

Leica HER2 FISH System - 30 Test

Instruções de uso

Para uso no sistema Leica Biosystems' BOND-MAX and BOND-III.

O TA9217 é um produto de hibridização por fluorescência *in situ* desenhado para colorir 30 testes (30 lâminas coloridas com LSI HER2/CEP17 Dual Probe).



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



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

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

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

Sumário

Uso pretendido	3
Para uso em diagnóstico <i>in vitro</i>	3
Treinamento exigido	3
Resumo e explicação	3
Histórico	3
Resumo de concordância clínica do BOND-MAX System	4
Resumo de concordância clínica do BOND-III System	4
Princípios do procedimento	5
Componentes fornecidos	5
Instruções de uso	5
Armazenamento e estabilidade	5
Preparação da amostra	6
Advertências e precauções	6
Procedimento	6
A. Reagentes necessários, mas não fornecidos	6
B. Equipamentos necessários, mas não fornecidos	6
C. Metodologia	7
D. Pré-tratamento da enzima BOND	7
E. Protocolo de coloração padrão	7
F. Etapas de procedimento	7
G. Armazenamento das lâminas	8
Enumeração e avaliação dos sinais	9
Método recomendado para determinação de razão LSI HER2 a CEP17	10
Guia de interpretação do Leica HER2 FISH System - 30 Test	11
Folha de classificação Leica HER2 FISH System - 30 Test	12
Controle de qualidade	13
Uso de lâminas de controle	13
Limitações	14
A. Limitações gerais	14
B. Limitações específicas do produto	14
Concordância clínica do Leica HER2 FISH System - 30 Test para Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Mama	14
Resultados de concordância 2x2 BOND-MAX System - Mama	15
Resultados de concordância 2x2 BOND-III System - Mama	16
Concordância clínica do Leica HER2 FISH System - 30 Test com o Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Gástrico	17
2x2 Resultados de concordância BOND-MAX System - Gástrico	17
Teste de precisão – BOND-MAX System	18
A. Estudo de precisão dentro do funcionamento	18
B. Estudo de precisão dentro do instrumento	18
C. Estudo de precisão entre operações	18
D. Estudo de precisão entre laboratórios	18
E. Estudo de precisão entre observadores	18
F. Estudo de precisão lote a lote	19
Teste de precisão – BOND-III System	19
G. Estudo de precisão dentro da operação	19
H. Estudo de precisão dentro do instrumento	19
I. Estudo de precisão entre operações	19
J. Estudo de precisão entre laboratórios	20
K. Estudo de precisão entre observadores	20
L. Estudo de precisão lote a lote	20
Robustez da avaliação	20
Solução de problemas	22
Referências	24
Contrato de licença	25
Adições à edição anterior	25
Data da edição	25
Identificação dos símbolos	25

Uso pretendido

Para uso em diagnóstico *in vitro*

O Leica HER2 FISH System - 30 Test é projetado para detectar a amplificação do gene HER2/ neu através da hibridização com fluorescência *in situ* (FISH) em amostras de tecido de câncer de mama humano embebidos em parafina e fixadas com formol adenocarcinomas do estômago (incluindo junção gastroesofágica). O Leica HER2 FISH System - 30 Test é indicado como um auxiliar no teste de pacientes para os quais o tratamento com Herceptin® (trastuzumab) seja considerado (veja a bula de Herceptin). O Leica HER2 FISH System - 30 Test não é destinado ao uso na busca ou diagnóstico de câncer de mama. Todas as outras informações clínicas disponíveis devem também ser levadas em consideração, tais como o tamanho do tumor, o número de nódulos linfáticos envolvidos e o status do receptor de esteróides. Nenhuma decisão de tratamento para pacientes com câncer de mama deve ser baseada apenas no status da ampliação do gene HER2.

Obs.: Todos os pacientes nos testes clínicos com Herceptin foram selecionados por meio de um ensaio de avaliação clínica (CTA) imunocitoquímica investigativa. Nenhum dos pacientes destes testes foi selecionado usando o Leica HER2 FISH System - 30 Test. O Leica HER2 FISH System - 30 Test foi comparado ao ensaio do Abbott Molecular PathVysion® HER-2 DNA Probe Kit em um conjunto independente de amostras e tinha como objetivo fornecer resultados semelhantes aceitáveis, conforme indicado no resumo de concordância clínica. A correlação real dos resultados do Leica HER2 FISH System - 30 Test para o resultado clínico não foi estabelecida.

Todos os pacientes nos testes clínicos de câncer gástrico avançado (ToGA) com Herceptin foram selecionados usando o Dako HercepTest. Nenhum dos pacientes destes testes foi selecionado usando o Leica HER2 FISH System - 30 Test. O Leica HER2 FISH System - 30 Test foi comparado ao ensaio do Abbott Molecular PathVysion* HER-2 DNA Probe Kit em um conjunto independente de amostras e tinha como objetivo fornecer resultados semelhantes aceitáveis, conforme indicado no resumo de concordância clínica. A correlação real dos resultados do Leica HER2 - FISH System - 30 Test para o resultado clínico não foi estabelecida.

* Herceptin® é uma marca registrada da Genentech, Inc. e F. Hoffmann-La Roche Ltd. PathVysion® é uma marca registrada da Abbott Molecular Inc. Todos os direitos reservados. Usado sob licença.

Treinamento exigido

A Leica Biosystems fornecerá o treinamento sobre a preparação de amostras, o procedimento do ensaio e a interpretação do teste FISH do gene HER2 para todos os usuários.

Resumo e explicação

Histórico

O gene HER2, alternativamente conhecido como neu ou c-erbB2, é localizado no longo braço do cromossomo 17 na posição 17q11-12 (1). Tanto o gene HER2 quanto sua proteína codificada 185 kD têm demonstrado cumprir um papel importante na transformação maligna e na progressão do tumor de câncer de mama (2).

As funções do HER2 como um marcador de prognóstico, com amplificação do gene e da proteína sobre a expressão que estão sendo relacionadas a um aumento na taxa de recorrência da doença e mortalidade mais alta. O HER2 também funciona como um marcador preditivo para quimioterapia sistêmica selecionada e tratamentos examinados (3). Especificamente, a amplificação do gene HER2 demonstra ser um indicador de prognóstico medíocre em câncer de mama com nódulo positivo (4-8). Além disso, um estudo indica que o valor do prognóstico do HER2 é mais forte entre pacientes tratados com quimioterapia (7). Contudo, ao prever a sobrevivência geral e livre da doença em pacientes individuais, outros fatores de prognóstico, como o tamanho do tumor, número de nódulos linfáticos positivos e status do receptor de esteróides devem também ser levados em consideração.

A superexpressão da oncoproteína HER2, como um resultado da amplificação do gene encontrado nas células cancerígenas da mama, aponta o HER2 como um alvo para uma terapia baseada em anticorpos (3) - enquanto os resultados do teste de ToGA indicam claramente que o uso de Herceptin em câncer gástrico aliado à quimioterapia revela-se um tratamento eficaz que permite melhorar a sobrevivência geral em câncer gástrico positivo com HER2 (9). O Herceptin (trastuzumab) é um anticorpo monoclonal humanizado (10) que se une com alta afinidade à oncoproteína HER2 e demonstrou inibir a proliferação de células de tumor humano que superexpressam a oncoproteína HER2 tanto *in vitro* quanto *in vivo* (11-13). Desde o desenvolvimento do Herceptin, a detecção do gene HER2 e da proteína tornou-se uma ferramenta essencial na avaliação de tumores de mama, direcionando a escolha da terapia e o gerenciamento subsequente do paciente (14,15).

Tanto nas células em interfase quanto em metáfase derivadas das linhas de células de carcinoma de mama humano, FISH tem sido usado para mostrar a amplificação do gene HER2 (16-19). Para a quantificação da amplificação do gene HER2, o FISH avalia o nível da amplificação do gene HER2 diretamente nas células de tumor. A morfologia característica do tecido e da distribuição espacial de cópias oncogene em carcinomas de mama primários sem cultura individuais é mantida. As anomalias no número de cópia do cromossomo 17 (aneussomia) também são comumente encontradas em tumores de mama que podem se apresentar como eliminação ou ganho de cromossomos (polissomia). Essa variação de cromossomos tem impacto crítico na interpretação e no relatório do status de amplificação do gene HER2. Portanto, a medida do número de cópia do cromossomo 17 em conjunto com o HER2 é criticamente importante (4).

