

# Leica HER2 FISH System - 30 Test Käyttöohje

Käytettäväksi Leica Biosystems BOND-MAX- ja BOND-III System.

TA9217 on fluoresenssi *in situ* -hybridisaatiotuote, joka on suunniteltu värjäämään 30 testiä (30 preparaattia LSI HER2/CEP17 Dual Probe -kaksoisilmmaisimella).



Leica Biosystems Newcastle Ltd  
Balliol Business Park West  
Berton 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

# Sisällys

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Käyttötarkoitus</b> .....   | <b>3</b>  |
| Käytettäväksi <i>in vitro</i> diagnostiikkaan .....  | 3         |
| Vaadittu koulutus .....  | 3         |
| <b>Yhteenveto ja selitys</b> .....   | <b>3</b>  |
| Tausta .....   | 3         |
| Kliinisen yhtäpitävyyden yhteenveto, BOND-MAX System .....   | 4         |
| Kliinisen yhtäpitävyyden yhteenveto, BOND-III System .....   | 4         |
| Menetelmän periaate .....  | 5         |
| Toimitetut komponentit .....   | 5         |
| Käyttöohjeet .....   | 5         |
| Säilytys ja stabiileetti .....   | 5         |
| Näytteen valmistelu .....  | 6         |
| Varoitukset ja huomautukset .....  | 6         |
| <b>Menettely</b> .....   | <b>6</b>  |
| A. Tarvittavat, mutta ei toimitetut reagenssit .....   | 6         |
| B. Tarvittavat, mutta ei toimitetut laitteet .....   | 6         |
| C. Metodiikka .....  | 7         |
| D. BOND - entsyymien esikäsittely .....  | 7         |
| E. Oletus värjäysprotokolla .....  | 7         |
| F. Toimenpiteen vaiheet .....  | 7         |
| G. Preparaatin säilytys .....  | 8         |
| <b>Signaalin arviointi ja laskenta</b> .....   | <b>9</b>  |
| Suosittelu menetelmä LSI HER2 - CEP17 - suhteen määrittämiseksi .....  | 10        |
| <b>Leica HER2 FISH System - 30 Test tulkitapa</b> .....  | <b>11</b> |
| <b>Esimerkkipistesivu</b> .....  | <b>12</b> |
| <b>Laadunvalvonta</b> .....  | <b>13</b> |
| <b>Rajoitukset</b> .....   | <b>14</b> |
| A. Yleiset rajoitukset .....   | 14        |
| B. Tuotekohtaiset rajoitukset .....  | 14        |
| <b>Leica HER2 FISH System - 30 Test kliininen yhtäpitävyys Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Rinta</b> .....                                 | <b>14</b> |
| 2 x 2 yhtäpitävyydetulokset, BOND-MAX System - Rinta .....   | 15        |
| 2 x 2 yhtäpitävyydetulokset, BOND-III System - Rinta .....   | 16        |
| <b>Leica HER2 FISH System - 30 Test -välineen kliininen yhtäpitävyys Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit -laitteen kanssa - Mahalaukku</b> ..... | <b>17</b> |
| 2x2 yhtäpitävyydetulokset BOND-MAX System -automaatti - Mahalaukku .....   | 17        |
| <b>Tarkkuustestaus – BOND-MAX System</b> .....   | <b>19</b> |
| A. Suorituskohtaisen tarkkuuden tutkimus .....   | 19        |
| B. Instrumentikohtaisen tarkkuuden tutkimus .....  | 19        |
| C. Suoritusten välisen tarkkuuden tutkimus .....   | 19        |
| D. Laboratorioiden välisen tarkkuuden tutkimus .....   | 19        |
| E. Havainnoitsijoiden välisen tarkkuuden tutkimus .....  | 19        |
| F. Erien välisen tarkkuuden tutkimus .....   | 20        |
| <b>Tarkkuuden testaus – BOND-III System</b> .....  | <b>20</b> |
| G. Suorituskohtaisen tarkkuuden tutkimus .....   | 20        |
| H. Instrumentikohtaisen tarkkuuden tutkimus .....  | 20        |
| I. Suoritusten välisen tarkkuuden tutkimus .....   | 20        |
| J. Laboratorioiden välisen tarkkuuden tutkimus .....   | 20        |
| K. Havainnoitsijoiden välisen tarkkuuden tutkimus .....  | 21        |
| L. Erien välisen tarkkuuden tutkimus .....   | 21        |
| <b>Analyysin luotettavuus</b> .....  | <b>21</b> |
| <b>Vianmääritys</b> .....  | <b>23</b> |
| <b>Viitteet</b> .....  | <b>25</b> |
| <b>Lisenssisopimus</b> .....   | <b>26</b> |

