

Leica HER2 FISH System - 30 Test Brugsanvisning

Anvendes på Leica Biosystems' BOND-MAX and BOND-III System.

TA9217 er et *in situ*-fluorescenshybridiseringsprodukt, der er udviklet til at farve 30 test (30 objektglas farvet med LSI HER2/CEP17 Dual Probe).



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



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

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

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

Rx only

Indhold

Beregnet anvendelse	3
Til <i>in-vitro</i> -diagnostisk brug	3
Nødvendig uddannelse	3
Resumé og forklaring	3
Baggrund	3
Klinisk konkordansresumé BOND-MAX System	4
Klinisk konkordansresumé BOND-III System	4
Procedureprincipper	4
Medfølgende komponenter	5
Instruktioner for anvendelse	5
Opbevaring og stabilitet.....	5
Klargøring af prøver	6
Advarsler og forholdsregler	6
Procedure	6
A. Nødvendige reagenser, der ikke medfølger	6
B. Nødvendigt udstyr, der ikke medfølger	6
C. Metodik	7
D. BOND-enzymforbehandling	7
E. Standardfarvningsprotokol	7
F. Trin i proceduren	7
G. Opbevaring af objektglas	8
Vurdering og optælling af signaler	9
Anbefalet metode til bestemmelse af LSI HER2 til CEP17-forhold	10
Leica HER2 FISH System - 30 Test fortolkningsvejledning	11
Leica HER2 FISH System pointskema	12
Kvalitetskontrol	13
Brug af kontrolobjektglas	13
Begrænsninger	14
A. Generelle begrænsninger	14
B. Produktspecifikke begrænsninger.....	14
Klinisk konkordans for Leica HER2 FISH System - 30 Test med Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Bryst	14
2x2 konkordansresultater BOND-MAX System - Bryst	15
2x2 konkordansresultater BOND-III System - Bryst	16
Klinisk konkordans for Leica HER2 FISH System - 30 Test i forhold til Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Mave	17
2x2 konkordansresultater BOND-MAX System - Mave	17
Præcisionstest – BOND-MAX System	18
A. Præcisionstest under kørsel	18
B. Præcisionsundersøgelse i instrument.....	18
C. Præcisionsundersøgelse mellem kørsler	18
D. Præcisionsundersøgelse mellem laboratorier	18
E. Præcisionsundersøgelse mellem observatører	18
F. Præcisionsundersøgelse fra parti til parti	19
Præcisionstest – BOND-III System	19
G. Præcisionsundersøgelse under kørsel	19
H. Præcisionsundersøgelse i instrument.....	19
I. Præcisionsundersøgelse mellem kørsler	19
J. Præcisionsundersøgelse mellem laboratorier	19
K. Præcisionsundersøgelse mellem observatører	20
L. Præcisionsundersøgelse fra parti til parti	20
Testens robusthed	20
Fejlfinding	22
Referencer	24
Licensaftale	25
Ændring af tidligere udgave	25
Trykkesdato	25
Symbolidentifikation	25

Beregnet anvendelse

Til *in-vitro*-diagnostisk brug

Leica HER2 FISH System - 30 Test er beregnet til at registrere forstærkning af HER2/neu-genet via fluorescens *in situ* hybridisering (FISH) i formalinfixeret, paraffinindlejret humant brystkræftvæv og adenocarcinomer fra maven (inklusive herunder den gastroesophageale forbindelse). Leica HER2 FISH System - 30 Test indikeres som hjælpemiddel til vurdering af patienter, for hvem der overvejes behandling med Herceptin® (trastuzumab) (se indlæg i Herceptin-embalagen). Leica HER2 FISH System - 30 Test er ikke beregnet til brug i forbindelse med screening for eller diagnosticering af brystcancer. Alle øvrige kliniske oplysninger skal også tages i betragtning, herunder tumorens størrelse, antallet af påvirkede lymfekirtler samt steroidreceptorstatus. Beslutninger vedrørende behandling af brystcancerpatienter bør ikke baseres på HER2-genets forstærkningsstatus alene.

Bemærk! Alle patienter i de kliniske forsøg med Herceptin blev udvalgt ved hjælp af en forskningsmæssig immunocytokemisk klinisk forsøgstest (CTA). Ingen af patienterne i disse forsøg blev valgt ved hjælp af Leica HER2 FISH System - 30 Test. Leica HER2 FISH System - 30 Test er blevet sammenlignet med testen Abbott Molecular PathVysion® HER-2 DNA Probe Kit på et uafhængigt prøvesæt, og det er konstateret, at det leverer resultater med en acceptabel konkordans i overensstemmelse med det kliniske konkordansresumé. Den faktiske korrelation mellem resultaterne fra Leica HER2 FISH System - 30 Test og de kliniske resultater er ikke påvist.

Alle patienter i de kliniske forsøg med Herceptin® og fremskreden mavekræft (ToGA) blev udvalgt ved hjælp af Dako HercepTest. Ingen af patienterne i disse forsøg blev valgt ved hjælp af Leica HER2 FISH System - 30 Test. Leica HER2 FISH System - 30 Test er blevet sammenlignet med testen Abbott Molecular PathVysion® HER-2 DNA Probe Kit på et uafhængigt prøvesæt, og det er konstateret, at det leverer resultater med en acceptabel konkordans i overensstemmelse med det kliniske konkordansresumé. Den faktiske korrelation mellem resultaterne fra Leica HER2 FISH System - 30 Test og de kliniske resultater er ikke påvist.

** Herceptin® er et varemærke, der tilhører Genentech, Inc., og F. Hoffmann-La Roche Ltd. PathVysion® er et varemærke, der tilhører Abbott Molecular Inc. Alle rettigheder forbeholdes. Anvendes under licens.*

Nødvendig uddannelse

Leica Biosystems arrangerer uddannelse i klargøring af prøver, analyseprocedure og fortolkning af FISH-testning af HER2-genet for alle brugere.

Resumé og forklaring

Baggrund

HER2-genet, der også er kendt som neu eller c-erbB2, sidder på den lange arm af kromosom 17 på positionen 17q11-12 (1). Det er påvist, at både HER2-genet og dets 185 kD-kodede protein spiller en stor rolle i malign transformation og tumorprogression i brystcancer (2).

HER2 fungerer som en prognostisk markør, hvor genforstærkning og proteinoverekspression er forbundet med en øget forekomst af sygdommens tilbagevenden og højere dødelighed. HER2 fungerer også som prædiktiv markør for udvalgt systemisk kemoterapi og målrettede behandlinger (3). Det er specifikt påvist, at forstærkning af HER2-genet er en indikator for en dårlig prognose for knudepositiv brystcancer (4-8). Desuden indikerer en undersøgelse, at den prognostiske værdi af HER2 er stærkere hos patienter, der modtager behandling med kemoterapi (7). Ved prognostisering af sygdomsfri og generel overlevelse hos enkeltpatienter skal andre etablerede prognostiske faktorer som tumorstørrelse, antal positive lymfeknuder og steroidreceptorstatus dog også tages i betragtning.

Overekspression af HER2-oncoprotein som følge af genforstærkning fundet i brystcancer celler tyder på, at HER2 kan være mål for en antistofbaseret behandling (3) - mens resultaterne fra ToGA-forsøget klart indikerede, at brugen af Herceptin® ved mavekræft sammen med kemoterapi er en effektiv behandling, som forbedrer den generelle overlevelse ved HER2-positiv mavekræft (9).

Herceptin (trastuzumab), et humaniseret monoklonalt antistof (10), som binder sig med høj affinitet til HER2-oncoprotein, har vist sig at hæmme formeringen af humane tumorceller, der overudtrykker HER2-oncoprotein både *in-vitro* og *in vivo* (11-13). Siden udviklingen af Herceptin er opdagelsen af både HER2-genet og -proteinet blevet afgørende værktøjer i forbindelsen med vurdering af brysttumorer, som angiver både valg af behandling og efterfølgende patienthåndtering (14,15).

I både interfase- og metafaseceller afledt fra humane cellelinjer med brystcarcinom har FISH været anvendt til at vise HER2-genforstærkning (16-19). Ved kvantificering af HER2-genforstærkning vurderer FISH niveauet af HER2-genforstærkning direkte i tumorcellerne. Vævets karakteristiske morfologi og den spatiale fordeling af oncogenkopier i individuelle udyrkede primære brystcarcinomer bevares. Afvigelser i kromosom 17's kopinummer (aneusomi) ses også hyppigt i brystcancer tumorer. Disse kan forekomme som kromosomsletninger eller -tilføjelser (polysomi). Denne kromosomvariation har kritisk betydning for fortolkningen og rapporteringen af HER2-genforstærkningsstatus. Måling af kromosom 17's kopinummer sammen med HER2 er derfor afgørende (4).