O Leica HER2 FISH System - 30 Test contém a sonda LSI HER2 DNA, uma sonda de 226 kb de DNA fluorescente, diretamente rotulada SpectrumOrange™, específica para a localização do gene HER2 (17q11.2-q12) e a sonda DNA CEP17 DNA, uma sonda DNA de 5,4 kb fluorescente diretamente rotulada SpectrumGreen™ específica para a sequência satélite de DNA alpha na região centrométrica do cromossomo 17 (17p11.1-q11.1). A solução da sonda foi especialmente formulada e validada para uso no BOND-MAX and BOND-III System e não deve ser modificada ou usada em uma configuração manual.

Resumo de concordância clínica do BOND-MAX System

O Leica HER2 FISH System - 30 Test foi desenvolvido para fornecer uma alternativa totalmente automatizada para metodologias atuais usadas para determinar o status de amplificação do gene HER2. O desempenho do Leica HER2 FISH System - 30 Test no BOND-MAX System foi avaliado em um estudo independente que comparou os resultados do Leica HER2 FISH System - 30 Test com o Abbott Molecular PathVysion Ensaio do HER-2 DNA Probe Kit em 300 amostras de tumor de mama e em 109 adenocarcinomas do estômago (incluindo junção gastroesofágica). Nenhuma dessas amostras de tumor foi obtida de pacientes em estudos clínicos com Herceptin. Os resultados em tecido mamário indicaram uma concordância de 99,33% em uma análise 2x2 (95% de intervalo de segurança de 97,61–99,92%). Os resultados em adenocarcinomas do estômago (incluindo tecido de junção gastroesofágica) indicaram uma concordância de 98,17% em uma análise 2x2 (95% de intervalos de segurança de 93,53–99,78%). Os dados de concordância também indicam que um resultado positivo com o Leica HER2 FISH System - 30 Test é altamente provável a corresponder com um resultado positivo no ensaio do Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit. O Leica HER2 FISH System - 30 Test é interpretado como negativo para a amplificação do gene HER2 quando a razão do gene HER2:CEP17 for menor do que 2,0 e positivo quando a razão do gene HER2:CEP17 for maior ou igual a 2,0. Os resultados ambíguos (limitrofes), nos quais a razão do gene HER2:CEP17 está entre ou é igual a 1,8-2,2, devem ser interpretados com cuidado. Conte 20 núcleos adicionais e recalcule a razão.

Resumo de concordância clínica do BOND-III System

O Leica HER2 FISH System - 30 Test foi desenvolvido para fornecer uma alternativa totalmente automatizada para metodologias atuais usadas para determinar o status de amplificação do gene HER2. O desempenho do Leica HER2 FISH System - 30 Test no BOND-III System foi avaliado em um estudo independente comparando os resultados do Leica HER2 FISH System -

30 Test para o ensaio do Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit em 300 amostras de tumor de mama. Nenhuma dessas amostras de tumor foi obtida de pacientes em estudos clínicos com Herceptin®. Os resultados indicaram uma concordância de 99,67% em uma análise 2x2 (95% de intervalos de segurança de 98,16–99,99%). Os dados de concordância também indicam que um resultado positivo com o Leica HER2 FISH System - 30 Test é altamente provável a corresponder com um resultado positivo no ensaio Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit. O Leica HER2 FISH System - 30 Test é interpretado como negativo para a amplificação do gene HER2 quando a razão do gene HER2:CEP17 for menor que 2,0 e positivo quando a razão do gene HER2:CEP17 for maior ou igual a 2,0. Os resultados ambíguos (limítrofes), nos quais a razão do gene HER2:CEP17 está entre ou é igual a 1,8-2,2 devem ser interpretados com cuidado. Conte 20 núcleos adicionais e recalcule a razão.

Princípios do procedimento

O Leica HER2 FISH System - 30 Test contém os componentes exigidos para completar uma hibridização por fluorescência *in situ* baseada no procedimento de coloração para tecidos embebidos em parafina e fixados com formol. Após o pré-tratamento adequado, a incubação com a LSI HER2/CEP17 Dual Probe pronta para uso e a lavagem de rigor apropriado, as secções do tecido são desidratadas e montadas com DAPI. Os resultados são interpretados por um microscópio de fluorescência usando os filtros recomendados em comprimentos de onda adequados.

O Leica HER2 FISH System - 30 Test é apenas para uso no BOND-MAX and BOND-III System.

Componentes fornecidos

Os materiais listados abaixo (Tabela 1) são suficientes para colorir 30 testes (30 lâminas coloridas com LSI HER2/CEP17 Dual Probe).

LSI HER2/CEP17 Probe 6,6 mL	Contém o LSI HER2/CEP17 Dual Probe pronto para o uso. Contém <60% (v/v) formamida.
Post Hybridization Wash 2 9 mL	Contém a solução para lavagem pós-hibridização pronta para uso. Contém <50% (v/v) formamida.
BOND Enzyme Concentrate 2 1 mL	Contém uma solução de Proteinase K em 1,7 mg/ml.
BOND Enzyme Diluent 65 mL	Contém diluente de enzimas.
BOND Open Container 3 x 7 mL	BOND Open Container utilizado para Enzyme 5.

Tabela 1: Componentes do Leica HER2 FISH System - 30 Test

Consulte o MSDS individual para mais informações sobre segurança do produto, disponível em www.LeicaBiosystems.com/TA9217 - IFU

Instruções de uso

Todos os reagentes fornecidos são especificamente formulados para usar com este ensaio e os números de lotes são específicos para cada Leica HER2 FISH System - 30 Test. Para que o ensaio seja válido, não se deve fazer nenhuma substituição.

Armazenamento e estabilidade

Armazene a 2–8 °C. Não congele. Volte a 2–8 °C imediatamente após o uso. Qualquer desvio dessas condições invalidará o ensaio. Certifique-se de que o Leica HER2 FISH System - 30 Test seja usado dentro de sua data de validade designada. Os sinais que indicam contaminação e/ou

instabilidade do Leica HER2 FISH System - 30 Test são a turbidez das soluções (com exceção da solução da sonda) e desenvolvimento de odor. O usuário deve verificar as condições de armazenamento que não sejam as especificadas acima.

Preparação da amostra

Os métodos padrão de processamento de tecidos devem ser usados para todas as amostras (20). Recomenda-se que os tecidos sejam preparados em fixadores baseados em formol e diariamente processados e embebidos em parafina. Por exemplo, amostras devem ter uma espessura de 3–4 mm e fixadas por 18–24 horas em 10% de formol tamponado neutro. Os tecidos devem ser desidratados em uma série de álcoois e limpas com xileno, seguidos pela impregnação com cera de parafina fundida, mantida a 60 °C, no máximo. As amostras de tecido devem ser seccionadas entre 4-6 µm.

As secções de tecidos agrupadas em lâminas carregadas (BOND Plus Slides – cód. de produto S21.2113 ou Apex BOND Slides cód. de produto 3800040) podem ser armazenadas por até 12 meses a 2–8 °C antes da coloração. Após o seccionamento, é recomendado que as lâminas sejam incubadas a 60 °C por uma hora. As secções coloridas devem ser armazenadas a -20 °C para preservar o sinal fluorescente e evitar o desbotamento. Permita que as lâminas armazenadas cheguem à temperatura ambiente antes da leitura.

Advertências e precauções

Para usuários profissionais somente.

Um ou mais componentes no produto são perigosos e podem causar dano ao feto.

Como regra, as pessoas com menos de 18 anos não podem trabalhar com este produto. Os usuários devem ser cuidadosamente instruídos sobre o procedimento de trabalho, as propriedades perigosas do produto e as instruções de segurança necessárias.

As amostras, antes e depois da fixação, bem como todos os materiais expostos a elas, devem ser manuseadas como se fossem capazes de transmitir doenças infecciosas e descartadas com as devidas precauções.

Nunca pipete reagentes com a boca e evite o contato da pele e membranas mucosas com reagentes e amostras. Se os reagentes ou as amostras entrarem em contato com áreas sensíveis, lave-as com água corrente abundante. Procure aconselhamento médico. Consulte as regulamentações federais, estaduais ou locais para descartar componentes potencialmente tóxicos.

Minimize a contaminação microbiana de reagentes para que não ocorra uma coloração não específica.

