

## Identificación del producto

N.º categoría	Descripción
47862	ImPath HER2 FISH

## Uso previsto

La sonda ImPath HER2 FISH (código de producto 47862) está prevista para ser utilizada con el ImPath ISH Detection Kit (código de producto 44996) para detectar el gen humano ERBB2 (también denominado HER2) así como los satélites alfa del cromosoma 17 en tejido incluido en parafina y fijado en formol o muestras de células por hibridación fluorescente *in situ* (FISH) en el ImPath 36 (código de producto 43965).

Los resultados deben interpretarse dentro del contexto del historial clínico del paciente con respecto a otros datos patológicos y clínicos del paciente aportados por un patólogo cualificado.

## Resumen y explicación

El gen ERBB2 (denominado HER2 y NEU) está situado en la región cromosómica 17q12 y codifica el receptor del factor de crecimiento celular p185.

Se ha establecido una correlación entre un diagnóstico deficiente de la enfermedad y la multiplicación del proto-oncogén ERBB2, observada en aproximadamente el 20 % de todas las muestras de cáncer de mama. Se han obtenido resultados similares en varias neoplasias malignas, como el cáncer de ovario, el cáncer de estómago y los carcinomas de la glándula salival.

## Principios y procedimientos

Puede detectarse la presencia de determinadas secuencias de ácidos nucleicos en células o tejidos por hibridación fluorescente *in situ* (FISH) mediante el uso de sondas de ADN etiquetadas con colorantes fluorescentes. La hibridación da lugar a la doble formación de secuencias presentes en el objeto de ensayo y la sonda específica que puede visualizarse mediante un microscopio de fluorescencia y los filtros adecuados.

ImPath HER2 FISH contiene polinucleótidos etiquetados en naranja (excitación a 547 nm y emisión a 572 nm, similar a la rodamina), que se dirigen al gen ERBB2, y polinucleótidos etiquetados en verde (excitación a 503 nm y emisión a 528 nm, similar a FITC), que se dirigen a las secuencias de satélites alfa del centrómero del cromosoma 17 (D17Z1).

## Materiales y métodos

### Reactivos incluidos

El producto indicado es una sonda FISH lista para usar en un vial, fabricado para usar en el ImPath 36. El vial cuenta con una etiqueta RFID que es leída por el ImPath 36 para proporcionar información específica del producto y del lote.

### Reconstitución, mezcla y dilución

El producto está listo para su uso. No requiere reconstitución, mezcla ni dilución. Las diferencias en el procesamiento del tejido y los procedimientos técnicos en el laboratorio pueden generar resultados variables y, por consiguiente, se aconseja efectuar controles regulares. (Véase la sección de procedimientos de control de calidad)



42 life sciences GmbH & Co. KG  
Fischkai 1  
27572 Bremerhaven  
Alemania

3 de noviembre de 2015  
ES REV 1.2

Distribuido por:  
A. Menarini Diagnostics S.r.l.  
Via Sette Santi, 3  
50131 Florencia  
Italia



Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*

con arreglo a la Directiva UE 98/79/CE

## Son necesarios materiales y reactivos (no se suministran)

Pueden ser necesarios los siguientes reactivos y materiales para la tinción, pero no se suministran con la sonda FISH.

1. Tejido de control positivo y negativo
2. Portaobjetos para microscopio, con carga positiva
3. Horno de secado capaz de mantener una temperatura de 50-60 °C.
4. Cubetas o bañeras para tinción
5. Temporizador
6. Etanol o alcohol reactivo
7. ImPath ISH Detection Kit (código de producto 44996)
8. DAPI/Antifade\*
9. Cubreobjetos
10. Microscopio de fluorescencia (400-1000x)
11. Juego de filtros apropiados

\*Uso recomendado: ImPath DAPI (código de producto 47861)

## Conservación y manejo

Consérvese a 2-8 °C en posición vertical. Consérvese protegido de la luz. Agítelo antes de abrir.

Para garantizar el suministro adecuado del reactivo y la estabilidad de la sonda FISH, es preciso poner el reactivo en las condiciones de conservación anteriormente indicadas inmediatamente después de su uso.

