

# Leica HER2 FISH System - 30 Test

## Инструкции за Инструкции за употреба

За употреба с Leica Biosystems' BOND - MAX System and BOND - III System.

TA9217 е флуоресцентен *in situ* хибридизационен продукт, предназначен да оцветява 30 теста (30 предметни стъкла оцветени с 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

# Съдържание

<b>Употреба</b> .....	<b>3</b>
За използване при диагностика <i>in vitro</i> .....	3
Необходимо обучение .....	3
<b>Резюме и обяснение</b> .....	<b>3</b>
Основа .....	3
Резюме за клинично съгласуване BOND-MAX System .....	4
Резюме за клинично съгласуване BOND-III System .....	4
Принцип на процедурата .....	5
Предоставени компоненти .....	5
Насоки за употреба .....	5
Съхранение и стабилност .....	5
Подготвяне на проба .....	6
Предупреждения и предпазни мерки .....	6
<b>Процедура</b> .....	<b>6</b>
A. Необходими реагенти, които не са доставени .....	6
B. Необходимо оборудване, което не е доставено .....	6
C. Методология .....	7
D. BOND ензимно предварително третиране .....	7
E. Стандартен протокол по оцветяване .....	7
F. Процедурни стъпки .....	7
G. Съхранение на предметните стъкла .....	8
<b>Оценка и изборяване на сигнала</b> .....	<b>9</b>
Препоръчан метод за определяне на LSI HER2 към CEP17 съотношение .....	10
<b>Leica HER2 FISH System - 30 Test Наръчник за тълкуване</b> .....	<b>11</b>
<b>Примерна таблица за оценки</b> .....	<b>12</b>
<b>Качествен контрол</b> .....	<b>13</b>
Използване на контролни предметни стъкла .....	13
<b>Ограничения</b> .....	<b>14</b>
A. Общи ограничения .....	14
B. Специфични за продукта ограничения .....	14
<b>Клинично съгласуване на Leica HER2 FISH System - 30 Test с Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Гърди</b> .....	<b>15</b>
Резултати от 2x2 съгласуване BOND-MAX System - Гърди .....	15
Резултати от 2x2 съгласуване BOND-III System - Гърди .....	16
<b>Клинично съгласуване на Leica HER2 FISH System - 30 Test за комплекта за Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - стомах</b> .....	<b>17</b>
Резултати от 2x2 съгласуване на BOND-MAX System - стомах .....	17
<b>Тестване с точност – BOND-MAX System</b> .....	<b>18</b>
A. Тестване с точност на резултатите в една серия .....	18
B. Тестване с точност на резултатите при един инструмент .....	18
C. Тестване с точност на резултатите в няколко серии .....	18
D. Тестване с точност на резултатите в няколко лаборатории .....	19
E. Тестване с точност на резултатите при няколко наблюдателя .....	19
F. Тестване с точност на резултатите от серия в серия .....	19
<b>Тестване с точност – BOND-III System</b> .....	<b>19</b>
G. Тестване с точност на резултатите в една серия .....	19
H. Тестване с точност на резултатите при един инструмент .....	19
I. Тестване с точност на резултатите в няколко серии .....	20
J. Тестване с точност на резултатите в няколко лаборатории .....	20
K. Тестване с точност на резултатите при няколко наблюдателя .....	20
L. Тестване с точност на резултатите от серия в серия .....	20
<b>Здравина на образеца</b> .....	<b>21</b>
<b>Разрешаване на проблеми</b> .....	<b>22</b>
<b>Референции</b> .....	<b>24</b>
<b>Лицензно споразумение</b> .....	<b>25</b>
Изменения спрямо предишната версия .....	25
Дата на издаване .....	25
<b>Идентификация на символите</b> .....	<b>25</b>

## Употреба

### За използване при диагностика *in vitro*

Leica HER2 FISH System - 30 Test е предназначена да открива амплификация на HER2/неу ген чрез флуоресцентна *in situ* хибридизация (FISH) във фиксирани във формалин включен в парафин рак от човешка гърда и аденокарциноми от стомаха (включително гастроезофагеалната връзка) и включени в парафин проби от човешка тъкан с рак на гърдата. Leica HER2 FISH System - 30 Test е посочена като помощно средство при оценката на пациенти, за които се разглежда като възможност лечение с Herceptin® (trastuzumab) (вж. Herceptin листовката в опаковката). Leica HER2 FISH System - 30 Test не е замислена за използване за следене или диагностициране на рак на гърдата. Всякаква друга налична клинична информация трябва също да се взема под внимание, като напр. размер на тумора, брой на включени лимфни възли и статус на стероидния рецептор. Решението за лечение на пациенти с рак на гърдата не трябва да се базира единствено на HER2 статуса на генна амплификация.

Бележка: Всички пациенти в клиничните опити с Herceptin са подбрани с помощта на изследващ имуноцитохимичен набор от клинични изпитвания (CTA). Нито един от пациентите в тези изпитвания не е бил избран с помощта на Leica HER2 FISH System - 30 Test. Leica HER2 FISH System - 30 Test е сравнена с на Abbott Molecular PathVysion® HER-2 DNA Probe Kit на базата на независим набор от проби и е сметнато, че предоставя приемливи резултати за съгласуване, както това е посочено в резюмето за клинично съгласуване. Актуалното съотнасяне на резултатите от Leica HER2 FISH System - 30 Test към клиничния резултат не е установено.

Всички пациенти в клиничните опити с Herceptin при напреднал рак на стомаха (ToGA) са били избрани с помощта на Dako HercepTest. Нито един от пациентите в тези изпитвания не е бил избран с помощта на Leica HER2 FISH System - 30 Test. Leica HER2 FISH System - 30 Test е сравнена с образец от комплекта за ДНК проби на Abbott Molecular PathVysion® HER-2 DNA Probe Kit на базата на независим набор от проби и е сметнато, че предоставя приемливи резултати за съгласуване, както това е посочено в резюмето за клинично съгласуване. Актуалното съотнасяне на резултатите от Leica HER2 FISH System - 30 Test към клиничния резултат не е установено.

\* Herceptin® е търговска марка на Genentech, Inc. и F. Hoffmann-La Roche Ltd. PathVysion® е търговска марка на Abbott Molecular Inc. Всички права запазени. Използвано по лиценз.

### Необходимо обучение

Leica Biosystems ще осигури обучение при подготовката на проби, процедурата с образци и тъкуването на FISH тестването на HER2 гена за всички потребители.

### Резюме и обяснение

#### Основа

Генът HER2, който освен това е известен като неврилима или c-erbB2, се намира върху дясното рамо на хромозома 17 на позиция 17q11-12 (1). Както HER2 генът, така и неговият 185 kD кодиран протеин са показали, че играят основна роля в злокачествената трансформация и прогреса на тумора при рака на гърдата (2).

HER2 функционира като прогнозен маркер с генна амплификация и свръхекспресираност на протеина, свързани с увеличена степен на поява на заболяването и по-висока смъртност. HER2 също така функционира като предсказуем маркер за избраната системна хемотерапия и таргетираните лечения (3). По-специално амплификацията на HER2 гена е показала, че е индикатор на лоша прогноза при рак на гърдата с позитивни лимфни възли (4-8). Освен това едно изследване посочва прогнозната стойност на HER2 като по-силна при пациенти, третирани с хемотерапия (7). Обаче при предсказването на лечението на болестта и оцеляването на индивидуалните пациенти трябва да се вземат предвид и други утвърдени прогнозни фактори, като напр. размер на тумора, брой на позитивните лимфни възли и статус на стероидния рецептор.

Свръхекспресираността на HER2 онкопротеин в резултат на генната амплификация, открита в клетките с рак на гърдата, предполага HER2 като цел за терапия на базата на антитела (3) - докато резултатите от ToGA опита ясно показват, че употребата на Herceptin при рак на стомаха заедно с хемотерапия е ефективно лечение, което подобрява общото оцеляване

при HER2 положителен рак на стомаха (9). Herceptin (trastuzumab) е хуманизирано моноклонално антитяло (10), което се свързва с голям афинитет към онкопротеина HER2 и е доказано, че е показало, че потиска пролиферацията на човешки туморни клетки, които свърхекспресират онкопротеина HER2 както *in vitro*, така и *in vivo* (11-13). След разработката на Herceptin откриването на HER2 гена и на протеина се е превърнало в основен инструмент при оценката на тумори на гърдата, давайки насока както за избора на терапия, така и за последващите грижи за пациентите (14, 15).

Както в интерфазните, така и в метафазните клетки, извлечени от човешки клетъчни линии с карцином на гърдата, FISH се използва за показване на HER2 генната амплификация (16-19). За количествено характеризирани на HER2 генната амплификация FISH оценява нивото на HER2 генна амплификация директно в туморните клетки. Характеристичната морфология на тъканта и пространственото разпределение на онкогенните копия в индивидуални некултивирани първични карциноми на гърдата се запазват. Отклонения в броя на копията на хромозома 17 (аневсомия) също често се откриват в туморите на гърдата. Те могат да са налице и като изтривания или натрупвания на хромозоми (полисомия). Тази хромозомна вариация има съществено влияние върху тълкуването и докладването на статуса на генна амплификация на HER2. Ето защо измерването на броя на копията на хромозома 17 във връзка с HER2 е от съществено значение (4).