Procedimento

A. Reagentes necessários, mas não fornecidos

- BOND Dewax Solution (AR9222)
- BOND Epitope Retrieval Solution 1 (AR9961)
- BOND Wash Solution x10 Concentrate (AR9590)
- Solventes padrão usados em ensaios baseados em hibridização em fluorescência *in situ* (por exemplo, etanol, absoluto e graduado)
- Água destilada ou desionizada
- Contracorante DAPI
- Leica HER2 FISH Control Slides (TA9123)
- BOND Aspiring Probe Cleaning System (CS9100)

B. Equipamentos necessários, mas não fornecidos

- Pipetas (capazes de medir volumes de 1-20 µl e 100 – 1000 µl)
- Lâminas carregadas (BOND Plus Slides – cód. de produto S21.2113 ou Apex BOND Slides cód. de produto 3800040)
- BOND-MAX (21.0051) or BOND-III (21.2201)
- BOND Universal Covertiles™ (S21.2001, S21.4583 ou S21.4611)
- BOND Mixing Stations (S21.1971)
- BOND Slide Label & Print Ribbon (S21.4564)
- Lamínulas
- Incubadora (capaz de manter 60 °C)
- Microscópio de fluorescência (objetiva 60-100x) com fonte de luz adequada. Registre o número de horas em que a lâmpada foi usada e substitua-a antes de exceder o tempo

classificado. Certifique-se de que a lâmpada está alinhada adequadamente.

- Conjunto de filtro de fluorescência adequada (SpectrumOrange™ – Pico de agitação em 559 nm, pico de emissão em 588 nm, SpectrumGreen™ – pico de agitação em 497 nm, pico de emissão em 524 nm e DAPI – pico de agitação em 367 nm, pico de emissão em 452 nm). Conjuntos de filtro de microscópio de fluorescência com multibandpass otimizados para uso com o Leica HER2 FISH System - 30 Test estão disponíveis para a maioria dos modelos dos microscópios. Os conjuntos de filtro recomendados para o Leica HER2 FISH System - 30 Test são DAPI/9-Orange bandpass duplo, DAPI/Green bandpass duplo, Green/Orange(V.2) bandpass duplo e o DAPI/Green/Orange (V.2) bandpass triplo.

C. Metodologia

- Antes de adotar essa metodologia, os usuários devem ser adequadamente treinados na técnica de fluorescência *in situ* automatizada.
- Cada secção de teste colorida com a LSI HER2/CEP17 Dual Probe permite a análise da mesma célula do HER2 e dos sinais do cromossomo centromérico 17. Uma razão subsequente do HER2 com os sinais do cromossomo 17 permitirão que um valor quantitativo seja designado à amostra, indicando um resultado negativo (não amplificado) ou positivo (amplificado). Os resultados ambíguos (limítrofes) (1,8-2,2) devem ser interpretados com cuidado. Conte 20 núcleos adicionais e recalcule a razão.

D. Pré-tratamento da enzima BOND

Antes de colorir, dilua o BOND Enzyme Concentrate 2 fornecido em uma diluição 1:300 usando o BOND Enzyme Diluent fornecido em um dos BOND Open Containers fornecidos. Por exemplo, para colorir 10 lâminas, prepare 3 ml da solução de enzima de trabalho ao diluir 10 µl do BOND Enzyme Concentrate 2 em 2990 µl de BOND Enzyme Diluent. É recomendado que a enzima esteja preparada recentemente antes de cada execução de coloração e que um volume mínimo de 900 µl seja usado por execução.

E. Protocolo de coloração padrão

É recomendado que o Leica HER2 FISH System - 30 Test seja usado com o protocolo de coloração recomendado, mostrado na Tabela 2 abaixo.

Tipo de protocolo	Nome do protocolo
Coloração	*FISH Protocol A
Preparação	*Dewax
HIER	*HIER 25 min with ER1 (97)
Enzimas	*Enzyme 5 for 25 min
Desnaturação	*D10
Hibridização	*ISH Hybridization (12Hr)

Tabela 2: Leica HER2 FISH System - 30 Test Staining Protocol

F. Etapas de procedimento

Essas instruções devem ser lidas em conjunto com o manual do usuário BOND-MAX and BOND-III System. Um BOND Universal Covertile novo deve ser usado com cada lâmina. O uso das BOND Universal Covertiles que foram previamente utilizadas para coloração imuno-histoquímica ou por hibridização *in situ* não foi validado com este teste.

1. No aparelho BOND-MAX and BOND-III System, certifique-se de que os recipientes a granel e de resíduos perigosos tenham capacidade suficiente para realizar as operações de coloração necessárias.
2. Certifique-se de que haja álcool adequado, água destilada ou desionizada, BOND Dewax Solution, BOND Epitope Retrieval Solution 1 e BOND Wash Solution nos recipientes de reagentes a granel, para desenvolver a execução da coloração.
3. Assegure-se de que uma BOND Mixing Station limpa esteja instalada.
4. Ligue o BOND-MAX and BOND-III System.

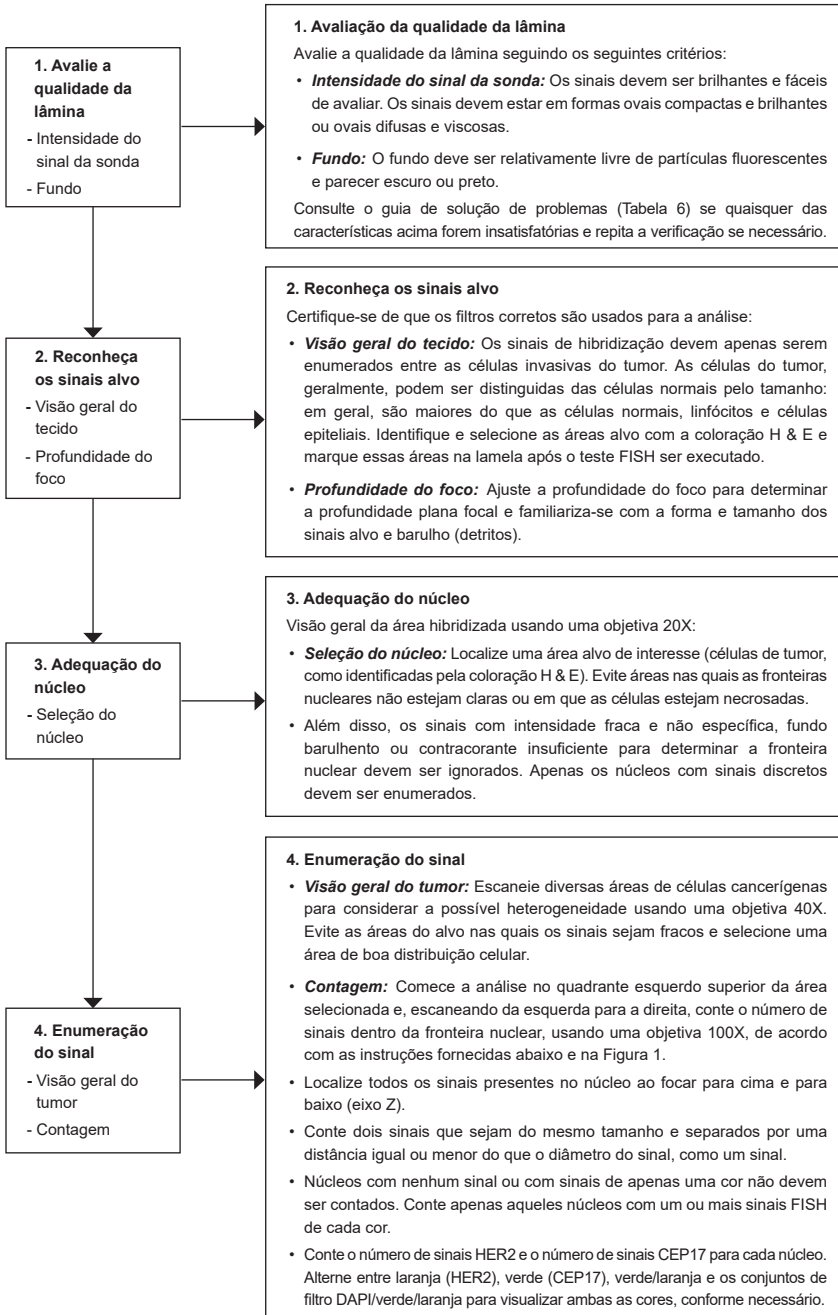
5. Ligue o computador anexo ao BOND-MAX and BOND-III System.
6. Abra o software BOND.
7. Para um kit Leica HER2 FISH System - 30 Test novo, escaneie os códigos de barras da bandeja reagente com o scanner portátil para inserir o sistema no inventário de reagentes BOND (apenas um único código de barras).
8. Prepare a BOND Enzyme 5 no BOND Open Container fornecido, em uma diluição de 1:300. Por exemplo, para 10 lâminas, acrescente 10 µl do BOND Enzyme Concentrate 2 a 2990 µl do BOND Enzyme Diluent.
9. Escaneie no BOND Open Container fornecido e registre como **Bond Enzyme 5**.
10. Vá até a tela de configuração Lâmina e clique em **Adicionar caso**.
11. Insira os detalhes para o primeiro caso. Certifique-se de que o volume no recipiente seja de **150 µl** e de que o protocolo de preparação seja o ***Dewax**. Clique em **OK**.
12. Com o estojo selecionado na tela de configuração Slide, clique em **Adic. lâmina**.
13. Primeiro, adicione as lâminas de teste do paciente. Assegure-se de que o tipo de tecido esteja definido como **Tecido de teste**.
14. Selecione o modo de coloração **Única**.
15. Selecione o processo **ISH**.
16. Selecione ***LSI HER2/CEP17 Dual Probe – 30 Test** na lista de sondas. Os padrões da guia Protocols para o protocolo de coloração correto (***FISH Protocol A**), protocolo HIER (***HIER 25 min with ER1 (97)**), protocolo EIER (***Enzyme 5 for 25 min**), desnaturação (***D10**) e hibridização (**ISH Hybridization (12Hr)**).
17. Repita as etapas de 10 a 16 até que as lâminas e controles do teste do paciente (lâminas de controle Leica HER2 FISH e/ou controles internos) tenham sido criados. Imprima os rótulos das lâminas.
18. Coloque os rótulos nas lâminas corretamente.
19. Abra as tampas de todos os recipientes do Leica HER2 FISH System - 30 Test e encha a bandeja de reagente no BOND-MAX and BOND-III System.
20. Aplique novos Covertiles a cada lâmina.
21. Carregue o bandeja de lâminas no BOND-MAX and BOND-III System e pressione o botão **Carregar/Descarregar**.
22. Confirme se as lâminas foram escaneadas e clique no botão **Run (Play)** na tela de status do sistema para iniciar a execução imediatamente (para o Leica HER2 FISH System - 30 Test é recomendado que esse ensaio seja realizado durante a noite, utilizando a funcionalidade início atrasado).
23. Certifique-se de que o campo do indicador de bandeja exibe **Proc (OK)** e de que o número do lote e a hora de conclusão sejam exibidos.
24. Quando a operação for concluída, pressione o botão **Carregar/Descarregar** e remova as bandejas de lâminas do BOND-MAX and BOND-III System.
25. Remova os Covertiles e enxágue as lâminas com água desionizada.
26. Desidrate rapidamente em duas alterações de álcool, ar seco.
27. Despeje 20 µl de DAPI diretamente na amostra.
28. Aplique a lamela e deixe a solução espalhar em toda a sua extensão, tomando cuidado de remover quaisquer bolhas de ar.
29. Sele a borda da lamela com esmalte ou selante similar.
30. Coloque as lâminas no escuro para facilitar o desenvolvimento do sinal antes da visualização sob o microscópio de fluorescência.
31. Para preservar a intensidade do sinal, armazene as lâminas coloridas a -20 °C.

