

Leica HER2 FISH System - 30 Test

Instrucciones de uso

Para el uso en el sistema Leica Biosystems' BOND-MAX and BOND-III

TA9217 es un producto de hibridación *in situ* de fluorescencia diseñado para la tinción de 30 pruebas (30 portaobjetos teñidos con LSI HER2/CEP17 Dual Probe).

Español



Leica Biosystems Newcastle Ltd
Balliol Business Park West
Benton Lane
Newcastle Upon Tyne NE12 8EW
United Kingdom
☎ +44 191 215 4242



Leica Biosystems Canada
71 Four Valley Drive
Concord, Ontario L4K 4V8
Canada
☎ +1 800 248 0123

Leica Biosystems Inc
1700 Leider Lane
Buffalo Grove IL 60089
USA
☎ +1 800 248 0123

Leica Biosystems Melbourne
Pty Ltd
495 Blackburn Road
Mt Waverley VIC 3149
Australia
☎ +61 2 8870 3500

Contenido

Uso previsto	3
Para uso diagnóstico <i>in vitro</i>	3
Formación requerida	3
Resumen y explicación	3
Introducción.....	3
Resumen de concordancia clínica BOND-MAX System	4
Resumen de concordancia clínica BOND-III System.....	5
Principio del procedimiento	5
Componentes suministrados	5
Instrucciones de uso	6
Almacenamiento y estabilidad.....	6
Preparación de muestras	6
Advertencias y precauciones	6
Procedimiento	7
A. Reactivos necesarios no suministrados.....	7
B. Equipo necesario no suministrado.....	7
C. Metodología	7
D. Pretratamiento enzimático BOND.....	7
E. Protocolo de tinción predeterminado	8
F. Procedimiento detallado	8
G. Almacenamiento de portaobjetos	9
Evaluación y enumeración de señales	10
Método recomendado para la determinación de la proporción entre LSI HER2 y CEP17.....	11
Leica HER2 FISH System - 30 Test Guía de interpretación	12
Leica HER2 FISH System - 30 Test Hoja de puntuación	13
Control de calidad	14
Uso de los portaobjetos de control	14
Limitaciones	15
A. Limitaciones generales	15
B. Limitaciones específicas del producto	15
Concordancia clínica del Leica HER2 FISH System - 30 Test con el Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Mama	15
2x2 Resultados de concordancia BOND-MAX System - Mama.....	16
2x2 Resultados de concordancia BOND-III System - Mama	17
Concordancia clínica del Leica HER2 FISH System - 30 Test con el Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit	18
Resultados de concordancia 2x2 del BOND-MAX System - Gástrico	18
Prueba de precisión – BOND-MAX System	20
A. Estudio de precisión intraciclo	20
B. Estudio de precisión ininstrumento	20
C. Estudio de precisión interciclo	20
D. Estudio de precisión interlaboratorio	20
E. Estudio de precisión interobservador.....	20
F. Estudio de precisión entre lotes	21
Prueba de precisión – BOND-III System	21
G. Estudio de precisión intraciclo	21
H. Estudio de precisión ininstrumento.....	21
I. Estudio de precisión interciclo.....	21
J. Estudio de precisión interlaboratorio	22
K. Estudio de precisión interobservador.....	22
L. Estudio de precisión entre lotes	22
Solidez del análisis	22
Resolución de problemas	24
Referencias	26
Acuerdo de licencia	27
Cambios con respecto a la edición anterior	27
Fecha de emisión	27
Identificación de símbolos	27

Uso previsto

Para uso diagnóstico *in vitro*

El Leica HER2 FISH System - 30 Test se ha diseñado para detectar la amplificación del gen HER2/neu mediante la hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH) en muestras de tejido de cáncer de mama y adenocarcinomas gástricos (incluyendo los que afectan a la unión gastroesofágica) humanos fijadas con formalina incluidos en parafina. El Leica HER2 FISH System - 30 Test está indicado como una ayuda para la evaluación de pacientes en los que se esté considerando el uso del tratamiento con Herceptin® (trastuzumab) (consulte el prospecto de Herceptin). El Leica HER2 FISH System - 30 Test no se ha diseñado para el examen o el diagnóstico del cáncer de mama. También se debe tener en cuenta el resto de información clínica disponible, como el tamaño del tumor, el número de nódulos linfáticos implicados y el estado del receptor de esteroides. Ninguna decisión de tratamiento para los pacientes de cáncer de mama debe basarse únicamente en el estado de amplificación del gen HER2.

Nota: La selección de todos los pacientes incluidos en los ensayos clínicos de Herceptin se llevó a cabo mediante un análisis CTA (análisis de ensayo clínico) de investigación inmunocitoquímica. Ninguno de los pacientes de dichos ensayos se seleccionó empleando el Leica HER2 FISH System - 30 Test. El Leica HER2 FISH System - 30 Test se ha comparado con el ensayo Abbott Molecular PathVysion® HER-2 DNA Probe Kit con una serie de muestras independientes y ha demostrado proporcionar resultados con una concordancia aceptable, tal como se indica en el Resumen de concordancia clínica. No obstante, no se ha establecido la correlación real de los resultados del Leica HER2 FISH System - 30 Test con los resultados clínicos.

La selección de todos los pacientes incluidos en los ensayos clínicos de cáncer gástrico avanzado (ToGA) se llevó a cabo mediante el Dako HercepTest. Ninguno de los pacientes de dichos ensayos fue seleccionado empleando el Leica HER2 FISH System - 30 Test. El Leica HER2 FISH System - 30 Test se ha comparado con el ensayo Abbott Molecular PathVysion® HER-2 DNA Probe Kit en una serie de muestras independientes y ha demostrado proporcionar resultados con una concordancia aceptable, tal y como se indica en el Resumen de concordancia clínica. No se ha establecido la correlación real de los resultados del Leica HER2 FISH System - 30 Test con la evolución clínica.

** Herceptin® es una marca comercial de Genentech, Inc. y F. Hoffmann-La Roche Ltd. PathVysion® es una marca comercial de Abbott Molecular Inc. Todos los derechos reservados. Uso bajo licencia.*

Formación requerida

Leica Biosystems ofrece formación sobre la preparación de muestras, el procedimiento del ensayo y la interpretación de la prueba FISH del gen HER2 para todos los usuarios.

Resumen y explicación

Introducción

El gen HER2, conocido de forma alternativa como neu o c-erbB2, está ubicado en el brazo largo del cromosoma 17 en la posición 17q11-12 (1). Se ha demostrado que tanto el gen HER2 como su proteína codificada 185 kD desempeñan un papel importante en el proceso de transformación maligna y de progresión del tumor del cáncer de mama (2).

HER2 actúa como un marcador de pronóstico, con la amplificación génica y la sobreexpresión de la proteína vinculados con un incremento de la tasa de recurrencia de la enfermedad y con una mayor mortalidad. HER2 también actúa como un marcador predictivo para la quimioterapia sistémica seleccionada y para los tratamientos objetivo (3). Concretamente, se ha demostrado que la amplificación del gen HER2 es un indicador de un pronóstico insuficiente en el cáncer de mama positivo para nódulos (4-8). Asimismo, existe un estudio que demuestra que el valor de pronóstico del HER2 es mayor en pacientes tratados con quimioterapia (7). No obstante, en las predicciones de supervivencia general y sin la enfermedad en pacientes individuales, también deben tenerse en cuenta otros factores de pronóstico establecidos como el tamaño del tumor, el número de nódulos linfáticos positivos y el estado del receptor de esteroides.

La sobreexpresión de la oncoproteína HER2, como resultado de la amplificación del gen, hallada en las células del cáncer de mama sugiere que la HER2 es un objetivo para una terapia basada en anticuerpos (3) - mientras que los resultados del ensayo ToGA indican claramente que el uso de Herceptin en carcinomas gástricos conjuntamente con la quimioterapia constituye un tratamiento efectivo que mejora la supervivencia total en carcinomas gástricos positivos para HER2 (9). Herceptin (trastuzumab) es un anticuerpo monoclonal humanizado (10) que se une con gran afinidad a la oncoproteína HER2 y que ha demostrado inhibir la proliferación de las células tumorales humanas que sobreexpresan la oncoproteína HER2 tanto *in vitro* como *in vivo* (11-13). Desde el desarrollo de Herceptin, la detección del gen y de la proteína HER2 se ha convertido en una herramienta esencial para la evaluación de tumores de mama, controlando la selección de la terapia y el subsiguiente tratamiento del paciente (14,15).

En las células de la interfase y de la metafase derivadas de las líneas celulares del carcinoma de mama humano, FISH se ha utilizado para mostrar la amplificación del gen HER2 (16-19). Para cuantificar la amplificación del gen HER2, FISH evalúa el nivel de amplificación del gen HER2 directamente en las células tumorales. Se retienen la morfología característica del tejido y la distribución espacial de las copias del oncogen en los carcinomas individuales de mama primarios no cultivados. Las aberraciones en el número de copias del cromosoma 17 (aneusomía) también son muy comunes en los tumores de mama. Estas pueden presentarse como pérdidas o ganancias de cromosomas (polisomía). Esta variación cromosómica tiene un efecto crítico sobre la interpretación y elaboración de informes del estado de amplificación del gen HER2. Por consiguiente, la medición del número de copias del cromosoma 17 en combinación con el HER2 es muy importante (4).