Leica HER2 FISH System - 30 Test omfatter LSI HER2 DNA-proben, som er en direkte mærket SpectrumOrange™ fluorescent DNA-probe på 226 Kb specifikt beregnet til HER2-genelocus (17q11.2-q12) og CEP17 DNA-probe, en direkte mærket SpectrumGreen™ fluorescent DNA-probe på 5,4 Kb specifikt beregnet til alfasatellit-DNA-sekvensen i det centrometriske område af kromosom 17 (17p11.1-q11.1). Problemløsningen er specifikt udviklet og godkendt til brug på BOND-MAX and BOND-III System og må ikke ændres eller anvendes i manuel sammenhæng.

Klinisk konkordansresumé BOND-MAX System

Leica HER2 FISH System - 30 Test er udviklet til at udgøre et fuldautomatisk alternativ til aktuelle metoder, der bruges til at bestemme HER2-genforstærkningsstatus. Leica HER2 FISH System - 30 Test ydelse på BOND-MAX System blev evalueret i en uafhængig undersøgelse, hvor man sammenlignede resultaterne af Leica HER2 FISH System - 30 Test i forhold til testen Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit på 300-brystkræftprøver og på 109 adenocarcinomer fra maven (herunder den gastroesophageale forbindelse). Ingen af disse tumorprøver stammede fra patienter i de kliniske Herceptin-undersøgelser. Resultaterne på brystvævet indikerede en 99,33 % konkordans ved en 2x2-analyse (95 % konfidensintervaller på 97,61-99,92 %). Resultaterne på adenocarcinomer fra maven (herunder den gastroesophageale forbindelse) indikerede en konkordans på 98,17 % ved en 2x2-analyse (95 % konfidensintervaller på 93,53-99,78 %). Overensstemmelsesdataene viste også, at et positivt resultat med Leica HER2 FISH System - 30 Test med stor sandsynlighed svarer til et positivt resultat på prøven med Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit. Leica HER2 FISH System - 30 Test fortolkes som negativt for HER2-genforstærkning, når HER2:CEP17-genforholdet er mindre end 2,0, og positivt, når HER2:CEP17-genforholdet er større end eller lig med 2,0. Tvetydige (borderline) resultater, hvor HER2:CEP17-genforholdet er mellem eller lig 1,8-2,2, skal fortolkes med forsigtighed. Tæl yderligere 20 kerner, og foretag en ny beregning af forholdet.

Klinisk konkordansresumé BOND-III System

Leica HER2 FISH System - 30 Test er udviklet til at udgøre et fuldautomatisk alternativ til aktuelle metoder, der bruges til at bestemme HER2-genforstærkningsstatus. Leica HER2 FISH System - 30 Test ydelse på BOND-III System blev evalueret i en uafhængig undersøgelse, hvor man sammenlignede resultaterne af Leica HER2 FISH System - 30 Test med Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit Assay på 300 brysttumoprøver. Ingen af disse tumorprøver stammede fra patienter i de kliniske Herceptin-undersøgelser. Resultaterne viste en overensstemmelse på 99,67% i en 2x2-analyse (95% konfidensintervaller på 98,16-99,99%). Overensstemmelsesdataene viste også, at et positivt resultat med Leica HER2 FISH System - 30 Test med stor sandsynlighed svarer til et positivt resultat på prøven med Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit. Leica HER2 FISH System - 30 Test fortolkes som negativt for HER2-genforstærkning, når HER2:CEP17-genforholdet er mindre end 2,0, og positivt, når

HER2:CEP17-genforholdet er større end eller lig med 2,0. Tvetydige (borderline) resultater, hvor HER2:CEP17-genforholdet er mellem eller lig 1,8-2,2, skal fortolkes med forsigtighed. Tæl yderligere 20 kerner, og foretag en ny beregning af forholdet.

Procedureprincipper

Leica HER2 FISH System - 30 Test omfatter komponenter, der er nødvendige for at udføre en farvningsprocedure baseret på fluorescens *in situ*-hybridisering til formalinfikseret, paraffinindkapslet væv. Efter relevant forbehandling, inkubering med brugsklar LSI HER2/CEP17 Dual Probe og korrekt stringensvask dehydreres vævssektionerne, hvorefter de monteres med DAPI. Resultaterne fortolkes ved hjælp af fluorescensmikroskopi med brug af de anbefalede filtre og ved de korrekte bølgelængder.

Leica HER2 FISH System - 30 Test er kun beregnet til brug på BOND-MAX and BOND-III System.

Medfølgende komponenter

De materialer, der er angivet nedenfor (tabel 1), rækker til farvning af 30 test (30 objektglas farvet med LSI HER2/CEP17 Dual Probe).

LSI HER2/CEP17 Probe 6,6 ml	Indeholder brugsklar LSI HER2/CEP17 Dual Probe. Indeholder <60% (v/v) formamid.
Post Hybridization Wash 2 9 ml	Indeholder brugsklar vaskeopløsning til brug efter hybridisering. Indeholder <50% (v/v) formamid.
BOND Enzyme Concentrate 2 1 ml	Indeholder Proteinase K opløsning på 1,7 mg/ml.
BOND Enzyme Diluent 65 ml	Indeholder enzymfortynder. Indeholder 0,035% 2-methylisothiazol-3(2H)-one.
BOND Open Container 3 x 7 ml	BOND Open Container der anvendes til Enzyme 5.

Tabel 1: Leica HER2 FISH System - 30 Test komponenter

Se det individuelle sikkerhedsdatablad for at finde flere oplysninger om produktsikkerhed på www.LeicaBiosystems.com/TA9217-IFU

Instruktioner for anvendelse

Alle reagenser er sammensat specifikt til brug sammen med denne test, og partinumre er specifikke for hvert Leica HER2 FISH System - 30 Test. For at testen kan virke som specificeret, må der ikke foretages substitutioner.

Opbevaring og stabilitet

Opbevares ved 2–8 °C. Må ikke fryses. Anbringes igen i temperaturer mellem 2-8 °C lige efter brug. Hvis der afviges fra disse betingelser, er testen ugyldig. Sørg for, at Leica HER2 FISH System - 30 Test anvendes før den angivne udløbsdato. De tegn, der angiver kontaminering og/eller ustabilitet i Leica HER2 FISH System - 30 Test, er opløsningernes turbiditet (med undtagelse af probeopløsningen) og lugtudvikling. Brugeren skal bekræfte opbevaringsforhold, der afviger fra dem, der er angivet ovenfor.

Klargøring af prøver

Standardmetoder for vævsbehandling bør bruges til alle prøver (20). Det anbefales, at vævsprøverne klargøres i formalinbaserede fiksativer, behandles rutinemæssigt og paraffinindkapsles. For eksempel bør prøver udtages i en tykkelse på 3-4 mm og fikseres i 18-24 timer i 10% neutral bufferjusteret formalin. Derefter skal vævet dehydreres i en serie alkoholpræparater, renses gennem xylen og derefter imprægneres med smeltet paraffinvoks ved højst 60 °C. Vævsprøverne skal sektioneres mellem 4–6 µm.

Vævssektioner monteret på ladede objektglas (BOND Plus Slides - produktkode S21.2113 Eller Apex BOND Slides - produktkode 3800040) kan opbevares i op til 12 måneder ved 2–8 °C, før de farves. Efter sektion anbefales det, at objektglassene inkuberes ved 60 °C i en time. Farvede sektioner skal opbevares ved -20 °C for at bevare de fluorescerende signal og forebygge begning. Opbevarede objektglas skal have stuetemperatur, før de aflæses.

Advarsler og forholdsregler

Må kun anvendes af uddannet fagpersonale.

En eller flere af produktets komponenter er farligt og kan forårsage skader på fosteret.

Som hovedregel må personer under 18 år ikke arbejde med produktet. Brugere skal have grundig indføring i de rigtige arbejdsprocedurer, produktets sundhedsskadelige egenskaber og nødvendige sikkerhedsforanstaltninger.

Prøver skal før og efter fiksering, ligesom alle materialer eksponeret for prøverne, håndteres som potentielt smittefarlige og bortskaffes under iagttagelse af passende forholdsregler.

Pipetter aldrig reagenser med munden og undgå, at reagenser og prøver kommer i kontakt med huden eller slimhinder. Hvis reagenser eller prøver kommer i kontakt med følsomme områder, skal der skylles efter med rigelige mængder vand. Søg læge. Konsulter landsdækkende og lokale love og regler vedrørende bortskaffelse af alle potentielt toksiske komponenter.

Minimer mikrobiel kontaminering af reagenserne, da der ellers kan forekomme øget uspecifik farvning.