## Käyttötarkoitus

### Käytettäväksi *in vitro* diagnostiikkaan

Leica HER2 FISH System - 30 Test on suunniteltu havaitsemaan HER2-/neu-geeniampliifikaatio fluoresenssilla *in situ* -hybridisaatioissa (FISH) formaliini-kiinnitetyissä, parafiiniin valetuissa ihmisen syöpäsolujen ja mahan rauhassyövän (mahan ja ruokatorven raja-alue mukaan luettuna). Leica HER2 FISH System - 30 Test on indikoitu apuna potilaiden arvioinnissa, joille harkitaan Herceptin® (trastuzumab) -hoitoa (ks. tuotetiedot Herceptin pakkauksesta). Leica HER2 FISH System - 30 Test ei ole tarkoitettu rintasyövän diagnostiseen seulontaan. Kaikki muut saatavissa olevat kliiniset tiedot on myös otettava huomioon. Näitä ovat esim. tuumorin koko, vaikutuksenalaisten imusolmukkeiden määrä ja steroidireseptorin tila. Mikään rintasyöpäpotilaan hoitopäätös ei saa perustua yksinomaan HER2-geenin ampliifikaatiotilaan.

Huomaa: Kaikki potilaat Herceptin kliinisissä kokeissa valittiin käyttäen tutkimuksellista immunosytokemiallista kliinisen tutkimuksen analyysia (CTA). Ketään potilasta näissä tutkimuksissa ei valittu käyttäen Leica HER2 FISH System - 30 Test. Leica HER2 FISH System - 30 Test on verrattu Abbott Molecular PathVysion® HER-2 DNA Probe Kit riippumattomalla sarjalla näytteitä ja sen on todettu tuottavan hyväksyttävän yhtäläisiä tuloksia, kuten on osoitettu kliinisen yhtäpitävyyden yhteenvedossa. Leica HER2 FISH System - 30 Test tulosten todellista korrelaatiota kliiniseen tulokseen ei ole luotu.

Kaikki "Herceptin advanced gastric cancer (ToGA)" -kliinisiin tutkimuksiin (pitkälle edennyt mahasyöpä) osallistuneet potilaat valittiin Dako HercepTest -testillä. Ketään tutkimuksiin osallistuneista potilaista ei valittu käyttäen Leica HER2 FISH System - 30 Test -laitetta. Leica HER2 FISH System - 30 Test -välinettä verrattiin Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit -laitteen analyysiin riippumattomilla näytteillä ja sen havaittiin tuottavan hyväksyttävän konkordenteja tuloksia, kuten Clinical Concordance Summary -julkaisusta selviää. Leica HER2 FISH System - 30 Test -testin tulosten varsinaista korrelaatiota kliinisten tulosten suhteen ei ole vahvistettu.

\* Herceptin® Genentech Inc.:in ja F. Hoffmann-La Roche Ltd.:n tavaramerkki. PathVysion® on Abbott Molecular Inc.:in tavaramerkki. Kaikki oikeudet pidätetään. Käytetään lisenssillä.

### Vaadittu koulutus

Leica Biosystems järjestää näyttöön valmistelun, analyysitoimenpiteiden ja HER2-geenin FISH-testin tulosten tulkinnan koulutuksen kaikille käyttäjille.

### Yhteenvedo ja selitys

#### Tausta

HER2-geeni, joka tunnetaan myös nimellä neu tai c-erbB2, sijaitsee kromosomin 17 pitkässä varressa paikassa 17q11-12 (1). Sekä HER2-geenin, että sen koodatun 185 kD -proteiinin on todettu olevan pääroolissa rintasyövän (2) pahanlaatuisessa muutoksessa ja tuumorin etenemisessä.