El Leica HER2 FISH System - 30 Test contiene la sonda de ADN LSI HER2, una sonda de ADN con marcado fluorescente directo SpectrumOrange™ de 226 Kb específica para el locus del gen HER2 (17q11.2-q12) y la sonda de ADN CEP17, una sonda de ADN con marcado fluorescente directo SpectrumGreen™ de 5,4 Kb específica para la secuencia de ADN satélite alfa de la región centromérica del cromosoma 17 (17p11.1-q11.1). La solución de la sonda se ha formulado y validado especialmente para el uso en el BOND-MAX and BOND-III System y no se debe modificar ni utilizar con una configuración manual.

Resumen de concordancia clínica BOND-MAX System

El Leica HER2 FISH System - 30 Test se ha desarrollado para proporcionar una alternativa totalmente automatizada a las metodologías actuales que se utilizan para determinar el estado de amplificación del gen HER2. El rendimiento del Leica HER2 FISH System - 30 Test en el BOND-MAX System se ha evaluado en un estudio independiente que compara los resultados del Leica HER2 FISH System - 30 Test con los del ensayo Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit en 300 muestras de tumor mamario y en 109 adenocarcinomas gástricos (incluyendo aquellos que afectan a la unión gastroesofágica). Ninguna de dichas muestras de tumor se había obtenido de pacientes incluidos en los ensayos clínicos de Herceptin. Los resultados en tejido mamario indicaron una concordancia del 99,33 % en un análisis 2x2 (intervalo de confianza del 95 % de 97,61 – 99,92 %). Los resultados obtenidos en adenocarcinomas gástricos (incluyendo los que afectan al tejido de la unión gastroesofágica) indicaron una concordancia del 98,17 % en un análisis 2x2 (intervalos de confianza del 95 % de 93,53 – 99,78 %). Los datos de la concordancia también indican que un resultado positivo con el Leica HER2 FISH System - 30 Test parece corresponderse con un resultado positivo con el ensayo Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit. El Leica HER2 FISH System - 30 Test se ha interpretado como negativo para la amplificación del gen HER2, si la proporción entre los genes HER2:CEP17 es inferior a 2,0 y como positivo si la proporción entre los genes HER2:CEP17 es mayor o igual a 2,0. Los resultados equívocos (dudosos), en los que la proporción entre los genes HER2:CEP17 se encuentra entre 1,8-2,2 o es igual a estos valores, deben interpretarse con precaución. Recuento 20 núcleos adicionales y vuelva a calcular la proporción.

Resumen de concordancia clínica BOND-III System

El Leica HER2 FISH System - 30 Test se ha desarrollado para proporcionar una alternativa totalmente automatizada a las metodologías actuales que se utilizan para determinar el estado de amplificación del gen HER2. El rendimiento del Leica HER2 FISH System - 30 Test en el BOND-III System se ha evaluado en un estudio independiente que compara los resultados del Leica HER2 FISH System - 30 Test con el Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit Assay en 300 muestras de tumores de mama. Ninguna de dichas muestras de tumor se había obtenido de pacientes incluidos en los ensayos clínicos de Herceptin. Los resultados han indicado una concordancia del 99,67% en un análisis de 2x2 (intervalos de confianza del 95% de 98,16–99,99%). Los datos de la concordancia también indican que un resultado positivo con el Leica HER2 FISH System - 30 Test parece corresponderse con un resultado positivo con el ensayo Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit. El Leica HER2 FISH System - 30 Test se ha interpretado como negativo para la amplificación del gen HER2, si la proporción entre los genes HER2:CEP17 es inferior a 2,0 y como positivo si la proporción entre los genes HER2:CEP17 es mayor o igual a 2,0. Los resultados equívocos (dudosos), en los que la proporción entre los genes HER2:CEP17 se encuentra entre 1,8-2,2 o es igual a estos valores, deben interpretarse con precaución. Recuento 20 núcleos adicionales y vuelva a calcular la proporción.

Principio del procedimiento

El Leica HER2 FISH System contiene los componentes necesarios para realizar un procedimiento de tinción basado en una hibridación *in situ* de fluorescencia para tejidos fijados con formalina e incluidos en parafina. Después del pretratamiento adecuado, la incubación con la LSI HER2/CEP17 Dual Probe lista para usar y un lavado astringente apropiado, los cortes de tejido se deshidratan y se montan con DAPI. Los resultados se interpretan con microscopía de fluorescencia, utilizando los filtros recomendados con las longitudes de onda adecuadas.

El Leica HER2 FISH System - 30 Test solo debe utilizarse en el BOND-MAX System o BOND-III.

Componentes suministrados

Los materiales que se enumeran a continuación (tabla 1) son suficientes para teñir 30 pruebas (30 portaobjetos teñidos con LSI HER2/CEP17 Dual Probe).

LSI HER2/CEP17 Probe 6,6 ml	Contiene la LSI HER2/CEP17 Dual Probe lista para usar. Contiene <60% (v/v) de formamida.
Post Hybridization Wash 2 9 ml	Contiene la solución de lavado posthibridación lista para usar. Contiene <50% (v/v) de formamida.
BOND Enzyme Concentrate 2 1 ml	Contiene la solución de proteinasa K de 1,7 mg/ml.
BOND Enzyme Diluent 65 ml	Contiene el diluyente enzimático.
BOND Open Container 3 x 7 ml	BOND Open Container utilizado para Enzyme 5.

Tabla 1: Componentes de Leica HER2 FISH System - 30 Test

Consulte la hoja de datos de seguridad del material correspondiente para obtener más información sobre la seguridad del producto, disponible en www.LeicaBiosystems.com/TA9217

Instrucciones de uso

Todos los reactivos suministrados están específicamente formulados para utilizarse en este ensayo y los números de lote correspondientes son específicos de cada Leica HER2 FISH System - 30 Test. Para que el análisis resulte válido, no debe sustituirse ninguno de los reactivos.

Almacenamiento y estabilidad

Almacenar a 2–8 °C. No congelar. Volver a enfriar a 2–8 °C inmediatamente después del uso. Cualquier desviación de estas condiciones invalidará el análisis. Asegúrese de que el Leica HER2 FISH System - 30 Test utilizado se encuentra dentro de la fecha de caducidad designada. Los signos que indican la contaminación y/o inestabilidad del Leica HER2 FISH System - 30 Test son la turbidez de las soluciones (con excepción de la solución de la sonda) y la aparición de olor. El usuario debe comprobar que las condiciones de almacenamiento no sean distintas de las especificadas anteriormente.

Preparación de muestras

Para ello, en todas las muestras deben emplearse los métodos estándares de procesamiento de tejidos (20). Se recomienda preparar los tejidos empleando fijadores a base de formalina, procesarlos de forma rutinaria e incluirlos en parafina. Así, por ejemplo, las muestras deben realizarse con un grosor de 3–4 mm y deben fijarse durante 18–24 horas en formalina tamponada neutra al 10%. A continuación, los tejidos deben deshidratarse en una serie de alcoholes y clarificarse con xileno. Acto seguido, debe realizarse una impregnación con cera de parafina fundida, mantenida a una temperatura máxima de 60 °C. Las muestras de tejido deben cortarse entre 4–6 µm.

Los cortes de tejido montados en portaobjetos cargados (BOND Plus Slides – código de producto S21.2113 o Apex BOND Slides - código de producto 3800040) se pueden conservar hasta 12 meses a 2–8 °C antes de la tinción. Después del corte, se recomienda incubar los portaobjetos a 60 °C durante una hora. Los cortes teñidos deben almacenarse a -20 °C para conservar la señal fluorescente y evitar la pérdida de intensidad. Los portaobjetos almacenados deben alcanzar la temperatura ambiente antes de la lectura.

Advertencias y precauciones

Solo para usuarios profesionales.

Uno o varios componentes del producto son peligrosos y pueden resultar perjudiciales para el feto.

Como regla general, las personas con edad inferior a los 18 años no podrán utilizar este producto. Los usuarios deben ser debidamente instruidos acerca del procedimiento de trabajo adecuado, las propiedades peligrosas del producto y las instrucciones de seguridad necesarias.

Las muestras, antes y después de ser fijadas, y todos los materiales expuestos a ellas, deben tratarse como sustancias capaces de transmitir infecciones y deben eliminarse tomando las precauciones adecuadas.

Nunca pipetee los reactivos con la boca y evite el contacto de los reactivos y de las muestras con la piel y las membranas de la mucosa. Si los reactivos o las muestras entran en contacto con zonas sensibles de su cuerpo, lávelas con abundante agua. Busque asistencia médica. Consulte la normativa estatal, regional o local sobre la eliminación de componentes potencialmente tóxicos.

Minimice la contaminación microbiana de los reactivos para evitar un posible aumento de la tinción inespecífica.