Procedure

A. Nødvendige reagenser, der ikke medfølger

- BOND Dewax Solution (AR9222)
- BOND Epitope Retrieval Solution 1 (AR9961)
- BOND Wash Solution x10 Concentrate (AR9590)
- Standardopløsningsmidler, der anvendes til test baseret på fluorescens *in situ*-hybridisering (f.eks. ethanol, absolut og graderet)
- Destilleret eller afioniseret vand
- DAPI Counterstain
- Leica HER2 FISH Control Slides (TA9123)
- BOND Aspirating Probe Cleaning System (CS9100)

B. Nødvendigt udstyr, der ikke medfølger

- Pipetter (målekapacitet 1-20 µl og 100-1000 µl)
- Ladede objektglas (BOND Plus Slides – produktkode S21.2113 Eller Apex BOND Slides - produktkode 3800040)
- BOND-MAX (21.0051) or BOND-III (21.2201)
- BOND Universal Covertiles™ (S21.2001, S21.4583 eller S21.4611)
- BOND Mixing Stations (S21.1971)
- BOND Slide Label & Print Ribbon (S21.4564)
- Dækglas
- Tørreovn (kan opretholde 60 °C)
- Fluorescensmikroskop (60–100x objektiv) med relevant lyskilde. Registrer det antal timer, pæren har været i brug, og udskift den, før det angivne antal timer overskrides. Kontroller,

at pæren er justeret korrekt.

- Korrekt fluorescensfiltersæt (SpectrumOrange™ – excitationstop ved 559 nm, emissionstop ved 588 nm, SpectrumGreen™ – excitationstop ved 497 nm, emissionstop ved 524 nm og DAPI – excitationstop ved 367 nm, emissionstop ved 452 nm). Multibåndpasfiltersæt til fluorescensmikroskop optimeret til brug med Leica HER2 FISH System - 30 Test fås til de fleste mikroskopmodeller. De anbefalede filtersæt til

Leica HER2 FISH System - 30 Test er DAPI/9-Orange dobbelt båndpas, DAPI/Green dobbelt båndpas, Green/Orange(V.2) dobbelt båndpas og DAPI/Green/Orange (V.2) tredobbelt båndpas.

C. Metodik

- Før denne metodik anvendes, skal brugerne have gennemgået den relevante uddannelse i automatisk *in situ*-fluorescensmeknik.
- Hver testsektion, der er farvet med LSI HER2/CEP17 Dual Probe gør det muligt at foretage den samme celleanalyse af både HER2 og centrometriske kromosom 17-signaler. Et efterfølgende forhold mellem HER2 og kromosom 17-signaler gør det muligt at tildele en kvantitativ værdi til prøven, som angiver et negativt (ikke forstærket) eller positivt (forstærket) resultat. Usikre (borderline) resultater (1,8-2,2) skal fortolkes med forsigtighed. Tæl yderligere 20 kerner, og foretag en ny beregning af forholdet.

D. BOND-enzymforbehandling

Før farvning af den medfølgende fortynder BOND Enzyme Concentrate 2 med en opløsning på 1:300 ved hjælp af den medfølgende BOND Enzyme Diluent i én af de medfølgende BOND Open Containers. For eksempel farves 10 objektglas ved at klargøre 3 ml enzymarbejdsopløsning ved at fortynde 10 µl BOND Enzyme Concentrate 2 i 2990 µl BOND Enzyme Diluent. Det anbefales, at enzymet klargøres umiddelbart før hver farvekørsel, og at der anvendes en minimumsmængde på 900 µl pr. kørsel.

E. Standardfarvningsprotokol

Det anbefales at bruge Leica HER2 FISH System - 30 Test sammen med den anbefalede standardfarvningsprotokol, der er vist i tabel 2 nedenfor.

Protokoltype	Protokolnavn
Farvning	*FISH Protocol A
Klargøring	*Dewax
HIER	*HIER 25 min with ER1 (97)
Enzym	*Enzyme 5 for 25 min
Denaturering	*D10
Hybridisering	*ISH Hybridization (12Hr)

Tabel 2: Standard Leica HER2 FISH System - 30 Test Staining Protocol

F. Trin i proceduren

Denne vejledning skal læses sammen med brugervejledningen til BOND-MAX and BOND-III System. Der skal bruges en ny BOND Universal Covertile til hvert objektglas.

Brugen af BOND Universal Covertiles, som tidligere har været brugt til enten immunhistokemisk eller *in situ*-hybridiseringsfarvning er ikke blevet valideret til denne test.

1. Sørg for, at beholderne til bulk og sundhedsfarligt affald på BOND-MAX and BOND-III System har tilstrækkelig kapacitet til at udføre de nødvendige farvningskørsler.
2. Sørg for, at der er tilstrækkelig alkohol, destilleret eller afioniseret vand, BOND Dewax Solution, BOND Epitope Retrieval Solution 1 og BOND Wash Solution i beholderne med bulkreagens, til at de nødvendige farvningskørsler kan udføres.
3. Sørg for, at der er monteret en ren BOND Mixing Station.

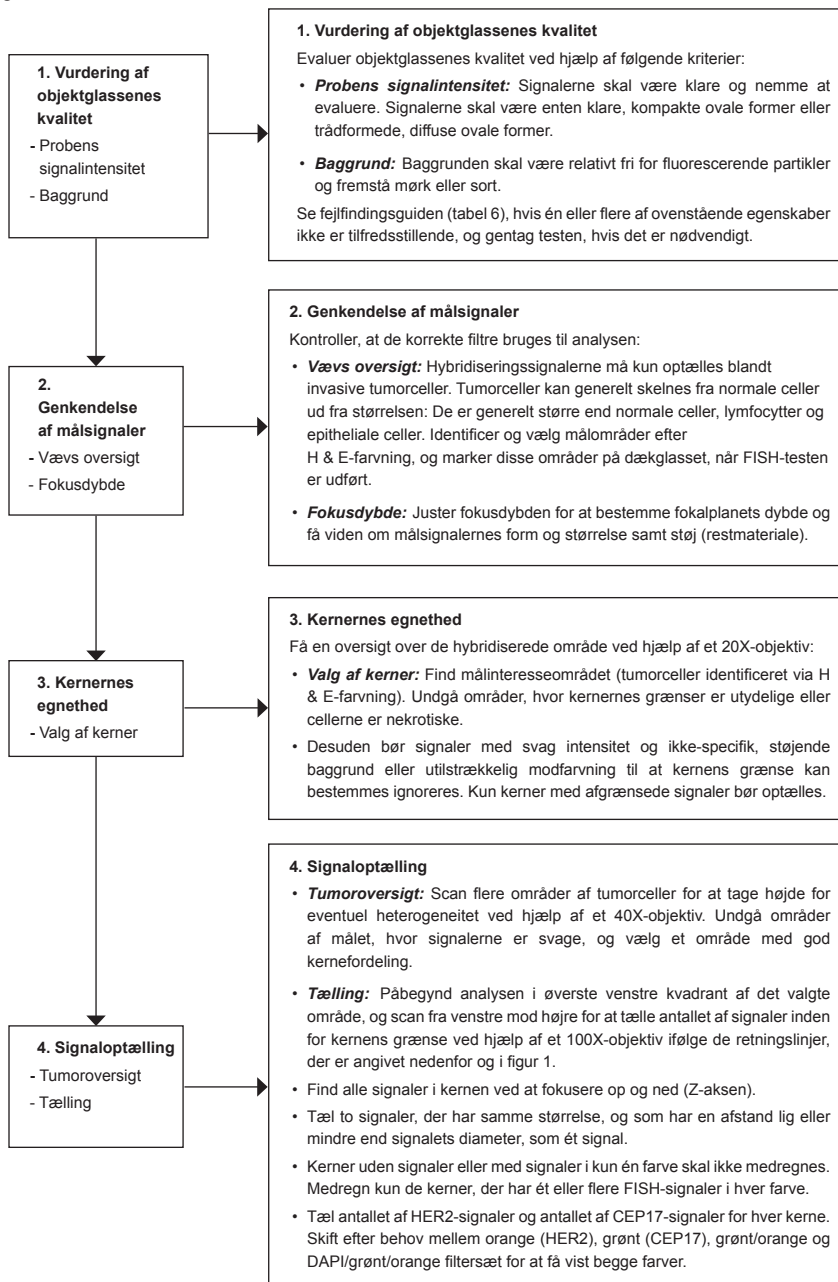
4. Tænd for BOND-MAX and BOND-III System.
5. Tænd for den pc, der er koblet til BOND-MAX and BOND-III System.
6. Åbn BOND-softwaren.
7. Ved et nyt Leica HER2 FISH System - 30 Test sæt scannes reagensbakkens stregkode med den håndholdte scanner for at indlæse systemet i BOND-reagensregistret (kun enkelt stregkode).
8. Klargør BOND Enzyme 5 i den medfølgende BOND Open Container med en fortynding på 1:300. Til 10 objektglas tilsættes for eksempel 10µl BOND Enzyme Concentrate 2 til 2990 µl BOND Enzyme Diluent.
9. Scan den medfølgende BOND Open Container, og registrer den som **Bond Enzyme 5**.
10. Gå til skærmen for opsætning af objektglas, og klik på **Tilføj sag**.
11. Indtast oplysningerne for det første tilfælde. Sørg for, at dispenseringsvolumenen indstilles til **150 µl**, og at klaringsprotokollen er ***Dewax**. Klik på **OK**.
12. Kontroller, at tilfældet er fremhævet på skærmen til opsætning af objektglas, og klik på **Tilføj slide**.
13. Tilføj først objektglas til patienttest. Sørg for, at vævstypen er indstillet til **Testvæv**.
14. Vælg farvningstilstanden **Enkelt**.
15. Vælg processen **ISH**.
16. Vælg ***LSI HER2/CEP17 Dual Probe – 30 Test** på listen over prober. Fanen for protokoller vender som standard tilbage til den korrekte farvningsprotokol (***FISH Protocol A**), HIER-protokol (***HIER 25 min with ER1 (97)**), EIER-protokol (***Enzyme 5 for 25 min**), denaturering (***D10**) og hybridisering (***ISH Hybridization (12Hr)**).
17. Gentag trin 10 til 16, til objektglassene til patienttest og kontrol (Leica HER2 FISH-kontrolobjektglas og/eller interne kontroller) er oprettet. Udskriv objektglasmærkater.
18. Sæt mærkaterne på objektglassene.
19. Åbn lågene på alle Leica HER2 FISH System-beholdere, og sæt reagensbakken på BOND-MAX and BOND-III System.
20. Sæt nye Covertiles på hvert objektglas.
21. Sæt bakken med objektglas på BOND-MAX and BOND-III System, og tryk på knappen **isæt/udtag**.
22. Bekræft, at objektglassene er scannet, og klik på knappen **Run (Play)** på systemstatusskærmen for at påbegynde kørslen med det samme (for Leica HER2 FISH System - 30 Test anbefales det, at denne test køres natten over, så den forsinkede startfunktion kan udnyttes).
23. Sørg for, at bakkeindikatorfeltet viser **Proc (OK)**, og at batchnummeret og sluttiden vises.
24. Når kørslen er udført, trykkes på knappen **isæt/udtag**, og bakken med objektglas tages ud af BOND-MAX and BOND-III System.
25. Fjern Covertiles, og skyl objektglassene med afioniseret vand.
26. Affugt dem hurtigt med to hold alkohol, lufttørres.
27. Hæld 20µl DAPI direkte på prøven.
28. Sæt et dækglas på, og lad opløsningen sprede sig helt ud. Sørg for at fjerne eventuelle luftbobler.
29. Dækglassets kanter tætnes med neglelak eller et tilsvarende tætningsmiddel.
30. Læg objektglassene mørkt for at fremme signaludviklingen, før de betragtes under fluorescensmikroskop.
31. Signalintensiteten bevares ved at opbevare farvede objektglas ved -20 °C.

