



HISTOSONDA c-erbB2

Referencia: CBM-0020-R5

Ensayo para 5 reacciones individuales en un único vial. 65µl por reacción

Clasificación del producto:

*Países miembros de la Unión Europea
Para Utilización en el Diagnóstico In Vitro

INTRODUCCIÓN

El c-erbB2 es denominado así ya que corresponde al homólogo humano de un gen viral que produce eritroblastosis leucémica en las aves. Este gen se aisló en una colonia celular del neuroblastoma/glioblastoma de la rata y por este motivo también es conocido como HER2-NEU.

Este gen codifica para un receptor tirosina-quinasa situado en la membrana citoplasmática y para el cual aún no conocemos su ligando.

Esta proteína pertenece a una familia de receptores cuyo principal miembro es el EGF^R (epidermal growth factor receptor) también conocido como c-erbB1. Esta familia está constituida por cuatro miembros (c-erbB1-c-erbB2, c-erbB3 y c-erbB4) que muestran una gran homología interna. Debido a esta homología anticuerpos dirigidos contra un miembro concreto de esta familia de proteínas pueden mostrar reacciones cruzadas con otros miembros.

Clinicamente se comprobó que entre un 15 y un 30% de los cánceres de mama sobreexpresan la proteína c-erbB2. Esta sobreexpresión implica un peor pronóstico de estos tumores confiriéndoles mayor agresividad y resistencia al taxol.

Ya que se han fabricado anticuerpos monoclonales terapéuticos contra esta proteína es de vital importancia conocer si un caso concreto tumoral sobreexpresa o no la proteína c-erbB2.

Hasta ahora, los métodos de detección se han basado en la inmunohistoquímica con anticuerpos dirigidos contra la proteína c-erbB2, que generalmente ofrecen resultados confusos y la determinación de la amplificación del gen que codifica este producto.

Cenbimo ha desarrollado una sonda para hibridación "in situ" que detecta el RNA transcrito del gen c-erbB2.

La detección del RNA mensajero de esta proteína ofrece múltiples ventajas ya que elimina los aspectos confusos de la inmunohistoquímica y por otra parte, detecta transcripción real, ya que el ver amplificación génica por FISH no garantiza que todos los genes amplificados se transcriban.

Histosonda c-erbB2 consiste en dos fragmentos de DNA monocatenario de 694 y de 1143 nucleótidos de longitud respectivamente dirigidos contra secuencias expresadas de este gen.

El tiempo de incubación de la sonda es de únicamente 1 hora y se trata de una sonda cromogénica de hibridación y sus resultados se observan directamente en un microscopio de campo claro.

FINALIDAD PREVISTA

Para su uso en diagnóstico in Vitro

La Histosonda c-erbB2 es útil para la detección del RNA de c-erbB2 y sus tumores.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

La Histosonda c-erbB2 ha sido diseñada para su utilización en el diagnóstico in vitro para uso profesional y debe ser manipulado por personal cualificado y debidamente entrenado.

Para la obtención de unos resultados adecuados, deben seguirse fielmente las instrucciones del manual. Cualquier cambio en las temperaturas o tiempos indicados, o en cualquier otro paso del proceso, puede dar lugar a resultados erróneos.

Este producto contiene azida sódica (NaN₃) como conservante en su composición. A las concentraciones en las que está presente (<0,1%) no está clasificado como peligroso. Una vez desechado el producto, deje correr abundante cantidad de agua para evitar acumulaciones de azidas metálicas en las cañerías.

COMPONENTES

1 tubo con el contenido suficiente de la Histosonda c-erbB2 para 5 reacciones individuales.

La Histosonda c-erbB2 consiste en dos segmentos de DNA de una sola cadena complementaria al RNA que se expresa de esta proteína y tienen longitudes de 695 y 1144 nucleótidos. Esta sonda ha sido marcada con Digoxigenina.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

Los reactivos suministrados se almacenan a temperatura 3-7°C hasta la fecha de caducidad indicada en su etiqueta. No utilizar el producto después de la fecha de caducidad indicada en su etiqueta.