HER2 toimii prognostisena markkerina geeniampliifikaation ja liiallisen proteiinin ollessa yhteydessä lisääntyneeseen määrään sairauden uusiutumisia ja korkeampaan kuolleisuuteen. HER2 toimii myös ennustavana markkerina valitulle systeemiselle kemoterapialle ja kohdistetuille hoidoille (3). Erityisesti HER2-geeniampliifikaation on todettu olevan huonon prognoosin indikaattori imusolmukepositiiviselle rintasyöväälle (4-8). Lisäksi yksi tutkimus osoittaa HER2:n prognoosiarvon olevan voimakkaampi kemoterapialla hoidetuilla potilailla (7). Sairaudeettomuuden ja henkiinjäämisen ennustamisessa yksittäisillä potilailla on kuitenkin otettava huomioon myös muut käytössä olevat prognostiset tekijät, kuten tuumorin koko, positiivisten imusolmukkeiden määrä ja steroidireseptorin tila.

HER2-onkoproteiinin liiallinen määrä rintasyöpäsoluissa geeniampliifikaation seurauksena indikoi HER2:n käyttöä kohteena vasta-ainepohjaiselle hoidolle (3) - kun ToGA-tutkimuksesta saadut tulokset osoittavat selvästi, että Herceptin-valmisteen käyttö mahasyövän hoidossa yhdessä kemoterapian kanssa on tehokas hoitomuoto, joka kaiken kaikkiaan parantaa

loonjäämistä HER2-positiivisissa mahasyövissä (9). Herceptinin (trastuzumab), humanisoidun monoklonaalisen vasta-aineen (10), joka sitoutuu suurella affiniteetilla HER2-onkoproteiiniin, on todettu estävän ihmisen tuumorisolujen leviämisen, joka yli-ilmentää HER2-onkoproteiiniin sekä *in vitro* että *in vivo* (11-13). Herceptin kehityksen jälkeen sekä HER2-geenin että proteiinin havaitsemisesta on tullut oleellisia työkaluja rintasyöpien arvioinneissa ohjaten sekä hoidon valintaa että myöhempää potilashallintaa (14,15).

FISH-testiä on käytetty osoittamaan HER2-geeniampplifikaatio (16-19) ihmisen rintakarsinoomasoluista johdetuissa sekä interfaasi- että metafaasi-soluissa. HER2-geenin kvantitatiiviseksi määrittämiseksi FISH-testi arvioi HER2-geeniampplifikaation suoraan tuumorisolusta. Kudoksen tyypillinen morfologia ja onkogeneenikopioiden spatiaalinen jakauma yksittäisissä kulturoimattomissa ensisijaisissa rintakarsinoomissa säilyvät entisellään. Myös poikkeamia kromosomi 17 kopiomäärässä (aneusomia) havaitaan yleisesti rintasyövissä. Näitä saattaa esiintyä kromosomipuutoksissa tai lisääntymisissä (polysomia). Tällä kromosomaattisella vaihtelulla on kriittinen vaikutus HER2-geeniampplifikaation tulkintaan ja raportointiin. Tämän vuoksi kromosomin 17 kopiomäärän mittaus HER2:n yhteydessä on kriittisen tärkeää (4).

Leica HER2 FISH System - 30 Test sisältää LSI HER2 DNA -ilmaisimen, 226 kilotavun SpectrumOrange™ suoraan osoitetun fluoresentti DNA-ilmaisimen, joka on tarkoitettu erityisesti HER2-geenilokukselle (17q11.2-q12) ja CEP17 DNA-ilmaisimen, 5,4 kilotavun SpectrumGreen™ suoraan osoitetun fluoresentti DNA-ilmaisimen, joka on tarkoitettu erityisesti alfa satelliitti DNA-sekvenssiin kromosomin 17 (17p11.1-q11.1) sentromeerisellä alueella. Ilmainsineste on erityisesti formuloitu ja validoitu käytettäväksi BOND-MAX- ja BOND-III-järjestelmissä ja niitä ei saa muokata tai käyttää manuaalisessa asetuksessa.