G. Opbevaring af objektglas

Farvede objektglas opbevares mørkt ved -20 °C. Lad objektglassene få stuetemperatur, før de betragtes, efter de er tages ud af -20 °C.

Vurdering og optælling af signaler

Følg nedenstående procedure for at vurdere signalkvaliteten og optælle HER2- og CEP17-signalerne:



Anbefalet metode til bestemmelse af LSI HER2 til CEP17-forhold

Brug følgende metode til at bestemme LSI HER2 til CEP17-forholdet:

1. Registrer og bestem antallet af LSI HER2- og CEP17-signaler i 20 kerner (se figur 2 Leica HER2 FISH System - 30 Test pointskema nedenfor).
2. Sammentæl alle LSI HER2-signaler. Dette tal angiver det samlede antal LSI HER2-signaler for tællingen, f.eks. 143.
3. Sammentæl alle CEP17-signaler. Dette tal angiver det samlede antal CEP17-signaler for tællingen, f.eks. 48.
4. Brug følgende udregning til at beregne det endelige resultat:

Det samlede antal LSI HER2-signaler divideret med det samlede antal CEP17-signaler, f.eks. $143/48$ svarer til et forhold på 2,98, som er positivt for HER2-forstærkning.

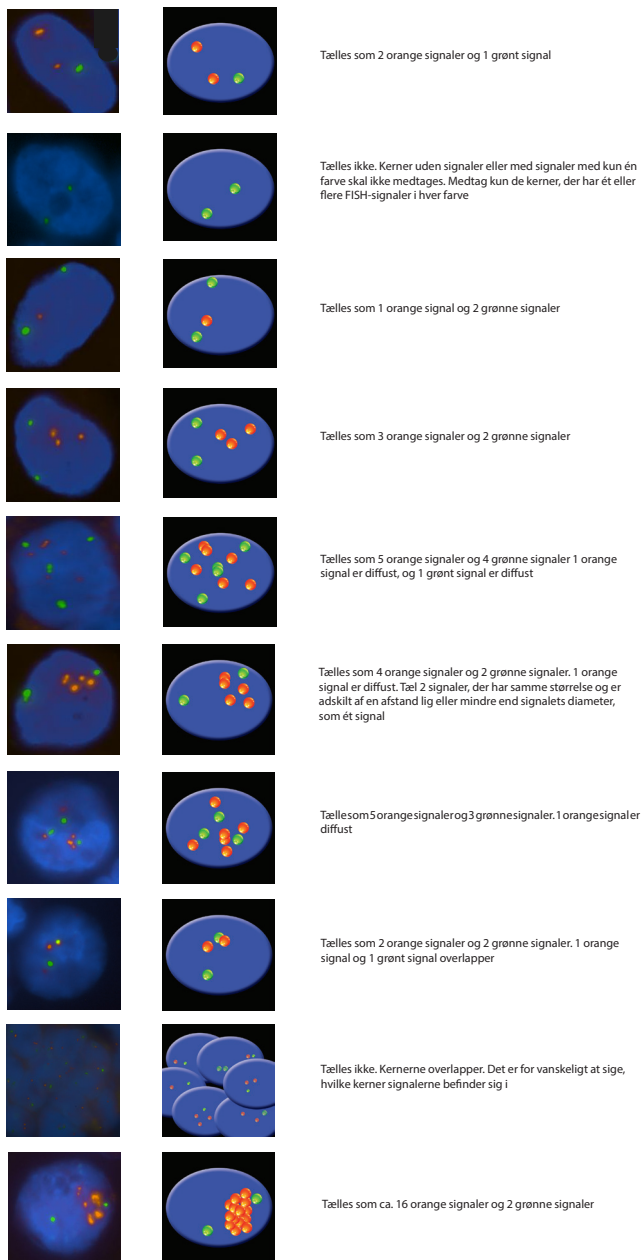
Vigtig note: Hvis forholdet mellem LSI HER2 og CEP17 er usikkert (1,80 - 2,20), skal der tælles yderligere 20 kerner, hvorefter forholdet beregnes igen.

Resultaterne skal rapporteres på følgende måde:

1. Hvis forholdet er <2 , er HER2-genforstærkningen ikke observeret
2. Hvis forholdet er ≥ 2 , er HER2-genforstærkningen observeret

Vigtig note: Et forhold lig eller tæt på grænsen (1,80 - 2,20) skal fortolkes med forsigtighed som beskrevet ovenfor.

Leica HER2 FISH System - 30 Test fortolkningsvejledning



Figur 1: Fortolkningsguide

Leica HER2 FISH System - 30 Test pointskema

Signaltælling for 20 kerner					
Kerne #	HER2-kopinummer	CEP17-kopinummer	Kerne #	HER2-kopinummer	CEP17-kopinummer
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	HER2:CEP17-forstærkningsforhold
Point i alt 1-20			
Gennemsnit pr. celle			

Figur 2: Pointskema for prøver

Automatisk Ariol-metode til HER2 FISH-bestemmelse

Anvendelsen af Ariol PathVysion-applikationen til digital scoring som en hjælp til tolkning blev valideret uafhængigt på en anden kohorte af prøver til anvendelse sammen med Leica HER2 FISH System. Ariol PathVysion®-applikationen til digital scoring er ved anvendelse sammen med Leica HER2 FISH System til in vitro-diagnostisk brug. Ved anvendelse sammen med Leica HER2 FISH System skal Ariol PathVysion-applikationen kalibreres til anvendelse med vævskontrolpræparater, **ikke** Leica HER2 FISH Control Slides (TA9123).

Alle diagnostiske beslutninger tages af en kvalificeret kliniker.

For yderligere oplysninger henvises til Ariol Brugermanualen.

