



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
Las Malvinas son argentinas

Disposición

Número:

Referencia: 1-47-3110-5252/17-7

VISTO el expediente N° 1-47-3110-5252/17-7 del Registro de la Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica y,

CONSIDERANDO:

Que por los presentes actuados la firma ROCHEM BIOCARE ARGENTINA S.A. solicita autorización para la venta a laboratorios de análisis clínicos del Producto para diagnóstico uso In Vitro denominado **HER2 IQFISH pharmDx™**.

Que en el expediente de referencia consta el informe técnico producido por el Servicio de Productos para Diagnóstico que establece que los productos reúnen las condiciones de aptitud requeridas para su autorización.

Que se ha dado cumplimiento a los términos que establecen la Ley N° 16.463, Resolución Ministerial N° 145/98 y Disposición ANMAT N° 2674/99.

Que el Instituto Nacional de Productos Médicos ha tomado la intervención de su competencia.

Que corresponde autorizar la inscripción en el RPPTM del producto médico objeto de la solicitud.

Que la presente se dicta en virtud de las facultades conferidas por los Decretos N° 1490/92 y sus modificatorios.

Por ello;

EL ADMINISTRADOR NACIONAL DE LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE
MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA

DISPONE:

ARTÍCULO 1º.- Autorízase la inscripción en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica (RPPTM) de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) del producto médico para diagnóstico de uso In Vitro denominado **HER2 IQFISH pharmDx™**, de acuerdo a lo solicitado por la firma ROCHEM BIOCARE ARGENTINA S.A. con los datos característicos que figuran al pie de la presente.

ARTICULO 2º.- Autorícense los textos de los proyectos de rótulos y Manual de Instrucciones que obran en el documento N° IF-2020-10990145-APN-INPM#ANMAT.

ARTÍCULO 3º.- En los rótulos e instrucciones de uso autorizados deberá figurar la leyenda “Autorizado por la ANMAT PM 1667-61”, con exclusión de toda otra leyenda no contemplada en la normativa vigente.

ARTÍCULO 4º.- Extiéndase el Certificado de Autorización e Inscripción en el RPPTM con los datos característicos mencionados en esta Disposición.

ARTÍCULO 5º.- Regístrese. Inscríbase en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica al nuevo producto. Por el Departamento de Mesa de Entrada, notifíquese al interesado, haciéndole entrega de la presente Disposición, conjuntamente con rótulos e instrucciones de uso autorizado y el Certificado mencionado en el artículo 4º. Gírese a la Dirección de Gestión de Información Técnica a los fines de confeccionar el legajo correspondiente. Cumplido, archívese.

DATOS IDENTIFICATORIOS CARACTERISTICOS

Nombre comercial: **HER2 IQFISH pharmDx™**.

Indicación de uso: ENSAYO DE HIBRIDACIÓN IN SITU FLUORESCENTE (FISH) DIRECTO PARA LA DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN *HER2* EN MUESTRAS DE TEJIDO DE CANCER MAMARIO FIJADO CON FORMOL E INCLUIDO EN PARAFINA (FFPE) Y MUESTRAS FFPE PROCEDENTES DE ADENOCARCINOMA DE ESTÓMAGO.

Forma de presentación: Envases por 20 determinaciones, conteniendo: Pre-treatment solution 20x (150 ml), Pepsin (4 x 6 ml), Pepsin diluent 10x (1 x 24 ml), HER2/ CEN-17 IQISH Probe mix (0.2 ml), Stringent Wash Buffer 20x (150 ml), Fluorescence Mounting Medium (0.4 ml), Wash Buffer 20x (500 ml).

Período de vida útil y condición de conservación: 12 (DOCE) meses, desde la fecha de elaboración conservado entre -18 y 8 °C.

Condición de venta: venta a Laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO.

Nombre y dirección del fabricante: DAKO DENMARK A/S. Produktionsvej 42. 2600 Glostrup. (DINAMARCA).

Expediente N° 1-47-3110-5252/17-7

AM

Digitally signed by GARAY Valeria Teresa
Date: 2022.03.31 15:35:09 ART
Location: Ciudad Autónoma de Buenos Aires

Digitally signed by Gestion Documental
Electronica
Date: 2022.03.31 15:35:11 -03:00



CE

HER2 IQFISH pharmDx™

Nº de catálogo K5731

2ª edición

HER2 IQFISH pharmDx™ es un ensayo de hibridación in situ fluorescente (FISH) directo para la determinación cuantitativa de la amplificación del gen *HER2* en muestras de tejido de cáncer mamario fijado con formol e incluido en parafina (FFPE) y muestras FFPE procedentes de pacientes con adenocarcinoma de estómago, incluido el de la unión gastroesofágica.

El ensayo está indicado como complemento de HercepTest™ en la evaluación de pacientes para quienes se esté considerando la posibilidad de tratamiento con Herceptin™.

El kit contiene reactivos suficientes para 20 pruebas.

(122303-002)

ROCHEM BIOCARE ARGENTINA S.A.
Fernando Matías Mendonça
D.N.I. 25.097.811
Apoderado

CARLOS E. G. BOBBFTT
DIRECTOR TÉCNICO
M.T. 11158

Índice

	Página
Uso previsto	4
Resumen y explicación - Mama	5
Principio del procedimiento - Mama	5
Reactivos - Mama.....	6
Material suministrado	6
Material necesario pero no suministrado.....	7
Precauciones - Mama.....	8
Almacenamiento - Mama.....	9
Preparación de las muestras - Mama.....	9
Cortes incluidos en parafina.....	9
INSTRUCCIONES DE USO - Mama	11
A. Preparación de los reactivos - Mama.....	11
A.1 Solución de pretratamiento	11
A.2 Tampón de lavado astringente.....	11
A.3 Tampón de lavado	11
A.4 Serie de etanol.....	11
B. Procedimiento de tinción - Mama.....	12
B.1 Notas sobre el procedimiento	12
B.2 Tratamiento de los tejidos antes de la tinción	12
B.3 Protocolo de tinción	13
Control de calidad - Mama	17
Interpretación de la tinción - Mama	17
Limitaciones - Mama	19
Características de resultados - Mama.....	19
Sensibilidad analítica.....	19
Especificidad analítica.....	19
Estudios de robustez.....	19
Repetibilidad	22
Reproducibilidad	22
Utilidad clínica	22
Solución de problemas - Mama.....	25
Apéndice 1 - Mama	27
Apéndice 2 - Mama	29
Apéndice 3 - Mama	30
Resumen y explicación - Gástrico	31

Principio del procedimiento - Gástrico	31
Reactivos - Gástrico	32
Material suministrado	32
Material necesario pero no suministrado.....	33
Equipo de microscopía y accesorios	34
Precauciones - Gástrico	34
Almacenamiento - Gástrico	35
Preparación de las muestras - Gástrico	36
Cortes incluidos en parafina.....	36
INSTRUCCIONES DE USO - Gástrico.....	37
A. Preparación de los reactivos - Gástrico	37
A.1 Solución de pretratamiento	37
A.2 Tampón de lavado astringente.....	37
A.3 Tampón de lavado	37
A.4 Serie de etanol.....	37
B. Procedimiento de tinción - Gástrico	38
B.1 Notas sobre el procedimiento	38
B.2 Tratamiento de los tejidos antes de la tinción	38
B.3 Protocolo de tinción	39
Control de calidad - Gástrico	42
Interpretación de la tinción - Gástrico	43
Limitaciones - Gástrico	45
Características de resultados - Gástrico.....	45
Sensibilidad analítica.....	47
Especificidad analítica.....	48
Estudios de robustez.....	48
Repetibilidad	49
Reproducibilidad	49
Utilidad clínica	50
Solución de problemas - Gástrico.....	51
Apéndice 4 - Gástrico	54
Apéndice 5 - Gástrico	56
Apéndice 6 - Gástrico	58
Apéndice 7 - Gástrico	59
Referencias	60
Explicación de los símbolos	62



Uso previsto

Para uso en diagnóstico in vitro.

HER2 IQFISH pharmDx™ es un ensayo de hibridación in situ fluorescente (FISH) directo diseñado para determinar cuantitativamente la amplificación del gen *HER2* en muestras de tejido de cáncer de mama fijadas en formol e incluidas en parafina (FFPE) y muestras FFPE procedentes de pacientes con adenocarcinoma de estómago, incluida la unión gastroesofágica. *HER2 IQFISH pharmDx™* está indicado como complemento del HercepTest™ en la evaluación de pacientes para los que se está considerando un tratamiento con Herceptin™ (trastuzumab) (consulte el prospecto de Herceptin™).

En pacientes con cáncer de mama, los resultados de *HER2 IQFISH pharmDx™* se utilizan junto a la información clinicopatológica usada para calcular el pronóstico en pacientes con cáncer de mama con nodos positivos en fase II.

El adenocarcinoma de estómago, incluida la unión gastroesofágica, también recibe el nombre de cáncer gástrico en este documento.

Consulte las páginas 5-30 para obtener información sobre su aplicación para el cáncer de mama.

Consulte las páginas 31-59 para obtener información sobre su aplicación para el cáncer gástrico.

Importante: Obsérvense las diferencias para el tejido de cáncer de mama y el tejido de cáncer gástrico especialmente en la interpretación de las Secciones de Tinción.

(122303-002)

P01489ES_002_K573121-2/LMA/2013.01 p. 4/62
ROCHEM BIOCARE ARGENTINA S.A.
Fernando Matias Merlo
D.N.I. 25.007.811
Apoderado

CARLOS E.G. BOBBFTT
DIRECTOR TÉCNICO
M.N. 11158

Resumen y explicación - Mama

El gen *HER2* humano (también conocido como *ERBB2* o *NEU*) está ubicado en el cromosoma 17 y codifica la proteína *HER2*, también llamada *p185^{HER2}*. La proteína *HER2* es una tirosina quinasa del receptor de membrana que presenta homología con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR* o *HER1*) (1-2). El gen *HER2* está presente en 2 copias en todas las células diploides normales.

En una proporción de pacientes con cáncer de mama, el gen *HER2* se amplifica como parte del proceso de transformación maligna y progresión tumoral (3-8). Generalmente, la amplificación del gen *HER2* lleva a una sobreexpresión de la proteína *HER2* en la superficie de las células cancerosas mamarias (9).

Se ha demostrado amplificación del gen *HER2* y/o sobreexpresión de su proteína en el 25-30% de los cánceres de mama. Este aumento de la expresión se asocia con un pronóstico adverso, un aumento del riesgo de recurrencia y reducción de las expectativas de vida. Varios estudios han demostrado que el estado en cuanto a *HER2* está correlacionado con la sensibilidad o resistencia a determinados regímenes quimioterapéuticos (10).

La demostración de una elevada sobreexpresión de la proteína *HER2* o de amplificación del gen *HER2* es esencial para iniciar la terapia con Herceptin™, que es un anticuerpo monoclonal contra la proteína *HER2*. Los estudios clínicos han demostrado que las pacientes cuyos tumores presentan una alta sobreexpresión de la proteína *HER2* y/o amplificación del gen *HER2* son las que más se benefician del tratamiento con Herceptin™ (11).

Principio del procedimiento - Mama

HER2 IQFISH pharmDx™ contiene todos los reactivos clave necesarios para llevar a cabo un procedimiento FISH con cortes de tejido incluidos en parafina, fijados en formol.

Después del desparafinado y la rehidratación, las muestras se calientan en una solución de pretratamiento, seguido de la digestión proteolítica usando pepsina. Después de los pasos de calentamiento y pretratamiento proteolítico, este kit emplea una mezcla de sondas IQFISH, lista para su uso y no tóxica, basada en una combinación de tecnologías de ANP (ácido nucleico peptídico) (12) y ADN. Esta mezcla de sondas consta de una mezcla de sondas de ADN marcado con Texas Red que cubren una región de 218 kb que incluye el gen *HER2* en el cromosoma 17, y de una mezcla de sondas de ANP marcado con fluoresceína cuya diana es la región centromérica del cromosoma 17 (CEN-17). La hibridación específica de ambas dianas conduce a la formación de una señal fluorescente roja bien definida en cada locus del gen *HER2*, así como de una señal fluorescente verde bien definida en el centrómero de cada cromosoma 17. Tras un lavado astringente, las muestras se montan con medio de montaje fluorescente que contiene DAPI y se cubren con cubreobjetos. Utilizando un microscopio de fluorescencia dotado de los filtros apropiados (consulte el Apéndice 3) se localizan las células tumorales, y se lleva a cabo la enumeración de las señales rojas (*HER2*) y verdes (CEN-17). A continuación se calcula la relación *HER2*/CEN-17. Las células normales presentes en el corte de tejido analizado sirven como control positivo interno de la eficacia del pretratamiento y de la hibridación. Consulte la Sección Interpretación de la tinción para obtener información detallada al respecto.

Si desea un curso de formación electrónica interactiva, utilice el programa de formación electrónica *HER2* IQFISH pharmDx™, que está diseñado para enseñar de forma rápida y precisa a los técnicos de laboratorio, a los anatomopatólogos y a los científicos a lograr unos resultados óptimos con el *HER2* IQFISH pharmDx™:

www.dako.com



Cáncer de mama

Reactivos - Mama

Material suministrado

Los materiales enumerados a continuación son suficientes para 20 pruebas (una prueba se define como una área diana de 22 mm x 22 mm). El número de pruebas se basa en el uso de 250 µL por portaobjetos del Vial 2A (5-8 gotas), 10 µL por portaobjetos del Vial 3, y 15 µL por portaobjetos del Vial 5). Las soluciones del Vial 3 y el Vial 5 son viscosas y es posible que haya que centrifugarlas brevemente en una microcentrifugadora para recoger todo el reactivo suministrado.

El kit proporciona suficientes materiales para 10 ciclos de tinción individuales (cuatro ciclos separados si se usa el método de inmersión en pepsina). *HER2 IQFISH pharmDx™* se suministra en hielo seco. **Los componentes del kit no se han expuesto a altas temperaturas durante el transporte siempre que todavía haya hielo seco cuando usted reciba el kit.** Si algunos componentes del kit permanecen sin congelar, esto no afecta a la eficacia de *HER2 IQFISH pharmDx™*.

Vial 1

PRE-TREATMENT SOLUTION (20x)

Solución de pretratamiento (20x)

150 mL, concentrado 20x
Tampón MES (ácido 2-[N-morfolin]etanosulfónico).

Vial 2A

PEPSIN

Pepsina

4 x 6,0 mL, listo para su uso
La solución de pepsina, pH 2,0, contiene un estabilizante y un agente antimicrobiano.

Vial 2B

PEPSIN DILUENT (10x)

Diluyente de pepsina (10x)

24 mL, concentrado 10x
Búfer de dilución, pH 2,0, contiene un agente antimicrobiano.

Vial 3

HER2/CEN-17 IQISH
PROBE MIX

Mezcla de sondas *HER2/CEN-17 IQISH*

0,2 mL, listo para su uso
Mezcla de sondas de ADN marcada con Texas Red *HER2* y sondas de ANP CEN-17 marcada con fluoresceína; suministradas en tampón de hibridación IQISH.

Vial 4

STRINGENT WASH BUFFER (20x)

Tampón de lavado astringente (20x)

150 mL, concentrado 20x
Tampón SSC (solución salina con citrato sódico) con detergente (Tween-20).

Vial 5

FLUORESCENCE
MOUNTING MEDIUM

Medio de montaje fluorescente

0,4 mL, listo para su uso
Medio de montaje fluorescente con 500 µg/L de DAPI (4',6-diamidina-2-fenilindol).

(122303-002)

ROCHEM BIOCARE ARGENTINA
Fernando Matias Mendonça
D.N. 25.097.811
Apostado

RO1499ES_002_K573121-2/LMA/2013.01 p. 6/62

CAPLOS E.G. BOBBFTT
DIRECTOR TÉCNICO
M.N. 11158

Cáncer de mama

Vial 6

WASH BUFFER (20x)

Tampón de lavado (20x)
500 mL, concentrado 20x
Tampón Tris/HCl.

COVERSLIP SEALANT

Sellador de cubreobjetos
1 tubo, listo para su uso
Solución para el sellado eliminable de cubreobjetos.

NOTA: Los siguientes reactivos del kit: La solución de pretratamiento (20x), pepsina, diluyente de pepsina (10x), tampón de lavado astringente (20x), medio de montaje fluorescente, tampón de lavado (20x) y sellador de cubreobjetos son intercambiables con los reactivos correspondientes del Dako Histology FISH Accessory Kit, n° de catálogo K5799.

Material necesario pero no suministrado

Reactivos de laboratorio

Agua destilada o desionizada

Etanol, 96%

Xileno o sustitutos de xileno

Equipo de laboratorio

Paños absorbentes

Pipetas regulables.

Termómetro calibrado, de inmersión parcial (intervalo 37–100 °C)

Termómetro de superficie calibrado (intervalo 37–100 °C)

Cubreobjetos (22 mm x 22 mm)

Pinzas

Campana extractora de gases

Dako Hybridizer (n° de catálogo S2450 o S2451)*

Bloque de calentamiento o hibridación*

Cámara de hibridación húmeda*

Microcentrifugadora

Portaobjetos, Dako Silanized Slides, n° de catálogo S3003, o portaobjetos recubiertos de poli-L-lisina (consulte Preparación de las muestras)

Recipientes o baños de tinción

Cronómetro (capaz de cronometrar intervalos de 2-15 minutos)

Mezclador vórtex

Baño de agua con tapa capaz de mantener una temperatura de 37(±2) °C, 63 (±2) °C y de 95 °C a 99 °C)

Microondas con capacidad de detección, si el pretratamiento se realiza mediante un microondas (consulte B3. Protocolo de tinción. Paso 1: Pretratamiento, método B).

* Se puede utilizar un bloque de calentamiento o un horno de hibridación para desnaturalización (66 (±1) °C) e hibridación (45 (±2) °C) junto con una cámara de hibridación húmeda, como alternativa al Dako Hybridizer.

(122303-002)

ROCHEM BIOCARE ARGENTINA
Fernando Matías Merlino
D.N.I. 25.097.811
Apoderado

CARLOS E. G. BOBBETT
DIRECTOR TÉCNICO
M.N. 11158

Cáncer de mama

Equipo de microscopía y accesorios

Filtros para microscopio de fluorescencia: doble filtro para DAPI y FITC/Texas Red, o monofiltros para FITC y Texas Red - consulte el Apéndice 3 para obtener detalles al respecto.

Debe utilizarse un microscopio de fluorescencia con una lámpara de mercurio de 100 vatios como fuente de luz. No se recomienda el uso de otras fuentes de luz con estos filtros.

Bandeja plegable para portaobjetos de microscopía (bandeja de cartón para 20 portaobjetos con cubierta de bisagra o similar)

Precauciones - Mama

1. Para uso en diagnóstico in vitro.
2. Para usuarios profesionales.
3. El Vial 1, solución de pretratamiento(20x), contiene ácido 2-morfolinoetanosulfónico al 1-20%, el Vial 2A, pepsina, contiene propan-2-ol al 5-10%; y el Vial 6, tampón de lavado (20x), contiene trometamol al 1-20%. A las concentraciones en que se encuentran en el producto, estas sustancias no requieren etiquetado de advertencia de productos peligrosos. Los usuarios profesionales pueden solicitar a Dako hojas de datos sobre la seguridad (MSDS, por sus siglas en inglés) de estos productos.
4. Vial 2A. pepsina, contiene pepsina A, que puede causar reacciones alérgicas.
5. Vial 2B, diluyente de pepsina (10x) que contiene un 60% de propan-2-ol y está marcado como:
Altamente inflamable.
Irritante.
R11 Altamente inflamable.
R36 Irritante para los ojos.
R67 Los vapores pueden provocar somnolencia y vértigo.
S9 Consérvese el recipiente en lugar bien ventilado.
S16 Manténgase lejos de toda fuente de ignición – No fumar.
S26 En caso de contacto con los ojos, enjuague inmediatamente con abundante agua y busque atención médica.
S60 Esta sustancia y su recipiente deben desecharse como material peligroso.
6. El sellador de cubreobjetos contiene nafta (petróleo) al 60-100%, ligeramente hidrotratada, está marcado como:
Extremadamente inflamable.
Peligroso para el medio ambiente.
R11 Altamente inflamable.
R51/53 Tóxico para los organismos acuáticos, puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático.
S9 Consérvese el recipiente en lugar bien ventilado.
S16 Manténgase lejos de toda fuente de ignición – No fumar.
S35 Este material y su envase deben desecharse de forma segura.
S57 Utilícese un envase de seguridad adecuado para evitar la contaminación del medio ambiente.
S61 Evitar el vertido en el entorno. Consulte las instrucciones especiales/hojas de datos de seguridad.
Consulte la hoja de datos de seguridad de materiales (MSDS) para obtener información más detallada.
7. Las muestras, antes y después de la fijación, así como todos los materiales expuestos a ellas, deben manipularse como capaces de transmitir infecciones, y desecharse con las precauciones apropiadas (13). Nunca pipetee reactivos con la boca y evite el contacto de la

Cáncer de mama

- piel y membranas mucosas con reactivos y muestras. En el caso de que los reactivos entren en contacto con zonas sensibles, lave con abundante agua.
8. A fin de evitar resultados erróneos, minimice la contaminación microbiana de los reactivos.
 9. La aplicación de tiempos y temperaturas de incubación o de métodos distintos a los especificados, puede producir resultados erróneos.
 10. El uso de métodos de fijación de tejidos y de espesores de muestras distintos a los especificados puede afectar negativamente a la morfología del tejido y/o a la intensidad de la señal.
 11. Evite la evaporación de la mezcla de sondas *HER2/CEN-17* durante la hibridación garantizando una humedad suficiente en la cámara de hibridación.
 12. Los reactivos están diluidos de forma óptima. Una mayor dilución puede provocar pérdida de eficacia.
 13. Utilice el equipo de protección individual adecuado para evitar el contacto con los ojos y la piel. Le rogamos que consulte la hoja de datos de seguridad (MSDS) para obtener información más detallada.
 14. Sólo deben utilizarse recipientes de tinción limpios para el método de inmersión en pepsina (Paso 2, método C).