G. Armazenamento das lâminas

Armazene as lâminas coloridas a -20 °C no escuro. Deixe que as lâminas cheguem à temperatura ambiente antes de visualizar, seguindo a remoção de -20 °C.

Enumeração e avaliação dos sinais

Para avaliar a qualidade do sinal e enumerar os sinais do HER2 e CEP17, siga o processo abaixo:



Método recomendado para determinação de razão LSI HER2 a CEP17

Para determinar a razão LSI HER2 a CEP17, use o seguinte método:

1. Registre e determine o número de sinais LSI HER2 e CEP17 em 20 núcleos (veja a folha de classificação Leica HER2 FISH System - 30 Test na Figura 2 abaixo).
2. Totalize todos os sinais de LSI HER2. Isso representa o total de sinais LSI HER2 para a contagem, por exemplo 143.
3. Totalize todos os sinais CEP17. Isso representa o total de sinais CEP17 para a contagem, por exemplo 48.
4. Para calcular o resultado final, use o seguinte cálculo:

Total de sinais LSI HER2 dividido pelo Total de sinais CEP17,
por exemplo $143/48$ igual à razão de 2,98, o que é positivo para a amplificação do HER2.

Observação importante: Se a razão LSI HER2 a CEP17 for ambígua (1,80 - 2,20), conte mais 20 núcleos e recalcule a razão.

Os resultados devem ser relatados como segue:

1. Se a razão for <2 , a amplificação do gene HER2 não foi observada
2. Se a razão for ≥ 2 , a amplificação do gene HER2 foi observada

Observação importante: Uma razão no limite ou próxima dele (1,80 - 2,20) deve ser interpretada com cuidado, como descrito acima.

Guia de Interpretação do Leica HER2 FISH System - 30 Test

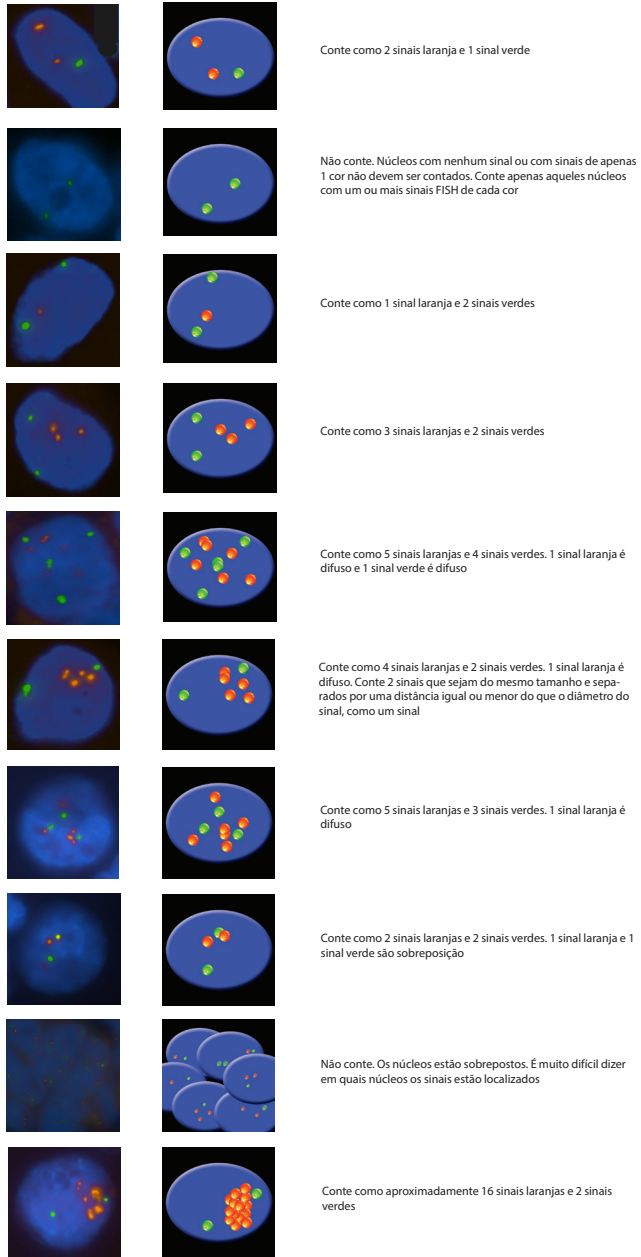


Figura 1: Guia de interpretação

Folha de classificação Leica HER2 FISH System - 30 Test

Contagem do sinal de 20 núcleos					
Nº do núcleo	Número da cópia do HER2	Número da cópia do CEP17	Nº do núcleo	Número da cópia do HER2	Número da cópia do CEP17
1			11		
2			12		
3			13		
4			14		
5			15		
6			16		
7			17		
8			18		
9			19		
10			20		
Total 1-10			Total 11-20		

	HER2	CEP17	Razão de amplificação HER2:CEP17
Classificação total 1-20			
Média por célula			

Figura 2: Folha de classificação de amostras

Método automatizado Ariol® para a determinação HER2 FISH

A utilização da aplicação da classificação digital Ariol PathVysion® como uma ajuda na interpretação foi validada independentemente num coorte diferente de amostras para utilização com o Leica HER2 FISH System. A aplicação da classificação digital Ariol PathVysion, quando utilizada em conjunção com o Leica HER2 FISH System, destina-se a utilização em Diagnóstico “In Vitro”. Quando utilizada com o Leica HER2 FISH System, a aplicação Ariol PathVysion deverá ser calibrada para que possa ser utilizada em lâminas de controlo de tecidos, **não** nas Leica HER2 FISH Control Slides (TA9123).