Kvalitetskontrol

Brug af kontrolobjektglas

Det anbefales, at et Leica HER2 FISH Control Slides anvendes i hver testkørsel til at overvåge testens udførelse og vurdere nøjagtigheden af signaloptællingen. Kontrolobjektglas skal køres for hvert farvningsbatch på BOND-MAX and BOND-III System og med hvert nyt reagensparti. Desuden kan enkeltbrugere vælge at bruge deres eget kontrolmateriale.

Vurder kontrolobjektglassets kvalitet, og udført signaloptælling i overensstemmelse med instruktionerne i afsnittet **Vurdering og optælling af signaler**. Kriterierne for objektglassenes kvalitet skal være opfyldt, og resultaterne for HER2:CEP17-forholdet skal være inden for den fastsatte grænse for acceptabel testudførelse. Se tabel 3 for acceptkriterier for Leica HER2 FISH Control Slides.

Cellelinje	Profil for Bond Oracle HER2 IHC System	HER2-receptorlastning pr. celle*	Leica HER2 FISH System - 30 Test HER2:CEP17 acceptkriterier
SKBr-3	3+	$4,3 \times 10^5$	HER2-forstærkning er observeret
MDA-MB-453	2+	$1,4 \times 10^5$	HER2/CEP17-genforholdet skal være mellem 1,5 – 2,5
MDA-MB-175	1+	$6,3 \times 10^4$	HER2-forstærkning er ikke observeret
MDA-MB-231	0	$9,3 \times 10^3$	HER2-forstærkning er ikke observeret

*HER2-receptorbelastningsanalysen i henhold til vurdering med flowcytometri

Tabel 3: Fortolkning af Leica HER2 FISH Control Slides.

Hvis testkontrollen ikke udføres, skal FISH-resultaterne for tilfældet ikke rapporteres. Hvis kontrolobjektglassene ikke opfylder acceptkriterierne for objektglassene, kan Leica HER2 FISH System - 30 Test være udført utilstrækkeligt. I så fald er det nødvendigt at udføre en ny test med nye kontrolobjektglas og patientprøveobjektglas. Hvis resultaterne er uden for det angivne område, men kontrolobjektglassene opfylder acceptkriterierne for kvalitet, kan det være nødvendigt at gentage screeningen af det samme objektglas, da optællingen muligvis ikke er udført korrekt. Se fejlfindingsguiden (tabel 6) i tilfælde af hybridiseringsfejl med enten prøve- eller kontrolobjektglasset.

For kliniske prøver når fortolkning af hybridiseringssignalet er vanskeligt, og der ikke er tilstrækkelig prøve til at foretage en ny test, er testen uinformativ. Hvis der ikke er nok celler, til at en analyse kan foretages, er testen uinformativ.

Patientprøver skal kontrolleres i henhold til standardlaboratorieprocedurer. Signalkvalitet og optællingsresultater skal dokumenteres i en relevant rapportformular.

Begrænsninger

A. Generelle begrænsninger

FISH er en teknik, der kræver specialiseret træning i alle dele af proceduren (herunder valg af passende reagenser, væv, fiksering, behandling og klargøring af objektglas) samt fortolkningen. Farvning af væv afhænger af håndtering, fiksering og behandling af vævet før farvningen. Ukorrekt fiksering, frysning, optøning, vask, tørring, opvarmning, sektion eller kontaminering med andet væv eller andre væsker kan medføre morfologiske artefakter, degradering af nucleinsyre, baggrundsfluorescens eller falske negative resultater. Ikke-overensstemmende resultater kan skyldes variationer i fiksering, indlejningsmetoder eller iboende irregulåriteter i vævet (21). For megen eller ufuldstændig kontrastfarvning kan kompromittere korrekt tolkning af resultaterne.

Ikke-specifik farvning som følge af en uhæftet probe har et spredt, granuleret udseende og kan være visualiseret eller fjernet fra det forventede hybridiseringssted. Brug intakte celler til tolkning af farvningsresultater. Nekrotiske eller degenererede celler kan farves uspecifikt (22). Uventet FISH-farvning eller variationer i farvningen kan skyldes ændringer i ekspressionsniveauerne i de kodende gener. Enhver ændring i de forventede farvningsmønstre skal fortolkes i forbindelse med alle øvrige diagnostiske undersøgelser. Fortolkningen af farvningen skal suppleres med morfologiske undersøgelser under anvendelse af egnede kontrolmaterialer og skal evalueres i lyset af patientens kliniske historik og andre diagnostiske test, der er udført af en kvalificeret patolog.

Testens udførelse (dvs. vurdering af kontrolmaterialerne tilstrækkelighed) og fortolkningen af eventuel farvning eller fravær heraf skal udføres på et behørigt certificeret/licenshavende laboratorium under overvågning af en kvalificeret og erfaren patolog, som er ansvarlig for den generelle vurdering af *in situ*-hybridiserings testen og fortolkningen af denne. Falske positive resultater i FISH kan skyldes krydsreaktioner i proben med andre nucleinsyressekvenser og/eller ikke-specifik binding. De skal anvendes relevant kontrol samt dokumentation for disse, og testene skal tage højde for alle relevante udløbsdatoer.

Teknisk og fortolkningsmæssig variation kan også forekomme, når FISH anvendes på materiale afledt fra cellelinjer (23).

B. Produktspecifikke begrænsninger

Dette produkt er ikke beregnet til brug i andre DNA-baserede diagnostiktest.

Leica HER2 FISH System - 30 Test reagenser må ikke erstattes med andre komponenter fra Leica Biosystems eller andre producenter. Det vil resultere i, at testen bliver ugyldig. Brugeren skal bekræfte eventuelle afvigelser fra de anbefalede procedurer.

Det anbefales kun at bruge væv, der er fikseret i formalinbaserede fiksativer, i testen. Brug af andre typer fiksativer kan medføre, at testen er ugyldig.

Vævssnit, der ligger uden for den anbefalede tykkelse, er ikke blevet valideret. Brugen af andre snittykkelse kan betyde, at testen er ugyldig.

Klinisk konkordans for Leica HER2 FISH System - 30 Test med Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Bryst

I denne undersøgelse har man undersøgt egnetheden af Leica HER2 FISH System - 30 Test til brug i fastsættelse af behandling til Herceptin-terapi (trastuzumab). Undersøgelsen havde til formål at undersøge konkordansen mellem Leica HER2 FISH System - 30 Test og en tidligere godkendt diagnostikanordning, Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, der anses for at være den "gyldne standard" for denne test på brystvæv. Acceptkriteriet for testen var, at den nedre grænse for det ensidige konfidensinterval på 95% er over 90% mellem Leica HER2 FISH System - 30 Test og den manuelle Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, mellem positiv (forstærket) og negativ (ikke-forstærket) formalinfikserede, paraffinindlejrede (FFPE) invasive brystcancertilfælde.

Undersøgelsen blev udført som en maskeret evaluering på tre steder af klinisk invasive brystcancerprøver. Hvert undersøgelsessted fik arkiverede, formalinfikserede, paraffinindlejrede

blokke af invasivt brystcancer carcinom med kendte ekspressionsniveauer for HER2-oncoprotein. En gruppe på 300 prøver bestående af 75, 0/1+ tidligere karakteriserede IHC-tilfælde; 150, 2+ tidligere karakteriserede IHC-tilfælde og 75, 3+ tidligere karakteriserede IHC-tilfælde blev valgt og delt ligeligt mellem de tre undersøgelsessteder, der deltog i forsøget.

Alle tilfælde var farvet med den manuelle Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit Assay i overensstemmelse med producentens vejledning som angivet i dokumentationen i pakken. Fortløbende sektioner fra hvert tilfælde blev derefter farvet med Leica HER2 FISH System - 30 Test på BOND-MAX and BOND-III System.

Alle farvede objektglas blev maskeret og vurderet ved hjælp af en randomiseret metode af en enkelt kvalificeret observatør på hvert af de tre undersøgelsessteder, der deltog i forsøget. Pointene blev fortolket som negative med et beregnet HER2/CEP17-genforhold på $<2,0$ og negative med et beregnet HER2/CEP17-genforhold på $\geq 2,0$. Dataene blev derefter analyseret for konkordans, positiv farvningsoverensstemmelse og negativ farvningsoverensstemmelse.

2x2 konkordansresultater BOND-MAX System - Bryst

Data blev grupperet som negative ($<2,00$) eller positive ($\geq 2,00$) til en 2x2-analyse. Den overensstemmelse, der blev observeret, for 300 prøver mellem de to test i en 2x2-analyse viser en konkordans på 99,33% (298/300) med en 95% CI på 97,61–99,92% for BOND-MAX System.