Almacenamiento - Mama

Conserve la mezcla de sondas *HER2/CEN-17 IQISH* (Vial 3) a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un lugar oscuro. El resto de reactivos se pueden conservar a $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la oscuridad. Todos los reactivos se pueden almacenar congelados. Los reactivos se pueden congelar y descongelar hasta 10 veces sin que pierdan su eficacia.

La pepsina, la mezcla de sondas *HER2/CEN-17 IQISH* y el medio de montaje fluorescente (Viales 2A, 3 y 5) puede verse afectados negativamente si se exponen al calor. No deje estos componentes a temperatura ambiente.

La mezcla de sondas *HER2/CEN-17 IQISH* y el medio de montaje fluorescente (Viales 3 y 5) pueden verse afectados negativamente si son expuestos a niveles lumínicos excesivos. No almacene estos componentes ni lleve a cabo análisis bajo una luz intensa, por ejemplo, la luz solar directa.

No utilice el kit después de la fecha de caducidad impresa en la caja del kit. Si los reactivos se almacenan bajo condiciones distintas de las especificadas en este documento, el usuario debe validar la eficacia de los reactivos (14).

No existen signos evidentes que indiquen inestabilidad de este producto. Por lo tanto, es importante evaluar células normales presentes en el corte de tejido analizado. Si observa un patrón de fluorescencia inesperado que no pueda atribuirse a las variaciones en los procedimientos de laboratorio y sospecha que existe un problema con *HER2 IQFISH pharmDx™*, póngase en contacto con el servicio técnico de Dako.

Preparación de las muestras - Mama

Las muestras de biopsias, escisiones o resecciones deben manipularse de tal forma que se conserve el tejido para el análisis FISH. Deben utilizarse con todas las muestras los métodos estándar de procesamiento de tejidos para su tinción inmunocitoquímica (15).

Cortes incluidos en parafina

Sólo los tejidos conservados con formol tamponado neutro e incluidos en parafina son adecuados para su uso. Las muestras deben cortarse en bloques de, por ejemplo, 3 ó 4 mm de espesor, y fijarse durante 18–24 horas con formol tamponado neutro. Los tejidos se deshidratan en una serie graduada de etanol y xileno, seguido de infiltración con parafina fundida mantenida a no más de $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los tejidos correctamente fijados e incluidos se conservarán indefinidamente antes de su seccionamiento y montaje en portaobjetos si se almacenan en un sitio fresco ($15-25\text{ }^{\circ}\text{C}$) (15-16). No es adecuado ningún otro fijador.



Cáncer de mama

Las muestras de tejido deben cortarse en cortes de 4–6 μm .

Los portaobjetos requeridos para el análisis de la amplificación del gen *HER2* y la verificación de la presencia de tumores deben prepararse a la vez. Se recomienda realizar un mínimo de 2 cortes en serie, 1 corte para la verificación de la presencia de tumores teñida con hematoxilina y eosina (tinción H&E), y 1 corte para el análisis de la amplificación del gen *HER2*. Se recomienda montar los cortes de tejido en los portaobjetos Dako Silanized Slides, N° de catálogo S3003, o en portaobjetos recubiertos de poli-L-lisina. Las muestras deben analizarse dentro de un período de 4–6 meses tras el seccionamiento, siempre que se almacenen a temperatura ambiente (20–25 °C).

(122303-002)

01499ES_002_K573121-2/LMA/2013.01 p. 10/62
ROCHEMOCARE ARGENTINA
Fernando Matias M. ...
D.N.I. 25.197.811
Apoderado

CARLOS E.G. BOBBFTT
DIRECTOR TÉCNICO
M.N. 11/58

Cáncer de mama

INSTRUCCIONES DE USO - Mama

A. Preparación de los reactivos - Mama

Es conveniente preparar los siguientes reactivos antes de proceder con la tinción:

A.1 Solución de pretratamiento

Es posible que aparezcan cristales en el Vial 1, pero, a temperatura ambiente, se disuelven. Asegúrese de que no haya cristales antes de la preparación del reactivo.

Diluya una cantidad suficiente del Vial 1 (solución de pretratamiento 20x) diluyendo el concentrado 1:20 en agua destilada o desionizada. La solución diluida sin usar puede almacenarse a 2–8 °C durante un mes. Deseche la solución diluida si está turbia.

A.2 Tampón de lavado astringente

Diluya una cantidad suficiente del Vial 4 (Tampón de lavado astringente 20x) diluyendo el concentrado 1:20 en agua destilada o desionizada. El tampón diluido sin usar puede almacenarse a 2–8 °C durante un mes. Si el tampón diluido presenta un aspecto turbio, deséchelo.

A.3 Tampón de lavado

Diluya una cantidad suficiente del Vial 6 (Tampón de lavado 20x) diluyendo el concentrado al 1:20 en agua destilada o desionizada. El tampón diluido sin usar puede almacenarse a 2–8 °C durante un mes. Si el tampón diluido presenta un aspecto turbio, deséchelo.

A.4 Serie de etanol

A partir de una solución de etanol al 96%, prepare 3 recipientes con etanol al 70%, 85% y 96%, respectivamente. Almacene los recipientes tapados a temperatura ambiente o a una temperatura de 2–8 °C, y utilícelos con un máximo de 200 portaobjetos. Si las soluciones presentan un aspecto turbio, deséchelas.

A.5. Solución de pepsina

Solo se necesita una solución de pepsina cuando se usa el método de inmersión en pepsina (Método C).

Prepare la solución de pepsina como sigue;

Para un recipiente con una capacidad de seis portaobjetos prepare 60 mL de solución de pepsina:

Añada 48 mL de agua destilada o desionizada (20–25 °C) al recipiente.

Añada 6 mL de diluyente de pepsina frío (2–8 °C) (10x) (Vial 2B) al recipiente.

Añada 6 mL de pepsina fría (2–8 °C) (Vial 2A) al recipiente.

Coloque la tapa del recipiente y equilibre la solución de pepsina a 37 (±2) °C en un baño de agua.

Para un recipiente con una capacidad de 24 portaobjetos, prepare 240 mL de solución de pepsina:

Añada 192 mL de agua destilada o desionizada a temperatura ambiente (20–25 °C) al recipiente.

Añada 24 mL de diluyente de pepsina frío (2–8 °C) (10x) (Vial 2B) al recipiente.

Añada 24 mL de pepsina fría (2–8 °C) (Vial 2A) al recipiente.

Coloque la tapa del recipiente y equilibre la solución de pepsina a 37 (±2) °C en un baño de agua.

La solución de pepsina equilibrada se debe usar dentro de las 5 horas siguientes.

B. Procedimiento de tinción - Mama

B.1 Notas sobre el procedimiento

El usuario debe leer detenidamente estas instrucciones y familiarizarse con todos los componentes antes de su uso (consulte la Sección Precauciones).

Todos los reactivos deben equilibrarse a la temperatura ambiente antes de su uso, de la manera descrita a continuación:

Vial 1: La solución de pretratamiento diluida debe equilibrarse a **95–99 °C** si se utiliza un baño de agua para el pretratamiento (B3. Protocolo de tinción, Paso 1: Pretratamiento, método A). Si se utiliza un microondas con capacidad de detección para el pretratamiento (B3. Protocolo de tinción, Paso 1: Pretratamiento, Método B). La solución de pretratamiento diluida debe equilibrarse a la temperatura ambiente de 20–25 °C.

Vial 2A: La pepsina debe aplicarse a **2–8 °C** (B3, Protocolo de tinción, Paso 2: Método A. y B) y mantenerse fría en todo momento.

Vial 2B: El diluyente de pepsina (10x) debe aplicarse a **2–8 °C** (B3, Protocolo de tinción, Paso 2: Método C).

Vial 3: La mezcla de sondas *HER2/CEN-17 IQISH* se separa en dos fases cuando se conserva a **-18 °C**. Antes de utilizar el Vial 3, asegúrese de que sólo haya una fase, equilibrando la mezcla de sondas a temperatura ambiente **20–25 °C** seguido de la mezcla. Descongele el Vial 3 a temperatura ambiente (20–25 °C) durante un máximo de 30 minutos (protéjalo de fuentes de luz intensas) y luego mezcle bien en remolino el vial durante 15 segundos a 2500 rpm usando un mezclador vórtex. Guarde el Vial 3 a **-18 °C** inmediatamente después de usarlo.

Vial 4: tampón de lavado astringente diluido; uno de los recipientes debe equilibrarse a temperatura ambiente, y el otro recipiente a **63 (±2) °C** antes de su uso.

Vial 5: El medio de montaje fluorescente puede aplicarse a cualquier temperatura de **2 a 25 °C**.

Vial 6: El tampón de lavado diluido debe equilibrarse a temperatura ambiente **20–25 °C**.

El sellador de cubreobjetos puede aplicarse a cualquier temperatura en el rango **2–25 °C**.

Todos los pasos deben llevarse a cabo a las temperaturas indicadas.

El procedimiento incluye una serie de deshidrataciones, seguidas del secado de los cortes de tejido. Asegúrese de que los cortes de tejido estén completamente secos antes de continuar con el paso siguiente. No permita que los cortes de tejido se sequen durante los demás pasos del procedimiento.

Si tiene que interrumpir el procedimiento de tinción, puede conservar los portaobjetos en el tampón de lavado tras el paso de desparafinado durante un máximo de 1 hora a temperatura ambiente (20–25 °C) sin que esto afecte a los resultados.

B.2 Tratamiento de los tejidos antes de la tinción

Eliminación de la parafina y rehidratación: Antes de llevar a cabo el análisis, debe eliminar la parafina de los portaobjetos de tejido para eliminar el medio de inclusión y rehidratarlos. Trate de no dejar restos de parafina. Cualquier residuo del medio de inclusión provocaría un aumento de la tinción no específica. Este paso debe realizarse a temperatura ambiente (20–25 °C).

1. Coloque los portaobjetos en un baño de xileno e incube durante 5 (±1) minutos. Cambie los baños y repita el paso una vez.
2. Golpee suavemente para eliminar el exceso de líquido e introduzca los portaobjetos en etanol al 96% durante 2 (±1) minutos. Cambie los baños y repita el paso una vez.
3. Golpee suavemente para eliminar el exceso de líquido e introduzca los portaobjetos en etanol al 70% durante 2 (±1) minutos. Cambie los baños y repita el paso una vez.
4. Golpee suavemente para eliminar el exceso de líquido e introduzca los portaobjetos en el tampón de lavado diluido (consulte INSTRUCCIONES DE USO, Sección A.3) durante un mínimo de 2 minutos. Inicie el procedimiento de tinción de la forma descrita en la Sección B.3, Paso 1, Pretratamiento.

Cáncer de mama

Cambie las soluciones de xileno y de alcohol después de cada 200 portaobjetos o menos. Puede utilizar sustitutivos del xileno.

NOTA: Los reactivos y las instrucciones suministrados con este kit se han diseñado para obtener resultados óptimos. Una mayor dilución de los reactivos o la modificación de las temperaturas de incubación pueden producir resultados erróneos o discordantes. Cualquier diferencia en el procesamiento del tejido y en los procedimientos técnicos que el usuario llevase a cabo en su laboratorio podría invalidar los resultados del ensayo.

B.3 Protocolo de tinción

Paso 1: Pretratamiento

El pretratamiento se puede realizar o bien mediante un baño de agua, según lo descrito en el método A) o, alternativamente, utilizando un microondas con capacidad de detección, según lo descrito en el método B).

Método A: Pretratamiento mediante baño de agua

Llene los recipientes, por ejemplo, recipientes de Coplin, con la solución de pretratamiento diluida (consulte las INSTRUCCIONES DE USO, Sección A.1). Coloque los recipientes de tinción con la solución de pretratamiento diluido en un baño de agua. Caliente el baño de agua y la solución de pretratamiento a 95–99 °C. Mida la temperatura del interior de los recipientes con un termómetro calibrado a fin de mantener la temperatura correcta. Tape los recipientes a fin de estabilizar la temperatura y evitar la evaporación.

Sumerja los cortes desparafinados a temperatura ambiente en la solución de pretratamiento precalentada en los recipientes de tinción. Vuelva a comprobar la temperatura e incube durante 10 (±1) minutos a 95–99 °C.

Retire del baño de agua el recipiente completo con los portaobjetos. Retire la tapa y deje que los portaobjetos se enfríen en la solución de pretratamiento durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Introduzca los portaobjetos en un recipiente que contenga tampón de lavado diluido (consulte las INSTRUCCIONES DE USO, Sección A.3) durante 3 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C).

Sustituya el tampón de lavado y empape los cortes durante 3 minutos más.

NOTA: La solución de pretratamiento está diseñada para aplicarla una sola vez. No reutilizar.

Método B: Pretratamiento utilizando un microondas con capacidad de detección

Rellene un recipiente de plástico con solución de pretratamiento diluida a temperatura ambiente (20–25 °C). Sumerja los cortes desparafinados en la solución de pretratamiento, cubra el recipiente con una tapa perforada y colóquelo en el horno microondas. Seleccione la función de detección de ebullición y un programa que funcione 10 minutos tras haber alcanzado la temperatura de ebullición*.

Tras los 10 minutos de incubación, saque del microondas el recipiente con los portaobjetos, retire la tapa y deje enfriar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Transfiera los portaobjetos a un recipiente con tampón de lavado diluido y déjelos a remojo durante 3 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C). Sustituya el tampón de lavado y empape los cortes durante 3 minutos más.

* El uso de un horno microondas con capacidades de detección significa que el horno debe contar con un sensor y programas que calienten inicialmente la solución de pretratamiento hasta el punto de ebullición y mantengan posteriormente la temperatura de pretratamiento necesaria (por encima de los 95 °C) mientras realiza una cuenta atrás del tiempo preseleccionado (10 (±1) minutos). Es posible que algunos microondas con capacidad de detección no incluyan la posibilidad de fijar libremente una cuenta atrás. Si el modelo sólo incluye programas predefinidos, asegúrese

de seleccionar un programa que mantenga la temperatura de pretratamiento necesaria (por encima de 95 °C) durante al menos 10 (±1) minutos y detenga manualmente el programa transcurridos 10 (±1) minutos.

NOTA: La solución de pretratamiento se ha diseñado para un solo uso. No reutilizar.

Paso 2: Pepsina, lista para su uso (RTU) o solución de pepsina

La incubación en pepsina se puede realizar aplicando directamente gotas de pepsina RTU en los portaobjetos a temperatura ambiente (20–25 °C) (Método A) o a 37 °C (Método B). O bien, puede sumergir los portaobjetos en una solución de pepsina e incubarlos a 37 (±2) °C (Método C).

Método A y Método B:

Golpee suavemente para eliminar el exceso de tampón. Utilizando un paño sin pelusa (por ejemplo, un paño absorbente o almohadillas de gasa), frote con cuidado alrededor de la muestra a fin de eliminar cualquier resto de líquido y de mantener los reactivos dentro del área prescrita.

Aplique 5–8 gotas (250 µL) de pepsina fría (2–8 °C) (Vial 2A) para cubrir la muestra. Almacene siempre la pepsina a 2–8 °C.

Método A: Pepsina, RTU - Incubación a 20–25 °C

Incube durante 5–15 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C). Un tiempo de incubación de 5–15 minutos es adecuado para la mayoría de las muestras, aunque el tiempo óptimo de incubación puede depender de la fijación del tejido y/o del grosor de la muestra y debe ser determinado por el usuario.

Golpee suavemente para eliminar cualquier resto de pepsina y empape los cortes en tampón de lavado diluido (consulte INSTRUCCIONES DE USO, Sección A.3) durante 3 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C).

Sustituya el tampón de lavado diluido y empape los cortes durante 3 minutos más. Continúe hasta la deshidratación.

Método B: Pepsina, RTU - Incubación a 37 °C

Coloque la muestra con pepsina en un bloque calefactor a 37 °C (p. ej. Dako Hybridizer) e incube durante 3–5 minutos. Un tiempo de incubación de 3–5 minutos es adecuado para la mayoría de las muestras, aunque el tiempo óptimo de incubación puede depender de la fijación del tejido y/o del grosor de la muestra y debe ser determinado por el usuario.

Golpee suavemente para eliminar el exceso de pepsina y sumerja los cortes en tampón de lavado diluido durante 3 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C).

Sustituya el tampón de lavado y empape los cortes durante 3 minutos más. Continúe hasta la deshidratación.

Deshidrate los cortes de tejido mediante una serie graduada de etanol: 2 minutos en etanol al 70%, 2 minutos en etanol al 85%, y 2 minutos en etanol al 96%.

Deje que los cortes de tejido se sequen al aire completamente.

Método C: Solución de pepsina - Inmersión de los portaobjetos en una solución de pepsina a 37 °C

El kit contiene suficientes reactivos para cuatro ciclos separados (60 mL de solución de pepsina, recipiente pequeño para seis portaobjetos) o un único ciclo (240 mL de solución de pepsina, recipiente grande para 24 portaobjetos). Prepare la solución de pepsina de la forma descrita en la Sección A.5.

Coloque la tapa del recipiente y equilibre la solución de pepsina a 37 (±2) °C en un baño de agua. Asegúrese de que la temperatura se haya estabilizado. Mida la temperatura del interior del recipiente con un termómetro calibrado a fin de mantener la temperatura correcta.

Golpee suavemente para eliminar el exceso de tampón de lavado. Sumerja los portaobjetos en la solución de pepsina a 37 (±2) °C e incube durante 20–30 minutos. Un tiempo de incubación de 20–30 minutos es adecuado para la mayoría de las muestras, aunque el tiempo óptimo de incubación puede depender de la fijación del tejido y/o del grosor de la muestra y debe ser determinado por el usuario.

Golpee suavemente para eliminar el exceso de solución de pepsina y sumerja los cortes en tampón de lavado diluido durante 3 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C).

Cáncer de mama

Sustituya el tampón de lavado y empape los cortes durante 3 minutos más. Continúe hasta la deshidratación.

Deshidrate los cortes de tejido mediante una serie graduada de etanol: 2 minutos en etanol al 70%, 2 minutos en etanol al 85%, y 2 minutos en etanol al 96%.

Deje que los cortes de tejido se sequen al aire completamente.

Paso 3: Mezcla de sondas HER2/CEN-17 IQISH

La mezcla de sondas HER2/CEN-17 IQISH se separa en dos fases cuando se conserva a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Antes de utilizar el Vial 3, asegúrese de que sólo haya una fase, equilibrando la mezcla de sondas a temperatura ambiente $20\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$) seguido de la mezcla. Descongele el Vial 3 a temperatura ambiente ($20\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante un máximo de 30 minutos (protéjalo de fuentes de luz intensas) y luego mezcle bien en remolino el vial durante 15 segundos a 2500 rpm usando un mezclador vórtex. Guarde el Vial 3 a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ inmediatamente después de usarlo. Aplique $10\text{ }\mu\text{L}$ de la mezcla de sondas HER2/CEN-17 IQISH (Vial 3) en el centro del corte de tejido. Coloque inmediatamente un cubreobjetos de vidrio de $22\text{ x }22\text{ mm}$ sobre la mezcla de sondas y deje que ésta se distribuya uniformemente debajo del cubreobjetos. Evite la formación de burbujas de aire. Si observa burbujas de aire, golpee suavemente con unas pinzas para retirarlas del tejido.