MUESTRAS

Cortes histológicos de tejidos fijados en formol e incluidos en parafina de 4-6 micrómetros de espesor.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Las muestras en las que se observe expresión de c-erbB2 deberán mostrar una coloración marrón en el citoplasma celular que contrastará sobre el fondo azul-violeta que confiere la tinción con hematoxilina. El facultativo valorará los resultados en base a su experiencia a partir de la visualización de las señales observadas en la muestra, en paralelo con las señales observadas en las muestras de control positivo y control negativo para la expresión de este gen.

LIMITACIONES DEL ENSAYO

La Histosonda c-erbB2 ha sido optimizada para detectar la expresión de su RNA en tejidos fijados en formol e incluidos en parafina. No se recomienda la utilización de otro tipo de muestras o de técnicas de preparación. El funcionamiento del producto ha sido validado utilizando los protocolos indicados en el manual de instrucciones.

La utilización de otros procedimientos o las modificaciones de los protocolos recomendados, pueden conducir a resultados erróneos.

Los resultados de este ensayo deben ser evaluados por el facultativo en combinación con el resto de datos clínicos del paciente de los que se disponga. Para la obtención de unos resultados óptimos y reproducibles es muy importante ajustarse rigurosamente a las condiciones de tiempos y temperaturas indicadas en el procedimiento.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) HER2 status determination using RNA-ISH - a rapid and simple technique showing high correlation with FISH and IHC in 141 cases of breast cancer. Javier Alba¹, Javier Gutiérrez², Victoria Mary Coupe², Beatriz Fernández¹, Ángel Vázquez-Boquete¹, Jesús Alba², Jerónimo Forteza¹ and Tomás García-Caballero¹
- 2) mRNA In Situ Hybridization (Histosonda): A New Diagnostic Tool for HER2-Status in Breast Cancer. A Multicentric Spanish Study. Bernet L, Martínez Benaclocha M, Castera C, Cano Muñoz R, Sevilla F, Alba J, de Dios Barranco J, Córdoba A, García-Caballero T, Hardisson D, de Francisco Hernandez JM, Lazaro JM, Polo L, Riu F, Rezola R, Rojo F, Ruiz I, Hernández A, de la Cámara de Las Heras JM, Coupe VM.

INSTRUCCIONES DE USO

Para la utilización de las sondas marcadas con Digoxigenina.

PRINCIPIO DEL MÉTODO

La Hibridación In Situ Cromogénica (CISH), es una técnica utilizada para determinar la presencia de una secuencia de ADN o ARN, o estudiar la expresión de un gen así como la evaluación simultánea de la morfología del tejido mediante el uso de microscopía de campo claro.

La sonda marcada, de secuencia conocida, se hibrida con su diana en el tejido problema. Esta unión se detecta mediante un proceso inmunohistoquímico.

Las Histosondas, cuya diana es el RNA mensajero, están destinadas a hacer visibles los genes que se expresan detectando la expresión génica.

Protocolo de HistoSonda

Para mayor información incluyendo Preguntas más Frecuentes y Apoyo Técnico por favor solicite el Manual Técnico completo de HistoSonda en la siguiente dirección de correo: techserv@cenbimo.com.

Accesorios necesarios para el desarrollo del protocolo pero no suministrados con el producto:

Proteína K, Anticuerpo Anti-Digoxina, polímero comercial anti-ratón HRP, solución de Diaminobenzidina (DAB).

Antes de comenzar, precaliente la cámara húmeda a 62°C.

1a. Desparafinación

1. Caliente los portaobjetos a 62°C durante 10mins utilizando una placa caliente o un incubador.
2. Introduzca los portaobjetos en el siguiente orden en:
 - a. Xileno: 10 mins
 - b. Xileno: 5mins

- c. Alcohol absoluto (etanol o isopropanol): 1min X 2 veces
 - d. Alcohol 96%: 1min X 3 veces
 - e. Metanol con 0.3% H₂O₂ o 3% H₂O₂ solo : 5mins
3. Lave enérgicamente los portaobjetos con agua destilada, manténgalos en agua 1min.