Procentdelen af positiv overensstemmelse (sensitivitet) eller Leica HER2 FISH System - 30 Test evne til at foretage korrekt identificering af positive tilfælde i Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe-test (den procentdel af prøver, der er angivet som positive af både Leica HER2 FISH System og det manuelle Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit af alle positive tilfælde i Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) var 99,03% (102/103).

Procentdelen af negativ overensstemmelse (specificitet) eller testens evne til at foretage korrekt identificering af negative tilfælde i Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (den procentdel af prøverne, der er angivet som negative af Leica HER2 FISH System - 30 Test og Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit af alle negative tilfælde i Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) var 99,49% (196/197). Se tabel 4.

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

Generel overensstemmelse (95% CI) = 99,33% (97,61 – 99,92%)

Tabel 4. 2x2 overensstemmelse mellem Leica HER2 FISH System - 30 Test på BOND-MAX System med Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit på brystvæv.

2x2 konkordansresultater BOND-III System - Bryst

Data blev grupperet som negative (<2,0) eller positive (≥2,0) til en 2x2-analyse. Den overensstemmelse, der blev observeret, for 300 prøver mellem de to test i en 2x2-analyse, viser en konkordans på 99,67% (299/300) med en 95% CI på 98,16–99,99% for BOND- III System.

Procentdelen af positiv overensstemmelse (sensitivitet) eller Leica HER2 FISH System - 30 Test evne til at foretage korrekt identificering af positive tilfælde i Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit-test (den procentdel af prøver, der er angivet som positive af både Leica HER2 FISH System og det manuelle Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit af alle positive tilfælde i Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) var 99,03% (102/103).

Procentdelen af negativ overensstemmelse (specificitet) eller testens evne til at foretage korrekt identificering af negative tilfælde i Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (den procentdel af prøverne, der er angivet som negative af Leica HER2 FISH System - 30 Test og Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit af alle negative tilfælde i Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) var 100% (197/197). Se tabel 5.

		Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit		
		Negativ (<2,0)	Positiv (≥2,0)	I alt
Leica HER2 FISH System - 30 Test BOND-III	Negativ (<2,0)	197	1	198
	Positiv (≥2,0)	0	102	102
	I alt	197	103	300

Generel overensstemmelse (95% CI) = 99,67% (98,16 – 99,99%).

Tabel 5. 2x2 overensstemmelse mellem Leica HER2 FISH System - 30 Test på BOND-III System med Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit på brystvæv.

Det kan konkluderes, at de data, der er genereret i denne undersøgelse, viser, at Leica HER2 FISH System - 30 Test kan anvendes som hjælpemiddel til vurdering af patienter, for hvem behandling med Herceptin (trastuzumab) overvejes grundet den høje konkordans med Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, som er en tidligere godkendt diagnostisk test til denne indikation.

Klinisk konkordans for Leica HER2 FISH System - 30 Test i forhold til Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Mave

I denne undersøgelse har man undersøgt egnetheden af Leica HER2 FISH System - 30 Test til brug i fastsættelse af behandling til Herceptin-terapi (trastuzumab). Undersøgelsen havde til formål at undersøge konkordansen mellem Leica HER2 FISH System - 30 Test og en tidligere godkendt diagnostikanordning, Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, som er blevet betragtet som "den gyldne standard" for denne test. Acceptkriteriet for testen var, at den nedre grænse for det ensidede konfidensinterval på 95 % er over 90 % mellem Leica HER2 FISH System - 30 Test og den manuelle Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, mellem positiv (forstærket) og negativ (ikke-forstærket) formalinfikserede, paraffinindlejrede (FFPE) invasive adenocarcinomer fra maven (herunder den gastroesophageale forbindelse). Forsøget blev gennemført som en evaluering af kliniske invasive adenocarcinomprøver fra maven. Testen blev udført på arkiverede formalin-fikserede, paraffinindlejrede vævsblokke af adenocarcinomer fra maven med kendte HER2-genspressionsniveauer. En gruppe på 109 prøver bestående af 50 forstærkede tilfælde og 59 ikke-forstærkede tilfælde blev udvalgt.

Alle tilfælde var farvet med den manuelle Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit Assay i overensstemmelse med producentens vejledning som angivet i dokumentationen i pakken. Fortløbende sektioner fra hvert tilfælde blev derefter farvet med Leica HER2 FISH System - 30 Test på BOND-MAX System.

Alle farvede objektglas blev vurderet ved hjælp af en randomiseret metode af en enkelt kvalificeret observatør. Pointene blev fortolket som negative med et beregnet HER2/CEP17-genforhold på $<2,0$ og negative med et beregnet HER2/CEP17-genforhold på $\geq 2,0$. Dataene blev derefter analyseret for konkordans, positiv farvningsoverensstemmelse og negativ farvningsoverensstemmelse.

2x2 konkordansresultater BOND-MAX System - Mave

Data blev grupperet som negative ($<2,0$) eller positive ($\geq 2,0$) til en 2x2-analyse. Den overensstemmelse, der blev observeret, for 109 prøver mellem de to test i en 2x2-analyse viser en konkordans på 98,17 % (107/109) med en 95 % CI på 93,53–99,78 % for BOND-MAX System.

Procentdelen af positiv overensstemmelse (sensitivitet) eller Leica HER2 FISH System - 30 Tests evne til at foretage korrekt identificering af positive tilfælde i Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe-test (den procentdel af prøver, der er angivet som positive af både Leica HER2 FISH System - 30 Test og det manuelle Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit af alle positive tilfælde i Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) var 96,00 % (48/50).

Procentdelen af negativ overensstemmelse (specificitet) eller testens evne til at foretage korrekt identificering af negative tilfælde i Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (den procentdel af prøverne, der er angivet som negative af Leica HER2 FISH System - 30 Test og Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit af alle negative tilfælde i Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) var 100 % (59/59). Se tabel 6.

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

Generel overensstemmelse (95 % CI) = 98,17 % (93,53-99,78 %)

Tabel 6. 2x2-overensstemmelse mellem Leica HER2 FISH System - 30 Test på BOND-MAX System og Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit på mavevæv.

Præcisionstest – BOND-MAX System

A. Præcisionstest under kørsel

Præcisionstesten under kørsel blev udført randomiseret og blindet. Præcisionstesten under kørsel af Leica HER2 FISH System - 30 Test blev evalueret på et enkelt undersøgelsessted på 540 tidligere HER2-beskrevne TMA-prøver, der indeholdt formalinfikserede, paraffinindlejrede brystcancertilfælde. Brug af TMA til bestemmelse af præcision under kørsel gjorde det muligt at anvende en større mængde tilfælde og dermed et større område af HER2-ekspression i en enkelt kørsel på et enkelt instrument.

Ved optælling af de objektglas, der er farvet i præcisionsundersøgelsen under kørsel, viste de 532/540 evaluerede tilfælde et konkordant resultat, der gav en samlet konkordans på 98,52% med en nedre 95% CI på 97,10%.

B. Præcisionsundersøgelse i instrument

Præcisionsundersøgelsen i instrumentet blev udført randomiseret og blindet. Præcisionstest i instrument af Leica HER2 FISH System - 30 Test blev evalueret på et enkelt undersøgelsessted på 1620 tidligere HER2-beskrevne TMA-prøver, der indeholdt formalinfikserede, paraffinindkapslede brystcancertilfælde. Brug af TMA til bestemmelse af præcision i instrumentet gjorde det muligt at anvende en større mængde tilfælde og dermed et større område af HER2-ekspression i flere kørsler på et enkelt instrument.

Ved optælling af objektglas, der er farvet i præcisionsundersøgelsen i instrumentet, viste 1620/1620 evaluerede tilfælde et konkordant resultat, der gav en samlet konkordans på 100% med en nedre 95% CI på 99,82%.

C. Præcisionsundersøgelse mellem kørsler

Præcisionsundersøgelsen mellem kørsler blev udført randomiseret og blindet. Præcisionstesten mellem kørsler af Leica HER2 FISH System - 30 Test blev evalueret på et enkelt undersøgelsessted på 900 tidligere HER2-beskrevne TMA-prøver, der indeholdt formalinfikserede, paraffinindlejrede brystcancertilfælde. Brugen af TMA til bestemmelse af daglig præcisionstestning mellem kørsler gjorde det muligt at teste et større antal tilfælde og dermed et større område af HER2-ekspression mellem kørslerne på forskellige dage.

Ved optælling af de objektglas, der er farvet i præcisionsundersøgelsen mellem kørsler, viste de 894/900 evaluerede tilfælde et konkordant resultat, der gav en samlet konkordans på 99,33% med en nedre 95% CI på 98,55%.

D. Præcisionsundersøgelse mellem laboratorier

Præcisionsundersøgelsen mellem laboratorier blev udført randomiseret og blindet. Præcisionstesten mellem laboratorier af Leica HER2 FISH System - 30 Test blev evalueret mellem tre undersøgelsessteder på 513 tidligere HER2-beskrevne TMA-prøver, der indeholdt formalinfikserede, paraffinindlejrede brystcancertilfælde. Brugen af TMA til bestemmelse af præcisionstestning mellem laboratorier gjorde det muligt at teste et større antal tilfælde og dermed et større område af HER2-ekspression mellem kørslerne på forskellige instrumenter.