Procedimiento

A. Reactivos necesarios no suministrados

- BOND Dewax Solution (AR9222)
- BOND Epitope Retrieval Solution 1 (AR9961)
- BOND Wash Solution x10 Concentrate (AR9590)
- Disolventes estándar utilizados en ensayos basados en hibridación *in situ* de fluorescencia (por ejemplo, etanol, absoluto y de grado)
- Agua destilada o desionizada
- Contratación DAPI
- Leica HER2 FISH Control Slides (TA9123)
- BOND Aspirating Probe Cleaning System (CS9100)

B. Equipo necesario no suministrado

- Pipetas (para la medición de volúmenes de 1-20 µl y 100 – 1000 µl)
- Portaobjetos cargados (BOND Plus Slides – S21.2113)
- BOND-MAX (21.0051) or BOND-III (21.2201)
- BOND Universal Covertiles™ (S21.2001, S21.4583 o S21.4611)
- BOND Mixing Stations (S21.1971)
- BOND Slide Label & Print Ribbon (S21.4564)
- Cubreobjetos
- Horno de secado (capaz de mantener 60 °C)
- Microscopio de fluorescencia (objetivo de 60–100x) con una fuente de luz adecuada. Registre el número de horas que se ha estado utilizando la bombilla y sustitúyala antes de que supere el tiempo recomendado. Asegúrese de que la lámpara está correctamente alineada.
- Juego de filtros de fluorescencia adecuados (SpectrumOrange™ – pico de excitación a 559 nm, pico de emisión a 588 nm, SpectrumGreen™ – pico de excitación a 497 nm, pico de emisión a 524 nm y DAPI – pico de excitación a 367 nm, pico de emisión a 452 nm). Los juegos de filtros de microscopía de fluorescencia multibanda optimizados para el uso con el Leica HER2 FISH System - 30 Test están disponibles para la mayoría de modelos de microscopio. Los juegos de filtros recomendados para el Leica HER2 FISH System - 30 Test son el de paso de banda dual DAPI/9-naranja, el de paso de banda dual DAPI/verde, el de paso de banda dual verde/naranja (V.2) y el de paso de banda triple DAPI/verde/naranja (V.2).

C. Metodología

- Antes de seguir esta metodología, los usuarios deben recibir la formación adecuada sobre la técnica de fluorescencia *in situ* automatizada.
- Cada corte de prueba teñido con LSI HER2/CEP17 Dual Probe permite el mismo análisis celular de las señales de HER2 y del cromosoma centromérico 17. La subsiguiente proporción entre las señales de HER2 y las del cromosoma 17 permitirá asignar un valor cuantitativo a la muestra, que indicará a su vez un resultado negativo (no amplificado) o positivo (amplificado). Los resultados equívocos (dudosos) (1.8-2.2) deben interpretarse con precaución. Recuento 20 núcleos adicionales y vuelva a calcular la proporción.

D. Pretratamiento enzimático BOND

Antes de la tinción, diluya el BOND Enzyme Concentrate 2 suministrado con una dilución 1:300 con el BOND Enzyme Diluent suministrado en uno de los BOND Open Containers disponibles. Por ejemplo, para teñir 10 portaobjetos, prepare 3 ml de solución enzimática de trabajo diluyendo 10 µl de BOND Enzyme Concentrate 2 en 2990 µl de BOND Enzyme Diluent. Se recomienda preparar el enzima justo antes de cada ciclo de tinción y que se utilice un volumen mínimo de 900 µl por ciclo.

E. Protocolo de tinción predeterminado

Se recomienda que el Leica HER2 FISH System - 30 Test se utilice con el protocolo de tinción predeterminado recomendado que se muestra a continuación en la tabla 2.

Tipo de protocolo	Nombre del protocolo
Tinción	*FISH Protocol A
Preparación	*Dewax
HIER	*HIER 25 min with ER1 (97)
Enzima	*Enzyme 5 for 25 min
Desnaturalización	*D10
Hibridación	*ISH Hybridization (12Hr)

Tabla 2: Leica HER2 FISH System - 30 Test Staining Protocol predeterminado

F. Procedimiento detallado

Estas instrucciones deben leerse conjuntamente con el manual de usuario BOND-MAX and BOND-III System. Debe utilizarse un nuevo BOND Universal Covertile con cada portaobjetos.

El uso de BOND Universal Covertiles que hayan sido previamente utilizados para tinción inmunohistoquímica o para hibridación *in situ* no se ha validado para esta prueba.

- En el BOND-MAX and BOND-III System, compruebe que la capacidad de los contenedores a granel y de los contenedores para desechos peligrosos es suficiente para realizar los ciclos de tinción necesarios.
- Asegúrese de que los contenedores de reactivos a granel contienen alcohol, agua destilada o desionizada, BOND Dewax Solution, BOND Epitope Retrieval Solution 1 y BOND Wash Solution para realizar los ciclos de tinción necesarios.
- Compruebe que se ha instalado una BOND Mixing Station limpia.
- Ponga en marcha el BOND-MAX and BOND-III System.
- Ponga en marcha el PC acoplado al BOND-MAX and BOND-III System.
- Abra el software BOND.
- Para un nuevo kit Leica HER2 FISH System - 30 Test, escanee el código de barras de la bandeja de reactivos con el escáner portátil para introducir el sistema en el inventario de reactivos de BOND (solo un código de barras único).
- Prepare BOND Enzyme 5 en el BOND Open Container suministrado con una dilución de 1:300. Por ejemplo, para 10 portaobjetos, añada 10 µl de BOND Enzyme Concentrate 2 a 2990 µl de BOND Enzyme Diluent.
- Escanee el BOND Open Container suministrado y regístrelo como **Bond Enzyme 5**.
- Vaya a la pantalla Slide setup y haga clic en **Añadir caso**.
- Introduzca los detalles del primer caso. Compruebe que el volumen de dispensación se ha fijado en **150 µl** y que el protocolo de preparación es ***Dewax**. Haga clic en **OK**.
- Con el caso resaltado en la pantalla Slide setup, haga clic en **Añadir portaobj.**
- En primer lugar, añada portaobjetos de pruebas de pacientes. Compruebe que el tipo de tejido está ajustado en **Tejido de prueba**.
- Seleccione el modo de tinción **Única**.
- Seleccione el proceso **ISH**.
- Seleccione ***LSI HER2/CEP17 Dual Probe – 30 Test** de la lista de sondas. La ficha Protocols muestra de forma predeterminada el protocolo de tinción correcto (***FISH Protocol A**), protocolo HIER (***HIER 25 min with ER1 (97)**), protocolo EIER (***Enzyme 5 for 25 min**), desnaturalización (***D10**) e hibridación (***ISH Hybridization (12Hr)**).
- Repita los pasos del 10 al 16 hasta que los portaobjetos de prueba del paciente y los controles (portaobjetos de control y/o controles internos Leica HER2 FISH) se hayan creado. Imprima las etiquetas de los portaobjetos.
- Coloque adecuadamente las etiquetas en los portaobjetos.

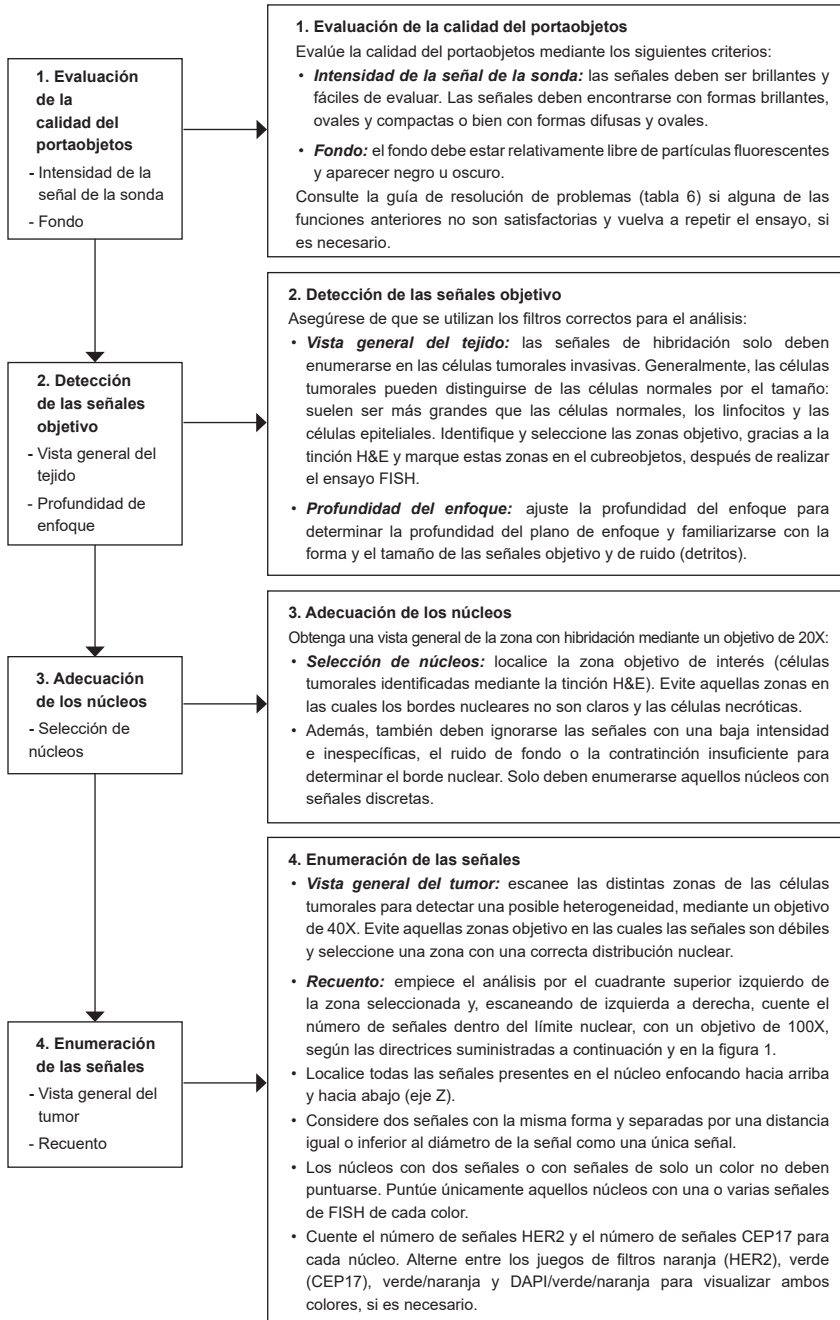
19. Abra las tapas de todos los contenedores del Leica HER2 FISH System - 30 Test y cargue la bandeja de reactivos en el BOND-MAX and BOND-III System.
20. Aplique nuevos Covertiles a cada portaobjetos.
21. Cargue la bandeja de portaobjetos en el BOND-MAX and BOND-III System y pulse el botón **Carga/Desc.**
22. Confirme que los portaobjetos se han escaneado y haga clic en el botón **Run (Play)** en la pantalla de estado System para iniciar el ciclo inmediatamente (para el Leica HER2 FISH System - 30 Test se recomienda que este ensayo se realice por la noche mediante la funcionalidad de inicio retardado).
23. Compruebe que el campo del indicador de bandeja muestra **Proc (OK)** y que se visualizan el número de lote y el tiempo de finalización.
24. Cuando haya completado el ciclo, pulse el botón **Carga/Descarga** y retire la bandeja de portaobjetos del BOND-MAX and BOND-III System.
25. Retire los Covertiles y lave los portaobjetos con agua desionizada.
26. Realice la deshidratación rápidamente con dos cambios de alcohol y secado con aire.
27. Dispense 20 µl de DAPI directamente sobre la muestra.
28. Aplique el cubreobjetos y permita que la solución se extienda completamente, eliminando las burbujas de aire.
29. Selle el borde del cubreobjetos con esmalte de uñas o un medio de sellado similar.
30. Coloque los portaobjetos en la oscuridad para facilitar la generación de la señal antes de la visualización bajo el microscopio de fluorescencia.
31. Para conservar la intensidad de la señal, almacene los portaobjetos teñidos a -20 °C.