Recuerde guardar el Vial 3 a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ inmediatamente después de usarlo.

Selle el cubreobjetos con el sellador de cubreobjetos, extendiendo el sellador alrededor de la periferia del cubreobjetos. Deje que el sellador de cubreobjetos se superponga al cubreobjetos y al portaobjetos; así se formará un sello alrededor del cubreobjetos. Asegúrese de que el sellador de cubreobjetos cubra todo el borde del cubreobjetos.

Prepare Dako Hybridizer* (nº de catálogo S2450 o S2451) para un ciclo de hibridación. Asegúrese de que las Humidity Control Strips (nº de catálogo S2452) estén saturadas y en estado óptimo para su utilización. Inicie el Hybridizer y seleccione un programa que:

Desnaturalice a $66\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos seguido de una hibridación a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 60–120 minutos.

Coloque los portaobjetos en el Hybridizer, asegúrese de que la tapa esté bien cerrada e inicie el programa. Consulte el manual de instrucciones de Dako Hybridizer para obtener más detalles.

* Para la desnaturalización y la hibridación puede utilizar instrumental que permita condiciones idénticas a las arriba descritas.

Coloque los portaobjetos sobre una superficie metálica o de piedra plana (sobre un bloque de calentamiento o un bloque en un horno de hibridación) precalentado a $66 (\pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$. Desnaturalice durante exactamente 10 minutos. Introduzca los portaobjetos en una cámara de hibridación humidificada precalentada. Cubra la cámara con una tapa e incube a $45 (\pm 2)\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 60–120 minutos. Tenga en cuenta que una temperatura de hibridación de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ no es adecuada para las sondas incluidas en este kit.

Paso 4: Lavado astringente

Llene dos recipientes de tinción, por ejemplo recipientes de Coplin, con tampón de lavado astringente diluido (consulte las INSTRUCCIONES DE USO, Sección A.2). Se recomienda utilizar un volumen mínimo de 100 mL o 15 mL por portaobjetos en cada recipiente.

Introduzca uno de los recipientes de tinción con tampón de lavado astringente diluido a temperatura ambiente en una campana extractora de gases, y el otro recipiente en un baño de agua. Caliente el baño de agua y el tampón de lavado astringente diluido a $63 (\pm 2)\text{ }^{\circ}\text{C}$. Asegúrese de que la temperatura se haya estabilizado. Tape el recipiente para estabilizar la temperatura y evitar la evaporación. Mida la temperatura del interior del recipiente que está en el baño de agua con un termómetro calibrado a fin de mantener la temperatura correcta. El tampón de lavado astringente contiene detergente y puede volverse turbio a $63\text{ }^{\circ}\text{C}$; esto no afecta a su eficacia.



Cáncer de mama

Utilizando pinzas o guantes, saque los portaobjetos de la cámara de hibridación y, con cuidado, elimine el sellador de cubreobjetos, así como los cubreobjetos, e introduzca los portaobjetos en el recipiente de prelavado a temperatura ambiente, uno por uno.

Tan pronto como se hayan quitado todos los cubreobjetos, transfiera los portaobjetos del recipiente de prelavado a temperatura ambiente al recipiente del baño de agua a 63 (± 2) °C.

Inmediatamente después de transferir los portaobjetos al tampón de lavado astringente diluido a 63 (± 2) °C al baño de agua, inicie el cronómetro. Realice el lavado astringente durante exactamente 10 minutos. Saque los portaobjetos del tampón de lavado astringente diluido y empape los cortes en tampón de lavado diluido durante 3 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C).

Cambie el tampón de lavado diluido y empape los cortes durante 3 minutos más.

Deshidrate los cortes de tejido mediante una serie graduada de etanol: 2 minutos en etanol al 70%, 2 minutos en etanol al 85%, y 2 minutos en etanol al 96%.

Deje que los cortes de tejido se sequen por completo.

Paso 5: Montaje

Aplique 15 μ L del medio de montaje fluorescente que contiene DAPI (Vial 5) al área diana del portaobjetos y cubra con un cubreobjetos de vidrio.

NOTA: Puede leer los portaobjetos transcurridos 15 minutos desde el montaje, o dentro de un período de 7 días. No obstante, tenga en cuenta que si expone los portaobjetos a la luz o a altas temperaturas, se produce desvanecimiento. A fin de reducir al mínimo el desvanecimiento, almacene los portaobjetos en la oscuridad a -18–8 °C.

(122303-002)

ROCHEM BIOPHARMACEUTICALS 002_K573121-2/LMA/2013.01 p. 18/62
Fernando Matías Mendocano
D.N.I. 25.097.811
Aprobado

CARLOS E.G. BOBBETT
DIRECTOR TÉCNICO
M.N. 1/158

Cáncer de mama

Control de calidad - Mama

1. Las señales deben ser brillantes, bien diferenciadas y fáciles de evaluar.
2. Las células normales son un control interno del ensayo de tinción.
 - Las células normales deberían presentar 1–2 señales verdes claramente visibles que indican que la sonda ANP de CEN-17 se ha hibridado satisfactoriamente con la región centromérica del cromosoma 17.
 - Las células normales deberían presentar también 1–2 señales rojas claramente visibles que indican que la sonda de ADN *HER2* se ha hibridado satisfactoriamente con el amplicón *HER2*.
 - Debido al corte del tejido, algunas células normales presentarán menos de las 2 señales de cada color esperadas.
 - Si no se pueden detectar señales en las células normales, el ensayo ha fracasado y los resultados deben considerarse no válidos.
3. La morfología del núcleo debe estar intacta al evaluarla utilizando un filtro para DAPI. Numerosas células fantasma y una morfología nuclear general pobre indican una sobredigestión de la muestra, que tiene como resultado la pérdida o fragmentación de las señales. Tales muestras deben considerarse no válidas.
4. Las diferencias en la fijación, el procesado y la inclusión del tejido en el laboratorio del usuario pueden generar variabilidad en los resultados, por lo que es necesario que el usuario lleve a cabo una evaluación regular de sus propios controles.

Interpretación de la tinción - Mama

Tejidos evaluables

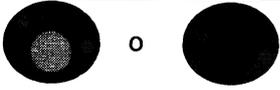
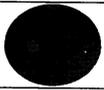
Sólo debe evaluar muestras de pacientes con carcinoma invasivo. En los casos de carcinoma in situ y carcinoma invasivo en la misma muestra, sólo debe evaluarse el componente invasivo. Evite las áreas de necrosis y las áreas donde los bordes nucleares sean ambiguos. No incluya núcleos que requieran un juicio subjetivo. Ignore los núcleos que presenten una intensidad de señal débil y tinción no específica o tinción de fondo alta.

Enumeración de la señal: localice el tumor dentro del contexto del portaobjetos teñido con H&E y evalúe el mismo área en el portaobjetos teñido mediante FISH. Examine varias áreas de células tumorales a fin de tener en cuenta una posible heterogeneidad. Seleccione una área que tenga una distribución óptima de núcleos. Comience el análisis en el cuadrante superior izquierdo del área seleccionada y, examinando de izquierda a derecha, cuente el número de señales comprendidas dentro del borde nuclear de cada núcleo evaluado, con arreglo a las pautas siguientes (consulte también el Apéndice 3).

- Acerque y aleje el enfoque para encontrar todas las señales de los núcleos individuales.
- Cuando dos señales sean del mismo tamaño y estén separadas por una distancia igual o inferior al diámetro de la señal, cuente éstas como una sola señal.
- En los núcleos con altos niveles de amplificación del gen *HER2*, las señales de *HER2* pueden estar muy cerca unas de las otras, formando un grupo de señales. En esos casos no es posible contar el número de señales de *HER2*; en vez de contarlos, debe realizarse una estimación. Debe prestar especial atención a las señales verdes, ya que los grupos de señales de *HER2* pueden cubrir las señales verdes, haciéndolas imposibles de ver. En caso de duda, compruebe las señales verdes utilizando un filtro específico para FITC.

No puntúe los núcleos que no presenten señales o que presenten señales de un solo color. Puntúe sólo los núcleos que presenten una o más señales FISH de cada color.

Pautas para el recuento de señales

1		No contar. Los núcleos se superponen; no todas las áreas de los núcleos son visibles
2		Dos señales verdes; no puntúe los núcleos que presenten señales de un solo color
3		Contar como 3 señales verdes y 12 señales rojas (estimación del grupo)
4		Contar como 1 señal verde y 1 señal roja. Dos señales que sean del mismo tamaño y estén separadas por una distancia igual o inferior al diámetro de una señal se cuentan como una sola señal.
5		No contar (núcleos sobre o infradigeridos). Ausencia de señales en el centro del núcleo (núcleo en forma de donut).
6		Contar como 2 señales verdes y 3 señales rojas. Dos señales que sean del mismo tamaño y estén separadas por una distancia igual o inferior al diámetro de una señal se cuentan como una sola señal.
7		Contar como 1 señal verde y 5 señales rojas.
8		Contar como 3 señales verdes (1 señal verde está fuera de foco) y 3 señales rojas.
9		Grupo de señales rojas que están tapando a señales verdes; comprobar las señales verdes utilizando un filtro específico para FITC, o no contar.

Registre los recuentos en una tabla como la que se indica en el Apéndice 2.

Cuente 20 núcleos por muestra de tejido y, si es posible, de áreas tumorales bien definidas (17).

Calcule la proporción *HER2/CEN-17* dividiendo el número total de señales rojas de *HER2* entre el número total de señales verdes de *CEN-17*.

Las muestras que presenten una proporción *HER2/CEN-17* igual o superior a 2 deben considerarse como amplificadas en cuanto al gen *HER2* (5, 17-19).

Los resultados que estén en el punto de corte (1,8-2,2) o cerca de él deben interpretarse con precaución.

Si la proporción es dudosa (1,8-2,2), cuente 20 núcleos adicionales y vuelva a calcular la proporción para los 40 núcleos.

En caso de duda, vuelva a puntuar el portaobjetos con la muestra. En los casos de proporción dudosa, el patólogo debe consultar con el médico a cargo de los tratamientos.

Limitaciones - Mama

1. FISH es un proceso de varios pasos que requiere formación especializada en la selección de los reactivos apropiados, selección, fijación y procesamiento de tejidos, preparación de los portaobjetos para FISH, e interpretación de los resultados de las tinciones.
2. Los resultados de FISH dependen de la manipulación y el procesamiento del tejido antes de su tinción. Una fijación, lavado, secado, calentamiento o corte incorrectos, o la contaminación con otros tejidos o líquidos, pueden afectar a la hibridación de las sondas. La aparición de resultados no coherentes puede deberse a variaciones en los métodos de fijación y de inclusión, o a irregularidades inherentes al tejido.
3. A fin de obtener resultados óptimos y reproducibles, debe desparafinar por completo los portaobjetos de tejido. La eliminación de la parafina debe realizarse al principio del proceso de tinción. (Consulte INSTRUCCIONES DE USO, Sección B.2).
4. Sólo debe utilizar baño de agua, bloque de calentamiento y horno de hibridación con calibración de la temperatura. El uso de otros tipos de equipos puede dar lugar a la evaporación de la mezcla de sondas *HER2/CEN-17 IQISH* durante la hibridación y debe ser validado por el usuario.

Características de resultados - Mama

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica de la mezcla de sondas *HER2/CEN-17 IQISH* se investigó utilizando 18 muestras de epitelio normal de mama humano. La proporción entre el número de señales de *HER2* y de señales de *CEN-17* se calculó basándose en un recuento de 20 núcleos por muestra.

La proporción de *HER2/CEN-17* de las 18 muestras de epitelio normal de mama humano fue 0,97–1,08.

Especificidad analítica

Las sondas de ADN *HER2* contenidas en la mezcla de sondas *HER2/CEN-17 IQISH* se han secuenciado y mapeado, confirmando una cobertura total de 218 kb incluido el gen *HER2*.

Las sondas de ANP *CEN-17* contenidas en la mezcla de sondas *HER2/CEN-17 IQISH* se han testado individualmente y combinadas, confirmando su hibridación específica con la región centromérica del cromosoma 17.

Para medir la capacidad del ensayo para identificar de forma exclusiva las sustancias diana *HER2* y *CEN-17* sin interferencia de otras sustancias, se realizaron estudios en muestras de tejido de epitelio normal de mama humano usando el Vial 3 que contenía el tampón de hibridación pero no la mezcla de sondas. Se evaluaron un total de 18 muestras en busca de la presencia de señales no relacionadas con la mezcla de sondas. No se observó detección de otras dianas cromosómicas ni interferencia con sustancias estrechamente relacionadas en ninguno de las 18 muestras.

Estudios de robustez

La robustez del ensayo *HER2 IQFISH pharmDx™* se evaluó variando el tiempo y la temperatura de pretratamiento y los métodos de calentamiento del tampón de pretratamiento (horno microondas o baño de agua), el tiempo y el método de incubación con pepsina (pepsina RTU o inmersión), la temperatura y el tiempo de desnaturalización, el tiempo de hibridación, y el tiempo y la temperatura del lavado astringente.

No se observó ninguna diferencia significativa en los resultados bajo las siguientes condiciones experimentales:

Cáncer de mama

- Método de pretratamiento A) Baño de agua durante 10 minutos combinado con cada una de las siguientes temperaturas: 95 °C, 95–99 °C , y 99 °C junto a 9, 10 y 11 minutos a 95–99 °C
- Método de pretratamiento B) Horno microondas durante 9, 10 y 11 minutos a temperaturas de >95 °C.
- Método de digestión con pepsina A) con tiempos de incubación de 5, 10 y 15 minutos temperatura ambiente (20–25 °C).
- Método de digestión con pepsina B) con tiempos de incubación de 3, 4 y 5 minutos a 37 °C.
- Método de digestión con pepsina C) con tiempos de incubación de 20, 25 y 30 minutos combinados con cada una de las siguientes temperaturas: 35, 37 y 39 °C.
- Desnaturalización durante 10 minutos combinado con cada una de las siguientes temperaturas: 65, 66 y 67 °C junto a 9, 10 y 11 minutos a 66 °C. Tiempo de hibridación de 60, 90 y 120 minutos a 45 °C.
- Lavado astringente durante 10 minutos combinado con cada una de las siguientes temperaturas: 61, 63 y 65 °C junto a 9, 10 y 11 minutos a 63 °C.

Nota: Para las pruebas de robustez sólo se cambió un parámetro del procedimiento de tinción a la vez, mientras que el resto de parámetros se mantuvieron constantes. Se recomienda respetar el tiempo y las temperaturas indicadas en el procedimiento de tinción.

La hibridación durante 60 minutos produjo una señal de alta intensidad, si bien ligeramente reducida en comparación a la hibridación de 90 y 120 minutos. No se observó una diferencia significativa en los resultados observados con otras combinaciones de tiempo/temperatura.

El procedimiento de tinción de *HER2* IQFISH pharmDx™ ofrece variables de protocolo para el pretratamiento de calor, la digestión con pepsina y el tiempo de hibridación. Cada combinación única se ha validado respecto al estado del gen *HER2*. La validación se realizó en 10 muestras FFPE de carcinoma de mama humano con cada una de las 12 posibles combinaciones. Se utilizó el kit *HER2* FISH pharmDx™ (K5331) como referencia. La proporción *HER2*/CEN-17 de cada muestra individual se muestra en la Figura 1. La tabulación cruzada entre las 12 pruebas y la tinción de referencia mostró una coincidencia general en el estado del gen *HER2* del 100% (10/10) con límites del 95% de confianza inferior de dos colas inferior y superior en el 78,3% y el 100%, respectivamente. El valor Kappa fue de 1,00 y la prueba de McNemars mostró la ausencia de sesgo (valor p de dos colas de 1,00).

Cáncer de mama

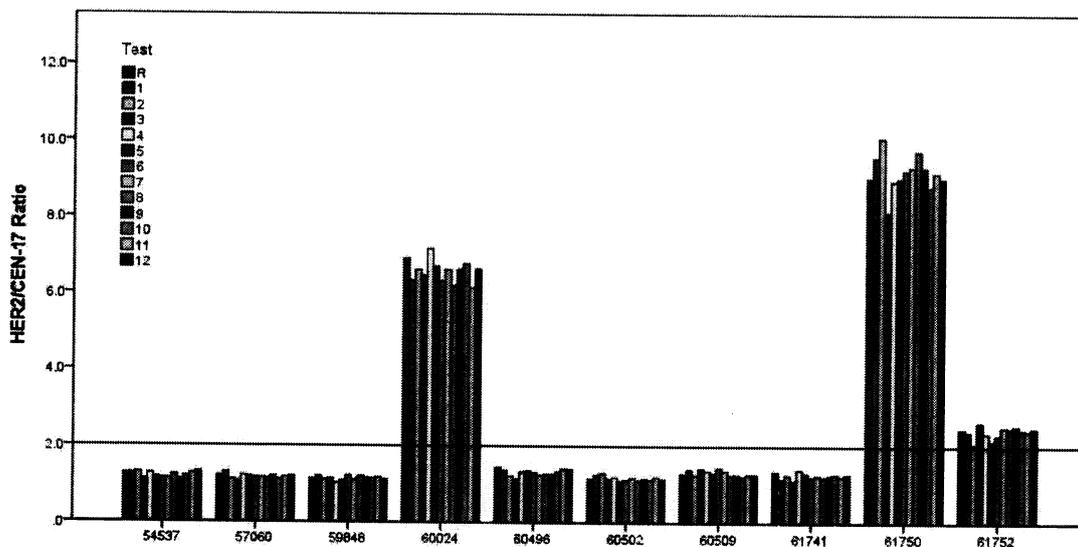


Figura 1. Proporciones *HER2/CEN-17* para 10 muestras de carcinoma de mama humano teñidas usando las 12 posibles combinaciones de protocolo con *HER2 IQFISH pharmDx™* (nº de catálogo K5731) (Prueba 1-12) y la referencia (R) del kit *HER2 FISH pharmDx™* (nº de catálogo K5331). La línea horizontal ilustra el punto de corte de 2,0.

Cáncer de mama

Repetibilidad

La repetibilidad (capacidad de ser repetida) de la proporción *HER2/CEN-17* se investigó con el ensayo *HER2 IQFISH pharmDx™* utilizando cortes consecutivos de muestras de carcinoma de mama humano mamario, con el estado del gen *HER2* no amplificado o amplificado. Se analizaron cortes por triplicado de cada muestra en el mismo procedimiento. El coeficiente de variación promedio fue del 5,2% para muestras no amplificadas (intervalo desde el 1% al 8%) y del 14% para muestras amplificadas (intervalo desde el 7% al 20%).

Se analizaron un total de cinco cortes consecutivos de cuatro muestras de carcinoma de mama humano de diferentes grosores (3, 4, 5, 6 y 7 μm) con *HER2 IQFISH pharmDx™*. El coeficiente de variación promedio de la proporción *HER2/CEN-17* fue del 7% (intervalo desde el 6% al 9%).

Reproducibilidad

Se probó el ensayo *HER2 IQFISH pharmDx™* en lo referente a reproducibilidad lote a lote y observador a observador usando tres lotes de *HER2 IQFISH pharmDx™* y tres observadores. La reproducibilidad se analizó en nueve muestras de carcinoma de mama humano diferentes con los estados del gen *HER2* no amplificado y amplificado.

El coeficiente de variación promedio de la reproducibilidad lote a lote fue del 5% para muestras no amplificadas (intervalo desde el 2% al 8%) y del 7,8% para muestras amplificadas (intervalo desde el 5% al 11%).

El coeficiente de variación promedio de la reproducibilidad observador a observador fue del 3,2% para muestras no amplificadas (intervalo desde el 0,2% al 6%) y del 2,8% para muestras amplificadas (intervalo desde el 2% al 4%).

Utilidad clínica

La utilidad clínica del kit Dako *HER2 FISH pharmDx™* (nº de catálogo K5331) se investigó en un estudio comparativo con el kit Vysis PathVysion™ *HER-2 DNA Probe*. El estudio incluyó 150 muestras archivadas de pacientes aquejadas de cáncer de mama de grado II-III, con nodos positivos o negativos.

El objetivo principal del estudio fue investigar el grado de concordancia entre las proporciones *HER2*/centrómero de cromosoma 17 de 150 muestras ensayadas con los kits Dako y Vysis, en lo relativo a la concordancia general de las proporciones y la concordancia de los resultados de FISH dicotomizados (grupos +/-).

Se hibridaron y puntuaron correctamente un total de 145 muestras, que por lo tanto eran elegibles para el análisis estadístico. En la Tabla 1 se muestra una tabulación cruzada 2 x 2 de los resultados.