Leica HER2 FISH System - 30 Test съдържа LSI HER2 ДНК проба, 226 Kb SpectrumOrange™ директно обозначена флуоресцентна ДНК проба, специфична за местоположението на HER2 гена (17q11.2-q12) и CEP17 ДНК проба, 5.4 Kb SpectrumGreen™ директно обозначена флуоресцентна ДНК проба, специфична за алфа сателитната ДНК последователност в центромерния регион на хромозома 17 (17p11.1-q11.1). Разтворът на пробата е специално формулиран и валидиран за използване при BOND системата и не трябва да се променя или използва в ръчна настройка.

## Резюме за клинично съгласуване BOND-MAX System

Leica HER2 FISH System - 30 Test е разработено за предоставяне на напълно автоматизирана алтернатива на текущите технологии, използвани за определяне на статуса на генна амплификация на HER2. Изпълнението на Leica FISH HER2 System - 30 Test на BOND-MAX System е оценена в независимо проучване, сравняване на резултатите на Leica FISH HER2 System - 30 Test за образец от комплекта за ДНК проби на Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit при 300 проби от тумор на гърдата и при 109 аденокарциноми на стомаха (включително гастрорезофагеалната връзка). Нито една от тези проби от тумори не са получени от пациенти в клинични изследвания на Herceptin. Резултатите при тъканта от гърди указаха 99,33 % съответствие в 2x2 анализ (95 % интервали на доверие от 97,61–99,92 %). Резултатите при аденокарциномите на стомаха (включително гастрорезофагеалната тъканна връзка) указаха 98,17 % съответствие в 2x2 анализ (95 % интервали на доверие от 93,53–99,78 %). Данните от съгласуването също така показват, че положителен резултат с Leica HER2 FISH System - 30 Test е много вероятно да съответства на положителен резултат при образеца от Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit. Leica HER2 FISH System - 30 Test се тълкува като отрицателна за HER2 генна амплификация, ако HER2:CEP17 генното съотношение е по-малко от 2.0 и като положителна, ако HER2:CEP17 генното съотношение е по-голямо или равно на 2.0. Двусмислени (гранични) резултати, при които HER2:CEP17 генното съотношение е между или равно на 1.8-2.2, трябва да се тълкуват внимателно. Прегледайте допълнителни 20 ядра и изчислете отново съотношението.

## Резюме за клинично съгласуване BOND-III System

Leica HER2 FISH System - 30 Test е разработено за предоставяне на напълно автоматизирана алтернатива на текущите технологии, използвани за определяне на статуса на генна амплификация на HER2. Представянето на Leica HER2 FISH System - 30 Test в BOND-III System бе оценено в независимо изследване, сравняващо резултатите на Leica HER2 FISH System - 30 Test спрямо образец от Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit при 300 проби от тумор на гърдата. Нито една от тези проби от тумори не са получени от пациенти в клинични изследвания на Herceptin. Резултатите показаха 99,67% съгласуване в 2x2 анализ (95% интервали на доверие от 98,16–99,99%). Данните от съгласуването също така показват, че положителен резултат с Leica HER2 FISH System - 30 Test е много вероятно да съответства на положителен резултат при образеца от Abbott

Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit. Leica HER2 FISH System - 30 Test се тълкува като отрицателна за HER2 гена амплификация, ако HER2:CEP17 генното съотношение е по-малко от 2.0 и като положителна, ако HER2:CEP17 генното съотношение е по-голямо или равно на 2.0. Двусмислени (гранични) резултати, при които HER2:CEP17 генното съотношение е между или равно на 1.8-2.2, трябва да се тълкуват внимателно. Пребройте допълнителни 20 ядра и изчислете отново съотношението.

## Принцип на процедурата

Leica HER2 FISH System - 30 Test съдържа компонентите, необходими за извършване на базираната на флуоресцентна *in situ* хибридизация процедура по оцветяване за фиксирани във формалин и включени в парафин тъкани. След подходящо предварително третиране, инкубация с готово за използване LSI HER2/CEP17 Dual Probe и измиване с подходяща сила секциите на тъканта се дехидратират и закрепват с DAPI. Резултатите се тълкуват чрез флуоресцентна микроскопия с помощта на препоръчаните филтри при подходящите дължини на вълните.

Leica HER2 FISH System - 30 Test е за използване само в системата BOND-MAX and BOND III System.

## Предоставени компоненти

Материалите, посочени по-долу (таблица 1), са достатъчни за оцветяване на 30 теста (30 предметни стъкла оцветени с LSI HER2/CEP17 Dual Probe).

<b>LSI HER2/CEP17 Probe</b> <b>6,6 mL</b>	Съдържа готово за използване LSI HER2/CEP17 Dual Probe. Съдържа <60% (v/v) формамид.
<b>Post Hybridization Wash 2</b> <b>9 mL</b>	Съдържа готово за използване разтвор за след хибридизационно измиване. Съдържа <50% (v/v) формамид.
<b>BOND Enzyme Concentrate 2</b> <b>1 mL</b>	Съдържа разтвор на протеиназа К при 1,7 мг/мл.
<b>BOND Enzyme Diluent</b> <b>65 mL</b>	Съдържа ензимен разреждател.
<b>BOND Open Container</b> <b>3 x 7 mL</b>	BOND Open Container използван за Enzyme 5.

Таблица 1: Компоненти на Leica HER2 FISH System - 30 Test

За допълнителна информация за продуктова безопасност се обърнете към индивидуалния ИЛДБ, който е наличен на адрес [www.leicaBiosystems.com/TA9217-IFU](http://www.leicaBiosystems.com/TA9217-IFU)

## Насоки за употреба

Всички доставени реагенти са формулирани специфично за използване с този образец и партидните номера са специфични за всяка Leica HER2 FISH System - 30 Test. За да е валиден образецът, не трябва да се правят замествания.

## Съхранение и стабилност

Да се съхранява при 2–8 °C. Да не се замразява. Да се върне до температура от 2–8 °C непосредствено след употреба. Всяко отклонение от тези условия ще направи образца невалиден. Уверете се, че Leica HER2 FISH System - 30 Test се използва в рамките на обозначения си срок на годност. Признаците за замърсяване и/или нестабилност на Leica HER2 FISH System - 30 Test са мътноста на разтворите (с изключение на разтвора на пробата) и издаване на миризма. Потребителят трябва да провери условията на съхранение, които са различни от тези, посочени по-горе.

## Подготвяне на проба

Стандартните методи за обработка на тъкани трябва да се използват за всички проби (20). Препоръчва се тъканите да се подготвят във фиксатори на формалинова основа и да са рутинно обработени и включени в парафин. Например пробите трябва да се блокират на дебелина от 3–4 мм и да се фиксират за 18–24 часа в 10% неутрално буферен формалин. Тъканите трябва след това да се дехидратират в серия от алкохоли и да се изчистят чрез ксилен, след което да се импрегнират с разтопен парафинов восък, който да е с температура от не повече от 60 °С. Пробите от тъкани трябва да са на разстояние между 4–6 µm.

Секциите от тъкани, закрепени върху заредени предметни стъкла (BOND Plus Slides – продукт код S21.2113 Или Apex BOND Slides - продукт код 3800040) могат да се запазят до 12 месеца при 2–8 °С преди оцветяване. След разделянето се препоръчва предметните стъкла да се инкубират при 60 °С за един час. Оцветените секции трябва да се съхраняват при -20 °С, за да се съхрани флуоресцентния сигнал и да се предотврати избледняването. Оставете съхраняваните предметни стъкла да достигнат стайна температура преди отчитането.

## Предупреждения и предпазни мерки

*Само за професионални потребители.*

Един или няколко компонента в продукта са опасни и могат да навредят на зародиша.

По правило на лица под 18-годишна възраст не е позволено да работят с този продукт. Потребителите трябва внимателно да са инструктирани за правилната процедура на работа, опасните свойства на продукта и необходимите инструкции за безопасност.

Пробите преди и след фиксирани, както и всички материали, които са изложени на тях, трябва да се третират така, че да не се предават инфекции, както и да се изхвърлят при спазване на подходящите предпазни мерки.

Никога не капете реагенти в устата и избягвайте контакт на кожата и лигавиците с реагенти и проби. Ако реагенти или проби влезнат в контакт с чувствителни области, измийте с обилно количество вода. Потърсете лекарска помощ. Консултирайте се с федералните, щатските или локални разпоредби за изхвърляне на потенциално токсични компоненти.

Намалете микробното замърсяване на реагентите, в противен случай може да се получи увеличаване на неспецифичното оцветяване.

