



ZytoLight

SPEC ALK/EML4 TriCheck Probe

REF	Z-2117-50	Σ	5 (0.05 ml)
REF	Z-2117-200	Σ	20 (0.2 ml)

Para a detecção qualitativa de rearranjos ALK-EML4 por hibridação *in situ* por fluorescência (FISH)



Dispositivo médico de diagnóstico *In Vitro*

de acordo com a diretiva EU 98/79/CE

1. Utilização pretendida

O ZytoLight SPEC ALK/EML4 TriCheck Probe (PL74) destina-se a ser utilizado para a detecção qualitativa de rearranjos envolvendo o gene humano ALK em 2p23.1-p23.2 e o gene humano EML4 em 2p21, em amostras fixadas em formalina e impregnadas em parafina, através de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH). A sonda destina-se a ser utilizada em combinação com os ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Prod. N°. Z-2028-5/-20).

A interpretação dos resultados deve ser realizada no âmbito do contexto da história clínica do paciente relativamente a outros dados clínicos e patológicos por um profissional qualificado.

2. Relevância clínica

Utilizando esta sonda é possível distinguir entre inversões EML4-ALK e translocações envolvendo o ALK, mas não o EML4, como as translocações ALK-TFG ou ALK-KIF5B. Inversões no braço curto do cromossoma 2 [inv(2)(p21p23)] têm sido frequentemente detetadas em carcinomas do pulmão de não-pequenas células (CPNPC) e levam à formação de transcrições de fusão EML4-ALK. Alguns estudos também reportaram transcrições de fusão EML4-ALK em câncros mamários, gástricos e coloreticais. Foram identificados diferentes pontos de quebra afetando o ALK e EML4 nas respetivas inversões. Assim, têm sido identificadas múltiplas transcrições variantes EML4-ALK, envolvendo sempre o domínio intracelular da quinase ALK. Terapias dirigidas à quinase ALK podem representar uma estratégia terapêutica bastante efetiva em doentes de CPNPC com rearranjos EML4-ALK. Para a identificação deste sub-grupo de doentes com CPNPC, a detecção específica de rearranjos EML4-ALK utilizando hibridação *in situ* por fluorescência, representa uma ferramenta para o diagnóstico e seleção terapêutica.

3. Princípio de teste

A técnica de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) permite a detecção e visualização de sequências específicas de ácidos nucleicos em amostras de células. Os fragmentos de ADN marcados por fluorescência, designados sondas FISH, e as respetivas cadeias-alvo de ADN nas

amostras, são codenaturados e subsequentemente renaturados durante a hibridação. Posteriormente, os fragmentos da sonda não específicos e não ligados são removidos através de fases de lavagem de estrigência. Após a coloração de contraste do ADN com DAPI, os fragmentos da sonda hibridados são visualizados utilizando o microscópio de fluorescência equipado com filtros de excitação e emissão específicos para os fluorocromos com os quais os fragmentos da sonda FISH foram diretamente marcados.

4. Reagentes fornecidos

O ZytoLight SPEC ALK/EML4 TriCheck Probe é composto por:

- Polinucleótidos (~10 ng/μl) com marcação ZyGreen (excitação 503 nm/emissão 528 nm), dirigidos ao mapeamento de sequências alvo em 2p23.1-p23.2* (chr2:29,460,144-30,095,822) proximais à região de quebra do ALK (ver Fig. 1).
- Polinucleótidos (~4.5 ng/μl) com marcação ZyOrange (excitação 547 nm/emissão 572 nm), dirigidos ao mapeamento de sequências alvo em 2p23.2* (chr2:29,174,204-29,383,335) distais à região de quebra do ALK (ver Fig. 1).
- Polinucleótidos (~37.0 ng/μl) com marcação ZyBlue (excitação 418 nm/emissão 467 nm), dirigidos ao mapeamento de sequências alvo em 2p21* (chr2:41,573,525-43,349,624) contendo a região do gene EML4 (ver Fig. 1).
- Tampão de hibridação baseado em formamida