Ved optælling af de objektglas, der er farvet i præcisionsundersøgelsen mellem laboratorier, viste de 510/513 evaluerede tilfælde et konkordant resultat, der gav en samlet konkordans på 99,42% med en nedre 95% CI på 98,30%.

E. Præcisionsundersøgelse mellem observatører

Præcisionsundersøgelsen mellem observatører blev udført randomiseret og blindet. Reproducerbarhedstest mellem observatører af Leica HER2 FISH System - 30 Test blev evalueret mellem tre undersøgelsessteder. Der blev anvendt en enkelt erfaren observatør på hvert undersøgelsessted. Atten brystcancertilfælde med hele sektioner blev brugt til præcisionstestning mellem observatører og afspejlede de prøvetyper, der blev brugt i den kliniske sammenhæng.

Ved optælling af de objektglas, der er farvet i præcisionsundersøgelsen mellem observatører, viste de 53/54 evaluerede tilfælde et konkordant resultat, der gav en samlet konkordans på 98,15% med en nedre 95% CI på 90,11%.

F. Præcisionsundersøgelse fra parti til parti

Præcisionsundersøgelsen fra parti til parti blev udført randomiseret og blindet. Præcisionen fra parti til parti blev bestemt ud fra tre uafhængigt fremstillede partier af Leica HER2 FISH System - 30 Test, der er produceret i henhold til god produktionsskik. Hvert parti blev testet på et enkelt undersøgelsessted på 540 tidligere HER2-beskrevne TMA-prøver, der indeholdt formalinfikserede, paraffinindlejrede brystcancertilfælde. Brugen af TMA til bestemmelse af reproducerbarhed fra parti til parti gør det muligt at teste en større mængde tilfælde og et større område af HER2 -ekspression mellem partierne.

Ved optælling af de objektglas, der er farvet i præcisionsundersøgelsen fra parti til parti, viste de 534/540 evaluerede tilfælde et konkordant resultat, der gav en samlet konkordans på 98,89% med en nedre 95% CI på 97,60%.

Præcisionstest – BOND-III System

G. Præcisionsundersøgelse under kørsel

Præcisionstesten under kørsel blev udført randomiseret og blindet. Præcisionstesten under kørsel af Leica HER2 FISH System - 30 Test blev evalueret på et enkelt undersøgelsessted på 540 tidligere HER2-beskrevne TMA-prøver, der indeholdt formalinfikserede, paraffinindlejrede brystcancertilfælde. Brug af TMA til bestemmelse af præcision under kørsel gjorde det muligt at anvende en større mængde tilfælde og dermed et større område af HER2-ekspression i en enkelt kørsel på et enkelt instrument.

Ved optælling af de objektglas, der er farvet i præcisionsundersøgelsen under kørsel, viste de 540/540 evaluerede tilfælde et konkordant resultat, der gav en samlet konkordans på 100% med en nedre 95% CI på 99,45%.

H. Præcisionsundersøgelse i instrument

Præcisionsundersøgelsen i instrumentet blev udført randomiseret og blindet. Præcisionstest i instrument af Leica HER2 FISH System - 30 Test blev evalueret på et enkelt undersøgelsessted på 1620 tidligere HER2-beskrevne TMA-prøver, der indeholdt formalinfikserede, paraffinindkapslede brystcancertilfælde. Brug af TMA til bestemmelse af præcision i instrumentet gjorde det muligt at anvende en større mængde tilfælde og dermed et større område af HER2-ekspression i flere kørsler på et enkelt instrument.

Ved optælling af de objektglas, der er farvet i præcisionsundersøgelsen under kørsel, viste de 1620/1620 evaluerede tilfælde et konkordant resultat, der gav en samlet konkordans på 100% med en nedre 95% CI på 99,82%.

I. Præcisionsundersøgelse mellem kørsler

Præcisionsundersøgelsen mellem kørsler blev udført randomiseret og blindet. Præcisionstesten mellem kørsler af Leica HER2 FISH System - 30 Test blev evalueret på et enkelt undersøgelsessted på 900 tidligere HER2-beskrevne TMA-prøver, der indeholdt formalinfikserede, paraffinindlejrede brystcancertilfælde. Brugen af TMA til bestemmelse af daglig præcisionstestning mellem kørsler gjorde det muligt at teste et større antal tilfælde og et større område af HER2-ekspression mellem kørslerne på forskellige dage.

Ved optælling af de objektglas, der er farvet i præcisionsundersøgelsen mellem kørsler, viste de 891/900 evaluerede tilfælde et konkordant resultat, der gav en samlet konkordans på 99,00% med en nedre 95% CI på 98,11%.

J. Præcisionsundersøgelse mellem laboratorier

Præcisionsundersøgelsen mellem laboratorier blev udført randomiseret og blindet. Præcisionstesten mellem laboratorier af Leica HER2 FISH System - 30 Test blev evalueret mellem tre undersøgelsessteder på 513 tidligere HER2-beskrevne TMA-prøver, der indeholdt formalinfikserede, paraffinindlejrede brystcancertilfælde. Brugen af TMA til bestemmelse af præcisionstestning mellem laboratorier gjorde det muligt at teste et større antal tilfælde og dermed et større område af HER2-ekspression mellem kørslerne på forskellige instrumenter.

Ved optælling af de objektglas, der er farvet i præcisionsundersøgelsen mellem laboratorier, viste de 511/513 evaluerede tilfælde et konkordant resultat, der gav en samlet konkordans på 99,61% med en nedre 95% CI på 98,60%.

K. Præcisionsundersøgelse mellem observatører

Præcisionsundersøgelsen mellem observatører blev udført randomiseret og blindet. Reproducerbarhedstest mellem observatører af Leica HER2 FISH System - 30 Test blev evalueret mellem tre undersøgelsessteder. Der blev anvendt en enkelt erfaren observatør på hvert undersøgelsessted. Atten brystcancertilfælde med hele sektioner blev brugt til præcisionstestning mellem observatører og afspejlede de prøvetyper, der blev brugt i den kliniske sammenhæng.

Ved optælling af de objektglas, der er farvet i præcisionsundersøgelsen mellem observatører, viste de 53/54 evaluerede tilfælde et konkordant resultat, der gav en samlet konkordans på 98,15% med en nedre 95% CI på 90,11%.

L. Præcisionsundersøgelse fra parti til parti

Præcisionsundersøgelsen fra parti til parti blev udført randomiseret og blindet. Præcisionen fra parti til parti blev bestemt ud fra tre uafhængigt fremstillede partier af Leica HER2 FISH System - 30 Test, der er produceret i henhold til god produktionsskik. Hvert parti blev testet på et enkelt undersøgelsessted på 540 tidligere HER2-beskrivne TMA-prøver, der indeholdt formalinfikserede, paraffinindlejrede brystcancertilfælde. Brugen af TMA til bestemmelse af reproducerbarhed fra parti til parti gør det muligt at teste en større mængde tilfælde og et større område af HER2-ekspresion mellem partierne.

Ved optælling af de objektglas, der er farvet i præcisionsundersøgelsen fra parti til parti, viste de 540/540 evaluerede tilfælde et konkordant resultat, der gav en samlet konkordans på 100% med en nedre 95% CI på 99,45%.

Testens robusthed

Der er blevet udført robusthedsundersøgelser for BOND-MAX and BOND-III System for at bestemmetestenstoleranceområde for varmegenvindingstid og temperatur, enzymgenvindingstid, temperatur og koncentration, denatureringstid og temperatur, hybridiseringstid og temperatur samt stringensvasketid og temperatur. Robusthedsundersøgelser ved hjælp af standardprotokollen for BOND-MAX and BOND-III System blev også udført uden for de anbefalede grænser som defineret i FDA/ORA-vejledningen ORA LAB5.3 Rev1.7 for temperatur og fugtighed.