## Процедура

### A. Необходими реагенти, които не са доставени

- BOND Dewax Solution (AR9222)
- BOND Epitope Retrieval Solution 1 (AR9961)
- BOND Wash Solution x10 Concentrate (AR9590)
- Стандартни разтворители, използвани в базирани на флуоресцентна *in situ* хибридизация образци (напр. етанол, абсолютен и степенуван)
- Дистилирана или дейонизирана вода
- DAPI Контраоцветяване
- Leica HER2 FISH Control Slides (TA9123)
- BOND Aspirating Probe Cleaning System (CS9100)

### B. Необходимо оборудване, което не е доставено

- Пипети (с възможност за измерване на обеми 1-20 µL и 100 – 1000 µL)
- Заредени предметни стъкла (BOND Plus Slides – продукт код S21.2113 Или Apex BOND Slides - продукт код 3800040)
- BOND-MAX (21.0051) or BOND - III (21.2201)
- BOND Universal Covertiles™ (S21.2001)
- BOND Mixing Stations (S21.1971)
- BOND Slide Label & Print Ribbon (S21.4564)
- Покривни стъкла
- Изсушаваща пещ (способна да поддържа 60 °С)
- Флуоресцентен микроскоп (60–100x обектив) с подходящ светлинен източник. Запишете броя часове, през които крушката е използвана и сменете крушката

преди тя да превиши определеното време на работа. Уверете се, че лампата е правилно поставена.

- Подходящ флуоресцентен филтърен комплект (SpectrumOrange™ – пик на възбуждане при 559nm, пик на емисия при 588nm, SpectrumGreen™ – пик на възбуждане при 497nm, пик на емисия при 524nm и DAPI – пик на възбуждане при 367nm, пик на емисия при 452nm). За повечето модели микроскопи са на разположение флуоресцентни филтърни комплекти с многочестотна лента, оптимизирани за използване с Leica HER2 FISH System - 30 Test. Препоръчаните филтърни комплекти за Leica HER2 FISH System - 30 Test са DAPI/9-Orange двойна честотна лента, DAPI/Green двойна честотна лента, Green/Orange (V.2) двойна честотна лента и DAPI/Green/Orange (V.2) тройна честотна лента.

## C. Методология

- Преди извършването на тази методология, потребителите трябва да са подходящо обучени за автоматизирания *in situ* флуоресцентен метод.
- Всяка тестова секция, оцветена с LSI HER2/CEP17 Dual Probe, позволява еднакъв клетъчен анализ на сигналите от HER2 и центромерната хромозома 17. Последващо съотношение на сигналите от HER2 спрямо тези от хромозома 17 ще позволи задаване на количествена оценка към мострата, посочвайки отрицателен (неувеличен) или положителен (увеличен) резултат. Двусмислените (гранични) резултати (1.8-2.2) трябва да се тълкуват внимателно. Препоръчват се допълнителни 20 ядра и изчислете отново съотношението.

## D. BOND ензимно предварително третиране

Преди оцветяването разреждете доставения BOND Enzyme Concentrate 2 при съотношение 1:300 с помощта на доставения BOND Enzyme Diluent в един от BOND Open Containers, които са предоставени. Например за оцветяване на 10 предметни стъкла пригответе 3 мл работен ензимен разтвор като разреждете 10 µL от BOND Enzyme Concentrate 2 в 2990 µL от BOND Enzyme Diluent. Препоръчва се ензимът да е пряко приготвен преди всяка серия на оцветяване и на серия да се използва минимален обем от 900 µL.

## E. Стандартен протокол по оцветяване

Препоръчва се Leica HER2 FISH System - 30 Test да се използва с препоръчвания стандартен протокол по оцветяване, показан в таблица 2 по-долу.

Тип на протокола	Име на протокола
Оцветяване	*FISH Protocol A
Препарат	*Dewax
HIER	*HIER 25 min with ER1 (97)
Ензим	*Enzyme 5 for 25 min
Денатуриране	*D10
Хибридизация	*ISH Hybridization (12Hr)

Таблица 2: Стандартен Leica HER2 FISH System - 30 Test Staining Protocol

## F. Процедурни стъпки

Тези инструкции трябва да са в съответствие с наръчника на потребителя на BOND System. Нов BOND Universal Covertile трябва да се използва за всяко предметно стъкло.

Използването на BOND Universal Covertiles, които преди това е използван за имунохистохимично или *in situ* хибридизационно оцветяване, не е валидирано за този тест.

1. Върху BOND-MAX и BOND-III System се уверете, че контейнерите за насипни и опасни отпадъци имат достатъчен капацитет за извършване на необходимите серии на оцветяване.
2. Уверете се, че има адекватно количество алкохол, дестилирана или дейонизирана вода, BOND Dewax Solution, BOND Epitope Retrieval Solution 1 и BOND Wash Solution в контейнерите за насипен реагент за извършване на необходимите серии на оцветяване.

3. Уверете се, че е монтирана чиста BOND Mixing Station.
4. Включете BOND-MAX и BOND-III System.
5. Включете компютъра, прикрепен към BOND-MAX и BOND-III System.
6. Отворете BOND софтуера.
7. За нов Leica HER2 FISH System - 30 Test комплект сканирайте баркода на табличката с реагент с ръчен скенер, за да въведете системата в BOND реагентния опис (само единичен баркод).
8. Пригответе BOND Enzyme 5 в доставения BOND открит контейнер при разреждане от 1:300. Например за 10 предметни стъкла добавете 10µL от BOND Enzyme Concentrate 2 към 2990 µL от BOND Enzyme Diluent.
9. Сканирайте в доставения BOND открит контейнер и регистрирайте като Bond Enzyme 5.
10. Отидете на екрана за настройка на предметните стъкла и щракнете Add case (Добави капсула).
11. Въведете детайлите за първата капсула. Уверете се, че обеят е зададен на 150 µL и протоколът за препарата е \*Dewax (Сваляне на парафин). Щракнете върху ОК.
12. С маркираната капсула на екрана за настройка на предметните стъкла щракнете Add slide (Добави предметно стъкло).
13. Първо добавете пациентски тестови предметни стъкла. Уверете се, че типът тъкан е заден на Test tissue (Тестова тъкан).
14. Изберете режим на оцветяване Single (Единичен).
15. Изберете процес ISH.
16. Изберете \*LSI HER2/CEP17 Dual Probe – 30 тест от списъка с проби. Етикетът с протоколи праща към правилния протокол за оцветяване (\*FISH Protocol A), HIER протокол (\*HIER 25 min with ER1 (97)), EIER протокол (\*Enzyme 5 for 25 min), денатуриране (\*D10) и хибридизация (\*ISH Hybridization (12Hr)).
17. Повторете стъпки от 10 до 16 докато предметните стъкла и контроли от пациентския тест (Leica HER2 FISH Control Slides стъкла и/или амбулаторни контроли) не се създадат. Разпечатайте етикетите за предметните стъкла.
18. Обозначете предметните стъкла по подходящ начин.
19. Отворете капациите на всички Leica HER2 FISH System - 30 Test контейнери и заредете табличката с реагент в BOND-MAX и BOND-III System.
20. Поставете нови Covertiles към всяко предметно стъкло.
21. Заредете табличката за предметни стъкла в BOND-MAX и BOND-III System. и натиснете бутона Load/Unload (Зареждане/разтоварване).
22. Потвърдете, че предметните стъкла са сканирани и щракнете върху бутона Run (Play) (Серия (Пусни)) върху екрана за статус на системата, за да започнете незабавно серията (за Leica HER2 FISH System - 30 Test се препоръчва този образец да се постави за нощна серия с използване на функционалността за отложен старт).
23. Уверете се, че индикаторното поле на табличката показва Proc (OK) (Обраб) и че груповият номер и времето на завършване са показани.
24. Когато серията завърши, натиснете бутона Load/Unload (Зареждане/разтоварване) и извадете табличката с предметни стъкла от BOND-MAX и BOND-III System.
25. Махнете Covertiles и изплакнете предметните стъкла в дейонизирана вода.
26. Дехидрирайте светкавично при две смени на алкохола, изсушете на въздух.
27. Поставете 20µL от DAPI директно върху пробата.
28. Поставете покривно стъкло и оставете разтвора да се разпростре до пълната му степен, като внимавате да не оставите мехурчета въздух.
29. Уплътнете ръба на покривното стъкло с лак за нокти или подобен уплътнител.
30. Поставете предметните стъкла на тъмно, за да улесните образуването на сигнал преди да разглеждате под флуоресцентен микроскоп.
31. За запазване на интензивността на сигнала съхранявайте оцветените предметни стъкла при -20 °C.