*De acordo com o Conjunto do Genoma Humano GRCh37/hg19

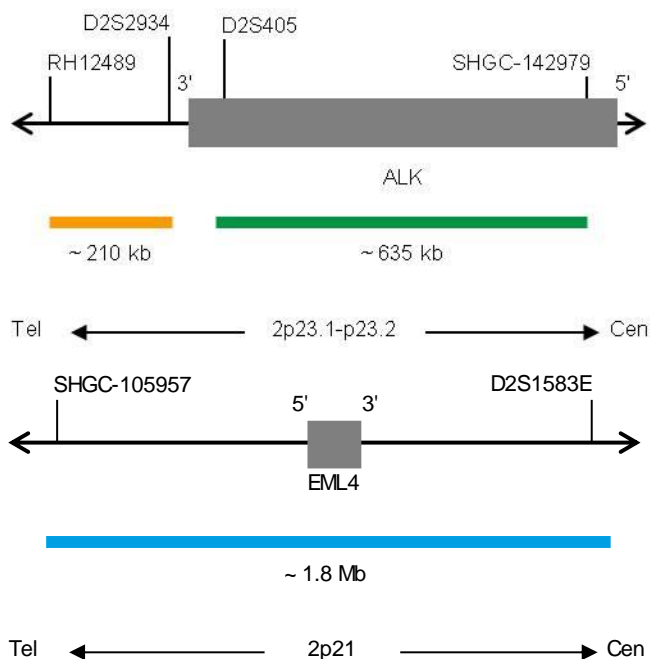


Fig. 1: Cima: SPEC ALK Mapa da sonda; Baixo: SPEC EML4 Mapa da sonda (sem escala)

O ZytoLight SPEC ALK/EML4 TriCheck está disponível em duas apresentações:

- Z-2117-50: 0.05 ml (5 reações de 10 μl cada)
- Z-2117-200: 0.2 ml (20 reações de 10 μl cada)

5. Materiais necessários mas não fornecidos

- ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Prod. N°. Z-2028-5/-20)
- Amostras de controlo positivo e negativo
- Lâminas de microscópio, com carregamento positivo
- Banho-maria (37°C, 98°C)
- Hibridador ou placa quente
- Hibridador ou câmara de humidade na estufa de hibridação
- Pipetas ajustáveis (10 μl, 25 μl)
- Tinas de coloração
- Temporizador
- Termómetro calibrado

- Etanol ou álcool
- Xilol
- Água desionizada ou destilada
- Lamelas (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Cola, por ex.: Fixogum Rubber Cement (Prod. N.º. E-4005-50/-125) ou similar
- Microscópio de fluorescência devidamente calibrado (400-1000x)
- Óleo de imersão aprovado para microscopia de fluorescência
- Conjuntos de filtros adequados

6. Armazenamento e manuseamento

Armazenar a 2-8°C na posição vertical, protegido da luz solar. Utilizar protegido da luz. Repor as condições de armazenamento imediatamente após a utilização. Não utilizar reagentes após terminar a data de validade indicada no rótulo. O produto é estável até à data de validade indicada no rótulo, quando manuseado em conformidade.

7. Avisos e precauções

- Ler as instruções antes de utilizar!
- Não utilizar reagentes após terminar a data de validade!
- Este produto contém substâncias (em concentrações e volume reduzidos) que são nocivas para a saúde e potencialmente infecciosas. Evitar qualquer contacto direto com os reagentes. Tomar as medidas de proteção adequadas (utilizar luvas descartáveis, óculos de proteção e vestuário de laboratório)!
- Caso os reagentes entrem em contacto com a pele, lavar imediatamente com água abundante!
- Está disponível a ficha de dados de segurança, se solicitada, para utilização profissional.
- Não reutilizar os reagentes.
- Evitar a contaminação cruzada das amostras dado que poderá conduzir a resultados incorretos.
- A sonda não deve ser exposta à luz, especialmente luz forte, por um período prolongado de tempo, ou seja, todos os passos devem ser realizados, quando possível, numa sala escura e/ou utilizando recipientes resistentes à luz!

Frases de risco e de aviso:

O componente que determina o risco é a formamida.



Perigo

H351	Suspeito de provocar cancro.
H360FD	Pode afetar a fertilidade. Pode afectar o nascituro
H373	Pode afetar os órgãos após exposição prolongada ou repetida.
P201	Pedir instruções específicas antes da utilização.
P202	Não manuseie o produto antes de ter lido e percebido todas as precauções de segurança.
P260	Não respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.
P280	Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.
P308+P313	EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: consulte um médico.
P405	Armazenar em local fechado à chave.