Todas as decisões de diagnóstico são efetuadas pelo clínico qualificado.

Para mais informações, consulte o manual do utilizador Ariol.

Controle de qualidade

Uso de lâminas de controlo

É recomendado que uma Leica HER2 FISH Control Slide seja incluída em cada teste executado para monitorar o desempenho da verificação e para testar a precisão da enumeração de sinais. As lâminas de controlo devem ser executadas para cada lote de coloração no BOND-MAX and BOND-III System e com cada novo lote de reagente. Além disso, os usuários individuais podem optar por usar seu próprio material de controlo.

Avalie a qualidade da lâmina de controlo e realize a enumeração de sinais de acordo com as instruções na seção **Avaliação e enumeração de sinais**. Os critérios para a qualidade da lâmina devem ser atingidos e os resultados da razão HER2:CEP17 devem estar dentro das faixas estabelecidas para o desempenho aceitável do teste. Veja a Tabela 3 para critérios de aceitação das Leica HER2 FISH Control Slides.

Linha da célula	Perfil do Bond Oracle HER2 IHC System	Carga do receptor de HER2 por célula*	Crítérios de aceitação Leica HER2 FISH System - 30 Test HER2:CEP17
SKBr-3	3+	$4,3 \times 10^5$	A amplificação do HER2 é observada
MDA-MB-453	2+	$1,4 \times 10^5$	A razão do gene HER2/CEP17 deve estar entre 1,5 - 2,5
MDA-MB-175	1+	$6,3 \times 10^4$	A amplificação do HER2 não é observada
MDA-MB-231	0	$9,3 \times 10^3$	A amplificação do HER2 não é observada

*Análise de carga do receptor de HER2 avaliada pela citometria de vazão

Tabela 3: Interpretação Leica HER2 FISH Control Slide

Se a verificação de controlo falhar, os resultados FISH para esse caso não devem ser relatados. Se as lâminas de controlo falharem em satisfazer os critérios de aceitação, o Leica HER2 FISH System - 30 Test pode ter sido executado incorretamente. Nesse exemplo, um teste repetido com lâminas de controlo frescas e lâmina(s) de amostra do paciente será exigido. Se os resultados estiverem fora da faixa especificada, mas as lâminas de controlo satisfizerem os critérios de aceitação para a qualidade, pode ser recomendado a repetição da triagem da mesma lâmina pode ser apropriada, já que a enumeração pode não ter sido executada corretamente. Consulte o guia de solução de problemas (Tabela 6) no caso de falha da hibridização, tanto com a amostra quanto com a(s) lâminas(s) de controlo.

Para amostras clínicas, quando a interpretação do sinal de hibridização for difícil e houver amostras insuficientes para um novo ensaio, o teste não é informativo. Se há células insuficientes para análise, o teste não é informativo.

As amostras de pacientes devem ser controladas de acordo com os procedimentos padronizados de funcionamento do laboratório. Os resultados de enumeração e qualidade de sinal devem ser documentados no formato adequado de um relatório.

Limitações

A. Limitações gerais

FISH é uma técnica que precisa de treinamento especializado em todos os aspectos do procedimento (incluindo a seleção de reagentes adequados, tecidos, fixação, processamento e preparação da lâmina IHC) e de interpretação. A coloração do tecido depende do manuseio, da fixação e processamento do tecido antes da coloração. A fixação, o congelamento, o degelo, a lavagem, a secagem, o aquecimento, o seccionamento incorretos ou a contaminação por outros tecidos ou fluidos podem produzir degradação de ácido nucleico artificial morfológico, fluorescência do fundo ou resultados negativos falsos. Os resultados inconsistentes podem ser provenientes das variações de fixação, métodos de inclusão ou irregularidades inerentes dentro do tecido (21). A contracoloração excessiva ou incompleta também pode comprometer a interpretação correta dos resultados.

A coloração não específica como um resultado de sonda desacoplada tem uma aparência granular difusa e pode ser visualizada à distância do local esperado de hibridização. Use células intactas para a interpretação de resultados da coloração. As células degeneradas ou necrosadas podem colorir de forma não específica (22). A coloração FISH inesperada ou as variações na coloração podem ser resultado de alterações nos níveis de expressão da codificação de genes. Qualquer alteração nos padrões de coloração esperados deve ser interpretada em associação com todas as outras investigações de diagnóstico. A interpretação da coloração deve ser complementada por estudos morfológicos e pelo uso de material de controle adequado, além de ser avaliada dentro do contexto do histórico clínico do paciente e de outros testes de diagnósticos, realizados por um patologista qualificado.

A realização do ensaio (ou seja, as avaliações da adequação dos materiais de controle) e a interpretação de qualquer coloração imuno-histoquímica ou sua ausência devem ser executadas em um laboratório devidamente credenciado/licenciado sob a supervisão de um patologista qualificado e experiente que seja responsável pela avaliação geral do ensaio de hibridização *in situ* e sua interpretação. Os resultados negativos falsos em FISH podem ser devidos à reação cruzada da sonda com outras sequências de ácido nucléico e/ou vinculação não específica. Os controles apropriados devem ser usados e documentados, e testes devem levar em consideração todas as datas de validade relevantes.

A variação técnica e de interpretação também pode ser vista quando FISH é usado em materiais derivados da linha de células (23).

B. Limitações específicas do produto

Este produto não é projetado para uso em qualquer outra verificação de diagnóstico baseada em DNA.

Não substitua os reagentes do Leica HER2 FISH System - 30 Test por nenhum outro componente fornecido pela Leica Biosystems ou por outros fabricantes. Isso invalidará o ensaio. O usuário deve validar quaisquer desvios dos procedimentos recomendados.

No ensaio, é recomendado usar apenas tecidos presos em fixadores baseados em formol. O uso de qualquer outro tipo de fixador pode invalidar o ensaio.

O corte de seções de tecidos fora da faixa de espessura recomendada não será validado. O uso de qualquer outra espessura de seção pode invalidar o ensaio.

Concordância clínica do Leica HER2 FISH System - 30 Test para Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Mama

Este estudo examinou a adequação do Leica HER2 FISH System - 30 Test para uso como um auxiliar na determinação de tratamento para terapia com Herceptin (trastuzumab). O estudo foi designado para examinar a concordância entre o Leica HER2 FISH System - 30 Test e um dispositivo de diagnóstico previamente aprovado, o Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, considerado como o “padrão de ouro” para essa verificação em tecido mamário. O critério de aceitação para o teste foi que o menor limite de 95% de intervalo de segurança de um lado é maior do que 90% entre o Leica HER2 FISH System - 30 Test e o manual Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, entre casos de câncer de mama invasivos embebidos em parafina (FFPE), fixados com formol, positivos (amplificados) e negativos (não amplificados).

O estudo foi conduzido com amostras de três locais, avaliação mascarada de carcinoma de mama invasivo clínico. Cada um dos locais de investigação foram abastecidos com blocos de tecido de carcinoma de mama invasivo embebidos em parafina, fixados em formol arquivados com níveis de expressão da oncoproteína HER2 conhecidos. Um coorte de 300 amostras consistindo em 75, 0/1+ casos IHC previamente caracterizados; 150, 2+ casos IHC previamente caracterizados; e 75, 3+ casos IHC previamente caracterizados foram selecionados e divididos igualmente em cada um dos três locais de teste de investigação.

Todos os casos foram coloridos com o manual Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit Assay de acordo com as instruções de uso do fabricante, como especificado na bula. As secções sequenciais de cada caso foram coloridas com o Leica HER2 FISH System - 30 Test no BOND-MAX and BOND-III System.

Todas as lâminas coloridas foram mascaradas e classificadas de maneira aleatória por um único observador treinado em cada um dos três locais de teste de investigação. As classificações foram interpretadas como negativas com uma razão de gene HER2/CEP17 de $<2,0$ e positivo com uma razão do gene calculada HER2/CEP17 de $\geq 2,0$. Os dados foram analisados para concordância, pelo acordo de coloração positiva e o acordo de coloração negativa.