G. Almacenamiento de portaobjetos

Almacene los portaobjetos teñidos a -20 °C en la oscuridad. Deje que los portaobjetos alcancen la temperatura ambiente antes de la visualización y después de retirarlos de los -20 °C.

Evaluación y enumeración de señales

Para evaluar la calidad de la señal y enumerar las señales de HER2 y de CEP17, siga este proceso:



Método recomendado para la determinación de la proporción entre LSI HER2 y CEP17

Para determinar la proporción entre LSI HER2 y CEP17, utilice el método siguiente:

1. Anote y determine el número de señales LSI HER2 y CEP17 en 20 núcleos (consulte la figura 2 Hoja de puntuación del Leica HER2 FISH System - 30 Test).
2. Sume todas las señales de LSI HER2. De este modo, se obtiene el total de señales de LSI HER2 para el recuento, por ejemplo, 143.
3. Sume todas las señales de CEP17. De este modo, se obtiene el total de señales de CEP17 para el recuento, por ejemplo, 48.
4. Para calcular el resultado final, utilice el siguiente cálculo:

Total de señales de LSI HER2 dividido entre el total de señales CEP17, por ejemplo, $143/48$ es igual a una proporción de 2,98, que es positiva para la amplificación de HER2.

Nota importante: si la proporción entre LSI HER2 y CEP17 es equívoca (1,80 - 2,20), realice el recuento en 20 núcleos adicionales y vuelva a calcular la proporción.

Los resultados deben reflejarse del siguiente modo:

1. Si la proporción es <2 , no se ha observado la amplificación del gen HER2
2. Si la proporción es ≥ 2 , se ha observado la amplificación del gen HER2

Nota importante: una proporción igual o cercana al valor de corte (1,80 - 2,20) debe interpretarse con precaución, tal como se ha descrito más arriba.

Leica HER2 FISH System- 30 Test Guía de interpretación

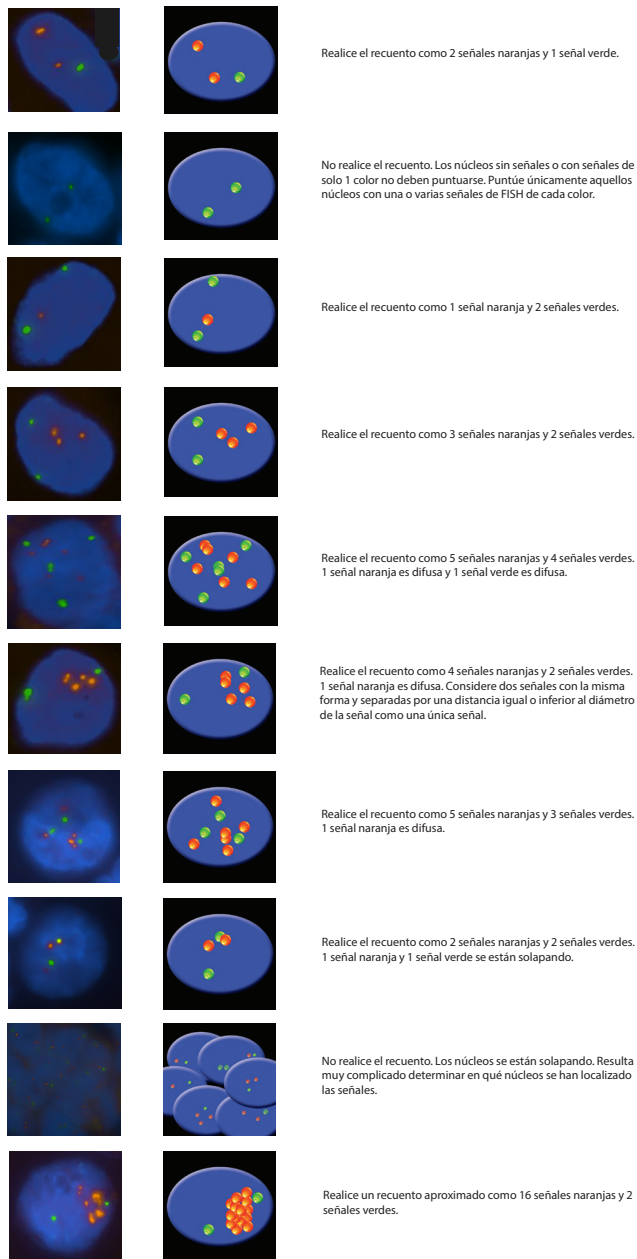


Figura 1: Guía de interpretación

Leica HER2 FISH System - 30 Test Hoja de puntuación

Recuento de señales en 20 núcleos					
Número de núcleo	Número de copias de HER2	Número de copias de CEP17	Número de núcleo	Número de copias de HER2	Número de copias de CEP17
1			11		
2			12		
3			13		
4			14		
5			15		
6			16		
7			17		
8			18		
9			19		
10			20		
Total 1-10			Total 11-20		

	HER2	CEP17	Proporción de amplificación HER2:CEP17
Puntuación total 1-20			
Promedio por célula			

Figura 2: Hoja de puntuación de la muestra

Técnica Ariol automatizada para la determinación de HER2 FISH

La aplicación de clasificación digital Ariol PathVysion® como ayuda para la interpretación se ha homologado en una cohorte de muestras distintas para su uso con el Leica HER2 FISH System. La aplicación de clasificación digital Ariol PathVysion, cuando se usa con el Leica HER2 FISH System, sirve para uso diagnóstico in vitro. Cuando se usa con el Leica HER2 FISH System, la aplicación Ariol PathVysion debe calibrarse para el uso con portaobjetos de tejidos de referencia, **no** con los Leica HER2 FISH Control Slides (TA9123).

Es el médico cualificado quien toma todas las decisiones de diagnóstico.

Si desea más información, consulte el manual del operador de Ariol.

Control de calidad

Uso de los portaobjetos de control

Se recomienda incluir un Leica HER2 FISH Control Slide en cada ciclo de prueba para controlar el rendimiento del ensayo y para evaluar la precisión de la enumeración de las señales. Los portaobjetos de control deben utilizarse para cada lote de tinción en el BOND-MAX and BOND-III System y con cada nuevo lote de reactivo. Además, los usuarios individuales pueden elegir utilizar su propio material de control.

Evalúe la calidad del portaobjetos de control y realice la enumeración de señales según las instrucciones de la sección **Evaluación y enumeración de señales**. Los criterios para la calidad del portaobjetos deben cumplirse y los resultados de la proporción HER2:CEP17 deben encontrarse dentro de los rangos establecidos para un rendimiento de la prueba aceptable. Consulte en la tabla 3 los criterios de aceptación de Leica HER2 FISH Control Slides.

Línea celular	Perfil del Bond Oracle HER2 IHC System	HER2 Carga del receptor por célula*	Leica HER2 FISH System - 30 Test Criterios de aceptación HER2:CEP17
SKBr-3	3+	4,3 x 10 ⁵	Se observa la amplificación de HER2
MDA-MB-453	2+	1,4 x 10 ⁵	La proporción entre los genes HER2/CEP17 debe encontrarse entre 1,5-2,5
MDA-MB-175	1+	6,3 x 10 ⁴	No se observa la amplificación de HER2
MDA-MB-231	0	9,3 x 10 ³	No se observa la amplificación de HER2

*Análisis de la carga de receptor HER2, evaluada mediante citometría de flujo.

Tabla 3: Interpretación de Leica HER2 FISH Control Slide.