1b. Inhibición de uniones inespecíficas de DNA (opcional)

Por lo general este paso no es necesario, a menos que el tejido que vaya a hibridar contenga una gran cantidad de leucocitos polimorfonucleares eosinófilos (generalmente médula ósea y tejidos gástricos).

1. Introducir los portaobjetos en agua destilada hirviendo durante **30 segundos** e inmediatamente transfíralos a agua destilada a temperatura ambiente.

¡ **Importante:** un tratamiento térmico excesivo puede provocar una tinción de fondo. Saque los portaobjetos de manera inmediata. !

2. Desproteinización

1. Preparar una dilución de Proteína K comercial a una concentración de 0,033 mg/ml en PBS pH 7.4.
2. Retire el exceso de agua de cada porta-objeto con un pañuelo de papel.
3. Cubra el tejido con 200µl de Proteína K e incube en una cámara húmeda exactamente 10mins a temperatura ambiente.
4. Lave enérgicamente con agua.
5. Introduzca los portaobjetos en PBS pH 7.4 durante 2mins.

¡ **(Importante:** si los cortes han sido tratados previamente con calor en microondas, use la Proteína K sólo durante 5 minutos, ya que este tratamiento sensibiliza mucho los tejidos para esta enzima. **Las médulas óseas requieren una digestión de 20 min a 55°C con Proteína K tras su tratamiento con calor.** !

3. Incubación con la sonda

1. Retire el exceso de buffer del portaobjeto con un pañuelo de papel.
2. Añada los 65µl de la sonda al corte asegurándose de que todo el tejido queda cubierto y de que no quedan burbujas de aire.
3. Coloque los cristales en posición horizontal en una cámara húmeda y cierre bien.
4. Incube a 62°C durante 1 h.

4. Lavado de la sonda

¡ La solución de la sonda es muy viscosa. Es **muy importante** lavar bien los cristales para asegurarse de que la solución de la sonda es completamente retirada. !

1. Lave la superficie del tejido vigorosamente con PBS pH 7.4 para retirar toda la sonda.
2. Agite en PBS durante 5mins.

5. Revelado de la sonda

Protocolo para el revelado manual de la sonda.

1. Retire el exceso de buffer de los cortes como anteriormente.
2. Cubra el tejido con 100 µl de Anti-Digoxina (no suministrado con este producto) e incube en una cámara húmeda durante 30mins a temperatura ambiente.
3. Lave enérgicamente con PBS, y agite en PBS pH 7.4 durante 1min.
4. Retire el exceso de buffer de los cortes.
5. Ponga una gota de un polímero comercial HRP (no suministrado con este producto) que reconozca el anticuerpo primario utilizado sobre el tejido (suficiente para cubrir todo el tejido 50-100µl) e incube en una cámara húmeda siguiendo las instrucciones del fabricante.
6. Lave vigorosamente con PBS, agite en PBS durante 1min.
7. Retire el exceso de buffer de los tejidos y aplique una dilución de Diaminobenzidina (DAB) comercial siguiendo las instrucciones del fabricante.
8. Lave con agua.
9. Tiña los cortes brevemente (2-3secs) con hematoxilina Harris diluida al 50% en agua destilada.
10. Lave con agua, deshidrate y haga el montaje de los cristales siguiendo los protocolos habituales del laboratorio.

Fecha de emisión: 23/08/2016



HISTOSONDA c-erbB2

Reference: CBM-0020-R5

Assay of one vial for 5 individual reactions. 65µl for reaction.

Product classification:

*EU countries
"For In Vitro Diagnostics"

INTRODUCTION

c-erbB2 is denominated as such as it corresponds to the human homologue of a viral gene that causes leukemia erythroblastosis in birds. This gene was isolated in a neuroblastoma/glioblastoma rat cell colony and for this reason it is also known as HER2-NEU.

This gene codes for a tyrosine kinase receptor situated in the cytoplasmic membrane and for whom the ligand is still unknown.

This protein belongs to a family of receptors whose principle member is EGF α r (epidermal growth factor receptor) also known as c-erbB1. This family is made up of four members (c-erbB1, c-erbB2, c-erbB3 and c-erbB4) that share great internal homology. Due to this homology antibodies targeted against this family of proteins can cross react with other members.