Resultados de concordância 2x2 BOND-MAX System - Mama

Os dados foram agrupados como negativos ($<2,00$) ou positivos ($\geq 2,00$) para uma análise 2x2. O acordo observado para 300 amostras entre os dois testes em uma análise 2x2 mostra uma concordância de 99,33% (298/300) com um 95% CI de 97,61–99,92% para o BOND-MAX System.

A porcentagem do acordo positivo (sensibilidade) ou a habilidade do Leica HER2 FISH System - 30 Test identificar corretamente os casos positivos da verificação Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe (a porcentagem de amostras classificadas positivas tanto para o Leica HER2 FISH System - 30 Test e o manual Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) foi de 99,03% (102/103).

A porcentagem do acordo negativo (especificidade) ou a habilidade do teste em identificar corretamente os casos negativos Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (a porcentagem de amostras classificadas negativas tanto para o Leica HER2 FISH System - 30 Test e Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) foi de 99,49% (196/197). Veja a tabela 4.

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

Concordância geral (95% CI) = 99,33% (97,61 - 99,92%)

Tabela 4. Concordância 2x2 de Leica HER2 FISH System - 30 Test no BOND-MAX System com Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit em tecido mamário.

Resultados de concordância 2x2 BOND-III System - Mama

Os dados foram agrupados como negativos ($<2,00$) ou positivos ($\geq 2,00$) para uma análise 2x2. O acordo observado para 300 amostras entre os dois testes em uma análise 2x2 mostra uma concordância de 99,67% (299/300) com um 95% CI de 98,16–99,99% para o BOND-III System. A percentagem do acordo positivo (sensibilidade) ou a habilidade do Leica HER2 FISH System - 30 Test em identificar corretamente os casos positivos da verificação Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (a percentagem de amostras classificadas positivas tanto para o Leica HER2 FISH System - 30 Test e o manual Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit fora de todos os casos positivos Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) foi de 99,03% (102/103).

A percentagem do acordo negativo (especificidade) ou a habilidade do teste em identificar corretamente os casos negativos Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (a percentagem de amostras classificadas negativas tanto para o Leica HER2 FISH System - 30 Test e Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit fora de todos os casos negativos Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) foi de 100% (197/197). Veja a tabela 5.

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

Concordância geral (95% CI) = 99,67% (98,16 - 99,99%)

Tabela 5. Concordância 2x2 de Leica HER2 FISH System - 30 Test no BOND-III System com Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit em tecido mamário.

Concluindo, os dados gerados neste estudo demonstram que o Leica HER2 FISH System - 30 Test pode ser usado como um auxiliar na avaliação de pacientes para os quais o tratamento com Herceptin (trastuzumab) seja considerado, baseado em sua alta concordância com Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, um teste de diagnóstico previamente aprovado para esta indicação.

Concordância clínica do Leica HER2 FISH System - 30 Test com o Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Gástrico

Este estudo examinou a adequação do Leica HER2 FISH System - 30 Test para uso como um auxiliar na determinação de tratamento para terapia com Herceptin (trastuzumab). O estudo foi designado para examinar a concordância entre o Leica HER2 FISH System - 30 Test e um dispositivo de diagnóstico previamente aprovado, o Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, considerado como o "padrão de ouro" para essa verificação em tecido gástrico. O critério de aceitação para o teste foi que o menor limite de 95% de intervalo de segurança de um lado é maior do que 90% entre o Leica HER2 FISH System - 30 Test e o manual Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, entre casos de adenocarcinomas do estômago embebidos em parafina (FFPE), fixados com formol, positivos (amplificados) e negativos (não amplificados) (incluindo junção gastroesofágica). O estudo foi conduzido como amostras de adenocarcinoma gástrico invasivo clínico. O teste foi realizado em blocos de tecido de adenocarcinoma gástrico arquivados, embebidos em parafina, fixados com formol com níveis expressivos de gene HER2. Uma coorte de 109 amostras que consistem em 50 casos amplificados e 59 casos não amplificados foi selecionada.

Todos os casos foram coloridos com o manual Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit Assay de acordo com as instruções de uso do fabricante, como especificado na bula. As seções sequenciais de cada caso foram coloridas com o Leica HER2 FISH System - 30 Test no BOND-MAX System.

Todas as lâminas coloridas foram classificadas de maneira aleatória por um único observador treinado. As classificações foram interpretadas como negativas com uma razão de gene HER2/CEP17 de $<2,0$ e positivo com uma razão do gene calculada HER2/CEP17 de $\geq 2,0$. Os dados foram analisados para concordância, pelo acordo de coloração positiva e o acordo de coloração negativa.

2x2 Resultados de concordância BOND-MAX System - Gástrico

Os dados foram agrupados como negativos ($<2,00$) ou positivos ($\geq 2,00$) para uma análise 2x2. O acordo observado para 109 amostras entre os dois testes em uma análise 2x2 mostra uma concordância de 98,17% (107/109) com um 95% CI de 93,53–99,78% para o BOND-MAX System.

A porcentagem do acordo positivo (sensibilidade) ou a habilidade do Leica HER2 FISH System - 30 Test identificar corretamente os casos positivos da verificação Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe (a porcentagem de amostras classificadas positivas tanto para o Leica HER2 FISH System - 30 Test e o manual Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit fora de todos os casos positivos Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) foi de 96,00% (48/50).

A porcentagem do acordo negativo (especificidade) ou a habilidade do teste em identificar corretamente os casos negativos Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (a porcentagem de amostras classificadas negativas tanto para o Leica HER2 FISH System - 30 Test e Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit fora de todos os casos negativos Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) foi de 100% (59/59). Veja a tabela 6.

		Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit		
		Negativos (<2,0)	Positivos ($\geq 2,0$)	Totais
Leica HER2 FISH System - 30 Test BOND-MAX	Negativos (<2,0)	59	2	61
	Positivos ($\geq 2,0$)	0	48	48
	Totais	59	50	109

Concordância geral (95% CI) = 98.17% (93.53–99.78%)

Tabela 6. Concordância 2x2 de Leica FISH System- 30 Test no Leica BOND Max System com Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit no tecido gástrico.

Teste de precisão – BOND-MAX System

A. Estudo de precisão dentro do funcionamento

O estudo de precisão dentro do funcionamento foi executado de modo cego e aleatório. O teste de precisão dentro do funcionamento do Leica HER2 FISH System - 30 Test foi avaliado em um único local de investigação em 540 amostras de TMA caracterizadas previamente HER2 contendo casos de câncer de mama embebidos em parafina e fixados com formol. O uso de TMAs para a determinação da precisão dentro do funcionamento permitiu um volume maior de casos cobrindo uma faixa mais ampla da expressão HER2 dentro de uma única execução em um único instrumento.

Na enumeração das lâminas coloridas com o estudo de precisão dentro da operação, 532/540 dos casos avaliados demonstraram um resultado concordante, dando uma concordância geral de 98,52% com uma CI menor 95% de 97,10%.

B. Estudo de precisão dentro do instrumento

O estudo de precisão dentro do instrumento foi executado de modo cego e aleatório. O teste de precisão dentro do instrumento do Leica HER2 FISH System - 30 Test foi avaliado em um único local de investigação em 1620 amostras de TMA caracterizadas previamente HER2 contendo casos de câncer de mama embebidos em parafina e fixados com formol. O uso de TMAs para a determinação da precisão dentro do instrumento permitiu um volume maior de casos cobrindo uma faixa mais ampla da expressão HER2 dentro de execuções múltiplas em um único instrumento.

Na enumeração das lâminas coloridas com o estudo de precisão dentro do instrumento, 1620/1620 dos casos avaliados demonstraram um resultado concordante, dando uma concordância geral de 100% com uma CI menor 95% de 99,82%.

C. Estudo de precisão entre operações

O estudo de precisão entre as operações foi executado de modo cego e aleatório. O teste de precisão entre o funcionamento do Leica HER2 FISH System - 30 Test foi avaliado em um único local de investigação em 900 amostras de TMA caracterizadas previamente HER2 contendo casos de câncer de mama embebidos em parafina e fixados com formol. O uso de TMAs para a determinação da precisão entre a operação, teste de precisão dia-a-dia permitiu um volume maior de casos cobrindo uma faixa mais ampla da expressão do HER2 a ser testada dentro de execuções em dias diferentes.

Na enumeração das lâminas coloridas com o estudo de precisão entre as operações, 894/900 dos casos avaliados demonstraram um resultado concordante, dando uma concordância geral de 99,33% com uma CI menor 95% de 98,55%.