Tabla 1. Resultados dicotomizados de 145 muestras de cáncer de mama ensayadas con el kit Dako *HER2 FISH pharmDx™* y con el kit Vysis PathVysion™ *HER-2 DNA Probe*. Se puntuaron 60 núcleos en cada muestra con cada uno de los dos kits.

	Kit Dako amplificación (-)	Kit Dako amplificación (+)	Suma
Kit Vysis amplificación (-)	95	2	97
Kit Vysis amplificación (+)	5	43	48
Suma	100	45	145

Cáncer de mama

La concordancia entre los ensayos Dako y Vysis fue del 95%, con un intervalo de confianza del 92–99%. El valor kappa fue 0,89.

El test de McNemar para el análisis del sesgo (error) sistemático entre ambos ensayos no fue significativo ($p=0,22$).

En la Figura 2 se muestra una representación de la dispersión de las observaciones pareadas de las 145 muestras.

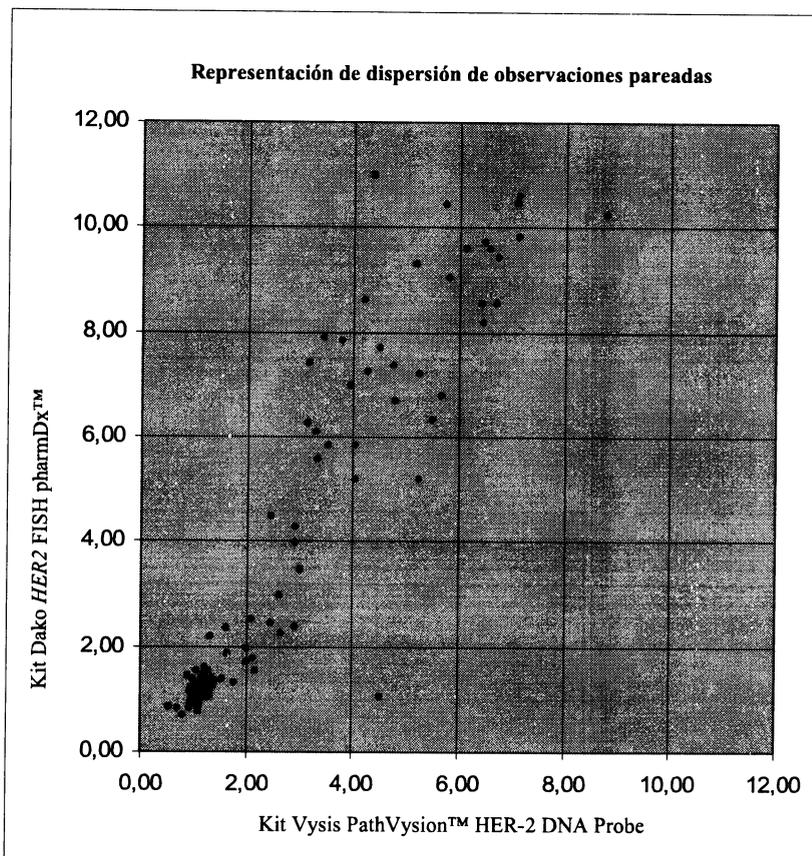


Figura 2. Se analizó la amplificación del gen HER2 en 145 muestras de cáncer de mama utilizando el kit Dako *HER2 FISH pharmDx™* y el kit Vysis *PathVysion™ HER-2 DNA Probe*. Los resultados se expresan como proporciones *HER2*/centrómero de cromosoma 17. Se puntuaron 60 núcleos en cada muestra con cada uno de los dos kits.

La concordancia general entre los ensayos Dako *HER2 FISH pharmDx™* y Vysis *PathVysion™ HER-2 DNA Probe* se investigó utilizando el análisis de la diferencia entre las observaciones pareadas del logaritmo (proporción), y un análisis de la regresión lineal del logaritmo (proporción) de ambos ensayos. Se llegó a la conclusión de que la diferencia entre las observaciones pareadas del logaritmo (proporción) es sistemáticamente creciente según la suma de las proporciones *HER2*/centrómero de cromosoma 17, y que a proporciones altas, la proporción medida es mayor en el ensayo Dako que en el ensayo Vysis.

La mayor proporción *HER2*/centrómero de cromosoma 17 observada con el kit Dako *HER2 FISH pharmDx™* puede estar relacionada con una verdadera diferencia entre ambos ensayos, a saber, que una mayor resolución del kit Dako *HER2 FISH pharmDx™* Kit conduce a proporciones más altas en los casos con alta amplificación del gen *HER2*.



Cáncer de mama

No obstante, la evaluación de los kits se llevó a cabo en 2 centros diferentes y por lo tanto es esperable una variación interlaboratorios. Además, se ha descrito en la literatura una mayor variación en los casos de alta amplificación, que no se considera clínicamente relevante (18). El estudio actual no permite investigar si existe una diferencia sistemática entre ambos ensayos si la investigación se realiza entre varios laboratorios. Cabe añadir que la variación observada entre ambos ensayos es de una magnitud similar a la de la variación entre centros observada en el estudio de portabilidad.

Dako *HER2* IQFISH pharmDx™ (nº de catálogo K5731) se ha comparado con el kit Dako *HER2* FISH pharmDx™ (nº de catálogo K5331) en un estudio comparable de 78 muestras de tejido mamario de carcinoma humano de mama. La tabulación cruzada del estado de *HER2* obtenida por los dos ensayos arrojaron una coincidencia general del 98,7% con los límites inferior y superior del intervalo de confianza del 95% en 94,2% y 99,9%. El valor kappa fue 0,96, siendo los límites inferiores y superiores del intervalo de confianza del 95% 0,89 y 1,00. El valor p de la prueba de McNemars fue 1,00, indicando la ausencia de sesgo entre los dos ensayos.

(122303-002)

ROCHEM BIOCARE ARGENTINA S.A.
Fernando Matías Merino
D.N.I. 25.997.611
Apoderado

1499ES_002_K573121-2/LMA/2013.01 p. 24/62

CARLOS E. CABRERA
DIRECTOR TÉCNICO
M.N. 11/58

Cáncer de mama

Solución de problemas - Mama

Problema	Causa probable	Solución sugerida
1. No hay señales o son débiles	<p>1a. El Kit ha sido expuesto a altas temperaturas durante su transporte o almacenamiento.</p> <p>1b. El microscopio no funciona correctamente</p> <ul style="list-style-type: none"> - Juego de filtros inapropiado - Lámpara incorrecta - Lámpara de mercurio demasiado vieja - Objetivos colectores sucios y/o con fisuras - Aceite de inmersión inadecuado <p>1c. Señales desvanecidas</p> <p>1d. Condiciones de pretratamiento incorrectas</p> <p>1e. Evaporación de la mezcla de sondas durante la hibridación</p>	<p>1a. Compruebe las condiciones de almacenamiento. Asegúrese de que había hielo seco presente en el kit cuando lo recibió. Asegúrese de que Vial 3 se ha almacenado a -18 °C en la oscuridad. Asegúrese de que los Viales 2A y 5 se han almacenado a un máximo de 2-8 °C en la oscuridad.</p> <p>1b. Compruebe el microscopio y asegúrese de que los filtros que se están utilizando son adecuados para su uso con los fluorocromos del kit; asegúrese también de que la lámpara de mercurio es la correcta y que no se haya utilizado más allá de su vida útil esperada (consulte el Apéndice 3). En caso de duda, contacte con el vendedor del microscopio.</p> <p>1c. Evite los exámenes prolongados con el microscopio y minimice la exposición de las muestras a fuentes de luz intensa.</p> <p>1d. Asegúrese de utilizar la temperatura y el tiempo de pretratamiento recomendados.</p> <p>1e. Asegúrese de que haya suficiente humedad en la cámara de hibridación.</p>
2. No hay señales verdes	2a. Condiciones de lavado astringente incorrectas	2a. Asegúrese de utilizar la temperatura y el tiempo recomendados para el lavado astringente, y de retirar los cubreobjetos antes de llevar a cabo el lavado astringente
3. No hay señales rojas	3a. Condiciones de pretratamiento incorrectas	3a. Asegúrese de utilizar la temperatura y el tiempo de pretratamiento recomendados.
4. Áreas sin señal	4a. Volumen insuficiente de sonda	4a. Asegúrese de que el volumen de sonda sea lo suficientemente grande como para cubrir el área bajo el cubreobjetos.

Cáncer de mama

Problema	Causa probable	Solución sugerida
	4b. Burbujas de aire atrapadas durante la aplicación de la mezcla de sondas o durante el montaje	4b. Evite la formación de burbujas de aire. Si se observan, elimínelas suavemente con la ayuda de unas pinzas.
5. Excesiva tinción de fondo	5a. Fijación inadecuada del tejido 5b. Parafina eliminada de forma incompleta 5c. Temperatura de lavado astringente demasiado baja 5d. Exposición prolongada del corte hibridado a una luz intensa	5a. Asegúrese de que sólo se usen cortes de tejido fijados con formol e incluidos en parafina. 5b. Siga los procedimientos de desparafinado y rehidratación descritos en la Sección B.2 5c. Asegúrese de que la temperatura del lavado astringente sea de 63 (±2) °C 5d. Evite los exámenes prolongados con el microscopio y minimice la exposición a fuentes de luz intensa
6. Morfología tisular deficiente	6a. Tratamiento con pepsina incorrecto 6b. Unas condiciones de pretratamiento incorrectas pueden tener como resultado un aspecto poco claro y turbio. 6c. Un tratamiento con pepsina muy prolongado o un espesor de corte muy reducido puede hacer que aparezcan células fantasma o células tipo donut.	6a. Cíñase a los tiempos de incubación con pepsina recomendados. Consulte la Sección B.3, Paso 2. Asegúrese de que la pepsina se manipule a la temperatura correcta. Consulte la Sección B.1. 6b. Asegúrese de utilizar la temperatura y el tiempo de pretratamiento recomendados. 6c. Acorte el tiempo de incubación con pepsina. Consulte la Sección B.3, paso 2. Asegúrese de que el espesor del corte sea de 4–6 µm.
7. Alto nivel de autofluorescencia verde en el portaobjetos, incluyendo las zonas sin tejido FFPE	7. Uso de portaobjetos de vidrio caducados o no recomendados	7. Asegúrese de que el portaobjetos revestido de vidrio (Dako Silanized Slides, nº de catálogo S3003 o portaobjetos recubierto de poli-L-lisina) no haya caducado.

NOTA: Si no puede atribuirse el problema a ninguna de las circunstancias anteriores, o si la acción correctiva sugerida no lo soluciona, póngase en contacto con el Servicio Técnico de Dako para solicitar más ayuda.



Cáncer de mama

Apéndice 1 - Mama

HER2 IQFISH pharmDx™, n° de catálogo K5731

Lista de comprobación del protocolo

ID del registro del ensayo de tinción: _____

Fecha del ensayo: _____

HER2 IQFISH pharmDx™, K5731: Lote _____

ID de muestra: _____

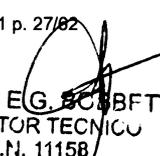
ID de equipo: _____

Fecha de la dilución/caducidad del tampón de lavado 1x (Vial 6 diluido al 1:20): _____ / _____

Tejido fijado con formol tamponado neutro	Sí <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
Paso 1: Pretratamiento		
Fecha de la dilución/caducidad de la solución de pretratamiento (Vial 1 diluido al 1:20)	/	
Temperatura medida de la solución de pretratamiento (95–99 °C) si se utiliza baño de agua para el calentamiento	°C	
Pretratamiento (10 minutos) y enfriamiento (15 minutos)		
Lavado en tampón de lavado (Vial 6 diluido al 1:20) (2 x 3 minutos)		
Paso 2: Pepsina		
Duración del tratamiento con pepsina (Vial 2) a 37 °C o bien	Minutos	
Duración del tratamiento con pepsina (Vial 2) a temperatura ambiente (20–25 °C) o bien	Minutos	
Duración de la inmersión en pepsina a 37 (±2) °C	Minutos	
Lavado en tampón de lavado (Vial 6 diluido al 1:20) (2 x 3 minutos)		
Deshidrate los portaobjetos (3 x 2 minutos) en series graduadas de etanol, y seque al aire		
Paso 3: Mezcla de sondas HER2/CEN-17		
Aplique la mezcla de sondas (Vial 3), cubra con el cubreobjetos y selle con el sellador de cubreobjetos		
Temperatura de desnaturalización medida (66 (±1) °C)	°C	
Desnaturalización durante 10 minutos		
Temperatura de hibridación medida (45 (±2) °C)	°C	
Tiempo de hibridación (60–120 minutos)	Minutos	
Paso 4: Lavado astringente		
Fecha de la dilución/caducidad del tampón de lavado astringente (Vial 4 diluido al 1:20)	/	
Temperatura medida del tampón de lavado astringente (63 (±2) °C)	°C	
Lavado astringente (10 minutos) tras retirar los cubreobjetos		
Lavado en tampón de lavado (Vial 6 diluido al 1:20) (2 x 3 minutos)	°C	
Deshidrate los portaobjetos (3 x 2 minutos) en series graduadas de etanol, y seque al aire	Minutos	

(122303-002)


 P01499ES_002_K573121-2/LMA/2013.01 p. 27/82
 ROCHEM BIOPHARM ARGENTINA S.A.
 Fernando Matias Maridoni
 D.N.N. 25.097.611
 Apoderado


 CARLOS E. G. SCHIFFT
 DIRECTOR TÉCNICO
 M.N. 11158



Cáncer de mama

Paso 5. Montaje	
Aplique 15 µL de medio de montaje fluorescente (Vial 5) y cubra con el cubreobjetos	

Comentarios:

Fecha y firma del técnico:

(122303-002)


ROCHEM BIOCA RE ARGENTINA S 1
Fernando Matias M. 14951_002_K573121-2/LMA/2013.01 p. 28/62
D.N.I. 25.097.811
Apoderado


CARLOS E.G. BOBBITT
DIRECTOR TÉCNICO
M.N. 11158



Cáncer de mama

Apéndice 2 - Mama

HER2 IQFISH pharmDx™, n° de catálogo K5731

Sistema de puntuación

ID del registro del ensayo de tinción: _____

Fecha del ensayo: _____

HER2 IQFISH pharmDx™, K5731 Lote: _____ ID de muestra: _____

Recuento de señales en 20 núcleos					
Núcleo n°	Puntuación HER2 (rojo)	Puntuación CEN-17 (verde)	Núcleo n°	Puntuación HER2 (rojo)	Puntuación CEN-17 (verde)
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)		

Para determinar la proporción *HER2/CEN-17*, cuente el número de señales de *HER2* y el número de señales de *CEN-17* en los mismos 20 núcleos y divida el número total de señales de *HER2* entre el número total de señales de *CEN-17*. Si la relación *HER2/CEN-17* es dudosa (1,8–2,2), cuente otros 20 núcleos y vuelva a calcular la proporción.

Una relación que esté en el punto de corte (1,8–2,2) o cerca de él debe interpretarse con precaución (consulte la guía de recuento).

	HER2	CEN-17	Proporción <i>HER2/CEN-17</i>
Puntuación total (1-20)			

- Relación < 2: No se observó amplificación del gen *HER2*
- Proporción \geq 2: Se observó amplificación del gen *HER2*

Fecha y firma del técnico: _____

Fecha y firma del patólogo: _____

Para conocer las pautas de recuento: consulte Interpretación de la tinción.

Cáncer de mama

Apéndice 3 - Mama

HER2 IQFISH pharmDx™, n° de catálogo K5731

Especificaciones del microscopio de fluorescencia

Dako le recomienda que utilice el siguiente equipo con el kit HER2 FISH pharmDx™, K5731:

1. Tipo de microscopio

- Microscopio de epifluorescencia.

2. Lámpara

- Lámpara de mercurio de 100 vatios (mantenga un registro del tiempo de combustión).

3. Objetivos

- Para el cribaje del tejido, puede aplicar objetivos de fluorescencia a seco 10X u objetivos de fluorescencia para aceite de inmersión 16X.
- Para un aumento de alta potencia y para la puntuación de las señales, le recomendamos que utilice exclusivamente objetivos de fluorescencia para aceite de inmersión, por ejemplo, 100X.

4. Filtros

Los filtros están diseñados individualmente para cada fluorocromo concreto, y debe elegirlos en consonancia. Dako recomienda el uso de un filtro específico para DAPI en combinación con un doble filtro de alta calidad específico para Texas Red/FITC.

- Filtro para DAPI, por ejemplo, filtro Chroma N° 31000.
- Doble filtro para Texas Red/FITC, por ejemplo, filtro Chroma N° 51006.
- Puede utilizar un filtro sencillo para Texas Red y otro filtro sencillo para FITC con fines de confirmación.

Fluorocromo	Longitud de onda de excitación	Longitud de onda de emisión
FITC	495 nm	520 nm
Texas Red	596 nm	615 nm

Los filtros son específicos de cada tipo de microscopio y el uso de los filtros adecuados es crucial para la interpretación. Si desea obtener información detallada al respecto, contacte con el proveedor de su microscopio o con el representante de Dako.

5. Aceite

- Aceite no fluorescente.

Precauciones

- No se recomienda utilizar una lámpara de mercurio de 50 vatios.
- No se pueden utilizar filtros para rodamina.
- No se recomienda utilizar triples filtros.

Un microscopio no optimizado puede causar problemas al leer las señales fluorescentes. Es importante que la fuente de luz no haya caducado y que esté correctamente alineada y enfocada.

Los clientes deben monitorizar y seguir las recomendaciones del fabricante de la lámpara de mercurio. Antes de interpretar los resultados, debe haberse realizado el mantenimiento del microscopio, y la lámpara de mercurio debe estar alineada.

Debe esforzarse por exponer la muestra a la menor cantidad de luz de excitación posible a fin de minimizar el desvanecimiento de la fluorescencia.

Le recomendamos que estudie la configuración de su microscopio concreto con el fabricante de éste antes de empezar la hibridación in situ fluorescente, o que consulte la literatura.

Resumen y explicación - Gástrico

El gen *HER2* humano (también conocido como *ERBB2* o *NEU*) está ubicado en el cromosoma 17 y codifica la proteína HER2, también llamada p185^{HER2}. La proteína HER2 es una tirosina quinasa del receptor de membrana que presenta homología con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR o HER1) (1-2). El gen *HER2* está presente en 2 copias en todas las células diploides normales.

La sobreexpresión de la proteína *HER2* y la amplificación del gen *HER2* en el cáncer gástrico se ha puesto de manifiesto en un gran número de estudios (revisado en (20)). La positividad para *HER2* se puede detectar en aproximadamente el 20% de los pacientes mediante IHQ o FISH (20). Estudios preclínicos in vitro e in vivo han puesto de manifiesto que trastuzumab (Herceptin™) es eficaz en diferentes tipos de cáncer gástrico lo que condujo al inicio de varios estudios clínicos (20-24). En un estudio de fase III BO18255, denominado como ToGA Trial, se aleatorizaron pacientes con adenocarcinoma inoperable localmente avanzado, recurrente y/o metastásico de estómago o de la unión gastroesofágica con *HER2* positivo para que recibieran tratamiento con 5-FU o capecitabina y cisplatino en monoterapia o en combinación con trastuzumab. En los pacientes que recibieron el tratamiento combinado de trastuzumab y quimioterapia se observó un aumento estadísticamente significativo de la supervivencia global (25). Trastuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado que se une con gran afinidad a la proteína *HER2* y que ha demostrado ser un inhibidor de la proliferación de células tumorales humanas que sobreexpresan la proteína *HER2* in vitro e in vivo (21-24).

Principio del procedimiento - Gástrico

HER2 IQFISH pharmDx™ contiene todos los reactivos clave necesarios para llevar a cabo un procedimiento FISH con cortes de tejido incluidos en parafina, fijados en formol.

Después del desparafinado y la rehidratación, las muestras se calientan en una solución de pretratamiento, seguido de la digestión proteolítica usando pepsina. Después de los pasos de calentamiento y pretratamiento proteolítico, este kit emplea una mezcla de sondas de ADN marcado para su uso y no tóxica, basada en una combinación de tecnologías de ANP (ácido nucleico peptídico) (12) y ADN. Esta mezcla de sondas consta de una mezcla de sondas de ADN marcado con Texas Red que cubren una región de 218 kb que incluye el gen *HER2* en el cromosoma 17, y de una mezcla de sondas de ANP marcado con fluoresceína cuya diana es la región centromérica del cromosoma 17 (CEN-17). La hibridación específica de ambas dianas conduce a la formación de una señal fluorescente roja bien definida en cada locus del gen *HER2*, así como de una señal fluorescente verde bien definida en el centrómero de cada cromosoma 17. Tras un lavado astringente, las muestras se montan con medio de montaje fluorescente que contiene DAPI y se cubren con cubreobjetos. Utilizando un microscopio de fluorescencia dotado de los filtros apropiados (consulte el Apéndice 3) se localizan las células tumorales, y se lleva a cabo la enumeración de las señales rojas (*HER2*) y verdes (CEN-17). A continuación se calcula la relación *HER2*/CEN-17. Las células normales presentes en el corte de tejido analizado sirven como control positivo interno de la eficacia del pretratamiento y de la hibridación. Consulte la Sección Interpretación de la tinción para obtener información detallada al respecto.