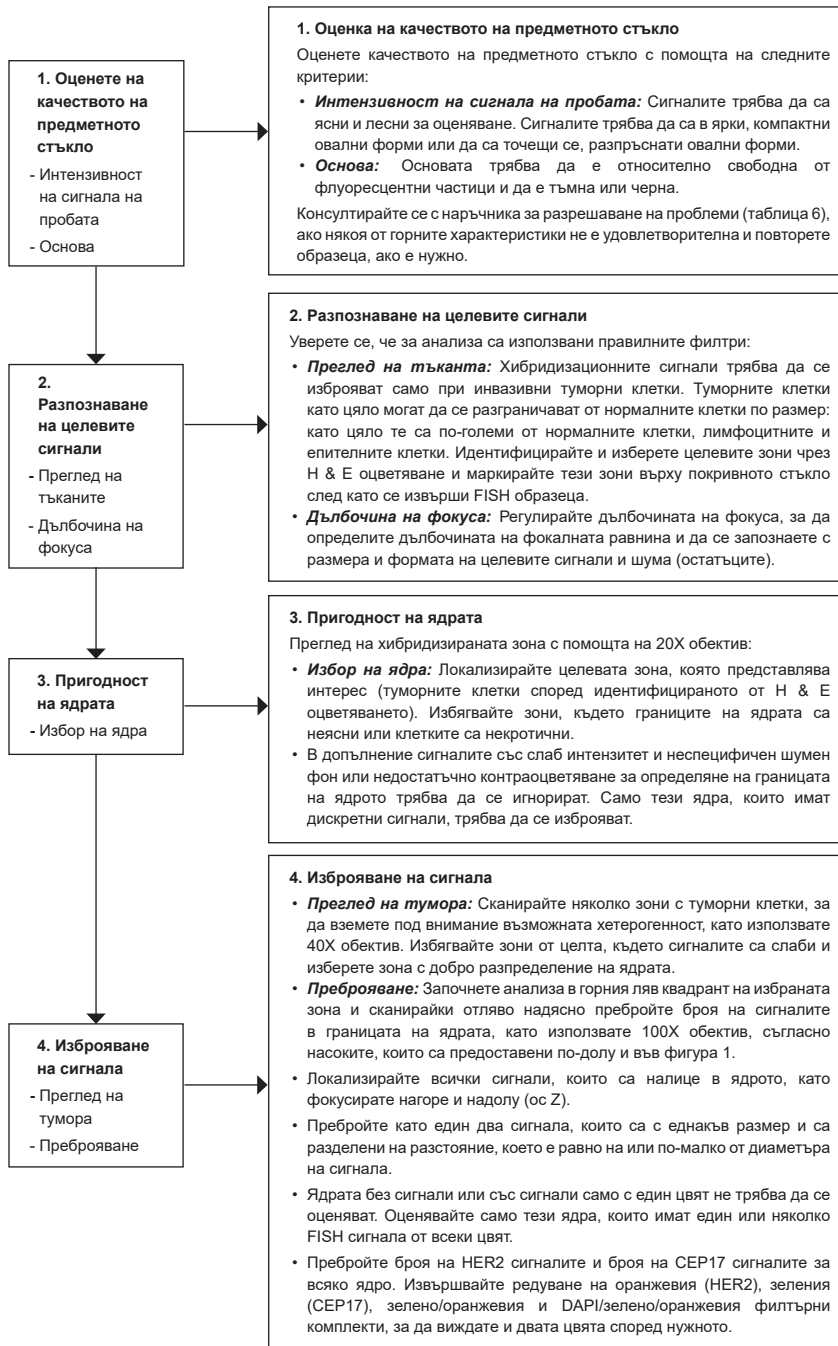
## G. Съхранение на предметните стъкла

Съхранявайте оцветените предметни стъкла при -20 °C на тъмно. Оставете предметните стъкла да достигнат стайна температура преди да ги разглеждате след изваждането от -20 °C.



## Оценка и изброяване на сигнала

За оценка на качеството на сигнала и изброяване на HER2 и CEP17 сигналите, следвайте процеса по-долу:



## Препоръчан метод за определяне на LSI HER2 към CEP17 съотношение

За определяне на LSI HER2 към CEP17 съотношение използвайте следния метод:

1. Запишете и определете броя на LSI HER2 и CEP17 сигналите в 20 ядра (вж. фигура 2 Leica HER2 FISH System - 30 Test таблица за резултати по-долу).
2. Съберете всички LSI HER2 сигнали. Това представлява общия брой LSI HER2 сигнали за преброяването, напр. 143.
3. Съберете всички CEP17 сигнали. Това представлява общия брой CEP17 сигнали за преброяването, напр. 48.
4. За изчисляване на крайния резултат използвайте следната калкулация:

Общият брой LSI HER2 сигнали разделени на общия брой CEP17 сигнали, напр.  $143/48$  е равно на съотношение от 2.98, което е положително за HER2 амплификация.

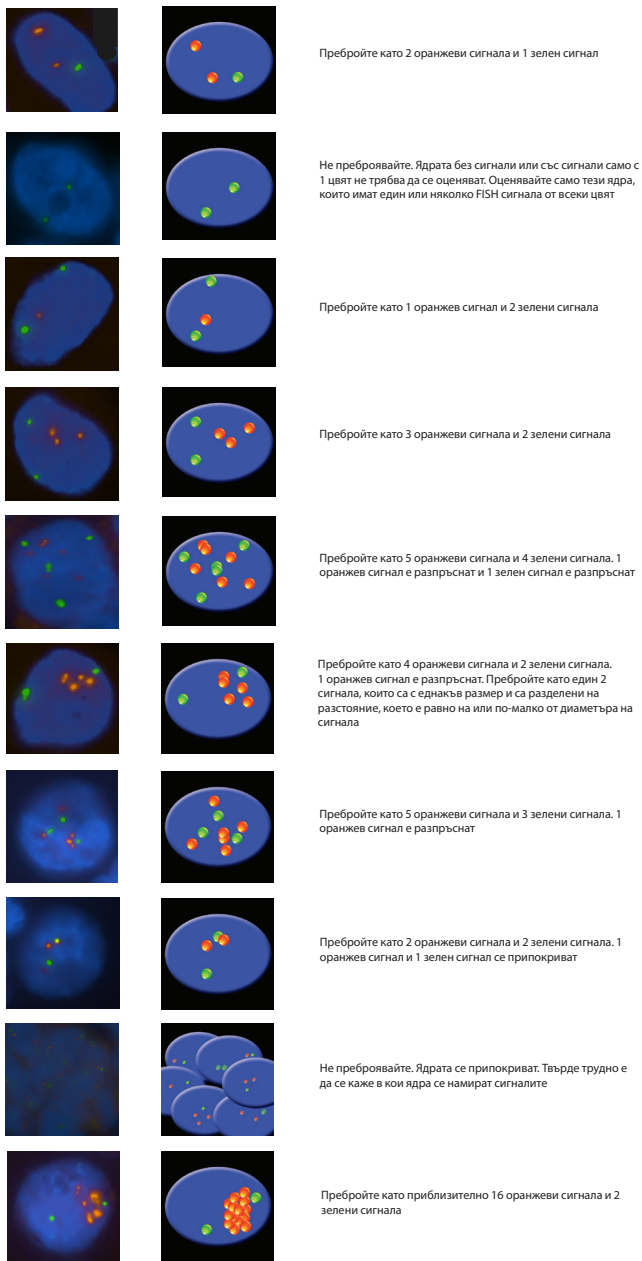
**Важна бележка: Ако LSI HER2 към CEP17 съотношението е двусмислено (1.80 - 2.20), пребройте допълнителни 20 ядра и изчислете наново съотношението.**

Резултатите трябва да се докладват както следва:

1. Ако съотношението е  $<2$ , HER2 генна амплификация не е наблюдавана
2. Ако съотношението е  $\geq 2$ , HER2 генна амплификация не е наблюдавана

**Важна бележка: Съотношение от или близо до границата (1.80 - 2.20) трябва да се тълкува внимателно, както е описано по-горе.**

# Leica HER2 FISH System - 30 Test Наръчник за Тълкуване



Фигура 1: Наръчник за тълкуване

## Leica HER2 FISH System - 30 Test Таблица за оценки

Преброяване на сигнал от 20 ядра					
Ядро ном.	HER2 Номер на копие	CEP17 Номер на копие	Ядро ном.	HER2 Номер на копие	CEP17 Номер на копие
1			11		
2			12		
3			13		
4			14		
5			15		
6			16		
7			17		
8			18		
9			19		
10			20		
Общо 1-10			Общо 11-20		
		HER2	CEP17	HER2:CEP17 Съотношение на амплификация	
Общ резултат 1-20					
Средно на клетка					

Фигура 2: Примерна таблица за оценки

## Автоматизиран Ariol метод за определяне на генната амплификация на HER2 FISH чрез флуоресцентна хибридизация in situ (FISH)

Използването на приложението за анализ на цифрови изображения на имунофлуоресцентни образци Ariol PathVysion като помощно средство при интерпретацията на лабораторните резултати беше валидирано по независим начин върху различна кохорта от проби за употреба със Leica HER2 FISH System. Когато се използва със Leica HER2 FISH System, приложението за анализ и оценка на цифрови изображения Ariol PathVysion® е за in vitro диагностика. Когато се използва със Leica HER2 FISH System, приложението Ariol PathVysion трябва да се калибрира за употреба с помощта на предметни стъкла с тъкани контроли, а не с Leica HER2 FISH Control Slides (TA9123).