It is clinically shown that between 15 and 30% of breast cancers over express the c-erbB2 protein. This over expression implies a worse prognosis for these tumors meaning that they are more aggressive and resistant to Taxol.

As there are therapeutic monoclonal antibodies against this protein it is vital to know if a concrete tumoral case over expresses the c-erbB2 protein or not.

Until now the methods of detection have been based on immunohistochemistry with antibodies targeted against the c-erbB2 protein which generally yield confusing results and the determination of amplification of the gene that codes for this product.

Cenbimo has designed a probe for in situ hybridization that detects the transcribed RNA of the c-erbB2 gene.

The detection of messenger RNA for this protein offers multiple advantages as it eliminates the confusing aspects of immunohistochemistry, and on the other hand detects real transcription, as to see genetic amplification by FISH does not guarantee that all amplified genes are transcribing.

Histosonda c-erbB2 consists of 2 fragments of single-stranded DNA with lengths of 694 and 1143 nucleotides that are targeted against expressed sequences of this gene.

The probe incubation period is only 1 hour and as it is a chromogenic hybridisation probe the results can be viewed directly by light microscope.

INTENDED USE

For use in In Vitro Diagnosis.

Histosonda c-erbB2 is useful for the detection of c-erbB2 RNA and its associated tumors.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

Histosonda c-erbB2 has been designed for professional use in In Vitro Diagnosis and must be manipulated by qualified and accordingly trained personnel.

In order to obtain the best results, the instructions contained in the manual must be followed. Any change to the indicated temperatures, times or any other step of the process can lead to poor results.

COMPONENTS

1 tube with the necessary amount of Histosonda c-erbB2.

Histosonda c-erbB2 consists of two segments of single-stranded DNA complementary to expressed RNA, with lengths of 695 and 1144 nucleotides. This probe has been labeled with Digoxigenin.

STORAGE CONDITIONS

Supplied reagents are stored at 3-7°C until expiration date. Do not use after expiration date.

SAMPLES

Block sections of formalin fixed paraffin embedded tissues. Sections of 4-6 micrometers in width are sufficient to conduct the study.

INTERPRETATION OF RESULTS

Samples in which c-erbB2 expression is observed will show a brownish color in the cell cytoplasm, which will contrast over the blue-violet background given by hematoxylin staining. The pathologist will evaluate the results according to their experience, and conclusions from the staining of the sample, in parallel with the staining observed in the positive and negative controls.

ASSAY LIMITATIONS

Histosonda c-erbB2 has been optimized to detect RNA expression in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. Its use is not recommended for other types of samples or preparation techniques.

The correct operation of this product has been validated using the protocols indicated in the instructions manual. The use of other procedures or the modification of the recommended protocols may lead to erroneous results.

The results from this assay must be evaluated by the pathologist in combination with the rest of available patient clinical data.

In order to obtain optimal and reproducible results it is important to rigorously maintain the time and temperature conditions indicated in the procedure.

BIBLIOGRAPHY

- 1) HER2 status determination using RNA-ISH - a rapid and simple technique showing high correlation with FISH and IHC in 141 cases of breast cancer. Javier Alba¹, Javier Gutiérrez², Victoria Mary Coupe², Beatriz Fernández¹, Ángel Vázquez-Boquete¹, Jesús Alba², Jerónimo Forteza¹ and Tomás García-Caballero¹
- 2) mRNA In Situ Hybridization (Histosonda): A New Diagnostic Tool for HER2-Status in Breast Cancer. A Multicentric Spanish Study. Bernet L, Martínez Benaclocha M, Castera C, Cano Muñoz R, Sevilla F, Alba J, de Dios Barranco J, Córdoba A, García-Caballero T, Hardisson D, de Francisco Hernandez JM, Lazaro JM, Polo L, Riu F, Rezola R, Rojo F, Ruiz I, Hernández A, de la Cámara de Las Heras JM, Coupe VM.