- Der blev ikke observeret en forskel i forstærkningsstatus, da standardtemperaturen for hvert varmeafhængigt trin blev forøget med 4° C eller reduceret med 4° C ved sammenligning med standardprotokollen for Leica HER2 FISH System - 30 Test. De højeste kvalitetsklassificeringer blev observeret ved standard-temperaturer, og disse temperaturer anbefales.
- Der blev ikke observeret en forskel i forstærkningsstatus, da den varmeinducerede epitopgendannelsestid (HIER) blev udført for 20 og 30 minutter ved 97 °C med BOND ER1-opløsning ved sammenligning med standardprotokollen for Leica HER2 FISH System - 30 Test. De højeste kvalitetsklassificeringer blev observeret ved standardtiden 25 minutter, og denne inkubationstid anbefales.
- Der blev ikke observeret en forskel i forstærkningsstatus, da den enzyminducerede epitopgendannelsestid (EIER) blev udført for 15 og 35 minutter ved 37 °C ved sammenligning med standardprotokollen for Leica HER2 FISH System - 30 Test. De højeste kvalitetsklassificeringer blev observeret ved standardtiden 25 minutter, og denne inkubationstid anbefales.
- Der blev ikke observeret en forskel i forstærkningsstatus, da enzymkoncentrationen for den enzyminducerede epitopgendannelse (EIER) blev udført med forhold mellem enzymkoncentrat/enzymfortynder på 1:200 og 1:500 ved hjælp af standardprotokollen Leica HER2 FISH System - 30 Test protocol. De højeste kvalitetsklassificeringer blev observeret ved standardkoncentrationen 1:300, og denne fortynding anbefales..
- Der blev ikke observeret en forskel i forstærkningsstatus, da denatureringstiden blev udført for 5 og 15 minutter ved sammenligning med standardprotokollen for Leica HER2 FISH System - 30 Test. De højeste kvalitetsklassificeringer blev observeret ved standardtiden på

10 minutter, og denne denatureringstid anbefales.

- Der blev ikke observeret en forskel i forstærkningsstatus, da hybridiseringstiden blev udført for 9 timer og 15 timer ved sammenligning med standardprotokollen for Leica HER2 FISH System - 30 Test. De højeste kvalitetsklassificeringer blev observeret ved standardtiden på 12 timer, og denne hybridiseringstid anbefales.
- Der blev ikke observeret en forskel i forstærkningsstatus, da vasketiden efter hybridisering blev udført for 2, 5 og 7 minutter ved sammenligning med standardprotokollen for Leica HER2 FISH System - 30 Test . De højeste kvalitetsklassificeringer blev observeret ved standardtiden 4 minutter, og denne vasketid efter hybridisering anbefales.
- Der blev ikke observeret en forskel i forstærkningsstatus, da Leica HER2 FISH System - 30 Test blev udført ved 28 °C og 30 % relativ fugtighed og 16 °C og 80 % relativ fugtighed ved sammenligning med standardprotokollen for Leica HER2 FISH System - 30 Test udført ved rumtemperatur.

Handlinger udført uden for de anbefalede parametre for testens afprøvede robusthed er ikke valideret. Brug af andre testparametre kan medføre, at testen bliver ugyldig.

Ovenstående tekst beskriver de testede tilstande og resultaterne af undersøgelsen. Bemærk, at Leica ikke testede alle tænkelige tilstandskombinationer og fraråder at bruge ikke-standardområder for alle tilstande. Standardprotokollen (Leica HER2 FISH Staining Protocol) fremgår af tabel 2.

Fejlfinding

Problem	Sandsynlig årsag	Afhjælpning
Intet eller svagt fluorescens-signal/farvning	Utilstrækkelig fiksering eller behandling af testprøve	Sørg for, at der bruges formalinbaserede fiksativer, og at behandlingsskemaerne er egnede til den prøve, der testes.
	Leica HER2 FISH System - 30 Test anvendes efter udløbsdatoen	Sørg for, at Leica HER2 FISH System - 30 Test anvendes før den angivne udløbsdato.
	Forkert protokolvalg	Sørg for, at *FISH Protocol A er valgt som standard i farvningsprotokolfeltet i dialogboksen Add slide.
	Utilstrækkelig dispensering af reagens	Sørg for, at alle BOND-reagenser er blevet allokeret til de rigtige beholdere og placeret korrekt på instrumentet.
	Utilstrækkelig deparafinering af objektglas	Sørg for, at tilstanden *Dewax er valgt i feltet Preparation i dialogboksen Tilføj slide.
	Ukorrekt forbehandling	Sørg for, at standardprotokollerne for forbehandling (HIER og Enzymatic Digestion) vælges. Juster protokollen for forbehandling (HIER eller Enzymatic Digestion), hvis det er nødvendigt.
	Utilstrækkelig denaturering	Sørg for, at der vælges korrekt standarddenaturering *D10.
	Utilstrækkelig hybridisering	Sørg for, at der vælges korrekt standardhybridisering *H12. Forlæng hybridiseringstiden, hvis det er nødvendigt.
	Overflødig vask efter hybridisering.	Reducer inkuberingstiden for vask efter hybridisering.
	Kørslen blev afbrudt, før den var færdig	Bekræft ved hjælp af BOND-softwaren, at der er rapporterbare fejl til stede under farvningskørslen, og følg anvisningerne i BOND-softwaren.
Forkert udstyr til fluorescensmikroskopi <ul style="list-style-type: none"> • Forkert filtersæt • Forkert lampe • Lampe med udløbet holdbarhed • Forkert olietype 	Sørg for, at al udstyr til fluorescensmikroskopi, der anvendes, er egnet til den test, der udføres, ved at kontrollere følgende: <ul style="list-style-type: none"> • Korrekt filtersæt • Korrekt lampe • God lampestyrke • Korrekt olie til brug til olieimmersionsmikroskopi 	
Overeksponering med UV-lys (fotoblegning)	Opbevar objektglassene mørkt før og efter vurderingen for at bevare de fluorescerende signaler. Signalet kan bevares i længere tid ved -20 °C.	

Problem	Sandsynlig årsag	Afhjælpning
Ikke-specifik fluorescerende signal/farvning af baggrunden	Utilstrækkelig vask efter hybridisering.	Forøg inkuberingstiden for vask efter hybridisering.
	Utilstrækkelig dispensering af reagens	Sørg for, at alle BOND-reagenser er blevet allokeret til de rigtige beholdere og placeret korrekt på instrumentet.
	Utilstrækkelig deparafinering af objektglas	Sørg for, at Dewax er valgt i feltet Preparation i dialogboksen Tilføj slide.
	Uspecifik krydsreaktion med områder med vævsnekrose	Sørg for, at der bruges formalinbaserede fiksativer, og at behandlingsskemaerne er egnede til den prøve, der testes. Test om muligt tilfældet igen ved hjælp af en anden blok. Hvis det ikke er muligt, skal du foretage vurderingen sammen med et tilsvarende hæmatoxylin- og eosin-farvet (H&E) snit og vælge de områder, der viser de bedste fikseringsmønstre.
	Sektioner fastgjort til objektglas med alternative klæbemidler	Brug (BOND Plus Slides - produktkode S21.2113 Eller Apex BOND Slides - produktkode 3800040)
Ringede bevaring af vævsmorfologi	Utilstrækkelig fiksering og behandling af væv	Sørg for, at der bruges formalinbaserede fiksativer, og at behandlingsskemaerne er egnede til den prøve, der testes. Test om muligt tilfældet igen ved hjælp af en anden blok. Hvis det ikke er muligt, skal du foretage vurderingen sammen med et tilsvarende hæmatoxylin- og eosin-farvet (H&E) snit og vælge de områder, der viser de bedste fikseringsmønstre.
	Ukorrekt forbehandling	Juster protokollen for forbehandling (HIER eller Enzymatic Digestion).
Vævet har løsnet sig fra patient/ kontrol-objektglas	Brug af forket type objektglas eller utilstrækkelig dræning af snit	Brug korrekte objektglas til patient/ kontrol-snit (f.eks. BOND Plus Slides - produktkode S21.2113 Eller Apex BOND Slides - produktkode 3800040) Sørg for, at objektglassene drænes tilstrækkeligt og inkuberes i 1 time ved 60 °C.

Tabel 7. Leica HER2 FISH System - 30 Test fejlsøgningsguide.

Hvis der opstår problemer med Leica HER2 FISH System - 30 Test, som falder uden for fejlfindingsguiden, skal du kontakte din lokale Leica Biosystems-serviceafdeling eller -forhandler for at få hjælp.

Referencer

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

Licensaftale

Dette produkt omfatter PathVysion FISH-prober fra Abbott Molecular Inc.

PathVysion, LSI og CEP er et varemærke, der tilhører Abbott Molecular Inc. Alle rettigheder forbeholdes. Anvendes under licens.









Ændring af tidligere udgave

Medfølgende komponenter, symbolidentifikation.

Trykkesdato

28 september 2020

Symbolidentifikation

	Batchkode		Opbevaring		Katalognummer
	Medicinsk udstyr til <i>in vitro</i> -diagnostisk brug		Producent	SN	Serienummer
	eFU - se i brugsanvisningen		Indeholder tilstrækkeligt til <n> test		Bruges før ÅÅÅÅ-MM-DD
Rx Only	Kun recept				

Herceptin er et varemærke, der tilhører Genentech, Inc. og F. Hoffmann-La Roche Ltd.