Si desea un curso de formación electrónica interactiva, utilice el programa de formación electrónica *HER2* IQFISH pharmDx™, que está diseñado para enseñar de forma rápida y precisa a los técnicos de laboratorio, a los anatomopatólogos y a los científicos a lograr unos resultados óptimos con el *HER2* IQFISH pharmDx™:

www.dako.com



Reactivos - Gástrico

Material suministrado

Los materiales enumerados a continuación son suficientes para 20 pruebas (una prueba se define como una área diana de 22 mm x 22 mm). El número de pruebas se basa en el uso de 250 µL por portaobjetos del Vial 2A (5-8 gotas), 10 µL por portaobjetos del Vial 3, y 15 µL por portaobjetos del Vial 5). Las soluciones del Vial 3 y el Vial 5 son viscosas y es posible que haya que centrifugarlas brevemente en una microcentrifugadora para recoger todo el reactivo suministrado.

El kit proporciona suficientes materiales para 10 ciclos de tinción individuales (cuatro ciclos separados si se usa el método de inmersión en pepsina). *HER2 IQFISH pharmDx™* se suministra en hielo seco. **Los componentes del kit no se han expuesto a altas temperaturas durante el transporte siempre que todavía haya hielo seco cuando usted reciba el kit.** Si algunos componentes del kit permanecen sin congelar, esto no afecta a la eficacia de *HER2 IQFISH pharmDx™*.

Vial 1

PRE-TREATMENT SOLUTION (20x)

Solución de pretratamiento (20x)

150 mL, concentrado 20x

Tampón MES (ácido 2-[N-morfolin]etanosulfónico).

Vial 2A

PEPSIN

Pepsina

4 x 6,0 mL, listo para su uso

La solución de pepsina, pH 2,0, contiene un estabilizante y un agente antimicrobiano.

Vial 2B

PEPSIN DILUENT (10x)

Diluyente de pepsina (10x)

24 mL, concentrado 10x

Búfer de dilución, pH 2,0, contiene un agente antimicrobiano.

Vial 3

HER2/CEN-17 IQISH
PROBE MIX

Mezcla de sondas *HER2/CEN-17 IQISH*

0,2 mL, listo para su uso

Mezcla de sondas de ADN marcada con Texas Red *HER2* y sondas de ANP CEN-17 marcadas con fluoresceína; suministradas en tampón de hibridación IQISH

Vial 4

STRINGENT WASH BUFFER (20x)

Tampón de lavado astringente (20x)

150 mL, concentrado 20x

Tampón SSC (solución salina con citrato sódico) con detergente (Tween-20).

Vial 5

FLUORESCENCE
MOUNTING MEDIUM

Medio de montaje fluorescente

0,4 mL, listo para su uso

Medio de montaje fluorescente con 500 µg/L de DAPI (4',6-diamidina-2-fenilindol).



Cáncer gástrico

Vial 6

WASH BUFFER (20x)

Tampón de lavado (20x)

500 mL, concentrado 20x
Tampón Tris/HCl.

COVERSLIP SEALANT

Sellador de cubreobjetos

1 tubo, listo para su uso
Solución para el sellado eliminable de cubreobjetos.

NOTA: Los siguientes reactivos del kit: La solución de pretratamiento (20x), la pepsina, el diluyente de pepsina (10x), el tampón de lavado astringente (20x), el medio de montaje fluorescente, el tampón de lavado (20x) y el sellador de cubreobjetos son intercambiables con los reactivos correspondientes del Dako Histology FISH Accessory Kit, nº de catálogo K5799.

Material necesario pero no suministrado

Reactivos de laboratorio

Agua destilada o desionizada

Etanol, 96%

Xileno o sustitutos de xileno

Equipo de laboratorio

Paños absorbentes

Pipetas regulables.

Termómetro calibrado, de inmersión parcial (intervalo 37–100 °C)

Termómetro de superficie calibrado (intervalo 37–100 °C)

Cubreobjetos (22 mm x 22 mm)

Pinzas

Campana extractora de gases

Dako Hybridizer (nº de catálogo S2450 o S2451)*

Bloque de calentamiento o hibridación*

Cámara de hibridación húmeda*

Microcentrifugadora

Portaobjetos, Dako Silanized Slides, nº de catálogo S3003, o portaobjetos recubiertos de poli-L-lisina (consulte Preparación de las muestras)

Recipientes o baños de tinción

Cronómetro (capaz de cronometrar intervalos de 2-15 minutos)

Mezclador vórtex

Baño de agua con tapa capaz de mantener una temperatura de 37(±2) °C, 63 (±2) °C y de 95 °C a 99 °C)

Microondas con capacidad de detección, si el pretratamiento se realiza mediante un microondas (consulte B3. Protocolo de tinción. Paso 1: Pretratamiento, método B).

* Se puede utilizar un bloque de calentamiento o un horno de hibridación para desnaturalización (66 (±1) °C) e hibridación (45 (±2) °C) junto con una cámara de hibridación húmeda, como alternativa al Dako Hybridizer.

(122303-002)

PO1499ES_002_K573121-2/LMA/2013.01 p. 33/62
ROBREM BIOCARE ARGENTINA S.A.
Fernando Matías Mendonça
D.N.I. 25.097.811
Apoderado

CARLOS E.G. ROBBETT
DIRECTOR TÉCNICO
M.N. 11/158

Equipo de microscopía y accesorios

Filtros para microscopio de fluorescencia: doble filtro para DAPI y FITC/Texas Red, o monofiltros para FITC y Texas Red - consulte el Apéndice 3 para obtener detalles al respecto.

Debe utilizarse un microscopio de fluorescencia con una lámpara de mercurio de 100 vatios como fuente de luz. No se recomienda el uso de otras fuentes de luz con estos filtros.

Bandeja plegable para portaobjetos de microscopía (bandeja de cartón para 20 portaobjetos con cubierta de bisagra o similar).

Precauciones - Gástrico

1. Para uso en diagnóstico in vitro.
2. Para usuarios profesionales.
3. El Vial 1, solución de pretratamiento (20x), contiene de ácido 2-morfolinoetanosulfónico al 1- <20%, el Vial 2A, pepsina, contiene propan-2-ol al 5-10%; y el Vial 6, tampón de lavado (20x), contiene trometamol al 1<20%. A las concentraciones en que se encuentran en el producto, estas sustancias no requieren etiquetado de advertencia de productos peligrosos. Los usuarios profesionales pueden solicitar a Dako hojas de datos sobre la seguridad (MSDS, por sus siglas en inglés) de estos productos.
4. El Vial 2, Pepsina, contiene pepsina A, que puede causar reacciones alérgicas.
5. Vial 2B, diluyente de pepsina (10x) que contiene un 60% de propan-2-ol y está marcado como:
Altamente inflamable.
Irritante.
R11 Altamente inflamable.
R36 Irritante para los ojos.
R67 Los vapores pueden provocar somnolencia y vértigo.
S9 Consérvese el recipiente en lugar bien ventilado.
S16 Manténgase lejos de toda fuente de ignición – No fumar.
S26 En caso de contacto con los ojos, enjuague inmediatamente con abundante agua y busque atención médica.
S60 Esta sustancia y su recipiente deben desecharse como material peligroso.
6. El sellador de cubreobjetos contiene nafta (petróleo) al 60–100%, ligeramente hidrotratada, está marcado como:
Extremadamente inflamable.
Peligroso para el medio ambiente.
R11 Altamente inflamable.
R51/53 Tóxico para los organismos acuáticos, puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático.
S9 Consérvese el recipiente en lugar bien ventilado.
S16 Conservar alejado de toda llama o fuente de chispas – No fumar.
S35 Este material y su recipiente deben eliminarse de una manera segura.
S57 Utilícese un envase de seguridad adecuado para evitar la contaminación del medio ambiente.
S61 Evítese su liberación al medio ambiente. Consulte las instrucciones especiales/hojas de datos de seguridad.
Consulte la hoja de datos de seguridad de materiales (MSDS) para obtener información más detallada.
7. Las muestras, antes y después de la fijación, así como todos los materiales expuestos a ellas, deben manipularse como capaces de transmitir infecciones, y desecharse con las precauciones apropiadas (16). Nunca pipetee reactivos con la boca y evite el contacto de la

- piel y membranas mucosas con reactivos y muestras. En el caso de que los reactivos entren en contacto con zonas sensibles, lave con abundante agua.
8. A fin de evitar resultados erróneos, minimice la contaminación microbiana de los reactivos.
 9. La aplicación de tiempos y temperaturas de incubación o de métodos distintos a los especificados, puede producir resultados erróneos.
 10. El uso de métodos de fijación de tejidos y de espesores de muestras distintos a los especificados puede afectar negativamente a la morfología del tejido y/o a la intensidad de la señal.
 11. Evite la evaporación de la mezcla de sondas *HER2/CEN-17* durante la hibridación garantizando una humedad suficiente en la cámara de hibridación.
 12. Los reactivos están diluidos de forma óptima. Una mayor dilución puede provocar pérdida de eficacia.
 13. Utilice el equipo de protección individual adecuado para evitar el contacto con los ojos y la piel. Le rogamos que consulte la hoja de datos de seguridad (MSDS) para obtener información más detallada.
 14. Debido a la naturaleza heterogénea de las muestras de cáncer gástrico es importante realizar un examen riguroso de la totalidad de la muestra para evaluar la distribución de la señal antes de seleccionar el área para la enumeración de las señales.
 15. No se recomienda evaluar muestras muy pequeñas (es decir, las muestras tienen que tener una morfología intacta y suficientes núcleos para realizar la enumeración).
 16. Si el análisis *HER2 FISH* se realiza en una muestra de biopsia, para garantizar una determinación fiable del estado en cuanto a *HER2* se deberán analizar varias (7-8) muestras de biopsia de diferentes regiones del tumor.
 17. Para la identificación de todos los tejidos de una muestra de biopsia, es importante inspeccionar el portaobjetos teñido con hematoxilina y eosina.
 18. Sólo deben utilizarse recipientes de tinción limpios para el método de inmersión en pepsina (Paso 2, método C).

Almacenamiento - Gástrico

Conserve la mezcla de sondas *HER2/CEN-17 IQISH* (Vial 3) a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un lugar oscuro. El resto de reactivos se pueden conservar a $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la oscuridad. Todos los reactivos se pueden almacenar congelados. Los reactivos se pueden congelar y descongelar hasta 10 veces sin que pierdan su eficacia.

La pepsina, la mezcla de sondas *HER2/CEN-17 IQISH* y el medio de montaje fluorescente (Viales 2A, 3 y 5) puede verse afectados negativamente si se exponen al calor. No deje estos componentes a temperatura ambiente.

La mezcla de sondas *HER2/CEN-17 IQISH* y el medio de montaje fluorescente (Viales 3 y 5) pueden verse afectados negativamente si son expuestos a niveles lumínicos excesivos. No almacene estos componentes ni lleve a cabo análisis bajo una luz intensa, por ejemplo, la luz solar directa.

No utilice el kit después de la fecha de caducidad impresa en la caja del kit. Si los reactivos se almacenan bajo condiciones distintas de las especificadas en este documento, el usuario debe validar la eficacia de los reactivos (13).

No existen signos evidentes que indiquen inestabilidad de este producto. Por lo tanto, es importante evaluar células normales presentes en el corte de tejido analizado. Si observa un patrón de fluorescencia inesperado que no pueda atribuirse a las variaciones en los procedimientos de laboratorio y sospecha que existe un problema con *HER2 IQFISH pharmDx™*, póngase en contacto con el servicio técnico de Dako.



Cáncer gástrico

Preparación de las muestras - Gástrico

Las muestras de adenocarcinoma de las biopsias, escisiones o resecciones del estómago, incluyendo la unión gastroesofágica, deben manipularse de tal forma que se conserve el tejido para el análisis FISH. Deben utilizarse con todas las muestras los métodos estándar de procesamiento de tejidos para su tinción inmunocitoquímica (14). Cuando se analicen muestras pequeñas de biopsia, se determinará con precisión la morfología intacta del tumor y la presencia de núcleos suficientes para realizar la enumeración de las señales. Si el análisis FISH de *HER2* se realiza en una muestra de biopsia, para garantizar una determinación fiable del estado en cuanto a *HER2* se deberán analizar varias (7-8) muestras de biopsia de diferentes regiones del tumor.

Cortes incluidos en parafina

Sólo los tejidos conservados con formol tamponado neutro e incluidos en parafina son adecuados para su uso. Las muestras deben cortarse en bloques de, por ejemplo, 3 ó 4 mm de espesor, y fijarse durante 18–24 horas con formol tamponado neutro. Las muestras de biopsia se fijaron durante 6–8 horas en el ToGA Trial (para obtener información sobre el estudio, consulte (25)). Los tejidos se deshidratan en una serie graduada de etanol y xileno, seguido de infiltración con parafina fundida mantenida a no más de 60 °C. Los tejidos correctamente fijados e incluidos se conservarán indefinidamente antes de su seccionamiento y montaje en portaobjetos si se almacenan en un sitio fresco (15–25 °C) (14, 15). No es adecuado ningún otro fijador.

Las muestras de tejido deben cortarse en cortes de 3–6 µm.

Los portaobjetos requeridos para el análisis de la amplificación del gen *HER2* y la verificación de la presencia de tumores deben prepararse a la vez. Se recomienda realizar un mínimo de 2 cortes en serie, 1 corte para la verificación de la presencia de tumores teñida con hematoxilina y eosina (tinción H&E), y 1 corte para el análisis de la amplificación del gen *HER2*. Se recomienda montar los cortes de tejido en los portaobjetos Dako Silanized Slides, N° de catálogo S3003, o en portaobjetos recubiertos de poli-L-lisina. Las muestras deben analizarse dentro de un período de 4–6 meses tras el corte, siempre que se almacenen a temperatura ambiente (20–25 °C).

INSTRUCCIONES DE USO - Gástrico

A. Preparación de los reactivos - Gástrico

Es conveniente preparar los siguientes reactivos antes de proceder con la tinción:

A.1 Solución de pretratamiento

Es posible que aparezcan cristales en el Vial 1, pero, a temperatura ambiente, se disuelven. Asegúrese de que no haya cristales antes de la preparación del reactivo.

Diluya una cantidad suficiente del Vial 1 (solución de pretratamiento 20x) diluyendo el concentrado 1:20 en agua destilada o desionizada. La solución diluida sin usar puede almacenarse a 2-8 °C durante un mes. Deseche la solución diluida si está turbia.

A.2 Tampón de lavado astringente

Diluya una cantidad suficiente del Vial 4 (Tampón de lavado astringente 20x) diluyendo el concentrado 1:20 en agua destilada o desionizada. El tampón diluido sin usar puede almacenarse a 2-8 °C durante un mes. Si el tampón diluido presenta un aspecto turbio, deséchelo.

A.3 Tampón de lavado

Diluya una cantidad suficiente del Vial 6 (tampón de lavado 20x) diluyendo el concentrado al 1:20 en agua destilada o desionizada. El tampón diluido sin usar puede almacenarse a 2-8 °C durante un mes. Si el tampón diluido presenta un aspecto turbio, deséchelo.

A.4 Serie de etanol

A partir de una solución de etanol al 96%, prepare 3 recipientes con etanol al 70%, 85% y 96%, respectivamente. Almacene los recipientes tapados a temperatura ambiente o a una temperatura de 2-8 °C, y utilícelos con un máximo de 200 portaobjetos. Si las soluciones presentan un aspecto turbio, deséchelas.

A.5. Solución de pepsina

Solo se necesita una solución de pepsina cuando se usa el método de inmersión en pepsina (Método C).

Prepare la solución de pepsina como sigue;

Para un recipiente con una capacidad de seis portaobjetos prepare 60 mL de solución de pepsina:

Añada 48 mL de agua destilada o desionizada a temperatura ambiente (20-25 °C) al recipiente.

Añada 6 mL de diluyente de pepsina frío (2-8 °C) (10x) (Vial 2B) al recipiente.

Añada 6 mL de pepsina fría (2-8 °C) (Vial 2A) al recipiente.

Coloque la tapa del recipiente y equilibre la solución de pepsina a 37 (±2) °C en un baño de agua.

Para un recipiente con una capacidad de 24 portaobjetos y 240 mL de solución de pepsina:

Añada 192 mL de agua destilada o desionizada a temperatura ambiente (20-25 °C) al recipiente.

Añada 24 mL de diluyente de pepsina frío (2-8 °C) (10x) (Vial 2B) al recipiente.

Añada 24 mL de pepsina fría (2-8 °C) (Vial 2A) al recipiente.

Coloque la tapa del recipiente y equilibre la solución de pepsina a 37 (±2) °C en un baño de agua.

La solución de pepsina equilibrada se debe usar dentro de las 5 horas siguientes.

B. Procedimiento de tinción - Gástrico

B.1 Notas sobre el procedimiento

El usuario debe leer detenidamente estas instrucciones y familiarizarse con todos los componentes antes de su uso (consulte la Sección Precauciones).

Todos los reactivos deben equilibrarse a la temperatura ambiente antes de su uso, de la manera descrita a continuación:

Vial 1: La solución de pretratamiento diluida debe equilibrarse a **95–99 °C** si se utiliza un baño de agua para el pretratamiento (B3. Protocolo de tinción, Paso 1: Método de pretratamiento A). Si se utiliza un microondas con capacidad de detección para el pretratamiento (B3. Protocolo de tinción, Paso 1: Pretratamiento, Método B) la solución de pretratamiento diluida debe equilibrarse a una temperatura ambiente de 20–25 °C.

Vial 2A: La pepsina debe aplicarse a **2–8 °C** (B3, Protocolo de tinción, Paso 2 Método A y B) y mantener fría a todo momento.

Vial 2B: El diluyente de pepsina (10x) debe aplicarse a **2–8 °C** (B3, Protocolo de tinción, Paso 2, Método C).

Vial 3: La mezcla de sondas *HER2/CEN-17 IQISH* se separa en dos fases cuando se conserva a -18 °C. Antes de utilizar el Vial 3, asegúrese de que sólo haya una fase, equilibrando la mezcla de sondas a temperatura ambiente **20–25 °C** seguido de la mezcla. Descongele el Vial 3 a temperatura ambiente (20–25 °C) durante un máximo de 30 minutos (protéjalo de fuentes de luz intensas) y luego mezcle bien en remolino el vial durante 15 segundos a 2500 rpm usando un mezclador vórtex. Guarde el Vial 3 a -18 °C inmediatamente después de usarlo.

Vial 4: tampón de lavado astringente diluido; uno de los recipientes debe equilibrarse a temperatura ambiente, y el otro a **63 (±2) °C** antes de su uso.

Vial 5: el medio de montaje fluorescente puede aplicarse a cualquier temperatura de 2 a 25 °C.

Vial 6: el tampón de lavado diluido debe equilibrarse a temperatura ambiente **20–25 °C**.

El sellador de cubreobjetos puede aplicarse a cualquier temperatura en el rango **2–25 °C**.

Todos los pasos deben llevarse a cabo a las temperaturas indicadas.

El procedimiento incluye una serie de deshidrataciones, seguidas del secado de los cortes de tejido. Asegúrese de que los cortes de tejido estén completamente secos antes de continuar con el paso siguiente. No permita que los cortes de tejido se sequen durante los demás pasos del procedimiento.

Si tiene que interrumpir el procedimiento de tinción, puede conservar los portaobjetos en el tampón de lavado tras el paso de desparafinado durante un máximo de 1 hora a temperatura ambiente (20–25 °C) sin que esto afecte a los resultados.

B.2 Tratamiento de los tejidos antes de la tinción

Eliminación de la parafina y rehidratación: Antes de llevar a cabo el análisis, debe eliminar la parafina de los portaobjetos de tejido para eliminar el medio de inclusión y rehidratarlos. Trate de no dejar restos de parafina. Cualquier residuo del medio de inclusión provocaría un aumento de la tinción no específica. Este paso debe realizarse a temperatura ambiente (20–25 °C).