PROCEDURE

For Digoxigenin- labeled probes

BASIS OF THE METHOD

Chromogenic In Situ Hybridization (CISH) is a technique used to determine the presence of a DNA or RNA sequence or to study gene expression, as well as for the simultaneous evaluation of tissue morphology by white light microscopy. A labeled probe of known sequence hybridizes with its target in the tissue being studied. This hybridization is then detected by an immunohistochemical process.

The Histosondas targets are messenger RNA and they are therefore designed to detect and visualise gene expression.

HistoSonda Protocol

Needed accessories for this protocol and not provided with the product

Proteinase K, Anti-Digoxin Antibody, polímero comercial anti-mouse HRP comercial polymer, Diaminobenzidine (DAB) solution.

For further important details including FAQs and Troubleshooting please ask for the complete HistoSonda Technical Manual at the email address: techserv@cenbimo.com

Before starting pre-heat the humid chamber to 62°C.

1a. Deproteinization

1. Heat slides at 62°C for 10mins using a hot plate or incubator.
2. Immerse slides in:
 - a. Xylene: 10 mins
 - b. Xylene: 5mins
 - c. Absolute alcohol (ethanol or isopropanol): 1min X 2
 - d. Alcohol 96%: 1min X 3
 - e. Methanol containing 0.3% H₂O₂ or 3% H₂O₂ only: 5mins
3. Wash well with distilled water, leave standing in water.

1b. Inhibition of unspecific DNA binding (optional)

Generally this step is not necessary unless the tissue to be hybridized contains a great quantity of polymorphonuclear eosinophil leukocytes (generally bone marrow and gastric tissues).

1. Place slides in boiling distilled water for 30 seconds and immediately transfer to distilled water at room temp.

! Important: excess heat treatment will result in background staining. Remove slides immediately. !

2. Deproteinization

1. Prepare a dilution of any commercial Proteinase K at a work concentration of 0,033mg/ml in PBS pH 7,4.
2. Remove excess water from individual slides with tissue paper.
3. Cover tissue sections with the 200µl of Proteinase K and incubate in a humid chamber for exactly 10mins at room temp.
4. Wash well with distilled water.
5. Transfer to PBS pH 7.4 for 2mins.

! (Important: if the slides have been boiled in the microwave previously only use Proteinase K for 5 minutes as the heat treatment will have significantly sensitized the tissue sections. **Bone marrows require a Proteinase K digestion of 20min at 55°C after heat treatment!**)

3. Incubation with the probe

1. Remove excess buffer from sections as described previously.
2. Add 65µl of probe to the tissue section ensuring the entire section is completely covered and avoiding air bubbles.
3. Place the slides in a horizontal position in a humid chamber and close well.
4. Incubate at 62°C for 1hr.

4. Washing the probe

! The probe solution is very viscous. It is very important to wash the slides well to ensure the probe solution is completely removed.!

1. Wash the surface of the section vigorously with PBS pH 7.4 to remove the probe.
2. Agitate in PBS for 5mins.

5. Revealing the probe

Protocol for manual revealing of the probe.

1. Remove excess buffer from sections as before.
2. Cover sections with 100µl of Anti-Digoxin (not provided with this product) following manufacturer's instructions and incubate in a humid chamber for 30mins at room temp.
3. Wash vigorously with PBS, pH 7.4 agitate in PBS for 1min.
4. Remove excess buffer from sections.
5. Drop commercial HRP polymer (not provided with this product) that binds the primary antibody used before over the sections (enough to cover the tissue 50-100µl) and incubate in a humid chamber following the manufacturer's instructions.
6. Wash vigorously with PBS, agitate in PBS 1min.
7. Remove excess buffer from sections and apply commercial Diaminobenzidine (DAB) (not provided with this product) following the manufacturer's instructions.
8. Wash with water.
9. Counter stain the sections briefly (2-3secs) with Harris hematoxylin diluted 50% in water.
10. Wash with water, dehydrate and cover slip following normal laboratory protocols.

Emission date: 23/08/2016



Manufacturer: CENBIMO S.L.
C/Doctor Iglesias Otero s-n
27004-Lugo, Spain