8. Limitações

- Apenas para utilização em diagnóstico *in vitro*.
- Apenas para utilização profissional.
- A interpretação clínica de qualquer coloração positiva, ou a ausência desta, deve ser efetuada no contexto da história clínica, morfologia e outros critérios histopatológicos, assim como outros testes de diagnóstico. É da responsabilidade do patologista qualificado estar familiarizado com as sondas FISH, reagentes, painéis de diagnóstico e métodos utilizados para produzir a preparação da coloração. A coloração deve ser realizada num laboratório certificado e licenciado, sob a supervisão de um patologista responsável pela revisão das lâminas

de coloração e que garanta a adequação dos controlos positivos e negativos.

• A coloração de amostras, especialmente, a intensidade do sinal e a coloração de fundo, depende do manuseamento e do processamento da amostra antes da coloração. A fixação, congelamento, descongelamento, lavagem, secagem, aquecimento ou microtomia inadequada ou a contaminação com outras amostras ou fluidos pode produzir perturbações ou falsos resultados. Os resultados inconsistentes podem resultar de variações nos métodos de fixação e inclusão, assim como de irregularidades inerentes à amostra.

• A sonda deve ser utilizada apenas para deteção dos loci descritos em 4 "Reagentes fornecidos"

• O desempenho foi validado utilizando os procedimentos descritos nestas instruções de utilização. As alterações a estes procedimentos podem afetar o desempenho e devem ser validadas pelo utilizador.

9. Substâncias que podem interferir

Os eritrócitos presentes na amostra podem apresentar autofluorescência, o que afeta o reconhecimento do sinal.

Os seguintes fixadores são incompatíveis com o equipamento FISH:

- Fixador de Bouin
- Fixador B5
- Fixadores ácidos (ex.: ácido pírco)
- Fixador de Zenker
- Alcoois (quando utilizados individualmente)
- Cloreto de mercúrio
- Fixador de formaldeído/zinco
- Fixador de Hollande
- Formalina não tamponada

10. Preparação de amostras

Recomendações:

- Fixação em formalina tamponada neutra a 10% durante 24 h à temperatura ambiente (18-25°C).
- Dimensão da amostra $\leq 0,5 \text{ cm}^3$.
- Utilizar parafina de qualidade Premium.
- A impregnação deve ser efetuada a temperaturas inferiores a 65°C.
- Preparar secções de micrótomo de 2-4 μm .
- Utilizar lâminas de microscópio com carregamento positivo.
- Adesão dos cortes durante 2-16 h a 50-60°C.

11. Tratamento de preparação do dispositivo

O produto está pronto a usar. Não requer reconstituição, mistura ou diluição. Permitir que a sonda atinja a temperatura ambiente (18-25°C) antes de a utilizar, protegida da luz. Antes de abrir o frasco, misturar por vórtex e rotação invertida durante alguns instantes.

12. Procedimento do teste

Pré-tratamento da amostra

Efetuar o pré-tratamento da amostra (desparafinação, proteólise) de acordo com as instruções de utilização do ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit.

Desnaturação e hibridação

1. Pipetar 10 μl da sonda para cada amostra pré-tratada.
2. Tapar a amostra com uma lamela de 22 mm x 22 mm (evitar bolhas de ar) e selar a lamela.

Recomendamos a utilização de cola (ex.: Fixogum) para a selagem.

3. Colocar as lâminas numa placa quente ou hibridador e desnaturar as amostras durante 10 min a 75°C.
4. Transferir as lâminas para uma câmara de humidade e hibridar durante a noite a 37°C (por ex.: numa estufa de hibridação).

É fundamental que as amostras não sequem durante a fase de hibridação.

Pós-hibridação

Realizar o processamento pós-hibridação (lavagem, coloração de contraste, microscopia de fluorescência) de acordo com as instruções de utilização do ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit.

13. Interpretação dos resultados

Com a utilização dos filtros adequados, os sinais de hibridação da sonda surgem a verde (proximal à região de quebra do ALK), laranja (distal à região de quebra do ALK) e azul (região gene EML4).

Situação normal: Em interfases de células normais ou em células sem rearranjo da região EML4-ALK, são visíveis dois sinais de fusão laranja/verde e dois sinais azuis (ver Fig. 2).

Situação anormal: Uma inversão EML4-ALK é indicada por um sinal verde separado do sinal laranja e um sinal azul adicional. O sinal verde separado e laranja estão co-localizados com o sinal azul. Uma translocação ALK não envolvendo o EML4 é indicada por sinal verde e laranja separados, sem sinal azul adicional. A inversão EML4-ALK com deleção das sequências 5' ALK é indicada pela perda de um dos sinais verde e co-localização do sinal laranja isolado com o sinal azul adicional (ver Fig. 2).