1. Coloque los portaobjetos en un baño de xileno e incube durante 5 (±1) minutos. Cambie los baños y repita el paso una vez.
2. Golpee suavemente para eliminar el exceso de líquido e introduzca los portaobjetos en etanol al 96% durante 2 (±1) minutos. Cambie los baños y repita el paso una vez.
3. Golpee suavemente para eliminar el exceso de líquido e introduzca los portaobjetos en etanol al 70% durante 2 (±1) minutos. Cambie los baños y repita el paso una vez.



Cáncer gástrico

4. Golpee suavemente para eliminar el exceso de líquido e introduzca los portaobjetos en el tampón de lavado diluido (consulte INSTRUCCIONES DE USO, Sección A.3) durante un mínimo de 2 minutos. Inicie el procedimiento de tinción de la forma descrita en la Sección B.3, Paso 1, Pretratamiento.

Cambie las soluciones de xileno y de alcohol después de cada 200 portaobjetos o menos.

Puede utilizar sustitutivos del xileno.

NOTA: Los reactivos y las instrucciones suministrados con este kit se han diseñado para obtener resultados óptimos. Una mayor dilución de los reactivos o la modificación de las temperaturas de incubación pueden producir resultados erróneos o discordantes. Cualquier diferencia en el procesamiento del tejido y en los procedimientos técnicos que el usuario llevase a cabo en su laboratorio podría invalidar los resultados del ensayo.

B.3 Protocolo de tinción

Paso 1: Pretratamiento

El pretratamiento se puede realizar o bien mediante un baño de agua, según lo descrito en el método A) o, alternativamente, utilizando un microondas con capacidad de detección, según lo descrito en el método B).

Método A: Pretratamiento mediante baño de agua

Llene los recipientes, por ejemplo, recipientes de Coplin, con la solución de pretratamiento diluida (consulte las INSTRUCCIONES DE USO, Sección A.1). Coloque los recipientes de tinción con la solución de pretratamiento diluido en un baño de agua. Caliente el baño de agua y la solución de pretratamiento a 95–99 °C. Mida la temperatura del interior de los recipientes con un termómetro calibrado a fin de mantener la temperatura correcta. Tape los recipientes a fin de estabilizar la temperatura y evitar la evaporación.

Sumerja los cortes desparafinados a temperatura ambiente en la solución de pretratamiento precalentada en los recipientes de tinción. Vuelva a comprobar la temperatura e incube durante 10 (± 1) minutos a 95–99 °C.

Retire del baño de agua el recipiente completo con los portaobjetos. Retire la tapa y deje que los portaobjetos se enfríen en la solución de pretratamiento durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Introduzca los portaobjetos en un recipiente que contenga tampón de lavado diluido (consulte las INSTRUCCIONES DE USO, Sección A.3) durante 3 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C).

Sustituya el tampón de lavado y empape los cortes durante 3 minutos más.

NOTA: la solución de pretratamiento está diseñada para aplicarla una sola vez. No reutilizar.

Método B: pretratamiento utilizando un microondas con capacidad de detección

Rellene un recipiente de plástico con solución de pretratamiento diluida a temperatura ambiente (20–25 °C). Sumerja los cortes desparafinados en la solución de pretratamiento, cubra el recipiente con una tapa perforada y colóquelo en el horno microondas. Seleccione la función de detección de ebullición y un programa que funcione 10 minutos tras haber alcanzado la temperatura de ebullición*.

Tras los 10 minutos de incubación, saque del microondas el recipiente con los portaobjetos, retire la tapa y deje enfriar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Transfiera los portaobjetos a un recipiente con tampón de lavado diluido y déjelos a remojo durante 3 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C). Sustituya el tampón de lavado y empape los cortes durante 3 minutos más.

Cáncer gástrico

* El uso de un horno microondas con capacidades de detección significa que el horno debe contar con un sensor y programas que calienten inicialmente la solución de pretratamiento hasta el punto de ebullición y mantengan posteriormente la temperatura de pretratamiento necesaria (por encima de los 95 °C) mientras realiza una cuenta atrás del tiempo preseleccionado (10 (±1) minutos). Es posible que algunos microondas con capacidad de detección no incluyan la posibilidad de fijar libremente una cuenta atrás. Si el modelo sólo incluye programas predefinidos, asegúrese de seleccionar un programa que mantenga la temperatura de pretratamiento necesaria (por encima de 95 °C) durante al menos 10 (±1) minutos y detenga manualmente el programa transcurridos 10 (±1) minutos.

NOTA: La solución de pretratamiento se ha diseñado para un solo uso. No reutilizar.

Paso 2: La incubación en pepsina, pepsina lista para su uso (RTU), o solución de pepsina se puede realizar aplicando directamente gotas de pepsina RTU en los portaobjetos a temperatura ambiente (20–25 °C) (Método A) o a 37 °C (Método B). O bien, puede sumergir los portaobjetos en una solución de pepsina e incubarlos a 37 (±2) °C (Método C).

Método A y Método B:

Golpee suavemente para eliminar el exceso de tampón. Utilizando un paño sin pelusa (por ejemplo, un paño absorbente o almohadillas de gasa), frote con cuidado alrededor de la muestra a fin de eliminar cualquier resto de líquido y de mantener los reactivos dentro del área prescrita.

Aplique 5–8 gotas (250 µL) de pepsina fría (2–8 °C) (Vial 2A) para cubrir la muestra. Almacene siempre la pepsina a 2–8 °C.

Método A: Pepsina, RTU - Incubación a 20–25 °C

Incube durante 5–15 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C). Un tiempo de incubación de 5–15 minutos es adecuado para la mayoría de las muestras, aunque el tiempo óptimo de incubación puede depender de la fijación del tejido y/o del grosor de la muestra y debe ser determinado por el usuario.

Golpee suavemente para eliminar cualquier resto de pepsina y empape los cortes en tampón de lavado diluido (consulte INSTRUCCIONES DE USO, Sección A.3) durante 3 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C).

Sustituya el tampón de lavado diluido y empape los cortes durante 3 minutos más. Continúe hasta la deshidratación.

Método B: Pepsina, RTU - Incubación a 37 °C

Coloque la muestra con pepsina en un bloque calefactor a 37 °C (p. ej. Dako Hybridizer) e incube durante 3–5 minutos. Un tiempo de incubación de 3–5 minutos es adecuado para la mayoría de las muestras, aunque el tiempo óptimo de incubación puede depender de la fijación del tejido y/o del grosor de la muestra y debe ser determinado por el usuario.

Golpee suavemente para eliminar el exceso de pepsina y sumerja los cortes en tampón de lavado diluido durante 3 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C).

Sustituya el tampón de lavado y empape los cortes durante 3 minutos más. Continúe hasta la deshidratación.

Deshidrate los cortes de tejido mediante una serie graduada de etanol: 2 minutos en etanol al 70%, 2 minutos en etanol al 85%, y 2 minutos en etanol al 96%.

Deje que los cortes de tejido se sequen al aire completamente.

Método C: Solución de pepsina - Inmersión de los portaobjetos en una solución de pepsina a 37 °C

El kit contiene suficientes reactivos para cuatro ciclos separados (60 mL de solución de pepsina, recipiente pequeño para seis portaobjetos) o un único ciclo (240 mL de solución de pepsina, recipiente grande para 24 portaobjetos). Prepare la solución de pepsina de la forma descrita en la Sección A.5.

Coloque la tapa del recipiente y equilibre la solución de pepsina a 37 (±2) °C en un baño de agua. Asegúrese de que la temperatura se haya estabilizado. Mida la temperatura del interior del recipiente con un termómetro calibrado a fin de mantener la temperatura correcta.

Golpee suavemente para eliminar el exceso de tampón de lavado. Sumerja los portaobjetos en la solución de pepsina a 37 (±2) °C e incube durante 20–30 minutos. Un tiempo de incubación de 20–30 minutos es adecuado para la mayoría de las muestras, aunque el tiempo óptimo de

incubación puede depender de la fijación del tejido y/o del grosor de la muestra y debe ser determinado por el usuario.

Golpee suavemente para eliminar el exceso de solución de pepsina y sumerja los cortes en tampón de lavado diluido durante 3 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C).

Sustituya el tampón de lavado y empape los cortes durante 3 minutos más. Continúe hasta la deshidratación.

Deshidrate los cortes de tejido mediante una serie graduada de etanol: 2 minutos en etanol al 70%, 2 minutos en etanol al 85%, y 2 minutos en etanol al 96%.

Deje que los cortes de tejido se sequen al aire completamente.

Paso 3: Mezcla de sondas HER2/CEN-17 IQISH

La mezcla de sondas HER2/CEN-17 IQISH se separa en dos fases cuando se conserva a -18 °C. Antes de utilizar el Vial 3, asegúrese de que sólo haya una fase, equilibrando la mezcla de sondas a temperatura ambiente (20–25 °C) seguido de la mezcla. Descongele el Vial 3 a temperatura ambiente (20–25 °C) durante un máximo de 30 minutos (protéjalo de fuentes de luz intensas) y luego mezcle bien en remolino el vial durante 15 segundos a 2500 rpm usando un mezclador vórtex. Guarde el Vial 3 a -18 °C inmediatamente después de usarlo.

Aplique 10 µL de la mezcla de sondas HER2/CEN-17 IQISH (Vial 3) en el centro del corte de tejido. Coloque inmediatamente un cubreobjetos de vidrio de 22 x 22 mm sobre la mezcla de sondas y deje que ésta se distribuya uniformemente debajo del cubreobjetos. Evite la formación de burbujas de aire. Si observa burbujas de aire, golpee suavemente con unas pinzas para retirarlas del tejido.

Recuerde guardar el Vial 3 a -18 °C inmediatamente después de usarlo.

Selle el cubreobjetos con el sellador de cubreobjetos, extendiendo el sellador alrededor de la periferia del cubreobjetos. Deje que el sellador de cubreobjetos se superponga al cubreobjetos y al portaobjetos; así se formará un sello alrededor del cubreobjetos. Asegúrese de que el sellador de cubreobjetos cubra todo el borde del cubreobjetos.

Prepare Dako Hybridizer* (nº de catálogo S2450 o S2451) para un ciclo de hibridación. Asegúrese de que las Humidity Control Strips (nº de catálogo S2452) estén saturadas y en estado óptimo para su utilización. Inicie el Hybridizer y seleccione un programa que:

Desnaturalice a 66 °C durante 10 minutos seguido de una hibridación a 45 °C durante 60–120 minutos

Coloque los portaobjetos en el Hybridizer, asegúrese de que la tapa esté bien cerrada e inicie el programa. Consulte el manual de instrucciones de Dako Hybridizer para obtener más detalles.

* Para la desnaturalización y la hibridación puede utilizar instrumental que permita condiciones idénticas a las arriba descritas.

Coloque los portaobjetos sobre una superficie metálica o de piedra plana (sobre un bloque de calentamiento o un bloque en un horno de hibridación) precalentado a 66 (±1) °C. Desnaturalice durante exactamente 10 minutos.

Introduzca los portaobjetos en una cámara de hibridación humidificada precalentada. Cubra la cámara con una tapa e incube a 45 (±2) °C durante 60–120 minutos. Tenga en cuenta que una temperatura de hibridación de 37 °C no es adecuada para las sondas incluidas en este kit.

Paso 4: Lavado astringente

Llene dos recipientes de tinción, por ejemplo recipientes de Coplin, con Tampón de lavado astringente diluido (consulte las INSTRUCCIONES DE USO, Sección A.2). Se recomienda utilizar un volumen mínimo de 100 mL o 15 mL por portaobjetos en cada recipiente.

Introduzca uno de los recipientes de tinción con Tampón de lavado astringente diluido a temperatura ambiente en una campana extractora de gases, y el otro recipiente en un baño de agua. Caliente el baño de agua y el tampón de lavado astringente diluido a 63 (±2) °C. Asegúrese de que la temperatura se haya estabilizado. Tape el recipiente para estabilizar la temperatura y evitar la evaporación. Mida la temperatura del interior del recipiente que está en el baño de agua

Interpretación de la tinción - Gástrico

Tejidos evaluables

Localice el tumor dentro del contexto del portaobjetos teñido con hematoxilina y eosina y evalúe el mismo área en el portaobjetos teñido mediante FISH (en el filtro para DAPI). Solo deben analizarse las de pacientes con adenocarcinoma de estómago, incluida la unión gastroesofágica. En los casos con metaplasia intestinal y adenocarcinoma en la misma muestra, sólo debe contabilizarse el componente de carcinoma gástrico. Evite las áreas de fuerte inflamación, necrosis y las áreas en las que los bordes de los núcleos sean ambiguos. No incluya los núcleos que requieran una valoración subjetiva. No incluya núcleos que presenten una intensidad de señal débil y no específica o tinción de fondo alta.

Comience con la evaluación microscópica del corte completo FISH teñido y el área asignada en el corte teñido con hematoxilina y eosina, respectivamente. Antes de enumerar el portaobjetos teñido mediante FISH, anote la distribución general de la señal (homogénea o heterogénea) en la hoja de enumeración de la señal. Si la distribución es heterogénea, anote si hay amplificación focal o amplificación de célula única (mosaico).

1) Distribución homogénea de la señal

Si la distribución de la señal es homogénea, enumere el número de centrómeros de cromosoma (señales verdes) y el número de genes *HER2* (señales rojas), respectivamente, desde 20 células en 1-2 áreas tumorales representativas.

2) Distribución heterogénea de la señal

Si la distribución de la señal es heterogénea, se evaluarán un total de 20 células de áreas seleccionadas, como se indica más abajo:

A) Si existe amplificación focal, se deberán seleccionar las áreas con células amplificadas.

B) Si hay distribución en mosaico o células amplificadas polisómicas y disómicas, se contarán las áreas con células amplificadas. En estas áreas, se debe contar un total de 20 células, no solo la células amplificadas, sino también las células no amplificadas adyacentes.

Si es posible, no seleccione áreas que se superpongan.

Ignorar la tinción de ADN bacteriano

Una serie de células especializadas (mastocitos y macrófagos), presentes entremezcladas en el tejido gástrico, muestran un alto grado de tinción mediante la sonda de *HER2* debido a la presencia de ADN bacteriano. Como consecuencia aparecen células fluorescentes muy rojas que se distinguen claramente de las células tumorales con una alta amplificación del gen *HER2*.

Enumeración de la señal

Cuando se ha seleccionado un área para la evaluación de señales, empiece el análisis en uno de los 20 núcleos adyacentes elegidos y cuente célula por célula omitiendo los núcleos que no cumplan los criterios de calidad. Cuente el número de señales comprendidas dentro del borde nuclear de cada núcleo evaluado, con arreglo a las pautas siguientes (consulte también el Apéndice 7).

- Acerque y aleje el enfoque para encontrar todas las señales de los núcleos individuales.
- Cuando dos señales sean del mismo tamaño y estén separadas por una distancia (igual o) inferior al diámetro de la señal, cuente éstas como una sola señal. La distancia tiene que ser al menos igual al diámetro de una señal de tamaño normal con el fin de contar dos señales individuales. Cuando la distancia entre dos señales es menor que el diámetro de una señal se tendrá que contar como una sola.
- En los núcleos con altos niveles de amplificación del gen *HER2*, las señales de *HER2* pueden estar muy cerca unas de las otras, formando un grupo de señales. En esos casos no es posible contar el número de señales de *HER2*; en vez de contarlos, debe realizarse una estimación. Debe prestar especial atención a las señales verdes, ya que los grupos de señales de rojas *HER2* pueden cubrir las señales verdes, haciéndolas imposibles de ver. En caso de duda, compruebe las señales verdes utilizando un filtro específico para FITC.

No puntúe los núcleos que no presenten señales o que presenten señales de un solo color. Puntúe sólo los núcleos que presenten una o más señales FISH de cada color.

Cáncer gástrico

Pautas para el recuento de señales

1		No contar. Los núcleos se superponen; no todas las áreas de los núcleos son visibles.
2		Dos señales verdes; no puntúe los núcleos que presenten señales de un solo color.
3		Contar como 3 señales verdes y 12 señales rojas (estimación del grupo).
4		Contar como 1 señal verde y 1 señal roja. Dos señales que sean del mismo tamaño y estén separadas por una distancia igual o inferior al diámetro de una señal se cuentan como una sola señal.
5		No contar (núcleos sobre o infradigeridos). Ausencia de señales en el centro del núcleo (núcleo en forma de donut).
6		Contar como 2 señales verdes y 3 señales rojas. Dos señales que sean del mismo tamaño y estén separadas por una distancia igual o inferior al diámetro de una señal se cuentan como una sola señal.
7		Contar como 1 señal verde y 5 señales rojas.
8		Contar como 3 señales verdes (1 señal verde está fuera de foco) y 3 señales rojas.
9		Grupo de señales rojas que están tapando a señales verdes; comprobar las señales verdes utilizando un filtro específico para FITC, o no contar.

Registre los recuentos en una tabla como la que se indica en el Apéndice 5 y 6.

Cuente 20 núcleos por muestra de tejido, y si es posible, de áreas tumorales bien definidas.

Calcule la proporción *HER2/CEN-17* dividiendo el número total de señales rojas de *HER2* entre el número total de señales verdes de *CEN-17*.

Las muestras que presenten una proporción *HER2/CEN-17* igual o superior a 2 deben considerarse como amplificadas en cuanto al gen *HER2* (26).

Los resultados que estén en el punto de corte (1,8–2,2) o cerca de él deben interpretarse con precaución.

Si la proporción es dudosa (1,8–2,2), cuente 40 núcleos adicionales y calcule la proporción para los 40 núcleos. Si la enumeración todavía es dudosa, el resultado válido será el de la segunda evaluación. Si está disponible, se deberá incluir una tinción inmunohistoquímica de *HER2* para conseguir una mejor orientación durante la segunda enumeración.

Cáncer gástrico

En caso de duda, vuelva a puntuar el portaobjetos con la muestra. En los casos de proporción dudosa, el patólogo debe consultar con el médico a cargo de los tratamientos.

Limitaciones - Gástrico

1. FISH es un proceso de varios pasos que requiere formación especializada en la selección de los reactivos apropiados, selección, fijación y procesamiento de tejidos, preparación de los portaobjetos para FISH, e interpretación de los resultados de las tinciones.
2. Los resultados de FISH dependen de la manipulación y el procesamiento del tejido antes de su tinción. Una fijación, lavado, secado, calentamiento o corte incorrectos, o la contaminación con otros tejidos o líquidos, pueden afectar a la hibridación de las sondas. La aparición de resultados no coherentes puede deberse a variaciones en los métodos de fijación y de inclusión, o a irregularidades inherentes al tejido.
3. A fin de obtener resultados óptimos y reproducibles, debe desparafinar por completo los portaobjetos de tejido. La eliminación de la parafina debe realizarse al principio del proceso de tinción. (Consulte INSTRUCCIONES DE USO, Sección B.2).
4. Sólo debe utilizar baño de agua, bloque de calentamiento y horno de hibridación con calibración de la temperatura. El uso de otros tipos de equipos puede dar lugar a la evaporación de la mezcla de sondas *HER2/CEN-17* durante la hibridación y debe ser validado por el usuario.

Características de resultados - Gástrico

Antecedentes

La seguridad y eficacia de trastuzumab (Herceptin™) se ha demostrado en un estudio clínico (el ToGA Trial) (25). El estudio fue diseñado como un estudio multicéntrico de fase III, abierto, aleatorizado realizado en pacientes con HER2 positivo con adenocarcinoma inoperable localmente avanzado, recurrente y/o metastásico de estómago o de la unión gastroesofágica. La positividad para HER2 en el ToGA Trial se definió según si era positiva con IHC (3+) (HercepTest™ de Dako) y/o positiva con *HER2* FISH (*HER2/CEN-17* ≥ 2,0) (kit *HER2* FISH pharmDx™ de Dako n° de catálogo K5331). Después de la inclusión en el estudio, los pacientes fueron aleatorizados para que recibieran quimioterapia (5-FU o capecitabina y cisplatino) o quimioterapia más trastuzumab. El criterio de valoración principal del estudio fue la supervivencia global (SG).

En el estudio se aleatorizaron 594 pacientes y 584 recibieron la medicación objeto del estudio y fueron incluidos en el conjunto de análisis completo (FAS). Para el criterio de valoración principal la combinación de quimioterapia más trastuzumab mostró ser superior estadísticamente que la quimioterapia sola. La mediana de la SG aumentó de 11,1 a 13,8 meses ($p=0,0046$) con un índice de riesgo de 0,74 (IC 95%: 0,60–0,91). Las curvas de Kaplan-Meier para la SG se muestran en la figura 3.