Si los controles del ensayo fallan, los resultados de FISH para este caso no deben notificarse. Si los portaobjetos de control no cumplen los criterios de aceptación de los portaobjetos, es posible que el Leica HER2 FISH System - 30 Test no se haya realizado correctamente. En este caso, será necesario repetir la prueba con nuevos portaobjetos de control y portaobjetos de muestras de pacientes. Si los resultados se encuentran fuera del rango especificado, pero los portaobjetos de control cumplen los criterios de aceptación para la calidad, es recomendable repetir el screening del mismo portaobjetos, ya que es posible que la enumeración no se haya realizado correctamente. Consulte la guía de resolución de problemas (tabla 6), en el caso de un fallo de hibridación, tanto en los portaobjetos de la muestra como en los de control.

Para las muestras clínicas, si resulta difícil interpretar la señal de hibridación y la muestra es insuficiente para repetir el ensayo, la prueba no tendrá ningún valor informativo. Si el número de células disponibles es insuficiente, la prueba no tendrá ningún valor informativo.

Las muestras de los pacientes deben controlarse según los procedimientos operativos de laboratorio estándar. La calidad de la señal y los resultados de la enumeración deben documentarse en un formulario de informe adecuado.

Limitaciones

A. Limitaciones generales

FISH es una técnica que requiere una formación especializada en todos los aspectos del procedimiento (incluyendo la selección de los reactivos, tejidos, fijación, procesamiento y preparación de portaobjetos adecuados) y de la interpretación. La tinción de tejidos varía en función de la manipulación, la fijación y el procesamiento del tejido antes de su tinción. Una inapropiada fijación, congelación, descongelación, lavado, secado, calentamiento, corte o la contaminación con otros tejidos o fluidos puede generar artefactos morfológicos, degradación del ácido nucleico, fluorescencia de fondo o resultados de falsos negativos. Los resultados inconsistentes pueden deberse a variaciones en los métodos de fijación e inclusión o a irregularidades inherentes del tejido (21). Una contratinción excesiva o incompleta puede influir negativamente en la correcta interpretación de los resultados.

La tinción no específica, como resultado de una sonda no unida, tiene un aspecto disperso y granular y puede visualizarse en el sitio de hibridación previsto o a una cierta distancia. Utilice células intactas para la interpretación de los resultados de tinción. Las células necróticas o degeneradas pueden teñirse inespecíficamente (22). Una tinción FISH inesperada o variaciones en la tinción pueden ser el resultado de alteraciones en los niveles de expresión de los genes codificantes. Cualquier cambio en los patrones de tinción esperados debe interpretarse en combinación con el resto de las investigaciones diagnósticas. La interpretación de la tinción debe complementarse con estudios morfológicos y con el uso del material de control adecuado y debe evaluarse en el contexto del historial clínico del paciente y de cualquier otra prueba diagnóstica realizada por un patólogo cualificado.

La determinación del rendimiento del análisis (es decir, la evaluación de la adecuación de los materiales de control) y la interpretación de cualquier tinción o de la ausencia de la misma deben llevarse a cabo en un laboratorio debidamente acreditado/autorizado bajo la supervisión de un patólogo adecuadamente cualificado y experimentado, que será el responsable de la evaluación global del análisis de hibridación *in situ* y de su interpretación. Los resultados de falsos positivos en FISH pueden deberse a la reactividad cruzada de la sonda con otras secuencias de ácidos nucleicos y/o a la unión inespecífica. Deben utilizarse y documentarse los controles adecuados y las pruebas deben tener en cuenta todas las fechas de caducidad relevantes.

La variación técnica y de interpretación también debe considerarse al utilizar FISH en materiales derivados de líneas celulares (23).

B. Limitaciones específicas del producto

Este producto no está diseñado para utilizarse en otros tipos de ensayos de diagnóstico basados en ADN.

No sustituya los reactivos de Leica HER2 FISH System - 30 Test por ningún otro componente suministrado por Leica Biosystems o por cualquier otro fabricante. Al realizarlo, invalidará el análisis. El usuario debe validar cualquier desviación con respecto a los procedimientos recomendados.

Se recomienda que en el análisis se utilicen únicamente tejidos fijados con fijadores a base de formalina. El uso de cualquier otro tipo de fijador invalidará el análisis.

Los cortes de tejido con un grosor diferente al rango recomendado no se han validado. Por tanto, el uso de cualquier otro grosor de corte puede invalidar el análisis.

Concordancia clínica del Leica HER2 FISH System- 30 Test con el Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Mama

Este estudio examinó la adecuación del Leica HER2 FISH System - 30 Test para el uso como ayuda en la determinación del tratamiento para la terapia con Herceptin (trastuzumab). El estudio se diseñó para examinar la concordancia entre el Leica HER2 FISH System - 30 Test y un dispositivo de diagnóstico previamente autorizado, el Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, considerado como la referencia para este ensayo en tejido mamario. El criterio de aceptación

para la prueba fue que el límite inferior del intervalo de confianza unilateral del 95% fuera superior al 90% entre el Leica HER2 FISH System - 30 Test y el Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit manual, entre muestras de cáncer de mama invasivo positivas (amplificadas) y negativas (no amplificadas) fijadas en formalina e incluidas en parafina (FFPE).

El estudio se realizó como una evaluación enmascarada en tres sitios de muestras de carcinomas mamarios invasivos. A cada uno de los sitios de investigación se le suministraron bloques de tejido de carcinoma mamario invasivo archivados, fijados en formalina e incluidos en parafina con niveles de expresión conocidos de la oncoproteína HER2. Se seleccionó una cohorte de 300 muestras, que constaban de 75, 0/1+ muestras de IHC previamente caracterizadas; 150, 2+ muestras de IHC previamente caracterizadas y 75, 3+ muestras de IHC previamente caracterizadas, y se distribuyeron de modo uniforme en cada uno de los sitios de investigación.

Todas las muestras se tiñeron con el Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit Assay manual, según las instrucciones de uso del fabricante, tal como se especificaba en el prospecto. Los cortes secuenciales de cada muestra se tiñeron a continuación con el Leica HER2 FISH System - 30 Test en el BOND-MAX and BOND-III System.

Todos los portaobjetos teñidos se enmascararon y su intensidad de tinción se elevó de forma aleatoria por un único observador cualificado en cada uno de los sitios de investigación. Las puntuaciones se interpretaron como negativas con una proporción entre los genes HER2/CEP17 calculada $<2,0$ y como positivas con una proporción entre los genes HER2/CEP17 calculada $\geq 2,0$. A continuación, se analizaron los datos para la concordancia para llegar a un acuerdo de tinción positiva o a un acuerdo de tinción negativa.

2x2 Resultados de concordancia BOND-MAX System - Mama

Los datos se agruparon como negativos ($<2,00$) o como positivos ($\geq 2,00$) para un análisis 2x2. El acuerdo observado para 300 muestras entre dos pruebas en un análisis 2x2 muestra una concordancia del 99,33% (298/300) con un IC 95% de 97,61–99,92% para el BOND-MAX System

El porcentaje de acuerdo positivo (sensibilidad) o la capacidad del Leica HER2 FISH System - 30 Test para identificar correctamente las muestras positivas del ensayo de Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (el porcentaje de muestras puntuadas como positivas tanto por el Leica HER2 FISH System - 30 Test como por el Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit manual entre todas las muestras positivas del Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) fue del 99,03% (102/103).

El porcentaje de acuerdo negativo (especificidad) o la capacidad de la prueba para identificar correctamente las muestras negativas de Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (el porcentaje de muestras puntuadas como negativas tanto por el Leica HER2 FISH System - 30 Test como por el Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit entre todas las muestras negativas del Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) fue del 99,49% (196/197). Consulte la tabla 4.

		Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit		
		Negativo ($<2,0$)	Positivo ($\geq 2,0$)	Totales
Leica HER2 FISH System - 30 Test BOND-MAX	Negativo ($<2,0$)	196	1	197
	Positivo ($\geq 2,0$)	1	102	103
	Totales	197	103	300

Concordancia total (IC 95%) = 99,33% (97,61 - 99,92%)

Tabla 4. 2x2 Concordancia del Leica HER2 FISH System - 30 Test en el BOND-MAX System con el sistema Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit en tejido mamario.

2x2 Resultados de concordancia BOND-III System - Mama

Los datos se agruparon como negativos ($<2,00$) o como positivos ($\geq 2,00$) para un análisis 2x2. El acuerdo observado para 300 muestras entre dos pruebas en un análisis 2x2 muestra una concordancia del 99,67% (299/300) con un IC 95% de 98,16–99,99% para el BOND-III System.

El porcentaje de acuerdo positivo (sensibilidad) o la capacidad del Leica HER2 FISH System - 30 Test para identificar correctamente las muestras positivas del ensayo de Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (el porcentaje de muestras puntuadas como positivas tanto por el Leica HER2 FISH System - 30 Test como por el Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit manual entre todas las muestras positivas del Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) fue del 99,03% (102/103).

El porcentaje de acuerdo negativo (especificidad) o la capacidad de la prueba para identificar correctamente las muestras negativas de Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (el porcentaje de muestras puntuadas como negativas tanto por el Leica HER2 FISH System - 30 Test como por el Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit entre todas las muestras negativas del Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) fue del 100% (197/197). Consulte la tabla 5.

		Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit		
		Negativo ($<2,0$)	Positivo ($\geq 2,0$)	Totales
Leica HER2 FISH System - 30 Test BOND-III	Negativo ($<2,0$)	197	1	198
	Positivo ($\geq 2,0$)	0	102	102
	Totales	197	103	300

Concordancia total (IC 95%) = 99,67% (98,16–99,99%).

Tabla 5. 2x2 Concordancia del Leica HER2 FISH System - 30 Test en el sistema BOND-III con el sistema Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit en tejido mamario.

Como conclusión, los datos generados en este estudio demuestran que el Leica HER2 FISH System - 30 Test se puede utilizar como una ayuda en la evaluación de pacientes para los cuales se está considerando el tratamiento con Herceptin (trastuzumab), sobre la base de su elevada concordancia con el Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, una prueba de diagnóstico autorizada previamente para esta indicación.

Concordancia clínica del Leica HER2 FISH System - 30 Test con el sistema Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Gástrico

Este estudio examinó la adecuación del Leica HER2 FISH System - 30 Test para su utilización como apoyo en la determinación del tratamiento con Herceptin (trastuzumab). El estudio se diseñó para evaluar la concordancia entre el Leica HER2 FISH System - 30 Test y un dispositivo de diagnóstico previamente autorizado, el Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, considerado la referencia para este ensayo en tejido gástrico. El criterio de aceptación para la prueba fue que el límite inferior del intervalo de confianza unilateral del 95 % fuera superior al 90 % entre el Leica HER2 FISH System - 30 Test y el sistema manual Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, entre los adenocarcinomas gástricos (incluyendo los que afectan a la unión gastroesofágica) fijados en formol e incluidos en parafina (FFPE, de sus siglas en inglés) positivos (amplificados) y negativos (no amplificados).

El estudio se realizó como una evaluación de muestras de adenocarcinoma gástrico clínicamente invasivo. Los ensayos se realizaron en bloques de tejido de archivo, fijados en formol e incluidos en parafina, con adenocarcinoma gástrico y niveles de expresión génica de HER2 conocidos. Se seleccionó una cohorte de 109 muestras que contenían 50 casos amplificados y 59 casos no amplificados.

Todas las muestras se tiñeron con el Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit Assay manual, según las instrucciones de uso del fabricante, tal como se especificaba en el prospecto. Los cortes secuenciales de cada muestra se tiñeron a continuación con el Leica HER2 FISH System - 30 Test en el BOND-MAX System.

Todas las preparaciones teñidas fueron puntuadas de forma aleatoria por un único observador capacitado. Las puntuaciones se interpretaron como negativas con una proporción entre los genes HER2/CEP17 calculada $<2,0$ y como positivas con una proporción entre los genes HER2/CEP17 calculada $\geq 2,0$. A continuación, se analizaron los datos para la concordancia para llegar a un acuerdo de tinción positiva o a un acuerdo de tinción negativa.

Resultados de concordancia 2x2 del BOND-MAX System - Gástrico

Los datos se agruparon como negativos ($<2,00$) o como positivos ($\geq 2,00$) para un análisis 2x2. El acuerdo observado para 109 muestras entre los dos ensayos en un análisis 2x2 muestra una concordancia del 98,17 % (107/109) con un IC 95 % de 93,53 – 99,78 % para el BOND-MAX System.

El porcentaje de acuerdo positivo (sensibilidad) o la capacidad del Leica HER2 FISH System - 30 Test para identificar correctamente las muestras positivas del ensayo Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (el porcentaje de muestras puntuadas como positivas tanto mediante el Leica HER2 FISH System - 30 Test como mediante el Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit manual de entre todas las muestras positivas para el sistema Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) fue del 96,00 % (48/50).

El porcentaje de acuerdo negativo (especificidad) o la capacidad de la prueba para identificar correctamente los casos negativos para el Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (el porcentaje de muestras puntuadas como negativas tanto mediante el Leica HER2 FISH System - 30 Test como mediante el Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit entre todas las muestras negativas del sistema Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) fue del 100 % (59/59). Consulte la tabla 6.

		Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit		
		Negativo (<2,0)	Positivo (≥2,0)	Totales
Leica HER2 FISH System - 30 Test BOND-MAX	Negativo (<2,0)	59	2	61
	Positivo (≥2,0)	0	48	48
	Totales	59	50	109

Concordancia total (IC 95 %) = 98,17 % (93,53 – 99,78 %)

Tabla 6. Concordancia 2x2 del Leica HER2 FISH System - 30 Test en el BOND-MAX System con el sistema Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit.

Prueba de precisión – BOND-MAX System

A. Estudio de precisión intraciclo

El estudio de precisión intraciclo se realizó de un modo enmascarado y aleatorio. El estudio de precisión intraciclo del Leica HER2 FISH System - 30 Test se evaluó en un único sitio de investigación, en 540 muestras de TMA previamente caracterizadas con HER2 que contenían muestras de cáncer de mama fijadas en formalina e incluidas en parafina. El uso de las TMA para la determinación de la precisión intraciclo permitió un gran número de muestras que cubrió un rango más amplio de expresión de HER2 dentro de un único ciclo en un único instrumento.

Al enumerar los portaobjetos teñidos en el estudio de precisión intraciclo, 532/540 muestras evaluadas mostraron un resultado concordante con una concordancia total del 98,52% con un IC 95% inferior de 97,10%.

B. Estudio de precisión intrainstrumento

El estudio de precisión intrainstrumento se realizó de un modo enmascarado y aleatorio. El estudio de precisión intrainstrumento del Leica HER2 FISH System - 30 Test se evaluó en un único sitio de investigación, en 1620 muestras de TMA previamente caracterizadas con HER2 que contenían muestras de cáncer de mama fijadas en formalina e incluidas en parafina. El uso de las TMA para la determinación de la precisión intrainstrumento permitió un gran número de muestras que cubrió un rango más amplio de expresión de HER2 dentro de varios ciclos en un único instrumento.

Al enumerar los portaobjetos teñidos en el estudio de precisión intrainstrumento, 1620/1620 muestras evaluadas mostraron un resultado concordante con una concordancia total del 100% con un IC 95% inferior de 99,82%.

C. Estudio de precisión interciclo

El estudio de precisión interciclo se realizó de un modo enmascarado y aleatorio. El estudio de precisión interciclo del Leica HER2 FISH System - 30 Test se evaluó en un único sitio de investigación, en 900 muestras de TMA previamente caracterizadas con HER2 que contenían muestras de cáncer de mama fijadas en formalina e incluidas en parafina. El uso de las TMA para la determinación de la prueba de precisión interciclo, día a día, permitió un gran número de muestras que cubrió un rango más amplio de la expresión del HER2 entre ciclos en distintos días.

Al enumerar los portaobjetos teñidos en el estudio de precisión interciclo, 894/900 muestras evaluadas mostraron un resultado concordante con una concordancia total del 99,33% con un IC 95% inferior de 98,55%.

D. Estudio de precisión interlaboratorio

El estudio de precisión interlaboratorio se realizó de un modo enmascarado y aleatorio. El estudio de precisión interlaboratorio del Leica HER2 FISH System - 30 Test se evaluó entre tres sitios de investigación en 513 muestras de TMA previamente caracterizadas con HER2 que contenían muestras de cáncer de mama fijadas en formalina e incluidas en parafina. El uso de las TMA para la determinación de la prueba de precisión interlaboratorio permitió un gran número de muestras que cubrió un rango más amplio de la expresión del HER2 entre ciclos en distintos instrumentos.

Al enumerar los portaobjetos teñidos en el estudio de precisión interlaboratorio, 510/513 muestras evaluadas mostraron un resultado concordante con una concordancia total del 99,42% con un IC 95% inferior de 98,30%.

E. Estudio de precisión interobservador

El estudio de precisión interobservador se realizó de un modo enmascarado y aleatorio. La prueba de reproducibilidad interobservador del Leica HER2 FISH System - 30 Test se evaluó en tres sitios de investigación. Se utilizó un único observador experimentado en cada sitio de investigación. Se utilizaron dieciocho muestras de cáncer de mama de corte completo para la precisión interobservador, que reflejaban los tipos de muestra utilizados en los estudios clínicos.

Al enumerar los portaobjetos teñidos en el estudio de precisión interobservador, 53/54 muestras evaluadas mostraron un resultado concordante con una concordancia total del 98,15% con un IC 95% inferior de 90,11%.

F. Estudio de precisión entre lotes

El estudio de precisión entre lotes se realizó de un modo enmascarado y aleatorio. La precisión entre lotes se determinó en tres lotes fabricados independientemente del Leica HER2 FISH System - 30 Test, fabricados según las Buenas prácticas de fabricación (GMP). Cada lote se probó en un único sitio de investigación en 540 muestras de TMA previamente caracterizadas de HER2 que contenían muestras de cáncer de mama fijadas en formalina e incluidas en parafina. El uso de las TMA para la determinación de la reproducibilidad entre lotes permitió un gran número de muestras que cubrió un rango más amplio de la expresión del HER2 probada entre lotes.

Al enumerar los portaobjetos teñidos en el estudio de precisión entre lotes, 534/540 muestras evaluadas mostraron un resultado concordante con una concordancia total del 98,89% con un IC 95% inferior de 97,60%.