Si se conserva correctamente, el reactivo es estable hasta la fecha indicada en la etiqueta. No deben utilizarse los reactivos pasada la fecha de caducidad para el método de conservación prescrito.

## Recogida de muestras y preparación para el análisis

Con esta sonda FISH pueden utilizarse tejidos incluidos en parafina, fijados en formol, tamponados con una solución neutra y procesados de forma rutinaria. El fijador recomendado para tejidos es formalina neutra tamponada al 10 %.

Hay que cortar cada sección según el grosor adecuado (aproximadamente 3-5 µm) y colocarla en un portaobjetos de cristal con carga positiva. Los portaobjetos que contienen la sección del tejido pueden introducirse durante al menos 2 horas (pero no más de 16 horas) en un horno a 50-60 °C.

## Advertencias y precauciones

1. Adopte las precauciones razonables cuando manipule reactivos. Utilice guantes desechables y bata cuando manipule materiales tóxicos o posibles carcinógenos.
2. Evite el contacto de los reactivos con los ojos y las membranas mucosas. Si los reactivos entran en contacto con áreas sensibles, lávelas con abundante agua.
3. Las muestras de tejido y células y todos los materiales que entren en contacto con ellas deben tratarse como residuos biológicos y deben eliminarse tomando las precauciones adecuadas. No pipetee con la boca.
4. Evite la contaminación microbiana de los reactivos, ya que podría generar resultados incorrectos.
5. El usuario debe optimizar los tiempos y las temperaturas de incubación de la solución de pepsina.
6. El reactivo prediluido listo para usar se diluye de manera óptima y una dilución adicional puede traducirse en la pérdida de calidad de tinción.

7. Este producto está clasificado como sustancia peligrosa. Para conocer más detalles, consulte la hoja de datos de seguridad de los materiales.
8. El usuario debe validar las condiciones de conservación si son diferentes a las especificadas en el prospecto.
9. Este producto, como cualquiera procedente de fuentes biológicas, debe manipularse de acuerdo con los procedimientos establecidos.

## Instrucciones de uso

La sonda ImPath HER2 FISH (código de producto 47862) está prevista para ser usada en combinación el ImPath ISH Detection Kit (código de producto 44996) en el ImPath 36 (código de producto 43965).

## Protocolo ISH ImPath:

ImPath ISH Detection Kit (código de producto 44996)

### Pasos del protocolo:

#### Procedimiento paso a paso

1. Siga las instrucciones de uso del ImPath 36 para ajustar el reactivo listo para su uso en el instrumento.
2. Cargue los portaobjetos, la sonda FISH y el ImPath ISH Detection Kit en el ImPath 36 según las instrucciones de uso del ImPath 36.

#### **Ajuste del tiempo de digestión de la pepsina según las condiciones prevalidadas por el usuario**

3. Inicie el procesamiento.
4. Cuando se haya completado el proceso de tinción, retire los portaobjetos del instrumento, deshidrate con etanol al 70 %, 90 % y 100 %, cada uno durante 1 minuto.
5. Seque las muestras al aire en un lugar oscuro.
6. Monte una solución DAPI/Antifade (se recomienda usar ImPath DAPI (código de producto 47861). Tape con un cubreobjetos y deje incubar en la oscuridad durante 15 minutos.
7. Guarde el portaobjetos en la oscuridad a 2-8° C.

## Procedimientos de control de calidad

### Control de tejido positivo

Es preciso realizar siempre un control de tejido positivo con cada procedimiento de hibridación. Este tejido puede contener células de hibridación multiplicadas (positivo) y no multiplicadas (negativo) y sirve tanto para el tejido de control positivo como el negativo.

Deben emplearse controles de tejido positivo conocidos para supervisar el correcto rendimiento de los tejidos procesados y los reactivos de prueba, no como una ayuda para determinar un diagnóstico específico de muestras de los pacientes. Si el control de tejido positivo no logra demostrar la hibridación positiva adecuada, deberán considerarse inválidos los resultados de las muestras del paciente.