D. Estudo de precisão entre laboratórios

O estudo de precisão entre laboratórios foi executado de modo cego e aleatório. O teste de precisão entre laboratórios do Leica HER2 FISH System - 30 Test foi avaliado entre três locais de investigação em 513 amostras de TMA caracterizadas previamente HER2 contendo casos de câncer de mama embebidos em parafina e fixados com formol. O uso de TMAs para a determinação do teste de precisão entre laboratórios permitiu um volume maior de casos cobrindo uma faixa mais ampla da expressão do HER2 a ser testada entre execuções em instrumentos múltiplos.

Na enumeração das lâminas coloridas com o estudo de precisão entre laboratórios, 510/513 dos casos avaliados demonstraram um resultado concordante, dando uma concordância geral de 99,42% com uma CI menor 95% de 98,30%.

E. Estudo de precisão entre observadores

O estudo de precisão entre observadores foi executado de modo cego e aleatório. O teste de reprodutibilidade entre observadores do Leica HER2 FISH System - 30 Test foi avaliado entre três locais de investigação. Um único observador com experiência em cada local de investigação foi usado. Dezoito casos de câncer de mama da secção inteira foram usados para a precisão entre observadores, refletindo tipos de amostras usadas em ambiente clínico.

Na enumeração das lâminas coloridas com o estudo de precisão entre observadores, 53/54 dos casos avaliados demonstraram um resultado concordante, dando uma concordância geral de 98,15% com uma CI menor 95% de 90,11%.

F. Estudo de precisão lote a lote

O estudo de precisão lote-a-lote foi executado de modo cego e aleatório. A precisão lote-a-lote foi determinada em três lotes fabricados independentemente do Leica HER2 FISH System - 30 Test, fabricados sob a Boa prática de fabricação (GMP). Cada lote foi testado em um único local de investigação em 540 amostras TMA HER2 previamente caracterizadas, contendo casos de câncer de mama embebidos em parafina e fixados com formol. O uso de TMAs para a determinação da reprodutibilidade lote-a-lote permite um volume maior de casos cobrindo uma faixa mais ampla da expressão HER2 a ser testada entre lotes.

Na enumeração das lâminas coloridas com o estudo de precisão lote-a-lote, 534/540 dos casos avaliados demonstraram um resultado concordante, dando uma concordância geral de 98,89% com uma CI menor 95% de 97,60%.

Teste de precisão – BOND-III System

G. Estudo de precisão dentro da operação

O estudo de precisão dentro da operação foi executado de modo cego e aleatório. O teste de precisão dentro da operação do Leica HER2 FISH System - 30 Test foi avaliado em um único local de investigação em 540 amostras de TMA caracterizadas previamente HER2 contendo casos de câncer de mama embebidos em parafina e fixados com formol. O uso de TMAs para a determinação da precisão dentro da operação permitiu um volume maior de casos cobrindo uma faixa mais ampla da expressão HER2 dentro de uma única execução em um único instrumento.

Na enumeração das lâminas coloridas com o Estudo de precisão dentro da operação, 540/540 dos casos avaliados demonstraram um resultado concordante, dando uma concordância geral de 100% com uma CI menor 95% de 99,45%.

H. Estudo de precisão dentro do instrumento

O estudo de precisão dentro do instrumento foi executado de modo cego e aleatório. O teste de precisão dentro do instrumento do Leica HER2 FISH System - 30 Test foi avaliado em um único local de investigação em 1620 amostras de TMA caracterizadas previamente HER2 contendo casos de câncer de mama embebidos em parafina e fixados com formol. O uso de TMAs para a determinação da precisão dentro do instrumento permitiu um volume maior de casos cobrindo uma faixa mais ampla da expressão do HER2 dentro de execuções múltiplas em um único instrumento.

Na enumeração das lâminas coloridas com o Estudo de precisão dentro da operação, 1620/1620 dos casos avaliados demonstraram um resultado concordante, dando uma concordância geral de 100% com uma CI menor 95% de 99,82%.

I. Estudo de precisão entre operações

O estudo de precisão entre operações foi executado de modo cego e aleatório. O teste de precisão entre operações do Leica HER2 FISH System - 30 Test foi avaliado em um único local de investigação em 900 amostras de TMA caracterizadas previamente HER2 contendo casos de câncer de mama embebidos em parafina e fixados com formol. O uso de TMAs para a determinação da precisão entre o funcionamento, teste de precisão dia-a-dia permitiu um volume maior de casos cobrindo uma faixa mais ampla da expressão HER2 a ser testada dentro de execuções em dias diferentes.

Na enumeração das lâminas coloridas com o Estudo de precisão entre operações, 891/900 dos casos avaliados demonstraram um resultado concordante, dando uma concordância geral de 99,00% com uma CI menor 95% de 98,11%.

J. Estudo de precisão entre laboratórios

O estudo de precisão entre laboratórios foi executado de modo cego e aleatório. O teste de precisão entre laboratórios do Leica HER2 FISH System - 30 Test foi avaliado entre três locais de investigação em 513 amostras de TMA caracterizadas previamente HER2 contendo casos de câncer de mama embebidos em parafina e fixados com formol. O uso de TMAs para a determinação do teste de precisão entre laboratórios permitiu um volume maior de casos cobrindo uma faixa mais ampla da expressão do HER2 a ser testada entre execuções em instrumentos múltiplos.

Na enumeração das lâminas coloridas com o Estudo de precisão entre laboratórios, 511/513 dos casos avaliados demonstraram um resultado concordante, dando uma concordância geral de 99,61% com uma CI menor 95% de 98,60%.

K. Estudo de precisão entre observadores

O estudo de precisão entre observadores foi executado de modo cego e aleatório. O teste de reprodutibilidade entre observadores do Leica HER2 FISH System - 30 Test foi avaliado entre três locais de investigação. Um único observador com experiência em cada local de investigação foi usado. Dezoito casos de câncer de mama da secção inteira foram usados para a precisão entre observadores, refletindo tipos de amostras usadas em ambiente clínico.

Na enumeração das lâminas coloridas com o Estudo de precisão entre observadores, 53/54 dos casos avaliados demonstraram um resultado concordante, dando uma concordância geral de 98,15% com uma CI menor 95% de 90,11%.

L. Estudo de precisão lote a lote

O estudo de precisão lote-a-lote foi executado de modo cego e aleatório. A precisão lote-a-lote foi determinada em três lotes fabricados independentemente do Leica HER2 FISH System - 30 Test, fabricados sob a boa prática de fabricação (GMP). Cada lote foi testado em um único local de investigação em 540 amostras TMA HER2 previamente caracterizadas, contendo casos de câncer de mama embebidos em parafina e fixados com formol. O uso de TMAs para a determinação da reprodutibilidade lote-a-lote permite um volume maior de casos cobrindo uma faixa mais ampla da expressão HER2 a ser testada entre lotes.

Na enumeração das lâminas coloridas com o estudo de precisão lote-a-lote, 540/540 dos casos avaliados demonstraram um resultado concordante, dando uma concordância geral de 100% com uma CI menor 95% de 99,45%.

Robustez da avaliação

Os estudos sobre robustez foram realizados no BOND-MAX and BOND-III System para determinar a faixa de tolerância do ensaio para o tempo de recuperação de calor e temperatura; tempo de recuperação de enzimas, temperatura e concentração; tempo de desnaturação e temperatura; tempo de hibridização e temperatura; tempo de rigor de lavagem e temperatura. Os estudos de robustez que usam o protocolo padrão BOND-MAX and BOND-III System também foram executados fora dos limites recomendados como definido no documento de orientação do FDA/ORAt ORA LAB5.3 Rev1.7 para temperatura e umidade.

- Nenhuma diferença no status da amplificação foi observada quando a temperatura padrão para cada etapa dependente de calor foi elevada em 4 °C ou diminuída em 4 °C, quando comparada ao protocolo padrão Leica HER2 FISH System - 30 Test. As mais altas classificações de qualidade foram observadas nas temperaturas padrão e essas temperaturas são as recomendadas.
- Não foi observada nenhuma diferença no status da amplificação quando o tempo de recuperação do epitopo de enzima induzido (HIER) foi executado por 20 minutos e 30 minutos a 97 °C com solução BOND ER1 quando comparado ao protocolo do Leica HER2 FISH System - 30 Test padrão. As taxas de qualidade mais altas foram observadas no tempo padrão de 25 minutos e esse tempo de incubação é recomendado.

