



FlexISH

RET/KIF5B TriCheck Probe

REF	Z-2269-50	Σ	5 (0.05 ml)
REF	Z-2269-200	Σ	20 (0.2 ml)

Para a detecção qualitativa de rearranjos humanos RET-KIF5B 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 FlexISH RET/KIF5B TriCheck Probe (PL226) destina-se a ser utilizado para a detecção qualitativa de rearranjos envolvendo o gene humano RET em 10q11.21 e o gene KIF5B em 10p11.22, em amostras fixadas em formalina e impregnadas em parafina, nomeadamente em amostras de linfoma Não-Hodgkin (LNH), através de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH). A sonda destina-se a ser utilizada em combinação com o FlexISH-Tissue Implementation Kit (Prod. No. Z-2182-5/-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

Rearranjos RET, incluindo inversões e translocações, são encontrados no carcinoma do pulmão de não pequenas células (CPNPC), com uma incidência de 1-2%. A inversão pericêntrica do cromossoma 10 [inv(10)(p11.2q11.2)] conduz a um transcrito de fusão do gene KIF5B e do proto-oncogene RET, formando assim uma proteína quimérica. A homo-dimerização resultante dos domínios de espiral enrolada de KIF5B provoca uma ativação aberrante da tirosina quinase recetora (RTK) de RET, um mecanismo conhecido a partir da fusão KIF5B-ALK que também é encontrada no adenocarcinoma do pulmão de não pequenas células (LADC). Doentes de LADC com fusões KIF5B-RET são comumente testados como negativos para as mutações principais nos genes EGFR, KRAS e ALK.

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 estringência.

Após a coloração de contraste do ADN com DAPI, os fragmentos da sonda hibridizados 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 FlexISH RET/KIF5B TriCheck Probe é composto por:

- Polinucleótidos (~2.5 ng/μl) com marcação ZyOrange (excitação 547 nm/emissão 572 nm), dirigidos ao mapeamento de sequências alvo em 10q11.21* (chr10:43,340,888-43,510,171) proximais à região de quebra do RET (ver Fig. 1).
- Polinucleótidos (~10.0 ng/μl) com marcação ZyGreen (excitação 503 nm/emissão 528 nm), dirigidos ao mapeamento de sequências alvo em 10q11.21* (chr10:43,626,274-44,112,146) distais à região de quebra do RET (ver Fig. 1).
- Polinucleótidos (~70.0 ng/μl) com marcação ZyBlue (excitação 418 nm/emissão 467 nm), dirigidos ao mapeamento de sequências alvo em 10p11.22* (chr10:31,640,467-33,085,804) contendo o gene KIF5B (ver Fig. 1).
- Tampão de hibridação baseado em formamida

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

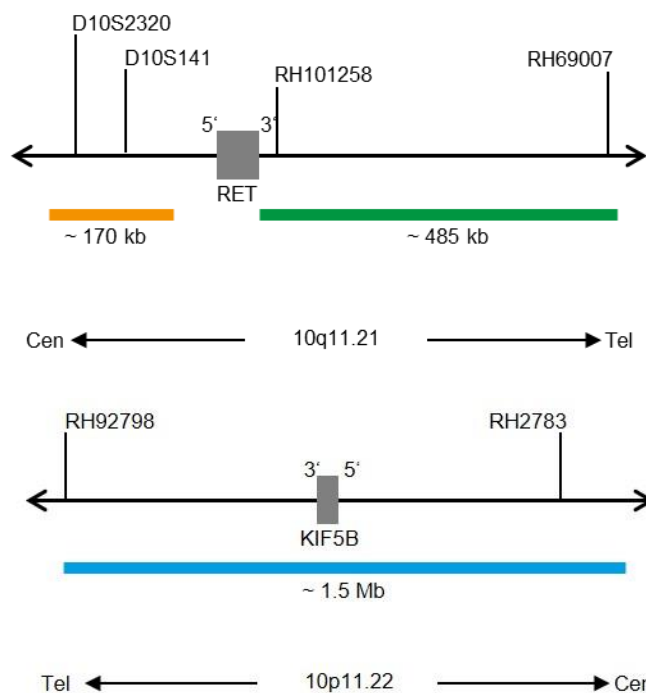


Fig. 1: Cima: SPEC RET Mapa da sonda; Baixo: SPEC KIF5B Mapa da sonda (sem escala)