### Control de tejido negativo

Puede utilizarse para el control de tejido negativo el mismo tejido utilizado para el control de tejido positivo.

Las células no neoplásicas en el portaobjetos/en la sección del tumor, como fibroblastos, células epiteliales o linfocitos, sirven como control interno y tienen que

mostrar el patrón de señal normal esperada, por lo que pueden servir como control de tejido negativo. Si estas células no logran demostrar la hibridación adecuada, deberán considerarse inválidos los resultados de las muestras del paciente.

## Discrepancias inexplicables

Las discrepancias inexplicables en los controles deben comunicarse de inmediato al servicio de atención de A. Menarini Diagnostics. Si los resultados del control de calidad no cumplen con las especificaciones, los resultados del paciente son inválidos. Consulte la sección de resolución de problemas de este prospecto. Identifique y subsane el problema. A continuación, repita todo el procedimiento con las muestras del paciente.

## Interpretación de los resultados

Con el uso de los juegos apropiados de filtros, las señales de hibridación del gen ERBB2 aparecen naranjas, las señales de hibridación de las secuencias de satélites alfa etiquetadas del centrómero del cromosoma 17 aparecen verdes. En las interfases de las células normales o células sin aberraciones del cromosoma 17, aparecen dos señales ERBB2 y dos señales de cromosoma 17. En las células con una multiplicación genética, puede verse un número mayor de señales específicas del gen o agrupaciones de señales.

Ha de extremarse la precaución para no evaluar células superpuestas, con el fin de evitar falsos resultados, por ejemplo, una multiplicación de los genes. Debido a la cromatina descondensada, pueden aparecer señales únicas de FISH como pequeñas agrupaciones de señales. De este modo, dos o tres señales del mismo tamaño, separadas por una distancia igual o menor al diámetro de una señal, deben contarse como una sola señal.

Las irregularidades del tejido, como el tejido en el límite, o tejido retraído o apretado, deben excluirse de la evaluación. No evalúe el tejido del paciente si los controles no son como esperaba. Rechace el resultado si muestra una fuerte autofluorescencia. La sobredigestión puede reconocerse por las áreas oscuras visibles dentro de los núcleos y debe excluirse de la evaluación.

Un resultado negativo o no específico puede estar causado por múltiples factores (consulte el capítulo de resolución de problemas en este prospecto).

## Limitaciones

1. Este reactivo es "solo para uso profesional" como hibridación fluorescente *in situ*. Se trata de un proceso de múltiples pasos que requiere una formación especializada en la selección de los reactivos y tejidos apropiados, fijación, procesamiento, preparación del portaobjetos FISH, e interpretación de los resultados de la hibridación.
2. Exclusivamente para uso en laboratorio.
3. Para aplicaciones de diagnóstico *in vitro*.
4. La tinción de tejidos, especialmente la intensidad de señal y la tinción del fondo, depende del manejo y el procesamiento del tejido antes de la tinción. Una fijación inadecuada, la congelación, descongelación, lavado, secado, calentamiento, división o contaminación con otros tejidos o líquidos puede producir irregularidades o resultados falsos. Los resultados inconsistentes pueden proceder de variaciones en la fijación y en los métodos de inclusión, así como de irregularidades inherentes en el tejido.
5. Una contratinción excesiva o incompleta puede afectar a la adecuada interpretación de los resultados.
6. La calidad de las señales depende del correcto posicionamiento del tejido en la mitad inferior del portaobjetos. Para más información sobre la correcta colocación

del tejido, póngase en contacto con su representante de ventas de A. Menarini Diagnostics.