**Всички диагностични решения се вземат от квалифициран клиницист.**

За допълнителна информация направете справка в ръководството за оператора на Ariol.

### Качествен контрол

#### Използване на контролни предметни стъкла

Препоръчва се Leica HER2 FISH Control Slide да се включва във всяка тестова серия за наблюдаване на представянето на образеца и за оценка на точността на изброяването на сигнала. Контролните предметни стъкла трябва да се пускат за всяка партида по оцветяване в BOND-MAX и BOND-III System с всяка нова партида реагент. В допълнение индивидуалните потребители могат да изберат да използват собствен контролен материал.

Оценете качеството на контролните предметни стъкла и извършете изброяване на сигнала съгласно инструкциите в раздел **Оценка и изброяване на сигнала**. Критериите за качество на предметното стъкло трябва да са удовлетворени и HER2:CEP17 резултатите от съотношението трябва да са в установените диапазони за приемливо тестово представяне. Вж. таблица 3 за критериите за приемане на Leica HER2 FISH Control Slides.

Клетъчната линия	Bond Oracle HER2 IHC System Профил	HER2 Рецепторно натоварвана клетка*	Leica HER2 FISH System - 30 Test HER2:CEP17 Критерии за приемане
SKBr-3	3+	$4.3 \times 10^5$	HER2 амплификация се наблюдава
MDA-MB-453	2+	$1.4 \times 10^5$	HER2/CEP17 генното съотношение трябва да е между 1.5 – 2.5
MDA-MB-175	1+	$6.3 \times 10^4$	HER2 амплификация не се наблюдава
MDA-MB-231	0	$9.3 \times 10^3$	HER2 амплификация не се наблюдава

\*HER2 анализ на рецепторното натоварване според оценката от течната цитометрия

Таблица 3: Тълкуване на Leica HER2 FISH Control Slide.

Ако контролите на образеца са неуспешни, резултатите от FISH за тази капсула не трябва да се докладват. Ако контролните предметни стъкла не покрият критериите за приемане на предметни стъкла, Leica HER2 FISH System - 30 Test може да е работела неадекватно. В този случай ще е необходим повторен тест с пресни контролни предметни стъкла и предметно(и) стъкло(а) с проба от пациента. Ако резултатите са извън посочения диапазон, но контролните предметни стъкла отговарят на критериите за приемане за качество, повторен скрийнинг на същото предметно стъкло може да е подходящ, тъй като изброяването може да не е било извършено правилно. Консултирайте се с наръчника за разрешаване на проблеми (таблица 6) в случай на грешка при хибридизация с пробата или контролното(ите) предметно(и) стъкло(а).

За клинични проби, при които тълкуването на хибридизационния сигнал е трудно и няма достатъчно проба за повторен образец, тестът не е информативен. Ако няма достатъчно клетки за анализ, тестът не е информативен.

Пациентските проби трябва да се контролират съгласно стандартните работни процедури на лабораторията. Качеството на сигнала и резултатите от изброяването трябва да се документират в подходящ докладен формуляр.

## Ограничения

### A. Общи ограничения

FISH е метод, който изисква специализирано обучение по всички аспекти на процедурата (включително избора на подходящи реагенти, тъкан, фиксиране, обработка и подготовка на предметно стъкло) и тълкуването. Оцветяването на тъканта зависи от преместването, фиксирането и обработката на тъканта преди оцветяването. Неправилното фиксиране, замразяване, разтопяване, измиване, изсушаване, нагряване, разделяне или замърсяването с други тъкани или течности може да доведе до морфологични артефакти, полинуклеотидно деградиране, фоново флуоресциране или погрешни отрицателни резултати. Непоследователните резултати може да се дължат на вариации във фиксирането, методите на поставяне или на присъщите нередности в тъканта (21). Прекомерното или непълно контраоцветяване може също да застраши правилното тълкуване на резултатите.

Неспецифичното оцветяване като резултат от несвързана проба има разпръснат, зърнист вид и може да се визуализира при очакваното място на хибридизация или отдалечено от него. Използвайте незасегнати клетки за тълкуване на резултатите от оцветяването. Некротичните или дегенерирани клетки могат да се оцветят неспецифично (22). Неочаквано FISH оцветяване или промени в оцветяването могат да са резултат от изменения в нивата на експресия на кодиращите гени. Всяка промяна в очакваните модели на оцветяване трябва да се тълкува във връзка с всички други диагностични изследвания. Тълкуването на оцветяването трябва да е съпътствано от морфологични изследвания и от използването на подходящ контролен материал и трябва да се оценява от квалифициран патолог в рамките на контекста на клиничната анамнеза на пациента и на други диагностични тестове.

Представянето на образеца (т.е. оценката на адекватността на контролните материали) и тълкуването на всяко оцветяване или неговата липса трябва да се извършват в надлежно акредитирана/лицензирана лаборатория под контрола на подходящо квалифициран и опитен патолог, който е отговорен за цялостната оценка на *in situ* хибридизационния образец и неговото тълкуване. Погрешните положителни резултати при FISH могат да се дължат на кръстосана реактивност на пробата към други полинуклеотидни последователности и/или неспецифично свързване. Подходящи контроли трябва да се приложат и документират и тестовите трябва да вземат под внимание всички релевантни срокове на годност.

Технически вариации и вариации при тълкуването могат да се наблюдават и когато FISH се използва за извлечени от клетъчни линии материали (23).

### B. Специфични за продукта ограничения

Този продукт не е замислен за употреба в друг базиран на ДНК диагностичен образец.

Не сменяйте Leica HER2 FISH System - 30 Test реагентите с други компоненти, независимо дали са доставени от Leica Biosystems или от други производители. Това ще доведе до инвалидиране на образеца. Потребителят трябва да валидира всяко отклонение от препоръчаните процедури.

Препоръчително е в образеца да се използват тъкани, които са фиксирани само във фиксатори на формалинова основа. Използването на друг тип фиксатор може да инвалидира образеца.

Секциите на тъкани, изрязани извън препоръчания диапазон на дебелина, не са валидирани. Използването на друга дебелина на секция може да инвалидира образеца.

## Клинично съгласуване на Leica HER2 FISH System - 30 Test с Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Гърди

Това изследване разгледа пригодността на Leica HER2 FISH System - 30 Test за употреба като помощно средство при определянето на лечение с терапия с Herceptin (trastuzumab). Изследването беше разработено за разглеждане на съгласуването между Leica HER2 FISH System - 30 Test и предварително одобрено диагностично устройство, Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, разглеждано като „златен стандарт“ за този образец от тъкан от гърдите. Критерият за приемане за тестването беше долното ограничение от 95% едностранен интервал на доверие да е над 90% между Leica HER2 FISH System - 30 Test и ръчния Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, между положителните (увеличени) и отрицателните (неувеличени) фиксирани във формалин и включени в парафин (FFPE) капсули с инвазивен рак на гърдата.

Изследването бе извършено като маскирана оценка в три центъра на клинични проби с инвазивен карцином на гърдата. Всеки изследващ център получи архивирани блокове от фиксирана във формалин и включена в парафин тъкан от инвазивен карцином на гърдата с известни нива на експресия на онкопротеина HER2. Група от 300 проби, състоящи се от 75, 0/1+ предварително характеризирани IHC капсули; 150, 2+ предварително характеризирани IHC капсули и 75, 3+ предварително характеризирани IHC капсули, беше избрана и пробите бяха разделени по-равно между трите изследващи центъра.

Всички капсули бяха оцветени с ръчен Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit образец съгласно инструкциите за употреба на производителя, посочени на листовката в опаковката. Последователни секции от всяка капсула след това бяха оцветени с Leica HER2 FISH System - 30 Test в BOND-MAX и BOND-III System.

Всички оцветени предметни стъкла бяха маскирани и оценени по произволен начин от по един обучен наблюдател във всеки от трите изследващи центъра. Резултатите бяха тълкувани като отрицателни с изчислено HER2/CEP17 генно съотношение от <2.0 и положителни с изчислено HER2/CEP17 генно съотношение от  $\geq 2.0$ . След това данните бяха анализирани за съгласуване, за договаряне на положително оцветяване и договаряне на отрицателно оцветяване.

### Резултати от 2x2 съгласуване BOND-MAX System - Гърди

Данните бяха групирани като отрицателни (<2.00) или положителни ( $\geq 2.00$ ) за 2x2 анализ. Наблюдаваното договаряне за 300 проби между двата теста в 2x2 анализ показва съгласуване от 99,33% (298/300) с 95% CI от 97,61–99,92% за BOND-MAX System.