O FlexISH RET/KIF5B TriCheck Probe está disponível em duas apresentações:

- Z-2269-50: 0.05 ml (5 reações de 10 μl cada)
- Z-2269-200: 0.2 ml (20 reações de 10 μl cada)

5. Materiais necessários mas não fornecidos

- FlexISH-Tissue Implementation Kit (Prod. No. Z-2182-5/-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 húmida na estufa de hibridação
- Pipetas ajustáveis (10 μl, 25 μl)
- Frascos ou banhos 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

H319	Provoca irritação ocular grave.
H351	Suspeito de provocar cancro.
H360FD	Pode afetar a fertilidade. Pode afetar o nascituro
H373	Pode afetar os órgãos após exposição prolongada ou repetida.
P201	Pedir instruções específicas antes da utilização.
P260	Não respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.
P280	Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.
P305+P351+P338	SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: Enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar.
P308+P313	EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: consulte um médico.
P337+P313	Caso a irritação ocular persista: consulte um médico.

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
- Álcoois (quando utilizados individualmente)
- Cloreto de mercúrio
- Fixador de formaldeído/zinco
- Fixador de Hollande
- Formalina não tamponada

10. Preparação de amostras

Preparar as amostras de acordo com as instruções de utilização do [FlexISH-Tissue Implementation Kit](#)

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 [FlexISH-Tissue Implementation Kit](#).

Desnaturação e hibridação

1. Pipetar 10 µl da sonda para cada amostra pré-tratada.
2. Cobrir 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. Realizar a hibridação durante 2 h a 16 h (*overnight*), transferindo as lâminas para hibridador ou câmara húmida em estufa a 37°.

É fundamental que as amostras não sequem durante a hibridação.

Pós-hibridação

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

13. Interpretação dos resultados

Com a utilização dos filtros adequados, os sinais de hibridação da sonda surgem a verde (distal à região de quebra do RET), a laranja (proximal à região de quebra do RET) e a azul (região KIF5B).

Situação normal: Em interfases de células normais ou células sem rearranjos de RET-KIF5B, são visíveis dois sinais de fusão verde/laranja ao utilizar um conjunto de filtro duplo apropriado e dois sinais azuis ao usar um conjunto de filtro único apropriado. Ao utilizar um conjunto de filtro triplo apropriado, são visíveis dois sinais de fusão verde/laranja, cada um em estreita proximidade com um sinal azul, indicando cromossomas 10 normais (ver Fig. 2).

Situação anormal: Uma fusão KIF5B-RET causada por uma inversão RET-KIF5B é indicada por um sinal de fusão verde/azul e um sinal de fusão laranja/azul nas proximidades. Uma translocação RET sem o envolvimento de KIF5B é indicada por um sinal laranja e azul próximo e um sinal verde separado. Sinais verdes isolados são resultado de deleções proximais da região de quebra do gene RET (ver Fig. 2).

Sinais sobrepostos podem surgir como sinais amarelos.

	Filtro Duplo Verde/Laranja	Filtro Simples Azul	Imagem Composta ou Filtro Triplo
Células normais			
Fusão KIF5B-RET causada por inversão			
Translocação RET não afetando KIF5B			

Fig. 2: Resultados esperados em núcleos de interfase normais e com rearranjos

Aberrações genómicas devido a pequenas deleções, duplicações ou inversões, podem resultar em padrões de sinais inesperados. 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 de controlo positivo e negativo validadas.

15. Características de desempenho

Precisão: a localização de hibridação da sonda foi avaliada em proliferações de metáfase 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 metáfase 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 metáfase 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 <i>FlexISH-Tissue Implementation Kit</i>
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 húmida. 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 do <u>FlexISH-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

- Gautschi O, et al. (2013) *J Thorac Oncol* 8: e43-4.
- Ju YS, et al. (2012) *Genome Res* 22: 436-45.
- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Kohno T, et al. (2012) *Nat Med* 18: 375-7.
- Tsuta K, et al. (2014) *Br J Cancer* 110: 1571-8.
- Wilkinson DG: *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.
- Yoh K, et al. (2017). *Lancet Respir Med* 5: 42-50.

Os nossos especialistas estão disponíveis para responder às suas questões.

Contacte help@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 FlexISH® são marcas registadas da ZytoVision GmbH.