Sinais verdes e laranjas sobrepostos podem surgir como sinais amarelos.

	Filtro Duplo Verde/Laranja	Filtro Azul	Imagem composta ou Filtro Triplo
Células normais			
Inversão EML4 – ALK			
Translocação ALK – não envolvendo EML4			
Inversão EML4 – ALK com deleção das sequências 5' ALK			

Fig. 2: Resultados esperados em núcleos normais e anormais

Poderá ser observada outra distribuição de sinal em algumas amostras anormais, que poderá resultar num padrão de sinal diferente do referido acima, indicando reorganizações variantes. Os padrões de sinal inesperados devem ser investigados.

Nota:

- Devido à cromatina descondensada, os sinais FISH individuais podem surgir como pequenos conjuntos de sinais. Assim, dois ou três sinais da mesma dimensão, separados por uma distância ≤ 1 ao diâmetro de um sinal, deverão ser considerados como um sinal.
- Não avaliar núcleos sobrepostos.
- Não contabilizar núcleos sobre-digeridos (reconhecidos pelas áreas escuras visíveis no interior dos núcleos)
- Não contabilizar núcleos com autofluorescência forte, o que afeta o reconhecimento de sinais.
- Um resultado negativo ou não específico pode ser causado por vários fatores (ver Capítulo 17).
- De forma a interpretar corretamente os resultados, o utilizador deve validar este produto antes da utilização em procedimentos de diagnóstico, de acordo com as diretivas nacionais e/ou internacionais.

14. Procedimentos do controlo da qualidade recomendados

De forma a monitorizar o desempenho correto das amostras processadas e dos reagentes, cada teste deve ser acompanhado de controlos internos e externos. Caso os controlos internos e/ou externos não demonstrem uma coloração adequada, os resultados das amostras dos pacientes devem ser considerados inválidos.

Controlo interno: células não neoplásicas na amostra que apresentem um padrão de sinal normal, por ex.: fibroblastos.

Controlo externo: amostras validadas de controlo positivo e negativo.

15. Características de desempenho

Precisão: a localização de hibridação da sonda foi avaliada em proliferações de metafase de um indivíduo do género masculino de cariótipo normal. Em todas as amostras testadas a sonda hibridou somente nos loci esperados. Não foram observados sinais adicionais ou hibridações cruzadas. Assim, a precisão foi calculada como sendo de 100%.

Sensibilidade analítica: para avaliação da sensibilidade analítica, a sonda foi avaliada em proliferações de metafase de indivíduos do género masculino de cariótipo normal. Todos os núcleos mostraram o padrão de sinais esperado em todas as amostras testadas. Assim, a sensibilidade analítica foi calculada como sendo de 100%.

Especificidade analítica: para avaliação da especificidade analítica, a sonda foi avaliada em proliferações de metafase de indivíduos do género masculino de cariótipo normal. Em todas as amostras testadas, todos os sinais hibridaram apenas nos loci alvo esperados e em nenhum outro loci. Assim, a especificidade analítica foi calculada como sendo de 100%.

16. Eliminação

A eliminação de reagentes deve ser realizada de acordo com as normas locais.

17. Resolução de problemas

Qualquer desvio relativamente às instruções de utilização pode conduzir a resultados de coloração inferiores ou a ausência total de coloração.

Sinais fracos ou ausência de sinais

Causa possível	Ação
Sem sequências-alvo disponíveis	Utilizar os controlos adequados
Amostra de tecido ou de células indevidamente fixada	Otimizar o tempo de fixação e o fixador ou aplicar uma fase de pós-fixação conforme descrito no "procedimento de teste" do manual do <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</u>
Pré-tratamento de calor, proteólise, desnaturação, hibridação ou temperatura de lavagem de estringência incorretas	Verificar a temperatura de todos os dispositivos técnicos utilizados com um termómetro calibrado
Pré-tratamento proteolítico executado de forma incorreta	Otimizar o tempo de incubação da pepsina, aumentar ou reduzir conforme necessário
Evaporação da sonda	Quando utiliza um hibridador, a utilização de faixas húmidas/tanques com água é obrigatória. Quando utiliza uma estufa de hibridação, é necessária a utilização de uma câmara de humidade. Adicionalmente, as lamelas devem estar perfeitamente seladas, por ex.: com Fixogum, para evitar a secagem da amostra durante a hibridação