7. La interpretación clínica de cualquier tinción positiva, o su ausencia, debe realizarse dentro del contexto del historial clínico, la morfología, otros criterios histopatológicos y otras pruebas de diagnóstico. Debe contar con un patólogo cualificado familiarizado con las sondas FISH, los reactivos, los paneles de diagnóstico y los métodos empleados para producir la preparación teñida. La tinción debe ser realizada en un laboratorio certificado y autorizado, bajo la supervisión de un patólogo responsable de revisar los portaobjetos teñidos y de garantizar la idoneidad de los controles positivos y negativos.
8. Las sondas FISH listas para usar y los reactivos se proporcionan a una dilución óptima para su uso según las instrucciones. Cualquier desviación de los procedimientos de prueba recomendados puede invalidar los resultados esperados. Deben aplicarse y documentarse controles apropiados. En todas las circunstancias, los usuarios deben aceptar la responsabilidad de la interpretación de los resultados.
9. Los reactivos pueden presentar reacciones inesperadas en tejidos no sometidos a ensayos previos. No es posible eliminar por completo la posibilidad de que se produzcan reacciones inesperadas incluso en grupos de tejidos sometidos a ensayos, debido a las variabilidades biológicas en los tumores o en otros tejidos patológicos. Póngase en contacto con el servicio de atención al cliente de A. Menarini Diagnostics si se produjese cualquier reacción inesperada sospechosa y documentada.

## Resultados esperados

La siguiente tabla muestra el rendimiento de la sonda ImPath HER2 FISH comparada con una sonda HER2 FISH manual certificada por la CE en un tejido de carcinoma mamario. De conformidad con la directriz ASCO (2013), una ratio HER2/CEN 17  $\geq 2,0$  se considera positiva.

		ImPath HER2 FISH		
		negativo (ratio HER2/CEN 17 <2,0)	positivo (ratio HER2/CEN 17 $\geq 2,0$ )	Total
Referencia	negativo (ratio HER2/CEN 17 <2,0)	14	0	14
	positivo (ratio HER2/CEN 17 $\geq 2,0$ )	0	5	5
	Total	14	5	19

Se obtiene una elevada concordancia del 100 %, una especificidad del 100 % y una sensibilidad del 100 % en el tejido de carcinoma mamario para la sonda ImPath HER2 FISH, cuando se realiza en el ImPath 36.

## Solución de problemas

1. Si no pueden observarse señales o estas son muy débiles, es posible que no se haya llevado a cabo adecuadamente un pretratamiento proteolítico y deba optimizarse el tiempo de incubación de la pepsina.
2. Asimismo, una solución tamponadora de lavado poco concentrada puede producir señales débiles. Por ello, es preciso controlar la concentración de la solución tamponadora de lavado.
3. Si el microscopio de fluorescencia está mal ajustado, también pueden generarse intensidades de señal débiles. Asegúrese de usar un microscopio de fluorescencia bien configurado y calibrado, con los juegos de filtros adecuados.
4. Un haz de luz demasiado fuerte mientras se maneja la sonda o el portaobjetos también puede traducirse en señales débiles o en ausencia de estas. La sonda y los portaobjetos teñidos deben manipularse lejos de la luz solar directa.
5. Si se producen señales de hibridación cruzada o una fuerte tinción del fondo, es posible que el pretratamiento proteolítico haya sido demasiado fuerte y deba optimizarse el tiempo de incubación de la pepsina.
6. Además, una solución amortiguadora de lavado demasiado concentrada puede producir hibridación cruzada o una fuerte tinción del fondo. Por ello, es preciso controlar la concentración de la solución amortiguadora de lavado.
7. Si las secciones de tejido se desprenden del portaobjetos, hay que comprobar que este posea carga positiva. Otra de las causas que podrían afectar negativamente a la adhesión del tejido son el secado insuficiente de la sección del tejido en el portaobjetos antes de la tinción o bien que la fijación en formol no tenga una solución suficientemente neutra. El grosor del tejido también puede influir.

Para saber qué acciones correctivas llevar a cabo, consulte con el delegado de su zona o póngase en contacto con el servicio de atención al cliente A. Menarini Diagnostics.

## Referencias

1. Kievits T, *et al.* Rapid subchromosomal localization of cosmids by nonradioactive in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6. (1990)
2. Wilkinson DG: *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, Oxford University Press ISBN 0 19 963327 4. (1992)
3. Wolff AC, *et al.* Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol.* 31(31):3997-4013 (2013)