Процентът положително договаряне (чувствителност) или способността на Leica HER2 FISH System да идентифицира правилно положителните капсули от образца от Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (процентът от пробите, оценени положително както от Leica HER2 FISH System - 30 Test, така и от ръчното Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit от всички Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit положителни капсули) беше 99,03% (102/103).

Процентът отрицателно договаряне (специфичност) или способността на теста да идентифицира правилно Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit отрицателните капсули (процентът на пробите, оценени отрицателно от Leica HER2 FISH System - 30 Test и комплекта за Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit от всичките Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit отрицателни капсули) беше 99,49% (196/197). Вж. таблица 4.

		Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit		
		Отрицателно(<2.0)	Положително( $\geq 2.0$ )	Общо
Leica HER2 FISH System - 30 Test BOND-MAX	Отрицателно(<2.0)	196	1	197
	Положително( $\geq 2.0$ )	1	102	103
	Общо	197	103	300

Общо съгласуване (95% CI) = 99,33% (97,61 – 99,92%)

Таблица 4. 2x2 съгласуване на Leica HER2 FISH System - 30 Test по BOND-MAX System с комплект за Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit по тъкан на гърдите.

## Резултати от 2x2 съгласуване BOND-III System - Гърди

Данните бяха групирани като отрицателни (<2.00) или положителни (≥2.00) за 2x2 анализ. Наблюдаваното договаряне за 300 проби между двата теста в 2x2 анализ показва съгласуване от 99,67% (299/300) с 95% CI от 98,16–99,99% за BOND-III System.

Процентът положително договаряне (чувствителност) или способността на Leica HER2 FISH System да идентифицира правилно положителните капсули от образеца Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (процентът на пробите, оценени положително както от Leica HER2 FISH System - 30 Test, така и от ръчното Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit от всичките Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit положителни капсули) беше 99,03% (102/103).

Процентът отрицателно договаряне (специфичност) или способността на теста да идентифицира правилно Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit отрицателните капсули (процентът на пробите, оценени отрицателно от Leica HER2 FISH System - 30 Test и Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit от всичките Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit отрицателни капсули) беше 100% (197/197). Вж. таблица 5.

		Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit		
		Отрицателно(<2.0)	Положително(≥2.0)	Общо
Leica HER2 FISH System - 30 Test BOND-III	Отрицателно(<2.0)	197	1	198
	Положително(≥2.0)	0	102	102
	Общо	197	103	300

Общо съгласуване (95% CI) = 99.67% (98.16 – 99.99%).

Таблица 5. 2x2 съгласуване на Leica HER2 FISH System - 30 Test по BOND-III System с комплект за Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit по тъкан на гърдите.

В заключение генерираните в настоящото изследване данни показват, че Leica HER2 FISH System - 30 Test може да се използва като помощно средство при определянето на пациенти, за които трябва да се разгледа терапия с Herceptin (trastuzumab) на базата на високото си съгласуване с Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, предварително одобрен диагностичен тест за тази индикация.



## Клинично съгласуване на Leica HER2 FISH System - 30 Test за комплекта за Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - стомах

Това изследване разглежда пригодността на Leica HER2 FISH System - 30 Test за употреба като помощно средство при определянето на лечение с терапия с Herceptin (трастузумаб). Изследването беше разработено за разглеждане на съгласуването между Leica HER2 FISH System - 30 Test и предварително одобрено диагностично устройство, комплект за Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, разглеждано като 'златен стандарт' за този образец стомашна тъкан. Критерият за приемане за тестването беше долното ограничение от 95 % едностранен интервал на доверие да е над 90 % между Leica HER2 FISH System - 30 Test и ръчния комплект за Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, между положителните (увеличени) и отрицателните (неувеличени) фиксирани във формалин и включени в парафин (FFPE) аденокарциноми на стомаха (включително гастроезофагеалната връзка).

Изследването бе извършено като оценка на клинични проби с инвазивна стомашна аденокарцинома. Тестването бе извършено при архивирани фиксирани във формалин, включени в парафин блокчета стомашна аденокарциномна тъкан с известни нива на експресия на HER2 гена. Група от 109 проби, състоящи се от 50 увеличени капсули и 59 неувеличени капсули, бе избрана.

Всички капсули бяха оцветени с ръчен образец от комплекта за Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit съгласно инструкциите за употреба на производителя, посочени на листовката в опаковката. Последователни секции от всяка капсула след това бяха оцветени с Leica HER2 FISH System - 30 Test в BOND-MAX System.

Всички оцветени предметни стъкла бяха маскирани и оценени по произволен начин от по един обучен наблюдател. Резултатите бяха тълкувани като отрицателни с изчислено HER2/CEP17 гено съотношение от  $<2,0$  и като положителни с изчислено HER2/CEP17 гено съотношение от  $\geq 2,0$ . След това данните бяха анализирани за съгласуване, за договаряне на положително оцветяване и договаряне на отрицателно оцветяване.

### Резултати от 2x2 съгласуване на BOND-MAX System - стомах

Данните бяха групирани като отрицателни ( $<2,00$ ) или положителни ( $\geq 2,00$ ) за 2x2 анализ. Наблюдаваното договаряне за 109 проби между двата теста в 2x2 анализ показва съгласуване от 98,17 % (107/109) с 95 % CI от 93,53–99,78 % за BOND-MAX System.

Процентът положително договаряне (чувствителност) или способността на Leica HER2 FISH System - 30 Test да идентифицира правилно положителните капсули от образца от комплекта за Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (процентът от пробите, оценени положително както от Leica HER2 FISH System - 30 Test и ръчния комплект за Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit от всички положителни капсули от комплекта за Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) беше 96,00 % (48/50).

Процентът отрицателно договаряне (специфичност) или способността на теста да идентифицира правилно отрицателните капсули от комплекта за Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (процентът на пробите, оценени отрицателно от Leica HER2 FISH System - 30 Test и комплекта за Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit от всички отрицателни капсули от комплекта за Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) беше 100 % (59/59). Вж. таблица 6.

		Комплект за Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit		
		Отрицателно (<2,0)	Положително (≥2,0)	Общо
Leica HER2 FISH System – 30 Test по BOND-MAX System	Отрицателно (<2,0)	59	2	61
	Положително (≥2,0)	0	48	48
	Общо	59	50	109

Общо съгласуване (95 % CI) = 98,17 % (93,53–99,78 %)

Таблица 6. 2x2 съгласуване на Leica HER2 FISH System - 30 Test в BOND-MAX System с комплект за Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit при стомашна тъкан.

## Тестване на точност – BOND-MAX System

### A. Тестване с точност на резултатите в една серия

Тестването с точност на резултатите в една серия бе извършено по произволен начин и на сляпо. Тестването с точност на резултатите в една серия на Leica HER2 FISH System - 30 Test бе оценено в един изследващ център за 540 преди това характеризирани като HER2 TMA проби, съдържащи фиксирани във формалин и включени в парафин капсули с рак на гърдата. Използването на TMA за определянето на точността на резултатите в една серия направи възможен по-големия обем капсули, като така бе покрит по-широк диапазон от HER2 експресия в рамките на една серия с един и същ инструмент.

При изброяването на предметните стъкла, които са оцветени в тестването с точност на резултатите в няколко серии, 532 от оценените 540 капсули показаха резултат на съгласуване, което даде общо съгласуване от 98,52% с по-нисък 95% CI от 97,10%.

### B. Тестване с точност на резултатите при един инструмент

Тестването с точност на резултатите при един инструмент бе извършено по произволен начин и на сляпо. Тестването с точност на резултатите при един инструмент на Leica HER2 FISH System - 30 Test бе оценено в един изследващ център за 1620 преди това характеризирани като HER2 TMA проби, съдържащи фиксирани във формалин и включени в парафин капсули с рак на гърдата. Използването на TMA за определянето на точността на резултатите при един инструмент направи възможен по-големия обем капсули, като така бе покрит по-широк диапазон от HER2 експресия в рамките на няколко серии с един и същ инструмент.

При изброяването на предметните стъкла, които са оцветени в тестването с точност на резултатите при един инструмент, 1620 от оценените 1620 капсули показаха резултат на съгласуване, което даде общо съгласуване от 100% с по-нисък 95% CI от 99,82%.

### C. Тестване с точност на резултатите в няколко серии

Тестването с точност на резултатите в няколко серии бе извършено по произволен начин и на сляпо. Тестването с точност на резултатите в няколко серии на Leica HER2 FISH System - 30 Test бе оценено в един изследващ център за 900 преди това характеризирани като HER2 TMA проби, съдържащи фиксирани във формалин и включени в парафин капсули с рак на гърдата. Използването на TMA за определянето на точността на резултатите в няколко серии ежедневно направи възможен по-големия обем капсули, като така бе покрит по-широк диапазон от HER2 експресия в рамките на няколко серии в различни дни.

При изброяването на предметните стъкла, които са оцветени в тестването с точност на резултатите в няколко серии, 894 от оценените 900 капсули показаха резултат на съгласуване, което даде общо съгласуване от 99,33% с по-нисък 95% CI от 98,55%.