Tampão de lavagem de estringência com concentração demasiado baixa	Verificar a concentração do tampão de lavagem de estringência
Soluções de desidratação antigas	Preparar soluções de desidratação novas
Microscópio de fluorescência incorretamente ajustado	Ajustar corretamente
Conjuntos de filtros inadequados	Utilizar conjuntos de filtros adequados para os fluorocromos da sonda. <i>Os conjuntos de filtros de passagem de banda tripla permitem menos luz, comparados com os conjuntos de filtros de passagem de banda dupla ou passagem simples. Consequentemente, os sinais podem surgir mais fracos utilizando os conjuntos de filtros de passagem de banda tripla</i>
Dano causado por exposição das sondas/fluoróforos	Realizar a hibridação e as fases de lavagem numa sala escura

Sinais de hibridação cruzada; perturbações de fundo

Causa possível	Ação
Desparafinação incompleta	Utilizar soluções novas; verificar a duração da desparafinação
Pré-tratamento proteolítico demasiado forte	Reduzir o tempo de incubação da pepsina
Volume da sonda por área demasiado elevado	Reduzir o volume da sonda por secção/área, distribuir a sonda por gotas para evitar a concentração local
Lâminas arrefecidas à temperatura ambiente antes da hibridação	Transferir rapidamente as lâminas para 37°C
Tampão de lavagem de estringência demasiado concentrado	Verificar a concentração do tampão de lavagem de estringência
Temperatura de lavagem após a hibridação demasiado baixa	Verificar a temperatura; aumentar se necessário
Desidratação das amostras entre as fases de incubação individual	Evitar a desidratação selando as lâminas e realizando a incubação num ambiente húmido

Morfologia do tecido degradada

Causa possível	Ação
Amostra de tecido ou de células indevidamente fixada	Otimizar o tempo de fixação e o fixador ou aplicar uma fase de pós-fixação conforme descrito no "procedimento de teste" do manual <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</u>
Pré-tratamento proteolítico executado de forma incorreta	Otimizar o tempo de incubação da pepsina, aumentar ou reduzir conforme necessário
Secagem insuficiente antes da aplicação da sonda	Prolongar a secagem ao ar

Núcleos sobrepostos

Causa possível	Ação
Espessura inadequada das secções de tecido	Efetuar secções de micrótopo de 2-4 µm.

Amostra desliza da lâmina

Causa possível	Ação
Revestimento inadequado da lâmina	Utilizar lâminas adequadas
Pré-tratamento proteolítico demasiado forte	Reduzir o tempo de incubação da pepsina

Coloração de contraste fraca

Causa possível	Ação
Solução DAPI de baixa concentração	Utilizar <u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (Prod. No. MT-0008-0.8)
Tempo de incubação da solução DAPI demasiado curto	Ajustar o tempo de incubação da solução DAPI

18. Literatura

- Inamura K, et al. (2009) *Mod Pathol* 22: 508-15.
- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Koivunen JP, et al. (2008) *Clin Cancer Res* 14: 4275-83.
- Lawce HJ & Olson S (2013) *J Assoc Genet Technol* 39: 66-71.
- Martelli MP, et al. (2009) *Am J Pathol* 174: 661-70.
- Perner S, et al. (2008) *Neoplasia* 10: 298-302.
- Preusser M, et al. (2013) *Lung Cancer* 80: 278-83.
- Rodig SJ, et al. (2009) *Clin Cancer Res* 15: 5216-23.
- Sasaki T, et al. (2010) *Eur J Cancer* 46: 1773-80.
- Schildgen V, et al. (2012) *Per Med* 9: 801-3.
- Schildhaus HU, et al. (2013) *Mod Pathol* 26: 1468-77.
- Schoppmann SF, et al. (2013) *Eur J Cancer* 49: 1876-81.
- Thunnissen E, et al. (2012) *Virchows Arch* 461: 245-57.
- Von Laffert M, et al. (2013) *Lung Cancer* 81: 200-6.
- Wilkinson DG: *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.

Os nossos especialistas estão disponíveis para responder às suas questões.

Contacte helptech@zytovision.com



ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/ Alemanha
Telefone: +49 471 4832-300
Fax: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
E-mail: info@zytovision.com

Marcas registadas:

ZytoVision® e ZytoLight® são marcas registadas da ZytoVision GmbH.