar el tiempo de fijación y el fijador o aplicar un paso posterior a la fijación como se describe en "Procedimiento de ensayo"
Pretratamiento proteolítico no realizado correctamente	Optimizar el tiempo de incubación con pepsina, aumentar o disminuir si es necesario
Secado insuficiente antes de la aplicación de la sonda	Prolongar el secado al aire

Núcleos superpuestos

Posible causa	Medida
Grosor inadecuado de los cortes histológicos	Preparar cortes de micrótomos de 2-4 μm

La muestra se desliza fuera del portaobjetos

Posible causa	Medida
Recubrimiento poco apropiado del portaobjetos	Utilizar portaobjetos adecuados
Tratamiento proteolítico previo demasiado intenso	Reducir el tiempo de incubación con pepsina

Contratinción débil

Posible causa	Medida
Solución DAPI de concentración baja	Utilizar <u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (Ref. MT-0008-0.8) en su lugar
Tiempo de incubación de DAPI demasiado corto	Ajustar el tiempo de incubación de DAPI

Bibliografía

- Baselga J, et al. (1999) *Semin Oncol* 26: 78-83.
- Brunello E, et al. (2012) *Histopathology* 60: 482-8.
- Brunner K, et al. (2010) *Anal Quant Cytol Histol* 32: 78-89.
- Cochet A, et al. (2012) *J Nucl Med* 53: 512-20.
- Coussens L, et al. (1985) *Science* 230: 1132-9.
- Ettl T, et al. (2012) *Hum Pathol* 43: 921-31.
- Ettl T, et al. (2012) *Br J Cancer* 106: 719-26.
- Fasching P, et al. (2011) *BMC Cancer* 11: 486.
- Haas M, et al. (2011) *Virchows Arch* 458: 403-11.
- Hillig T, et al. (2012) *APMIS* 120: 1000-7.
- Humbert O, et al. (2012) *Ann Oncol* 23: 2572-7.
- Hwang CC, et al. (2011) *Histopathology* 59: 984-92.
- Hynes NE & Stern DF (1994) *Biochim Biophys Acta* 1198: 165-84.
- Jäger M, et al. (2009) *Cancer Res* 69: 4270-6.
- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Lang D, et al. (2008) *Diagn Pathol* 3: 49ff.
- Lehmann-Che L, et al. (2011) *Br J Cancer* 104: 1739-46.
- Ly M, et al. (2012) *Oncology* 83: 257-63.
- Moelans CB, et al. (2011) *Crit Rev Oncol Hematol* 80: 380-92.
- Oliveira-Costa JP, et al. (2011) *Diagn Pathol* 6: 73.
- Park JB, et al. (1989) *Cancer Res* 49: 6605-9.
- Parris TZ, et al. (2010) *Clin Cancer Res* 16: 3860-74.
- Perrone G, et al. (2012) *PLoS One* 7: e43110.
- Popescu NC, et al. (1989) *Genomics* 4: 362-6.
- Sassen A, et al. (2008) *Breast Cancer Res* 10: R2.
- Sassen A, et al. (2009) *Breast Cancer Res* 11: R50.
- Schindlbeck C, et al. (2010) *J Cancer Res Clin Oncol* 136: 1029-37.
- Slamon DJ, et al. (1987) *Science* 235: 177-82.
- Vollmann-Zwerenz A, et al. (2010) *Cytometry Part A* 77: 387-99.
- 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.

Nuestros expertos están a su disposición para resolver cualquier duda. Póngase en contacto con helptech@zytovision.com



ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/Alemania
Teléfono: +49 471 4832-300
Fax: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
Correo electrónico: info@zytovision.com

Marcas comerciales:

ZytoVision® y ZytoLight® son marcas comerciales de ZytoVision GmbH.