## D. Тестване с точност на резултатите в няколко лаборатории

Тестването с точност на резултатите в няколко лаборатории бе извършено по произволен начин и на сляпо. Тестването с точност на резултатите в няколко лаборатории на Leica HER2 FISH System - 30 Test бе оценено между три изследващи центъра за 513 преди това характеризирани като HER2 TMA проби, съдържащи фиксирани във формалин и включени в парафин капсули с рак на гърдата. Използването на TMA за определянето на точността на резултатите в няколко лаборатории направи възможен по-големия обем капсули, като така бе покрит по-широк диапазон от HER2 експресия в рамките на серии с няколко инструмента.

При изброяването на предметните стъкла, които са оцветени в тестването с точност на резултатите в няколко лаборатории, 510 от оценените 513 капсули показаха резултат на съгласуване, което даде общо съгласуване от 99,42% с по-нисък 95% CI от 98,30%.

## E. Тестване с точност на резултатите при няколко наблюдателя

Тестването с точност на резултатите при няколко наблюдателя бе извършено по произволен начин и на сляпо. Тестването на възпроизводимостта между наблюдателите на Leica HER2 FISH System - 30 Test бе оценено между три изследващи центъра. Бе използван по един опитен наблюдател във всеки изследващ център. Осемнадесет капсули с цели секции рак на гърдата бяха използвани за точност на резултатите при няколко наблюдателя, отразявайки типовете проби, използвани в клиничната настройка.

При изброяването на предметните стъкла, които са оцветени в тестването с точност на резултатите при няколко наблюдателя, 53 от оценените 54 капсули показаха резултат на съгласуване, което даде общо съгласуване от 98,15% с по-нисък 95% CI от 90,11%

## F. Тестване с точност на резултатите от серия в серия

Тестването с точност на резултатите от серия в серия бе извършено по произволен начин и на сляпо. Точността от серия в серия бе определена при три независимо произведени серии от Leica HER2 FISH System - 30 Test, произведени съгласно добрата производствена практика (GMP). Всяка серия бе тествана в един изследващ център за 540 преди това характеризирани като HER2 TMA проби, съдържащи фиксирани във формалин и включени в парафин капсули с рак на гърдата. Използването на TMA за определянето на възпроизводимостта прави възможен по-големия обем капсули, като така се покрива по-широк диапазон от HER2 експресия, която да се тества между сериите.

При изброяването на предметните стъкла, които са оцветени в тестването с точност на резултатите от серия в серия, 534 от оценените 540 капсули показаха резултат на съгласуване, което даде общо съгласуване от 98,89% с по-нисък 95% CI от 97,60%.

## Тестване на точност – BOND-III System

### G. Тестване с точност на резултатите в една серия

Тестването с точност на резултатите в една серия бе извършено по произволен начин и на сляпо. Тестването с точност на резултатите в една серия на Leica HER2 FISH System - 30 Test бе оценено в един изследващ център за 540 преди това характеризирани като HER2 TMA проби, съдържащи фиксирани във формалин и включени в парафин капсули с рак на гърдата. Използването на TMA за определянето на точността на резултатите в една серия направи възможен по-големия обем капсули, като така бе покрит по-широк диапазон от HER2 експресия в рамките на една серия с един и същ инструмент.

При изброяването на предметните стъкла, които са оцветени в тестването с точност на резултатите в няколко серии, 540 от оценените 540 капсули показаха резултат на съгласуване, което даде общо съгласуване от 100% с по-нисък 95% CI от 99,45%.

### H. Тестване с точност на резултатите при един инструмент

Тестването с точност на резултатите при един инструмент бе извършено по произволен начин и на сляпо. Тестването с точност на резултатите при един инструмент на Leica HER2 FISH System - 30 Test бе оценено в един изследващ център за 1620 преди това характеризирани като HER2 TMA проби, съдържащи фиксирани във формалин и включени в парафин капсули с рак на гърдата. Използването на TMA за определянето на точността на резултатите при един инструмент направи възможен по-големия обем капсули, като така бе покрит по-широк диапазон от HER2 експресия в рамките на няколко серии с един и същ инструмент.

При изброяването на предметните стъкла, които са оцветени в тестването с точност на резултатите в няколко серии, 1620 от оценените 1620 капсули показаха резултат на съгласуване, което даде общо съгласуване от 100% с по-нисък 95% CI от 99,82%.

#### **I. Тестване с точност на резултатите в няколко серия**

Тестването с точност на резултатите в няколко серии бе извършено по произволен начин и на сяпо. Тестването с точност на резултатите в няколко серии на Leica HER2 FISH System - 30 Test бе оценено в един изследващ център за 900 преди това характеризирани като HER2 TMA проби, съдържащи фиксирани във формалин и включени в парафин капсули с рак на гърдата. Използването на TMA за определянето на точността на резултатите в няколко серии ежедневно направи възможен по-големия обем капсули, като така бе покрит по-широк диапазон от HER2 експресия в рамките на няколко серии в различни дни.

При изброяването на предметните стъкла, които са оцветени в тестването с точност на резултатите в няколко серии, 891 от оценените 900 капсули показаха резултат на съгласуване, което даде общо съгласуване от 99,00% с по-нисък 95% CI от 98,11%.

#### **J. Тестване с точност на резултатите в няколко лаборатории**

Тестването с точност на резултатите в няколко лаборатории бе извършено по произволен начин и на сяпо. Тестването с точност на резултатите в няколко лаборатории на Leica HER2 FISH System - 30 Test бе оценено между три изследващи центъра за 513 преди това характеризирани като HER2 TMA проби, съдържащи фиксирани във формалин и включени в парафин капсули с рак на гърдата. Използването на TMA за определянето на точността на резултатите в няколко лаборатории направи възможен по-големия обем капсули, като така бе покрит по-широк диапазон от HER2 експресия в рамките на серии с няколко инструмента.

При изброяването на предметните стъкла, които са оцветени в тестването с точност на резултатите в няколко лаборатории, 511 от оценените 513 капсули показаха резултат на съгласуване, което даде общо съгласуване от 99,61% с по-нисък 95% CI от 98,60%.

#### **K. Тестване с точност на резултатите при няколко наблюдателя**

Тестването с точност на резултатите при няколко наблюдателя бе извършено по произволен начин и на сяпо. Тестването на възпроизводимостта между наблюдателите на Leica HER2 FISH System - 30 Test бе оценено между три изследващи центъра. Бе използван по един опитен наблюдател във всеки изследващ център. Осемнадесет капсули с цели секции рак на гърдата бяха използвани за точност на резултатите при няколко наблюдателя, отразявайки типове проби, използвани в клиничната настройка.

При изброяването на предметните стъкла, които са оцветени в тестването с точност на резултатите при няколко наблюдателя, 53 от оценените 54 капсули показаха резултат на съгласуване, което даде общо съгласуване от 98,1% с по-нисък 95% CI от 90,11%.

#### **L. Тестване с точност на резултатите от серия в серия**

Тестването с точност на резултатите от серия в серия бе извършено по произволен начин и на сяпо. Точността от серия в серия бе определена при три независимо произведени серии от Leica HER2 FISH System - 30 Test, произведени съгласно добрата производствена практика (GMP). Всяка серия бе тествана в един изследващ център за 540 преди това характеризирани като HER2 TMA проби, съдържащи фиксирани във формалин и включени в парафин капсули с рак на гърдата. Използването на TMA за определянето на възпроизводимостта прави възможен по-големия обем капсули, като така се покрива по-широк диапазон от HER2 експресия, която да се тества между сериите.

При изброяването на предметните стъкла, които са оцветени в тестването с точност на резултатите от серия в серия, 540 от оценените 540 капсули показаха резултат на съгласуване, което даде общо съгласуване от 100% с по-нисък 95% CI от 99,45%.

## Здравина на образеца

Изследвания на образеца бяха извършени в BOND System (περίληψη на то съответно BOND-MAX και то съответно BOND-III), за определяне на диапазона

на толеранс на образеца за времето и температурата на възстановяване на топлина; времето, температурата и концентрацията за възстановяване на ензим; времето и температурата на денатуриране; времето и температурата на хибридизация и времето и температурата на измиване. Изследванията на образеца с помощта на BOND-MAX и BOND-III System протокола по подразбиране също така бяха извършени извън препоръчаните ограничения, както е посочено в документа на FDA/ORA за насока ORA LAB5.3 Rev1.7 за температура и влажност.