Prueba de precisión – BOND-III System

G. Estudio de precisión intraciclo

El estudio de precisión intraciclo se realizó de un modo enmascarado y aleatorio. El estudio de precisión intraciclo del Leica HER2 FISH System - 30 Test se evaluó en un único sitio de investigación, en 540 muestras de TMA previamente caracterizadas con HER2 que contenían muestras de cáncer de mama fijadas en formalina e incluidas en parafina. El uso de las TMA para la determinación de la precisión intraciclo permitió un gran número de muestras que cubrió un rango más amplio de expresión de HER2 dentro de un único ciclo en un único instrumento.

Al enumerar los portaobjetos teñidos en el estudio de precisión intraciclo, 540/540 muestras evaluadas mostraron un resultado concordante con una concordancia total del 100% con un IC 95% inferior de 99,45%.

H. Estudio de precisión ininstrumento

El estudio de precisión ininstrumento se realizó de un modo enmascarado y aleatorio. El estudio de precisión ininstrumento del Leica HER2 FISH System - 30 Test se evaluó en un único sitio de investigación, en 1620 muestras de TMA previamente caracterizadas con HER2 que contenían muestras de cáncer de mama fijadas en formalina e incluidas en parafina. El uso de las TMA para la determinación de la precisión ininstrumento permitió un gran número de muestras que cubrió un rango más amplio de expresión de HER2 dentro de varios ciclos en un único instrumento.

Al enumerar los portaobjetos teñidos en el estudio de precisión intraciclo, 1620/1620 muestras evaluadas mostraron un resultado concordante con una concordancia total del 100% con un IC 95% inferior de 99,82%.

I. Estudio de precisión interciclo

El estudio de precisión interciclo se realizó de un modo enmascarado y aleatorio. El estudio de precisión interciclo del Leica HER2 FISH System - 30 Test se evaluó en un único sitio de investigación, en 900 muestras de TMA previamente caracterizadas con HER2 que contenían muestras de cáncer de mama fijadas en formalina e incluidas en parafina. El uso de las TMA para la determinación de la prueba de precisión interciclo, día a día, permitió un gran número de muestras que cubrió un rango más amplio de la expresión del HER2 entre ciclos en distintos días.

Al enumerar los portaobjetos teñidos en el estudio de precisión interciclo, 891/900 muestras evaluadas mostraron un resultado concordante con una concordancia total del 99,00% con un IC 95% inferior de 98,11%.

J. Estudio de precisión interlaboratorio

El estudio de precisión interlaboratorio se realizó de un modo enmascarado y aleatorio. El estudio de precisión interlaboratorio del Leica HER2 FISH System - 30 Test se evaluó entre tres sitios de investigación en 513 muestras de TMA previamente caracterizadas con HER2 que contenían muestras de cáncer mamario fijadas en formalina e incluidas en parafina. El uso de las TMA para la determinación de la prueba de precisión interlaboratorio permitió un gran número de muestras que cubrió un rango más amplio de la expresión del HER2 entre ciclos en distintos instrumentos.

Al enumerar los portaobjetos teñidos en el estudio de precisión interlaboratorio, 511/513 muestras evaluadas mostraron un resultado concordante con una concordancia total del 99,61% con un IC 95% inferior de 98,60%.

K. Estudio de precisión interobservador

El estudio de precisión interobservador se realizó de un modo enmascarado y aleatorio. La prueba de reproducibilidad interobservador del Leica HER2 FISH System - 30 Test se evaluó en tres sitios de investigación. Se utilizó un único observador experimentado en cada sitio de investigación. Se utilizaron dieciocho muestras de cáncer de mama de corte completo para la precisión interobservador, que reflejaban los tipos de muestra utilizados en los estudios clínicos.

Al enumerar los portaobjetos teñidos en el estudio de precisión interobservador, 53/54 muestras evaluadas mostraron un resultado concordante con una concordancia total del 98,15% con un IC 95% inferior de 90,11%.

L. Estudio de precisión entre lotes

El estudio de precisión entre lotes se realizó de un modo enmascarado y aleatorio. La precisión entre lotes se determinó en tres lotes fabricados independientemente del Leica HER2 FISH System - 30 Test, fabricados según las Buenas prácticas de fabricación (GMP). Cada lote se probó en un único sitio de investigación en 540 muestras de TMA previamente caracterizadas de HER2 que contenían muestras de cáncer de mama fijadas en formalina e incluidas en parafina. El uso de las TMA para la determinación de la reproducibilidad entre lotes permitió un gran número de muestras que cubrió un rango más amplio de la expresión del HER2 probada entre lotes.

Al enumerar los portaobjetos teñidos en el estudio de precisión entre lotes, 540/540 muestras evaluadas mostraron un resultado concordante con una concordancia total del 100% con un IC 95% inferior de 99,45%.

Solidez del análisis

Se llevaron a cabo estudios de solidez en el BOND-MAX and BOND-III System para determinar el rango de tolerancia del ensayo para el tiempo y la temperatura de recuperación del calor, el tiempo de recuperación del enzima, la temperatura y la concentración, el tiempo y la temperatura de desnaturalización, el tiempo y la temperatura de hibridación y el tiempo y la temperatura del lavado astringente. Los estudios de solidez mediante el protocolo predeterminado del BOND-MAX and BOND-III System también se realizaron fuera de los límites recomendados, tal como se han definido en el manual de instrucciones de FDA/ORA ORA LAB5.3 Rev1.7 para la temperatura y la humedad.

- No se observó ninguna diferencia en el estado de amplificación si la temperatura predeterminada para cada paso dependiente de calor se aumentaba en 4 °C o se disminuía en 4 °C, si se comparaba con el protocolo predeterminado del Leica HER2 FISH System - 30 Test. Se observaron las clasificaciones de máxima calidad con las temperaturas predeterminadas, por lo que se recomienda utilizar estas temperaturas.
- No se observó ninguna diferencia en el estado de amplificación si el tiempo de recuperación del epítipo inducido por calor (HIER) se aplicaba durante 20 minutos y durante 30 minutos a 97 °C con la solución BOND ER1, si se comparaba con el protocolo predeterminado del Leica HER2 FISH System - 30 Test. Se observaron las clasificaciones de máxima calidad con un tiempo predeterminado de 25 minutos, por lo que se recomienda este tiempo de incubación.

- No se observó ninguna diferencia en el estado de amplificación si el tiempo de recuperación del epítipo inducido por enzima (EIER) se aplicaba durante 15 minutos y durante 35 minutos a 37 °C, si se comparaba con el protocolo predeterminado del Leica HER2 FISH System - 30 Test. Se observaron las clasificaciones de máxima calidad con un tiempo predeterminado de 25 minutos, por lo que se recomienda este tiempo de incubación.
- No se observó ninguna diferencia en el estado de amplificación si la concentración del enzima de recuperación del epítipo inducido por el enzima (EIER) se realizaba con relaciones de concentración de enzima/diluyente de enzima de 1:200 y 1:500 mediante el protocolo predeterminado del Leica HER2 FISH System - 30 Test protocol. Se observaron las clasificaciones de máxima calidad con una concentración predeterminada de 1:300 minutos, por lo que se recomienda esta dilución.
- No se observó ninguna diferencia en el estado de amplificación si el tiempo de desnaturalización se aplicaba durante 5 minutos y durante 15 minutos, si se comparaba con el protocolo predeterminado del Leica HER2 FISH System - 30 Test. Se observaron las clasificaciones de máxima calidad con un tiempo predeterminado de 10 minutos, por lo que se recomienda este tiempo de desnaturalización.
- No se observó ninguna diferencia en el estado de amplificación si el tiempo de desnaturalización se aplicaba durante 9 horas y durante 15 horas, si se comparaba con el protocolo predeterminado del Leica HER2 FISH System- 30 Test. Se observaron las clasificaciones de máxima calidad con un tiempo predeterminado de 12 horas, por lo que se recomienda este tiempo de hibridación.
- No se observó ninguna diferencia en el estado de amplificación si el tiempo de lavado de posthibridación se aplicaba durante 2, 5 y 7 minutos, si se comparaba con el protocolo predeterminado del Leica HER2 FISH System - 30 Test . Se observaron las clasificaciones de máxima calidad con un tiempo predeterminado de 4 minutos, por lo que se recomienda este tiempo de lavado de posthibridación.
- No se observó ninguna diferencia en el estado de amplificación si el Leica HER2 FISH System - 30 Test se aplicaba a 28 °C y con una humedad relativa del 30% y a 16 °C y con una humedad relativa del 80%, si se comparaba con el protocolo predeterminado del Leica HER2 FISH System - 30 Test en condiciones ambientales.

Las operaciones realizadas fuera de los parámetros recomendados para la solidez en el ensayo de prueba no se han validado. El uso de cualquier otro parámetro de prueba pueden invalidar el ensayo.

El texto anterior describe las condiciones sometidas a prueba y los resultados del estudio. Recuerde que Leica no contempla en el ensayo todas las combinaciones posibles de las condiciones y no recomienda el uso de rangos no predeterminados para todas las condiciones. El protocolo predeterminado del Leica HER2 FISH Staining Protocol se detalla en la tabla 2.