- Não foi observada nenhuma diferença no status da amplificação quando o tempo de recuperação do epítipo de enzima induzido (EIER) foi executado por 15 minutos e 35 minutos a 37 °C quando comparado ao protocolo do Leica HER2 FISH System - 30 Test padrão. As taxas de qualidade mais altas foram observadas no tempo padrão de 25 minutos e esse tempo de incubação é recomendado.
- Nenhuma diferença no status de amplificação foi observada quando a concentração de enzima de recuperação do epítipo induzido de enzima (EIER) foi executado com razões de 1:200 e 1:500 de concentrado de enzimas/diluentes de enzima usando o protocolo do Leica HER2 FISH System - 30 Test protocolo padrão. As taxas de qualidade mais altas foram observadas na concentração padrão de 1:300 e essa diluição é recomendada.
- Nenhuma diferença no status de amplificação foi observada quando o tempo de desnaturação foi executado por 5 minutos e 15 minutos quando comparado ao protocolo do Leica HER2 FISH System - 30 Test padrão. As taxas de qualidade mais altas foram observadas no tempo padrão de 10 minutos e esse tempo de desnaturação é recomendado.
- Nenhuma diferença no status de amplificação foi observada quando o tempo de hibridização foi executado por 9 horas e 15 horas quando comparado ao protocolo do Leica HER2 FISH System - 30 Test padrão. As taxas de qualidade mais altas foram observadas no tempo padrão de 12 horas e esse tempo de hibridização é recomendado.
- Nenhuma diferença no status de amplificação foi observada quando o tempo de lavagem pós-hibridização foi executado por 2, 5 e 7 minutos quando comparado ao protocolo do Leica HER2 FISH System - 30 Test padrão. As taxas de qualidade mais altas foram observadas no tempo padrão de 4 minutos e esse tempo de lavagem pós-hibridização é recomendado.
- Nenhuma diferença no status de amplificação foi observada quando o Leica HER2 FISH System - 30 Test foi executado a 28 °C e umidade relativa de 30% e 16 °C e umidade relativa de 80% quando comparado com o protocolo do Leica HER2 FISH System - 30 Test padrão realizado em condições ambientes.

As operações executadas fora dos parâmetros recomendados de robustez da avaliação testados não foram validados. O uso de qualquer outro parâmetro de teste pode invalidar o ensaio.

O texto acima descreve as condições testadas e os resultados do estudo. Observe que a Leica não testou todas as combinações possíveis e não recomenda o uso de faixas não padrão para todas as condições. O protocolo do Leica HER2 FISH Staining Protocol padrão está resumido na Tabela 2.

Solução de problemas

Problema	Causa provável	Ação corretiva
Nenhum sinal/ coloração ou sinal/coloração fluorescente fraco	Fixação incorreta ou processamento da amostra de teste	Certifique-se de que a fixação baseada em formol é usada e que o cronograma de processamento é adequado para a amostra em teste.
	Leica HER2 FISH System - 30 Test com data de validade vencida está sendo usado	Certifique-se de que o Leica HER2 FISH System - 30 Test seja usado dentro de sua data de validade especificada.
	Seleção incorreta do protocolo	Certifique-se de que o padrão adequado para o *FISH Protocol A no campo de protocolo de coloração da caixa de diálogo "Adic. lâmina".
	Quantidade incorreta de reagentes dispensados	Certifique-se de que todos os reagentes BOND foram alocados para os recipientes a granel e colocados nas posições adequadas no instrumento.
	Desparafinação inadequada das lâminas	Certifique-se de que o modo *Dewax está selecionado no campo Preparation da caixa de diálogo "Adic. lâmina".
	Pré-tratamento inadequado	Certifique-se de que os protocolos de pré-tratamento padrão (HIER e Digestão Enzimática) sejam selecionados. Ajuste o protocolo de pré-tratamento (HIER e/ou Digestão de Enzimas) se necessário.
	Desnaturação inadequada	Certifique-se de que a desnaturação padrão *D10 seja selecionada.
	Hibridização inadequada	Certifique-se de que a hibridização padrão *H12 seja selecionada. Prorroge o tempo de hibridização se necessário.
	Excesso pós-hibridização lavagem	Diminua o tempo de incubação de lavagem pós-hibridização.
	Operação interrompida antes da conclusão	Com o software BOND, confirme a presença de erros reportáveis durante a operação e a abordagem de coloração conforme orientado pelo software BOND.
	Equipamento de microscópio de fluorescência inadequado <ul style="list-style-type: none"> • Conjunto de filtros inadequado • Lâmpada incorreta • Lâmpada vencida • Tipo de óleo incorreto 	Certifique-se de que todo o equipamento de microscópio de fluorescência usado é adequado para a verificação sendo executada, confirme: <ul style="list-style-type: none"> • Conjunto de filtros adequado • Lâmpada adequada • Boa resistência da lâmpada • Óleo adequado para uso em microscópio de imersão a óleo
Excesso de exposição à luz UV (fotodegradação)	Armazene as lâminas antes e depois da avaliação no escuro para preservar os sinais fluorescentes. Para manter o sinal por longo tempo, armazene as lâminas a -20 °C.	

Problema	Causa provável	Ação corretiva
Coloração de fundo/sinal fluorescente não específico	Pós-hibridização inadequada lavagem	Aumente o tempo de incubação de lavagem pós-hibridização.
	Quantidade incorreta de reagentes dispensados	Certifique-se de que todos os reagentes BOND foram alocados nos recipientes a granel e colocados nas posições adequadas no aparelho.
	Desparafinação inadequada das lâminas	Certifique-se de que o modo Dewax está selecionado no campo Preparation da caixa de diálogo "Adic. lâmina".
	Reação cruzada não específica com áreas de necrose do tecido	Certifique-se de que a fixação baseada em formol é usada e que o cronograma de processamento é adequado para a amostra em teste. Se possível, teste o estojo novamente usando outro bloco. Se não for possível, avalie e selecione as áreas que mostram melhores padrões de fixação em conjunto com uma secção colorida H&E.
	Secções aderentes a lâminas usando adesivos alternativos	Use as BOND Plus Slides – cód. de produto S21.2113 ou Apex BOND Slides cód. de produto 3800040)
Preservação ruim da morfologia do tecido	Fixação e processamento do tecido inadequada	Certifique-se de que a fixação baseada em formol é usada e que o cronograma de processamento é adequado para a amostra em teste. Se possível, teste o estojo novamente usando outro bloco. Se não for possível, avalie e selecione as áreas que mostram melhores padrões de fixação em conjunto com uma secção colorida H&E.
	Pré-tratamento inadequado	Ajuste do protocolo pré-tratamento (HIER ou Digestão enzimática).
Tecido desconectado da(s) lâmina(s) de controle/paciente	Uso do tipo incorreto ou drenagem inadequada da secção	Certifique-se de que as lâminas corretas são usadas para as secções de controle/paciente (ex.: BOND Plus Slides – cód. de produto S21.2113 ou Apex BOND Slides cód. de produto 3800040) Certifique-se de que as lâminas recebam drenagem adequada e que sejam incubadas por 1 hora a 60 °C.

Tabela 7: Guia de solução de problemas Leica HER2 FISH System - 30 Test

Se algum problema associado ao Leica HER2 FISH System - 30 Test estiver fora do escopo do

guia de solução de problemas, entre em contato com o departamento de assistência técnica ou distribuidor da Leica Biosystems para obter ajuda.

Referências

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

22. Jackson P. 2007. Quality Assurance in Immunohistochemistry. In: Immunohistochemistry, 2007 (ed. Renshaw S), PP 205–237. Scion Publishing Ltd.
23. Bartlet JMS, Ibrahim M, et al External Quality Assurance of HER2 FISH Testing: Results of a UK NEQAS Pilot Scheme. Journal of Clinical Pathology. 2006.

Contrato de licença

Este produto contém sondas PathVysion FISH fornecidas por Abbott Molecular Inc. PathVysion, LSI e CEP são marcas registradas Abbott Molecular Inc. Todos os direitos reservados. Usado sob licença.

Adições à edição anterior

Dados gástricas adicionado.

Data da edição

26 fevereiro 2020

Identificação dos símbolos

	Código do lote		Armazenamento		Código de catálogo
	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>		Fabricante	SN	Número de série
	Consulte as instruções de uso		Contém suficiente para <n> testes		Use até AAAA-MM-DD

Herceptin é uma marca registrada de Genentech, Inc. e Hoffmann-La Roche Ltd.