- Не бе наблюдавана разлика в статуса на амплификация, когато подразбиращата се температура за всяка зависима от топлината стъпка бе увеличена с 4 °C или намалена с 4 °C в сравнение със стандартния Leica HER2 FISH System - 30 Test протокол. Най-високи качествени рейтинги бяха наблюдавани при температурите по подразбиране и тези температури се препоръчват.
- Не беше наблюдавана разлика в статуса на амплификация когато топлинното индуцирано епитопно възстановяване (HIER) е извършвано за 20 минути и 30 минути при 97 °C с BOND ER1 разтвор в сравнение със стандартния Leica HER2 FISH System - 30 Test протокол. Най-високи качествени рейтинги бяха наблюдавани при стандартно време от 25 минути и това време за инкубация се препоръчва.
- Не е наблюдавана разлика в статуса на амплификация, когато индуцираното епитопно възстановяване на ензима (EIER) е извършвано за 15 минути и за 35 минути при 37 °C в сравнение със стандартния Leica HER2 FISH System - 30 Test протокол. Най-високи качествени рейтинги бяха наблюдавани при стандартно време от 25 минути и това време за инкубация се препоръчва.
- Не е наблюдавана разлика в статуса на амплификация, когато индуцираното епитопно възстановяване на ензима (EIER) е извършвано със съотношения на ензимна концентрация/ензимно разреждане от 1:200 и 1:500 с помощта на стандартния Leica HER2 FISH System - 30 Test протокол. Най-високи качествени рейтинги бяха наблюдавани при стандартна концентрация от 1:300 и това разреждане се препоръчва.
- Не бе наблюдавана разлика в статуса на амплификация, когато денатурирането е извършвано за 5 минути и 15 минути в сравнение със стандартния Leica HER2 FISH System - 30 Test протокол. Най-високи качествени рейтинги бяха наблюдавани при стандартно време от 10 минути и това време за денатуриране се препоръчва.
- Не бе наблюдавана разлика в статуса на амплификация, когато хибридизацията е извършвана за 9 часа и 15 часа в сравнение със стандартния Leica HER2 FISH System - 30 Test протокол. Най-високи качествени рейтинги бяха наблюдавани при стандартно време от 12 часа и това време за хибридизация се препоръчва.
- Не бе наблюдавана разлика в статуса на амплификация, когато следхибризационното измиване е извършвано за 2 минути, 5 минути и 7 минути в сравнение със стандартния Leica HER2 FISH System - 30 Test протокол. Най-високи качествени рейтинги бяха наблюдавани при стандартно време от 4 минути и това време за следхибризационно измиване се препоръчва.
- Не бе наблюдавана разлика в статуса на амплификация, когато Leica HER2 FISH System - 30 Test измиване е извършвано при 28 °C и 30% относителна влажност и 16 °C и 80% относителна влажност в сравнение със стандартния Leica HER2 FISH System - 30 Test протокол, извършван при условия на околната среда.

Дейностите, извършени извън препоръчаните параметри на здравина на тествания образец, не са валидирани. Използването на друг тестови параметър може да инвалидира образеца.

Горният текст описва тестваните условия и резултатите от изследването. Отбележете, че Leica не са тествали всички възможни комбинации от условия и не препоръчват използването на диапазони извън стандартните се за всички условия. Стандартният Leica HER2 FISH Staining Protocol е посочен в таблица 2.

## Разрешаване на проблеми

Проблем	Вероятна причина	Коригиращо действие
Никакъв или слаб флуоресцентен сигнал/оцветяване	Неподходящо фиксиране или обработка на тестова проба	Уверете се, че е използван фиксатор на базата на формалин и че графичите за обработка са подходящи за пробата, която се подлага на тестване.
	Leica HER2 FISH System - 30 Test ce използва след срока на годност	Уверете се, че Leica HER2 FISH System - 30 Test ce използва в рамките на посочения срок на годност.
	Неправилен избор на протокол	Уверете се, че е зададен по подразбиране *FISH Protocol A в полето за staining protocol (протокол за оцветяване) на диалоговия прозорец Add slide (Добави предметно стъкло).
	Разпръснати са неподходящи насипни реагенти	Уверете се, че всички BOND реагенти са разпределени в подходящите насипни контейнери и поставени в правилните позиции на инструмента.
	Неадекватна депарафинизация на предметните стъкла	Уверете се, че е избран режим *Dewax (Сваляне на парафин) в полето Preparation (Подготовка) на диалоговия прозорец Add slide (Добави предметно стъкло).
	Неподходящо предварително третиране	Уверете се, че протоколите за предварително третиране (HIER и Enzymatic Digestion) по подразбиране са избрани. Настройте протокола за предварително третиране (HIER или Enzymatic Digestion), ако е нужно.
	Неадекватно денатуриране	Уверете се, че е избрано подходящо денатуриране *D10 по подразбиране.
	Неадекватна хибридизация	Уверете се, че е избрана подходяща хибридизация *H12 по подразбиране. Удължете времето за хибридизация, ако е нужно.
	Прекомерно следхибризационно измиване	Намалете времето за инкубация за измиване след хибридизация.
	Серията е прекратена преди завършване	Използвайки софтуера на BOND потвърдете наличието на подлежащи на докладване грешки по време на серията на оцветяване и действайте според инструкциите на софтуера на BOND.
Неподходящо флуоресцентно микроскопско оборудване	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Неподходящ филтърен комплект</li> <li>• Неправилна лампа</li> <li>• Изтекъл срок на годност на лампата</li> <li>• Неправилен тип масло</li> </ul>	<p>Уверете се, че цялото използвано флуоресцентно микроскопско оборудване е подходящо за образеца, който се извършва, потвърдете:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Подходящия филтърен комплект</li> <li>• Подходящата лампа</li> <li>• Добрата сила на лампата</li> <li>• Подходящото масло за използване в маслена имерсионна микроскопия</li> </ul>

Проблем	Вероятна причина	Коригиращо действие
Неспецифичен фонов флуоресцентен сигнал/оцветяване	Неадекватно следхибридизационно измиване	Увеличете времето на инкубация за следхибридизационното измиване.
	Разпръснати са неподходящи насипни реагенти	Уверете се, че всички BOND реагенти са разпределени в подходящите насипни контейнери и поставени в правилните позиции на инструмента.
	Неадекватна депарафинизация на предметните стъкла	Уверете се, че е избрано Dewax (Сваляне на парафин) в полето Preparation (Подготовка) на диалоговия прозорец Add Slide (Добави предметно стъкло).
	Неспецифична кръстосана реакция със зони с тъканна некроза	Уверете се, че е използван фиксатор на базата на формалин и че граfiците за обработка са подходящи за пробата, която се подлага на тестване. Ако е възможно, тествайте повторно капсулата с помощта на друг блок. Ако това не е възможно, оценете във връзка със съответната H&E оцветена секция и изберете зоните, които показват най-добри модели на фиксиране.
Лошо съхранение на тъканната морфология	Секции, слепени към предметните стъкла с помощта на алтернативни адезиви	Използвайте (Leica Biosystems Plus Slides – продуктово код S21.2113 Или Apex BOND Slides - продуктово код 3800040)
	Неадекватно фиксиране и обработка на тъканта	Уверете се, че е използван фиксатор на базата на формалин и че граfiците за обработка са подходящи за пробата, която се подлага на тестване. Ако е възможно, тествайте повторно капсулата с помощта на друг блок. Ако това не е възможно, оценете във връзка със съответната H&E оцветена секция и изберете зоните, които показват най-добри модели на фиксиране.
Тъканта е отстранена от пациентското/ контролно предметно стъкло(а)	Неподходящо предварително третиране	Настройте протокола за предварително третиране (HIER или Enzymatic Digestion).
	Използване на неправилен тип предметни стъкла или неадекватно сушене на секция	Уверете се, че подходящи предметни стъкла са използвани за пациентските/контролните секции (напр. Leica Biosystems Plus Slides – продуктово код S21.2113 Или Apex BOND Slides - продуктово код 3800040) Уверете се, че предметните стъкла получават адекватно оттичане и се инкубират за 1 час при 60 °C.

Таблица 7. Leica HER2 FISH System - 30 Test Наръчник за разрешаване на проблеми.

Ако има проблеми, свързани с Leica HER2 FISH System - 30 Test, които да попада извън обхвата на наръчника за разрешаване на проблеми, моля, свържете се за помощ с вашия локален технически сервизен отдел на Leica Biosystems или с дистрибутора.

## Референции

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. Slamon DJ, Clark GM,
4. 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 19087-1898: USA
21. Nadjji, 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.



## Лицензно споразумение

Настоящият продукт съдържа PathVysion FISH проби, доставени от Abbott Molecular Inc. PathVysion, LSI и CEP са търговска марка на Abbott Molecular Inc. Всички права запазени. Използвано по лиценз.

## Изменения спрямо предишната версия

Добавено Стомашните данни.

## Дата на издаване

26 Февруари 2020

## Идентификация на символите

	Партиден код		Съхранение		Каталожен номер
	Медицинско устройство <i>in vitro</i> диагностика		Производител		Сериен номер
	За употреба прегледайте инструкциите		Съдържа достатъчно за $n > 6$ пробя тествове		Да се използва до ГГГГ-ММ-ДД

Herceptin е търговска марка на Genentech, Inc. и F. Hoffmann-La Roche Ltd.