Resolución de problemas

Problema	Causa probable	Acción correctora
Señal fluorescente/ tinción no existente o débil	Inadecuada fijación o procesamiento de la muestra de prueba	Compruebe que se ha utilizado un fijador a base de formalina y que los programas de procesamiento son adecuados para la muestra que se está analizando.
	El Leica HER2 FISH System - 30 Test se está utilizando fuera de la fecha de caducidad	Asegúrese de que el Leica HER2 FISH System - 30 Test utilizado se encuentra dentro de la fecha de caducidad designada.
	Elección incorrecta del protocolo	Compruebe que el campo "Staining protocol" del cuadro de diálogo "Añad. port." muestra el protocolo predeterminado *FISH Protocol A.
	Se han dispensado reactivos a granel inadecuados	Compruebe que todos los reactivos BOND se han asignado a los contenedores a granel apropiados y que están colocados en las posiciones apropiadas del instrumento.
	Inadecuada desparafinización de los portaobjetos	Compruebe que el modo *Dewax está seleccionado en el campo "Preparation" del diálogo "Añadir portaobj.":
	Pretratamiento inadecuado	Asegúrese de que se han seleccionado los protocolos de pretratamiento predeterminados (HIER y digestión enzimática). Ajuste el protocolo de pretratamiento (HIER y/o digestión enzimática), si es necesario.
	Desnaturalización inadecuada	Asegúrese de que se ha seleccionado la desnaturalización predeterminada adecuada *D10.
	Hibridación inadecuada	Asegúrese de que se ha seleccionado la hibridación predeterminada adecuada *H12. Ajuste el protocolo de pretratamiento (HIER o digestión enzimática), si es necesario.
	Lavado de posthibridación excesivo	Disminuya el tiempo de incubación del lavado de posthibridación.
	Ciclo abortado antes de completarse	Usando el software BOND, confirme la presencia de cualquier error notificable durante el ciclo de tinción y siga las instrucciones del software BOND para solucionarlo.
	Equipo de microscopía de fluorescencia inadecuado <ul style="list-style-type: none"> • Juego de filtros inadecuado • Lámpara incorrecta • Lámpara caducada • Tipo de aceite incorrecto 	Asegúrese de que todos los equipos de microscopía de fluorescencia utilizados sean adecuados para el ensayo que se está realizando, confirme lo siguiente: <ul style="list-style-type: none"> • El juego de filtros es adecuado • La lámpara es adecuada • La intensidad de la lámpara es la correcta • El aceite para el uso en la microscopía de inmersión es adecuado
	Sobreexposición a la luz UV (blanqueado provocado por la luz)	Almacene los portaobjetos antes y después de la evaluación en la oscuridad para conservar las señales fluorescentes. Para conservar la señal durante mucho tiempo, almacene los portaobjetos a -20 °C.

Problema	Causa probable	Acción correctora
Señal fluorescente/ tinción de fondo no específica	Lavado de posthibridación inadecuado	Aumente el tiempo de incubación del lavado de posthibridación.
	Se han dispensado reactivos a granel inadecuados	Compruebe que todos los reactivos BOND se han asignado a los contenedores a granel apropiados y que están colocados en las posiciones adecuadas del instrumento.
	Inadecuada desparafinización de los portaobjetos	Compruebe que el modo "Dewax" está seleccionado en el campo "Preparation" del diálogo "Añadir portaobj.".
	Reacción cruzada inespecífica en zonas de necrosis tisular	Compruebe que se ha utilizado un fijador a base de formalina y que los programas de procesamiento son adecuados para la muestra que se está analizando. Si es posible, vuelva a analizar ese caso usando otro bloque. Si esto no es posible, evalúe y seleccione las zonas que muestran los mejores patrones de fijación junto con el corte teñido con la tinción H&E correspondiente.
	Cortes adheridos a los portaobjetos con adhesivos alternativos	Utilice los BOND Plus Slides – código de producto S21.2113 o Apex BOND Slides - código de producto 3800040).
Conservación insuficiente de la morfología del tejido	Fijación y procesamiento del tejido inadecuados	Compruebe que se ha utilizado un fijador a base de formalina y que los programas de procesamiento son adecuados para la muestra que se está analizando. Si es posible, vuelva a analizar ese caso usando otro bloque. Si esto no es posible, evalúe y seleccione las zonas que muestran los mejores patrones de fijación junto con el corte teñido con la tinción H&E correspondiente.
	Pretratamiento inadecuado	Ajuste el protocolo de pretratamiento (HIER o digestión enzimática).
Tejido desprendido del(de los) portaobjetos de paciente/control	Uso del tipo incorrecto de portaobjetos o del drenaje inadecuado del corte	Compruebe que se están utilizando los portaobjetos adecuados para los cortes de paciente/control (por ejemplo, BOND Plus Slides – código de producto S21.2113 o Apex BOND Slides - código de producto 3800040). Asegúrese de que los portaobjetos se someten al drenaje adecuado y que se incuban durante 1 hora a 60 °C.

Tabla 7. Leica HER2 FISH System - 30 Test Guía de resolución de problemas.

Si surgen problemas asociados al Leica HER2 FISH System - 30 Test que no se incluyen en la guía de resolución de problemas, póngase en contacto con el Departamento de Servicio

Referencias

1. Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA. The neu oncogene encodes an epidermal growth factor related protein. *Nature* 1986;319:226–30.
2. Lonardo F, Di Marco E, King CR, Pierce JH, Segatto O, Aaronson SA, et al. The normal erbB-2 product is an atypical receptor-like tyrosine kinase with constitutive activity in the absence of ligand. *New Biologist* 1990; 2: 992–1003.
3. Wolff A.C., Hammond E.H., Schwartz J.N., et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 25, 1-28, 2007.
4. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235:177-182.
5. Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 1992;10:7:1049-1056.
6. Gullick WJ, Love SB, Wright C, et al. c-erbB-2 protein overexpression in breast cancer is a risk factor in patients with involved and uninvolved lymph nodes. *British Journal of Cancer* 1991;63:434-438.
7. Borg A, Tandon AK, Sigurdsson H, et al. HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. *Cancer Research* 1990;50:4332-4337.
8. Tandon AK, Clark GM, Chamness AU, et al. HER-2/neu oncogene protein and prognosis in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 1989; 7:1120-1128.
9. Van Cutsem E, Kang Y, Chung H, Shen L, Sawaki A, Lordick F et. al. Efficacy results from the ToGA trial: A phase III study of trastuzumab added to standard chemotherapy (CT) in first-line human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive advanced gastric cancer (GC). *Journal of Clinical Oncology* 2009; 27: LBA4509.
10. Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JBB, Henner D, Wong WLT, et al. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 1992; 89: 4285–9.
11. Hudziak RM, Lewis GD, Winget M, Fendly BM, Shepard HM, Ullrich A. p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Molecular & Cell Biology* 1989; 9: 1165–72.
12. Lewis GD, Figari I, Fendly B, Wong WL, Carter P, Gorman C, et al. Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185HER2 monoclonal antibodies. *Cancer Immunology and Immunotherapy* 1993; 37: 255–63.
13. Baselga J, Norton L, Albanell J, Kim Y-M, Mendelsohn J. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Research* 1998; 58: 2825–31.
14. Ellis I.O., Bartlett J., Dowsett M., Humphreys S., Jasani B., Miller K., Pinder S.E., Rhodes A. and Walker R. Best practise No. 176: Updated recommendations for Her-2 testing in the UK. *Journal of Clinical Pathology* 57; 233-237, 2004.
15. Walker R.A, Bartlett, J., Dowsett, M., Ellis, I., Hanby, A., Jasani, Miller, K., Pinder, S. HER2 Testing in the UK – further update to recommendations. *Journal of Clinical Pathology* 2007.054866
16. Press MF, Zhou JY, Ma Y, et al. Evaluation of HER-2/neu gene amplification by fluorescence in situ hybridization in invasive breast carcinoma. In: *FISH: Clinical Applications in Cancer and Genetics* February 8-11, 1994; Lake Tahoe, CA.
17. Pauletti G, Singh R, Press MF, et al. HER-2/neu gene amplification detected by fluorescence in situ hybridization: A comparative study with other techniques. Abstract 3247, *Proceedings of the American Association for Cancer Research* 1994 35:545.
18. Szöllösi J, Balázs M, Feuerstein BG, et al. Phenotype genotype relationship in erbB-2 amplification. *International Society for Analytical Cytology* 1994 Abstracts. 92. Abstract 536D.
19. Kallioniemi O, Kallioniemi A, Kurisu W, et al. ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1992;89:5321-5325.
20. The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Quality assurance for immunocytochemistry; Approved guideline. NCCLS document MM4-A (1-56238-396-5) NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 1999; 19087–1898: USA
21. Nadji, M. and Morales, A. R. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. *Laboratory Medicine* 1983; 14: 767.
22. Jackson P. 2007. Quality Assurance in Immunohistochemistry. In: *Immunohistochemistry, 2007* (ed. Renshaw S), PP 205–237. Scion Publishing Ltd.

23. Bartlet JMS, Ibrahim M, et al External Quality Assurance of HER2 FISH Testing: Results of a UK NEQAS Pilot Scheme. Journal of Clinical Pathology. 2006.

Acuerdo de licencia

Este producto contiene sondas FISH de PathVysion suministradas por Abbott Molecular Inc. PathVysion, LSI y CEP son marcas comerciales de Abbott Molecular Inc. Todos los derechos reservados. Uso bajo licencia.

Cambios con respecto a la edición anterior

Añaden datos gástricos.

Fecha de emisión

26 Febrero 2020

Identificación de símbolos

	Código de lote		Almacenamiento		Referencia
	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>		Fabricante	SN	Número de serie
	Consulte las instrucciones de uso		Contiene suficiente para <n> pruebas		Usar hasta AAAA-MM-DD

Herceptin es una marca comercial de Genentech, Inc. y F. Hoffmann-La Roche Ltd.