## Kliinisen yhtäpitävyyden yhteenvedo, BOND-MAX System

Leica HER2 FISH System - 30 Test kehitettiin tuottamaan täysin automaattinen vaihtoehto nykyisille menetelmille HER2-geenin ampplifikaatiotilan määrittämiseksi. Leica HER2 FISH System - 30 Test suorituskyky BOND-MAX System evaluoitiin riippumattomassa tutkimuksessa vertaamalla Leica HER2 FISH System - 30 Test -välineestä Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit Assay -laitteeseen 300 rintasyöpäkasvaimien näytteellä ja 109 mahan (mahan ja ruokatorven raja-alue mukaan luettuna) rauhassyöpänäytteellä. Mitään näistä tuumorinäytteistä ei otettu Herceptinin kliinisissä tutkimuksissa mukana olevilta potilailta. Rintakudoksen tutkimustulokset osoittivat 99,33 % konkordanssin 2x2 analyysissä (97,61 – 99,92 % luottamusväli 95 %). Mahan rauhassyöpänäytteiden tulokset (mahan ja ruokatorven raja-alue mukaan luettuna) osoittivat 98,17 % konkordanssin 2x2 analyysissä (93,53 – 99,78 % luottamusväli 95 %). Yhtäpitävyydet osoittavat myös, että positiivinen tulos Leica HER2 FISH System - 30 Test vastaa suurella todennäköisyydellä positiivista tulosta Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit. Leica HER2 FISH System - 30 Test tulkitaan negatiiviseksi HER2-geeniampplifikaatiolle, kun HER2:CEP17 -geenisuhde on alle 2,0 ja positiiviseksi, kun HER2:CEP17 -geenisuhde on vähintään 2,0. Rajatuloksia, joissa HER2:CEP17 -geenisuhde on 1,8-2,2, on tulkittava varovaisuudella. Laske lisää 20 tumaketta ja laske suhde uudelleen.

## Kliinisen yhtäpitävyyden yhteenvedo, BOND-III System

Leica HER2 FISH System - 30 Test kehitettiin tuottamaan täysin automaattinen vaihtoehto nykyisin käytössä oleville menetelmille HER2-geeniampplifikaation määrittämiseen. Leica HER2 FISH System - 30 Test suorituskyky BOND-III System evaluoitiin riippumattomassa tutkimuksessa vertaamalla Leica HER2 FISH System - 30 Test tuloksia Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit Assay 300:ssa rintasyöpänäytteessä. Mitään näistä tuumorinäytteistä ei otettu Herceptinin kliinisissä tutkimuksissa mukana olevilta potilailta. Tulokset osoittavat 99,67 %:n yhtäpitävyyttä 2 x 2 analyysissä (95 %:n luottamusintervallit, 98,16-99,99 %). Yhtäpitävyydet osoittavat myös, että positiivinen tulos Leica HER2 FISH System - 30 Test vastaa suurella todennäköisyydellä positiivista tulosta Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit. Leica HER2 FISH System - 30 Test tulkitaan negatiiviseksi koskien HER2-geeniampplifikaatiota,

kun HER2:CEP17 -geenisuhde on alle 2,0 ja positiiviseksi, kun HER2:CEP17 -geenisuhde on vähintään 2,0. HER2:CEP17 -geenisuhde on 1,8-2,2, on tulkittava varovaisuudella. Laske lisää 20 tumaketta ja laske suhde uudelleen.

## Menetelmän periaate

Leica HER2 FISH System - 30 Test sisältää osat, jotka tarvitaan suorittamaan fluoresenssi *in situ* -hybridisaatiopohjaisessa värjäysmenetelmässä formaliini-kiinnitetyissä, parafiiniin upotetuissa kudoksissa. Asianmukaisen esikäsittelyn jälkeen seuraa inkubaatio käyttövalmiilla LSI HER2:CEP17 -kaksoisilmaisimella ja asianmukainen huolellinen pesu. Tämän jälkeen kudokset kuivataan ja kiinnitetään DAPI:lla. Tulokset tulkitaan fluoresenssi mikroskopiassa käyttäen suositeltuja suodattimia asianmukaisissa aaltopituuksissa. Leica HER2 FISH System - 30 Test on tarkoitettu käytettäväksi vain BOND-MAX- ja BOND-III System kanssa.