Especificidad analítica

Las sondas de ADN *HER2* contenidas en la mezcla de sondas *HER2/CEN-17 IQISH* se han secuenciado y mapeado, confirmando una cobertura total de 218 kb incluido el gen *HER2*.

Las sondas de ANP *CEN-17* contenidas en la mezcla de sondas *HER2/CEN-17 IQISH* se han testado individualmente y combinadas, confirmando su hibridación específica con la región centromérica del cromosoma 17.

Para medir la capacidad del ensayo para identificar de forma exclusiva las sustancias diana *HER2* y *CEN-17* sin interferencia de otras sustancias, se realizaron estudios en muestras de adenocarcinoma de cáncer gástrico usando el Vial 3 que contenía el tampón de hibridación pero no la mezcla de sondas. Se evaluaron un total de 18 muestras en busca de la presencia de señales no relacionadas con la mezcla de sondas. No se observó detección de otras dianas cromosómicas ni interferencia con sustancias estrechamente relacionadas en ninguno de las 18 muestras

Estudios de robustez

La robustez del ensayo *HER2 IQFISH pharmDx™* se evaluó variando el tiempo y la temperatura de pretratamiento y los métodos de calentamiento del tampón de pretratamiento (horno microondas o baño de agua), el tiempo y el método de incubación con pepsina (pepsina RTU o inmersión), la temperatura y el tiempo de desnaturalización, el tiempo de hibridación, y el tiempo y la temperatura del lavado astringente.

No se observó ninguna diferencia significativa en los resultados bajo las siguientes condiciones experimentales:

- Método de pretratamiento A) Baño de agua durante 10 minutos combinado con cada una de las siguientes temperaturas: 95 °C, 95–99 °C, y 99 °C junto a 9, 10 y 11 minutos a 95–99 °C
- Método de pretratamiento B) Horno microondas durante 9, 10 y 11 minutos a temperaturas de >95 °C.
- Método de digestión con pepsina A) con tiempos de incubación de 5, 10 y 15 minutos temperatura ambiente (20–25 °C).
- Método de digestión con pepsina B) con tiempos de incubación de 3, 4 y 5 minutos a 37 °C.
- Método de digestión con pepsina C) con tiempos de incubación de 20, 25 y 30 minutos combinados con cada una de las siguientes temperaturas: 35, 37 y 39 °C.
- Desnaturalización durante 10 minutos combinado con cada una de las siguientes temperaturas: 65, 66 y 67 °C junto a 9, 10 y 11 minutos a 66 °C.
- Tiempos de hibridación de 60, 90 y 120 minutos a una temperatura de 45 °C.
- Lavado astringente durante 10 minutos combinado con cada una de las siguientes temperaturas: 61, 63 y 65 °C junto a 9, 10 y 11 minutos a 63 °C.

Nota: Para las pruebas de robustez sólo se cambió un parámetro del procedimiento de tinción a la vez, mientras que el resto de parámetros se mantuvieron constantes. Se recomienda respetar el tiempo y las temperaturas indicadas en el procedimiento de tinción.

El procedimiento de tinción de *HER2 IQFISH pharmDx™* ofrece variables de protocolo para el pretratamiento de calor, la digestión con pepsina y el tiempo de hibridación. Cada combinación única se ha validado respecto al estado del gen *HER2*. La validación se realizó en 10 muestras FFPE de adenocarcinoma gástrico y de la unión gastroesofágica humanas de mama humano con cada una de las 12 posibles combinaciones. Se utilizó el

(122303-002)

PP1499ES_002_K573121-2/LMA/2013.01 p. 48/62
ROCHEM BIO CARE ARGENTINA S.A.
Fernando Matias Mendonça
D.N.I. 25.097.811
Apoderado

CARLOS E.G. BOBBFTT
DIRECTOR TÉCNICO
M.N. 11158

Cáncer gástrico

kit *HER2* FISH pharmDx™ (K5331) como referencia. La proporción *HER2/CEN-17* de cada muestra individual se muestra en la Figura 5. La tabulación cruzada entre las 12 pruebas y la tinción de referencia mostró una coincidencia general en el estado del gen *HER2* del 100% (10/10) con límites del 95% de confianza inferior de dos colas inferior y superior en el 78,3% y el 100%, respectivamente. El valor Kappa fue de 1,00 y la prueba de McNemars mostró la ausencia de sesgo (valor p de dos colas de 1,00).

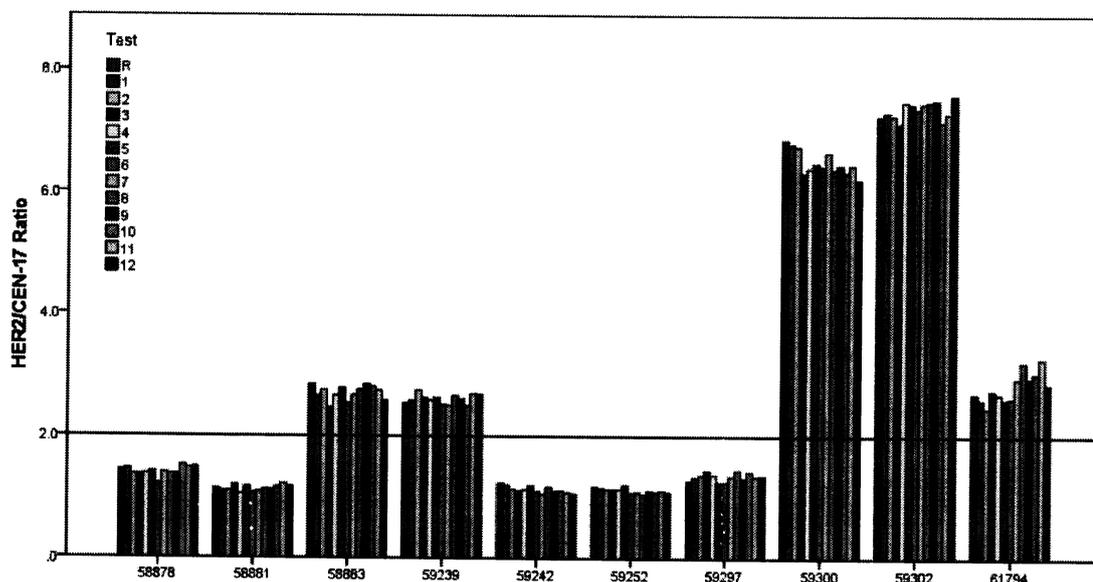


Figura 5. Las proporciones individuales *HER2/CEN-17* para 10 muestras de adenocarcinoma gástrico humano teñidas usando las 12 posibles combinaciones de protocolo con *HER2* IQFISH pharmDx™ (nº de catálogo K5731) (Prueba 1-12) y la referencia (R) del kit *HER2* FISH pharmDx™ (nº de catálogo K5331). La línea horizontal ilustra el punto de corte de 2,0.

Repetibilidad

La repetibilidad de la proporción *HER2/CEN-17* se investigó con el ensayo *HER2* IQFISH pharmDx™ utilizando cortes consecutivos de nueve muestras diferentes de adenocarcinoma gástrico, con el estado del gen *HER2* no amplificado o amplificado. Se analizaron cortes por triplicado de cada muestra en el mismo procedimiento. El coeficiente de variación promedio fue del 3,5% para muestras no amplificadas (intervalo desde el 1% al 5%) y del 2,8% para muestras amplificadas (intervalo desde el 1% al 5%).

La repetibilidad en cortes consecutivos de muestras de adenocarcinoma gástrico con espesores diferentes (2, 3, 4, 5, 6, y 7 µm) fue evaluada con *HER2* IQFISH pharmDx™. El coeficiente de variación de la proporción *HER2/CEN-17* fue del 4,5 (intervalo del 3% al 6%), es decir, en el mismo intervalo que el tejido de igual espesor y dentro de los criterios de aceptación preestablecidos.

Reproducibilidad

Se probó el ensayo *HER2* IQFISH pharmDx™ en lo referente a reproducibilidad lote a lote y observador a observador usando tres lotes de *HER2* IQFISH pharmDx™ y tres observadores. La reproducibilidad se analizó en nueve muestras de adenocarcinoma gástrico diferentes con los estados del gen *HER2* no amplificado y amplificado.



Cáncer gástrico

El coeficiente de variación promedio de la reproducibilidad lote a lote fue del 3,8% para muestras no amplificadas (intervalo desde el 2% al 7%) y del 1,8% para muestras amplificadas (intervalo desde el 1% al 3%).

El coeficiente de variación promedio de la reproducibilidad observador a observador fue del 4,3% para muestras no amplificadas (intervalo desde el 3% al 5%) y del 4,4% para muestras amplificadas (intervalo desde el 2% al 7%). Las muestras de adenocarcinoma gástrico consistieron en un 78,8% de muestras de resección y en un 22,2% de muestras de biopsia. El 55,6% de las muestras se obtuvieron del estómago y un 44,4% de la unión gastroesofágica.

Utilidad clínica

La utilidad clínica de Dako *HER2* IQFISH pharmDx™ (nº de catálogo K5731) se investigó en un estudio comparativo con el kit Dako *HER2* FISH pharmDx™ (nº de catálogo K5331). El estudio incluía 79 muestras de cáncer gástrico que consistían en diferentes tipos de tejido de adenocarcinoma gástrico, como adenocarcinomas del estómago o de la unión gastroesofágica y resecciones o biopsias con distribución de señales homogéneas o heterogéneas (focales o en mosaico). Todos los tumores han sido evaluados en cuanto al estado de la expresión de la proteína *HER2* usando Dako HercepTest™ (nº de catálogo K5207). En el estudio se incluyeron muestras de cada uno de los cuatro grupos de puntuación IHC (0, 1+, 2+, 3+). La tabulación cruzada del estado de *HER2* obtenida por los dos ensayos arrojaron una coincidencia general del 98,7% con los límites inferior y superior del intervalo de confianza del 95% en 94,2% y 99,9%. El valor kappa fue 0,97, siendo los límites inferiores y superiores del intervalo de confianza del 95% 0,92 y 1,00. El valor p de la prueba de McNemars fue 1,00, indicando la ausencia de sesgo entre los dos ensayos.

(122303-002)

P01499ES_002_K573121-2/LMA/2013.01 p. 50/62

ROCHEM BIO CARE ARGENTINA S.A.
Fernando Matias Montenegro
D.N.I. 25.097.811
Apoderado

CAPLOS E.G. BOBBETT
DIRECTOR TÉCNICO
M.N. 11758

Solución de problemas - Gástrico

Problema	Causa probable	Solución sugerida
1. No hay señales o son débiles	1a. El Kit ha sido expuesto a altas temperaturas durante su transporte o almacenamiento. 1b. El microscopio no funciona correctamente - Juego de filtros inapropiado - Lámpara incorrecta - Lámpara de mercurio demasiado vieja - Objetivos colectores sucios y/o con fisuras - Aceite de inmersión inadecuado 1c. Señales desvanecidas 1d. Condiciones de pretratamiento incorrectas 1e. Evaporación de la mezcla de sondas durante la hibridación	1a. Compruebe las condiciones de almacenamiento. Asegúrese de que había hielo seco presente en el kit cuando lo recibió. Asegúrese de que Vial 3 se ha almacenado a -18 °C en la oscuridad. Asegúrese de que los Viales 2A y 5 se han almacenado a un máximo de 2-8 °C en la oscuridad. 1b. Compruebe el microscopio y asegúrese de que los filtros que se están utilizando son adecuados para su uso con los fluorocromos del kit; asegúrese también de que la lámpara de mercurio es la correcta y que no se haya utilizado más allá de su vida útil esperada. (consulte el Apéndice 7). En caso de duda, contacte con el vendedor del microscopio. 1c. Evite los exámenes prolongados con el microscopio y minimice la exposición de las muestras a fuentes de luz intensa. 1d. Asegúrese de utilizar la temperatura y el tiempo de pretratamiento recomendados. 1e. Asegúrese de que haya suficiente humedad en la cámara de hibridación.
2. No hay señales verdes	2a. Condiciones de lavado astringente incorrectas	2a. Asegúrese de utilizar la temperatura y el tiempo recomendados para el lavado astringente, y de retirar los cubreobjetos antes de llevar a cabo el lavado astringente
3. No hay señales rojas	3a. Condiciones de pretratamiento incorrectas	3a. Asegúrese de utilizar la temperatura y el tiempo de pretratamiento recomendados.



Cáncer gástrico

Problema	Causa probable	Solución sugerida
4. Áreas sin señal	<p>4a. Volumen insuficiente de sonda</p> <p>4b. Burbujas de aire atrapadas durante la aplicación de la mezcla de sondas o durante el montaje</p>	<p>4a. Asegúrese de que el volumen de sonda sea lo suficientemente grande como para cubrir el área bajo el cubreobjetos.</p> <p>4b. Evite la formación de burbujas de aire. Si se observan, elimínelas suavemente con la ayuda de unas pinzas.</p>
5. Excesiva tinción de fondo	<p>5a. Fijación inadecuada del tejido</p> <p>5b. Parafina eliminada de forma incompleta</p> <p>5c. Temperatura de lavado astringente demasiado baja</p> <p>5d. Exposición prolongada del corte hibridado a una luz intensa</p>	<p>5a. Asegúrese de que sólo se usen cortes de tejido fijados con formol e incluidos en parafina.</p> <p>5b. Siga los procedimientos de desparafinado y rehidratación descritos en la Sección B.2</p> <p>5c. Asegúrese de que la temperatura del lavado astringente sea de 63 (± 2) °C</p> <p>5d. Evite los exámenes prolongados con el microscopio y minimice la exposición a fuentes de luz intensa</p>
6. Morfología tisular deficiente	<p>6a. Tratamiento con pepsina incorrecto</p> <p>6b. Unas condiciones de pretratamiento incorrectas pueden tener como resultado un aspecto poco claro y turbio.</p> <p>6c. Un tratamiento con pepsina muy prolongado o un espesor de corte muy reducido puede hacer que aparezcan células fantasma o células tipo donut.</p>	<p>6a. Cifíase a los tiempos de incubación con pepsina recomendados. Consulte la Sección B.3, Paso 2. Asegúrese de que la pepsina se manipule a la temperatura correcta. Consulte la Sección B.1.</p> <p>6b. Asegúrese de utilizar la temperatura y el tiempo de pretratamiento recomendados.</p> <p>6c. Acorte el tiempo de incubación con pepsina. Consulte la Sección B.3, paso 2. Asegúrese de que el espesor del corte sea de 3–6 μm.</p>

(122303-002)

P01499ES_002_K573121-2/LMA/2013.01 p. 52/62
 ROCHEM BIO CARE ARGENTINA S.A.
 Fernando Matías Mendonça
 D.N.I. 25.097.611
 Apoderado

CARLOS E.G. BOBBETT
 DIRECTOR TÉCNICO
 M.N. 11168



Cáncer gástrico

Problema	Causa probable	Solución sugerida
7. Alto nivel de autofluorescencia verde en el portaobjetos, incluyendo las zonas sin tejido FFPE	7. Uso de portaobjetos de vidrio caducados o no recomendados	7. Asegúrese de que el portaobjetos revestido de vidrio (Dako Silanized Slides, nº de catálogo S3003 o portaobjetos recubierto de poli-L-lisina) no haya caducado.

NOTA: Si no puede atribuirse el problema a ninguna de las circunstancias anteriores, o si la acción correctiva sugerida no lo soluciona, póngase en contacto con el Servicio Técnico de Dako para solicitar más ayuda.

(122303-002)

P01499ES_002_K573121-2/LMA/2013.01 p. 53/62

ROCHEM BIOCARE ARGENTINA S.A.
Fernando Matias Mendonça
D.N.I. 25.097.811
Apoderado

CARLOS E.G. BOBBETT
DIRECTOR TÉCNICO
M.N. 11158



Cáncer gástrico

Apéndice 4 - Gástrico

HER2 IQFISH pharmDx™, nº de catálogo K5731

Lista de comprobación del protocolo

ID del registro del ensayo de tinción: _____

Fecha del ensayo: _____

HER2 IQFISH pharmDx™, K5731: Lote _____

ID de muestra: _____

ID de equipo: _____

Fecha de la dilución/caducidad del tampón de lavado 1x (Vial 6 diluido al 1:20): _____ / _____

Tejido fijado con formol tamponado neutro	Sí <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
Paso 1: Pretratamiento		
Fecha de la dilución/caducidad de la solución de pretratamiento (Vial 1 diluido al 1:20)	/	
Temperatura medida de la solución de pretratamiento (95–99 °C) si se utiliza baño de agua para el calentamiento	°C	
Pretratamiento (10 minutos) y enfriamiento (15 minutos)		
Lavado en tampón de lavado (Vial 6 diluido al 1:20) (2 x 3 minutos)		
Paso 2: Pepsina		
Duración del tratamiento con pepsina (Vial 2) a 37 °C o bien	Minutos	
Duración del tratamiento con pepsina (Vial 2) a temperatura ambiente o bien	Minutos	
Duración de la inmersión en pepsina a 37 (±2) °C	Minutos	
Lavado en tampón de lavado (Vial 6 diluido al 1:20) (2 x 3 minutos)		
Deshidrate los portaobjetos (3 x 2 minutos) en series graduadas de etanol, y seque al aire		
Paso 3: Mezcla de sondas HER2/CEN-17		
Aplique la mezcla de sondas (Vial 3), cubra con el cubreobjetos y selle con el sellador de cubreobjetos		
Temperatura de desnaturalización medida (66 (±1) °C)	°C	
Desnaturalización durante 10 minutos		
Temperatura de hibridación medida (45 (±2) °C)	°C	
Tiempo de hibridación (60–120 minutos)	Minutos	
Paso 4: Lavado astringente		
Fecha de la dilución/caducidad del tampón de lavado astringente (Vial 4 diluido al 1:20)	/	
Temperatura medida del tampón de lavado astringente (63 (±2) °C)	°C	
Lavado astringente (10 minutos) tras retirar los cubreobjetos		
Lavado en tampón de lavado (Vial 6 diluido al 1:20) (2 x 3 minutos)	°C	
Deshidrate los portaobjetos (3 x 2 minutos) en series graduadas de etanol, y seque al aire	Minutos	

(122303-002)

P01499ES_002_K573121-2/LMA/2013.01 p. 54/62

ROCHEM BIOCARE ARGENTINA S.A.
Fernando Matías Mendonça
D.N.I. 25.097.611
Aptderado

CARLOS E.G. BOBBETT
DIRECTOR TÉCNICO
M.N. 11158



Cáncer gástrico

Paso 5: Montaje	
Aplique 15 µL de medio de montaje fluorescente (Vial 5) y cubra con el cubreobjetos	

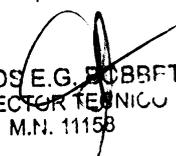
Comentarios:

Fecha y firma del técnico:

(122303-002)


ROCHEM BIO CARE ARGENTINA S.A.
Fernando Matias Mendonça
D.N.I. 25.097.811
Apoderado

P01499ES_002_K573121-2/LMA/2013.01 p. 55/62


CARLOS E.G. ROBBITT
DIRECTOR TÉCNICO
M.N. 11158



Cáncer gástrico

Apéndice 5 - Gástrico

HER2 IQFISH pharmDx™, n° de catálogo K5731

Sistema de puntuación

HER2 IQFISH pharmDx™, K5731 Lote: _____

ID del registro del ensayo de tinción: _____

Fecha del ensayo: _____ **ID de muestra:** _____

Caracterización de la distribución de la señal en el tejido:

Homogéneo:

Heterogéneo – Focal: o *Heterogéneo – Mosaico:*

Recuento de señales en 20 núcleos					
N° núcleo	Roja (HER2)	Verde (CEN-17)	N° núcleo	Roja (HER2)	Verde (CEN-17)
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		

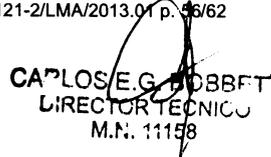
Para determinar la proporción *HER2/CEN-17*, cuente el número de señales de *HER2* y el número de señales de *CEN-17* en los mismos 20 núcleos y divida el número total de señales de *HER2* entre el número total de señales de *CEN-17*. Si la proporción *HER2/CEN-17* es dudosa (1,8–2,2), cuente 40 núcleos adicionales y vuelva a calcular la proporción (consulte el esquema de puntuación del recuento).

Una relación que esté en el punto de corte (1,8–2,2) o cerca de él debe interpretarse con precaución (consulte la guía de recuento).

(122303-002)


ROCHEM DIAGNÓSTICOS ARGENTINA S.A.
Fernando Matias Mendonça
D.N.I. 25.097.811
Apodado

P01499ES_002_K573121-2/LMA/2013.01 p. 56/62


CARLOS E.G. BOBBITT
DIRECTOR TÉCNICO
M.N. 11158



Cáncer gástrico

FISH PARA HER2	HER2	CEN-17	Proporción HER2/CEN-17
PUNTUACIÓN TOTAL (1-20)			

- Relación < 2: No se observó amplificación del gen *HER2*
- Relación \geq 2: Se observó amplificación del gen *HER2*

Fecha y firma del técnico: _____

Fecha y firma del patólogo: _____

Para conocer las pautas de recuento: consulte Interpretación de la tinción.

(122303-002)

ROCHEM BIOCARE ARGENTINA S.A.
Fernando Matias Mendonça
D.N.I. 25.007.611
Apoderado

P01499ES_002_K573121-2/LMA/2013.01 p. 57/62

CAPULO E. G. ROBBETT
DIRECTOR TÉCNICO
M.N. 11158



Cáncer gástrico

Apéndice 6 - Gástrico

HER2 IQFISH pharmDx™, n° de catálogo K5731

Esquema de puntuación del recuento

HER2 IQFISH pharmDx™, K5731 Lote: _____

ID del registro del ensayo de tinción: _____

Fecha del ensayo: _____ ID de muestra: _____

Señales en 40 núcleos adicionales (1-40)											
N° núcleo	Roja HER2	Verde CEN-17	N° núcleo	Roja HER2	Verde CEN-17	N° núcleo	Roja HER2	Verde CEN-17	N° núcleo	Roja HER2	Verde CEN-17
1			11			21			31		
2			12			22			32		
3			13			23			33		
4			14			24			34		
5			15			25			35		
6			16			26			36		
7			17			27			37		
8			18			28			38		
9			19			29			39		
10			20			30			40		
Total 1-10			Total 11-20			Total 21-30			Total 31-40		

Para determinar la proporción $HER2/CEN-17$, cuente el número de señales de $HER2$ y el número de señales de $CEN-17$ en los mismos 40 núcleos y divida el número total de señales de $HER2$ entre el número total de señales de $CEN-17$. Incluya la puntuación total de los núcleos 1-40 en la siguiente tabla.

FISH PARA HER2	HER2	CEN-17	Proporción $HER2/CEN-17$
PUNTUACIÓN TOTAL (1-40)			

- Relación < 2 : No se observó amplificación del gen $HER2$
- Relación ≥ 2 : Se observó amplificación del gen $HER2$

Fecha y firma del técnico: _____

Fecha y firma del patólogo: _____

Para conocer las pautas de recuento: consulte Interpretación de la tinción.

(122303-002)

ROCHEM BIOCARE ARGENTINA S.A.
Fernando Matías Mendonça
D.N. 25.097.811
Apoderado

P01499ES_002_K573121-2/LMA/2013.01.p.58/62

CARLOS E.G. BOBBETT
DIRECTOR TÉCNICO
M.N. 11158



Cáncer gástrico

Apéndice 7 - Gástrico

HER2 IQFISH pharmDx™, n° de catálogo K5731

Especificaciones del microscopio de fluorescencia

Dako le recomienda que utilice siguiente equipo para su uso con el kit HER2 FISH pharmDx™, K5731:

1. Tipo de microscopio

- Microscopio de epifluorescencia.

2. Lámpara

- Lámpara de mercurio de 100 vatios (mantenga un registro del tiempo de combustión).

3. Objetivos

- Para el cribaje del tejido, puede aplicar objetivos de fluorescencia a seco 10X u objetivos de fluorescencia para aceite de inmersión 16X.
- Para un aumento de alta potencia y para la puntuación de las señales, le recomendamos que utilice exclusivamente objetivos de fluorescencia para aceite de inmersión, por ejemplo, 100X.

4. Filtros

Los filtros están diseñados individualmente para cada fluorocromo concreto, y debe elegirlos en consonancia. Dako recomienda el uso de un filtro específico para DAPI en combinación con un doble filtro de alta calidad específico para Texas Red/FITC.

- Filtro para DAPI, por ejemplo, filtro Chroma N° 31000.
- Doble filtro para Texas Red/FITC, por ejemplo, filtro Chroma N° 51006.
- Puede utilizar un filtro sencillo para Texas Red y otro filtro sencillo para FITC con fines de confirmación.

Fluorocromo	Longitud de onda de excitación	Longitud de onda de emisión
FITC	495 nm	520 nm
Texas Red	596 nm	615 nm

Los filtros son específicos de cada tipo de microscopio y el uso de los filtros adecuados es crucial para la interpretación. Si desea obtener información detallada al respecto, contacte con el proveedor de su microscopio o con el representante de Dako.

5. Aceite

- Aceite no fluorescente.

Precauciones

- No se recomienda utilizar una lámpara de mercurio de 50 vatios.
- No se pueden utilizar filtros para rodamina.
- No se recomienda utilizar triples filtros.

Un microscopio no optimizado puede causar problemas al leer las señales fluorescentes. Es importante que la fuente de luz no haya caducado y que esté correctamente alineada y enfocada.

Los clientes deben monitorizar y seguir las recomendaciones del fabricante de la lámpara de mercurio. Antes de interpretar los resultados, debe haberse realizado el mantenimiento del microscopio, y la lámpara de mercurio debe estar alineada.

Debe esforzarse por exponer la muestra a la menor cantidad de luz de excitación posible a fin de minimizar el desvanecimiento de la fluorescencia.

Le recomendamos que estudie la configuración de su microscopio concreto con el fabricante de éste antes de empezar la hibridación in situ fluorescente, o que consulte la literatura.

(122303-002)

ROCHE DIAGNÓSTICA ARGENTINA S.A.
Fernando Matías Mendonça
D.N.I. 25.097.811
Aprobado

P01499ES_002_K573121-2/LMA/2013.01 p. 59/62

CARLOS E.G. ROBBETT
DIRECTOR TÉCNICO
M.N. 11153



Referencias

1. Muleris M, Almeida A, Malfroy B, Dutrillaux B. Assignment of v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2 (ERBB2) to human chromosome band 17q21.1 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1997;76(1-2):34-5.
2. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 1985;230(4730):1132-9.
3. King CR, Kraus MH, Aaronson SA. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science* 1985;229(4717):974-6.
4. Schwab M. Oncogene amplification in solid tumors. *Semin Cancer Biol* 1999;9(4):319-25.
5. Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Kurisu W, Thor A, Chen LC, Smith HS, et al. ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(12):5321-5.
6. Persons DL, Bui MM, Lowery MC, Mark HF, Yung JF, Birkmeier JM, et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for detection of HER-2/neu amplification in breast cancer: a multicenter portability study. *Ann Clin Lab Sci* 2000;30(1):41-8.
7. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235(4785):177-82.
8. Rennstam K, Baldetorp B, Kytola S, Tanner M, Isola J. Chromosomal rearrangements and oncogene amplification precede aneuploidization in the genetic evolution of breast cancer. *Cancer Res* 2001;61(3):1214-9.
9. Borg A, Tandon AK, Sigurdsson H, Clark GM, Ferno M, Fuqua SA, et al. HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. *Cancer Res* 1990;50(14):4332-7.
10. Nichols DW, Wolff DJ, Self S, Metcalf JS, Jacobs D, Kneuper-Hall R, et al. A testing algorithm for determination of HER2 status in patients with breast cancer. *Ann Clin Lab Sci* 2002;32(1):3-11.
11. Bilous M, Dowsett M, Hanna W, Isola J, Lebeau A, Moreno A, et al. Current perspectives on HER2 testing: a review of national testing guidelines. *Mod Pathol* 2003;16(2):173-82.
12. Nielsen PE, Egholm M, editors. *Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications*. Norfolk NR18 0EH, England: Horizon Scientific Press 1999.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS). Protection of laboratory workers from instrument biohazards and infectious disease transmitted by blood, body fluids, and tissue; Approved guideline. NCCLS document M29-A. 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA: NCCLS. 1997.
14. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, FR 7163, February 28. 1992.
15. Sheehan DC, Hrapchak BB. *Theory and practice of histotechnology*. St. Louis: CV Mosby Company. 1980.
16. Kiernan JA. *Histological and histochemical methods: theory and practice*. New York: Pergamon Press 1981.
17. Tsuda H, Akiyama F, Terasaki H, Hasegawa T, Kurosumi M, Shimadzu M, et al. Detection of HER-2/neu (c-erb B-2) DNA amplification in primary breast carcinoma. Interobserver reproducibility and correlation with immunohistochemical HER-2 overexpression. *Cancer* 2001;92(12):2965-74.
18. Ellis IO, Dowsett M, Bartlett J, Walker R, Cooke T, Gullick W, et al. Recommendations for HER2 testing in the UK. *J Clin Pathol* 2000;53(12):890-2.
19. Hanna W. Testing for HER2 status. *Oncology* 2001;61 Suppl 2:22-30.
20. Jorgensen JT. Targeted HER2 Treatment in Advanced Gastric Cancer. *Oncology* 2010;78(1):26-33.
21. Fujimoto-Ouchi K, Sekiguchi F, Yasuno H, Moriya Y, Mori K, Tanaka Y. Antitumor activity of trastuzumab in combination with chemotherapy in human gastric cancer xenograft models. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007;59(6):795-805.
22. Kim SY, Kim HP, Kim YJ, Oh do Y, Im SA, Lee D, et al. Trastuzumab inhibits the growth of human gastric cancer cell lines with HER2 amplification synergistically with cisplatin. *Int J Oncol* 2008;32(1):89-95.

(122303-002)

ROCHEM BIOCARE ARGENTINA S.A.
Fernando Matias Mendonça
D.N. 25.097.611
Aptoderado

P01499ES_002_K573121-2/LMA/2013.01 p. 60/62

CARLOS E. G. BOBBETT
DIRECTOR TÉCNICO
M.N. 11158

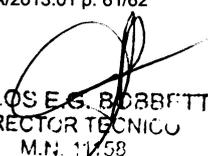


23. Matsui Y, Inomata M, Tojigamori M, Sonoda K, Shiraishi N, Kitano S. Suppression of tumor growth in human gastric cancer with HER2 overexpression by an anti-HER2 antibody in a murine model. *Int J Oncol* 2005;27(3):681-5.
24. Tanner M, Hollmen M, Junttila TT, Kapanen AI, Tommola S, Soini Y, et al. Amplification of HER-2 in gastric carcinoma: association with Topoisomerase IIalpha gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab. *Ann Oncol* 2005;16(2):273-8.
25. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2010; 376(9742):687-97
26. Hofmann M, Stoss O, Shi D, Buttner R, van de Vijver M, Kim W, et al. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology* 2008;52(7):797-805.

(122303-002)


ROCHEM BIOCARE ARGENTINA S.A
Fernando Matias Mendonça
D.N.I. 25.097.611
Apoderado

P01499ES_002_K573121-2/LMA/2013.01 p. 61/62


CARLOS E. G. BOBBETT
DIRECTOR TÉCNICO
M.N. 11758



Explicación de los símbolos

REF	Número de catálogo	-18°C	Límite de temperatura	LOT	Código de lote	Xi	Irritante
IVD	Producto sanitario para diagnóstico in vitro		Manténgase alejado de la luz solar (consulte la sección sobre almacenamiento) salmarena riento		Fecha de caducidad		Extremadamente inflamable
	Consulte las instrucciones de uso		Contenido suficiente para <n> ensayos		Fabricante		Peligroso para el medio ambiente

Fabricado por:
Dako Denmark A/S
Produktionsvej 42
DK-2600 Glostrup
Dinamarca
Tfno. +45 44 85 95 00
Fax +45 44 85 95 95
www.dako.com

(122303-002)

ROCHEM BIOCARE ARGENTINA S.A.
Fernando Matias Mendonça
D.N.I. 25.097.811
Apoderado

P01499ES_002_K573121-2/LMA/2013.01 p. 62/62

CARLOS E.G. BOBBETT
DIRECTOR TÉCNICO
M.N. 11158

HER2 IQFISH pharmDx™



PRE-TREATMENT SOLUTION (20x)

PEPSIN

PEPSIN DILUENT (10x)

HER2/CEN-17 IQISH
PROBE MIX

STRINGENT WASH BUFFER (20x)

FLUORESCENCE
MOUNTING MEDIUM

WASH BUFFER (20x)

COVERSLIP SEALANT



2001-01

REF

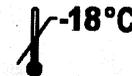
K5731

LOT

12345678



20



Keep away from sunlight

IVD

(17) 010101 (10) 12345678



(01) 0 5700579 03245 1 (240) K573111-2



ROCHEM BIOMEDICAL ARGENTINA S.A.
Fernando Matias Mendonça
D.N. 25.097.811
Aporizado

CAPLOS E. G. ROBBETT
LIRECON S.R.L. TECNICO
M.N. 11758



Extremely
Flammable (F+)



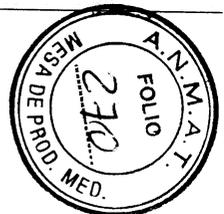
Irritant (Xi)



Dangerous for the
Environment (N)



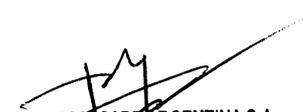
Address 1, Address 2
City, State Zip Country
Phone





SOBRERÓTULO

Elaborado por	Dako Denmark A/S Produktionsvej 42, DK-2600 Glostrup Dinamarca
Importado y Distribuido por	Rochem Biocare Argentina S.A. Herrera 1855, Planta Baja D-021, Barracas, (C1292) C.A.B.A
Director Técnico:	Carlos Bobbett
"Autorizado por ANMAT. N° de certificado ..."	


ROCHEM BIO CARE ARGENTINA S.A.
Fernando Matías Mendonça
D.N. 25.097.611
Apoderado


CARLOS E.G. BOBBETT
DIRECTOR TÉCNICO
M.N. 11158



1



2001-01



K5731



12345678

PRE-TREATMENT SOLUTION (20x)

150 mL

-18°C  8°C

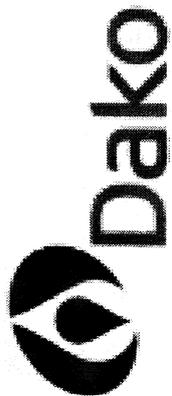


K5731 VIAL 1-2 Primary v0



ROCHEM BIOQUÍMICA ARGENTINA S.A.
Fernando Matías Mendonça
D.N.I.: 23.197.311
Apoderado

CARLOS E. G. ROBBETT
DIRECTOR TÉCNICO
M.N.: 1/158



2A

2001-01

PEPSIN

REF K5731

LOT 12345678

6 mL

-18°C / 8°C

IVD CE

K5731VIAL2A-2 Primary v

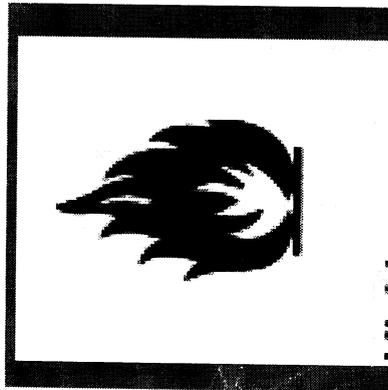


ROCHEM BIOQUÍMICA S.L. S. L.
Fernando Matias Mendonça
D.N.I. 25.087.811
Apostado

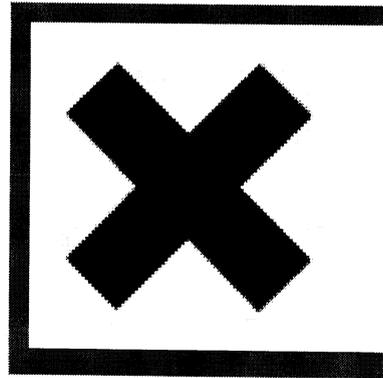
CARLOS E.G. COBBETT
DIRECTOR TÉCNICO
M.N. 11/58

 **Dako** **2B**

PEPSIN DILUENT (10x)



Highly Flammable (F)



Irritant (Xi)

 **2001-01**

 **REF** **K5731**

 **LOT** **12345678**

24 mL

-18°C  **8°C**



 **IVD**

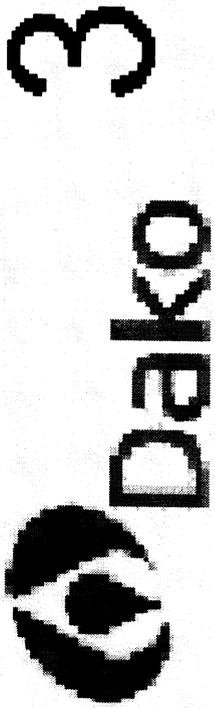
CE

K5731VIAL2B-2 Primary v



ROCHEM BIOCARE ARGENTINA S.A.
Fernando Mattias Mendonça
D.N.I. 25.097.611
Apoderado

CARLOS E.G. BOBBETT
DIRECTOR TÉCNICO
M.N. 11/68



**HER2CEN-17 IQISH
PROBE MIX**

Keep away from sunlight



2001-01

0.2 mL

REF K5731



LOT 12345678



MD



K5731 VIAL 3-2 Primary V0



RODRIGUEZ ARGENTINA SA
Fernando Matias Mendonça
D.N. 25.047.811
Apoderado

CARLOS E.G. CABBFTT
DIRECTOR TECNICO
M.N. 41158



4

STRINGENT WASH BUFFER (20x)

 2001-01

 REF K5731

 LOT 12345678

150 mL

-18°C  8°C



 IVD



K5731VIAL4-2 Primary v0




ROCHEM BIOCARE ARGENTINA S.A.
Fernando Matías Mendoza
D.N.I. 25.997.811
Aprobado


CARLOS E.G. BOBBETT
DIRECTOR TÉCNICO
M.N. 11156



**FLUORESCENCE
MOUNTING MEDIUM**

Keep away from sunlight

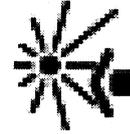


2001-01

0.4 mL

REF K5731

-18°C



LOT 12345678



IVD



K5731 VIAL 5-2 Primary v0



ROCHEM BIOARE ARGENTINA S.A.
Fernando Matias Mendonça
D.N.I. 25.097.811
Apoderado

CARLOS E.G. BOBBETT
DIRECTOR TÉCNICO
M.N. 11158



6

WASH BUFFER (20x)

 2001-01

 REF K5731

 LOT 12345678

500 mL

-18°C  8°C



 IVD

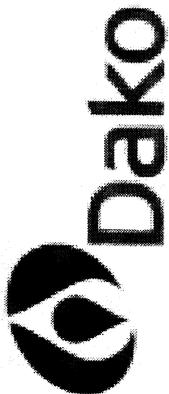


K5731VIAL6-2 Primary v0

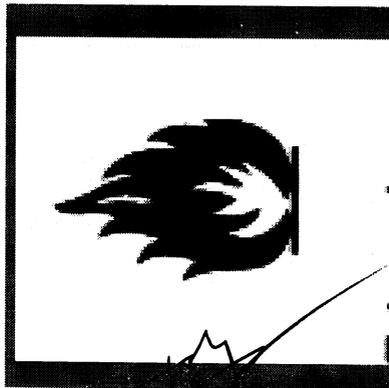


ROCHEM BIOPARE
Fernando Matias M.
D.N.I. 25.097.611
Anderado

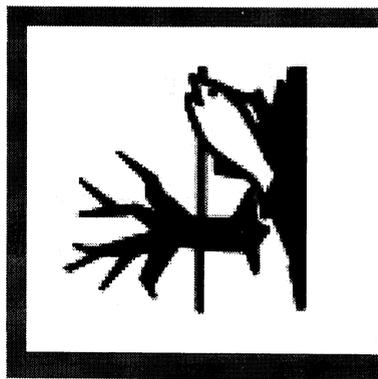

CARLOS E.G. BOBBETT
DIRECTOR TECNICO
M.N. 11158



COVERSLIP SEALANT



Extremely Flammable (F+)



Dangerous for the Environment (N)

 2001-01

 REF K5731

 LOT 12345678

10 g

-18°C  8°C



 IVD

 CE

K5731COVER-2 Primary v



ROCHEM BIOCAPAZ ARGENTINA S.A.
Fernando Matias Mendonça
D.N.I. 25.097.611
Xpoderpde

CARLOS E.G. B. BFTT
DIRECTOR TECNICO
M.F. 1158



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
2020 - Año del General Manuel Belgrano

Hoja Adicional de Firmas
Anexo

Número:

Referencia: 1-47-3110-5252-17-7 rochem biocare Argentina s.a

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 72 pagina/s.

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL ELECTRONICA - GDE
Date: 2020.02.18 09:43:37 -03:00

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL
ELECTRONICA - GDE
Date: 2020.02.18 09:43:39 -03:00