## Toimitetut komponentit

Alla luetellut materiaalit (Taulukko 1) riittävät värjäämään 30 testiä (30 preparaattia värjättyä LSI HER2/CEP17 Dual Probe).

|   |   |
|---|---|
| <b>LSI HER2/CEP17 Probe</b><br><b>6,6 mL</b>    | Sisältää käyttövalmiin LSI HER2/CEP17 Dual Probe.<br>Sisältää <60 % (v/v) formamiidia.            |
| <b>Post Hybridization Wash 2</b><br><b>9 mL</b> | Sisältää käyttövalmiin hybridisaation jälkeisen pesuliuoksen.<br>Sisältää <50% (v/v) formamiidia. |
| <b>BOND Enzyme Concentrate 2</b><br><b>1 mL</b> | Sisältää Proteinase K-liuoksen 1,7 mg/ml.   |
| <b>BOND Enzyme Diluent</b><br><b>65 mL</b>      | Sisältää entsyymilaimenteen.  |
| <b>BOND Open Container</b><br><b>3 x 7 mL</b>   | BOND Open Container käytetään Enzyme 5.   |

Taulukko 1: Leica HER2 FISH System - 30 Test osat

Katso yksittäisistä tuotetietolomakkeista lisätiedot tuoteturvallisuudesta. Tiedot ovat saatavissa osoitteessa [www.LeicaBiosystems.com/TA9217-IFU](http://www.LeicaBiosystems.com/TA9217-IFU)

## Käyttöohjeet

Kaikki toimitetut reagenssit on formuloitu erityisesti käytettäväksi tässä analyysissä ja eränumerot ovat spesifisiä kullekin Leica HER2 FISH System - 30 Test. Jotta analyysi olisi kelvollinen, mitään ainekorvauksia ei saa suorittaa.

## Säilytys ja stabiilitetti

Säilytä 2–8 °C:n lämpötilassa. Älä anna jäätyä. Palauta 2–8 °C:n lämpötilaan heti käytön jälkeen. Kaikki poikkeamat näistä endoista mitätöivät analyysin. Varmista, että Leica HER2 FISH System - 30 Test käytetään ennen viimeistä käyttöpäivämäärää. Leica HER2 FISH System - 30 Test kontaminaatiota ja/tai epävakautta osoittavat merkit ovat liuosten sameus (paitsi ilmaisinliuos) ja hajun muodostuminen. Käyttäjän on varmistettava muut kuin yllä määritetyt säilytysolosuhteet.

## Näytteen valmistelu

Kaikille näytteille (20) on käytettävä kudoksen käsittelyn vakiomenetelmiä. Kudosten valmistelua suositellaan formaliinipohjaisissa fiksaatiiveissa ja ne käsitellään rutiinimaisesti ja upotetaan parafiiniin. Esimerkiksi, näytteistä on otettava 3–4 mm paksut näytteet ja ne on kiinnitettävä 18–24 tuntia 10 %:n neutraalipuskuroidussa formaliinissa. Kudokset on sitten kuivattava sarjassa alkoholeja ja kirkastettava ksyleenillä. Tätä seuraa impregnointi sulalla korkeintaan 60 °C:n lämpötilassa olevalla parafiinivahalla. Kudosnäytteet leikataan 4–6 µm:n paksuisiin sektioihin.

Varattuihin preparaateihin kiinnitettyjä kudossektioita (BOND Plus Slides S21.2113) voidaan säilyttää enintään 12 kuukautta 2–8 °C:n lämpötilassa ennen värjäystä. Sektioinnin jälkeen on suositeltavaa, että preparaatteja inkuboidaan 60 °C:n lämpötilassa yksi tunti. Värjätyt sektiot on säilytettävä -20 °C:n lämpötilassa fluoresenssisignaalin säilyttämiseksi ja haalistumisen estämiseksi. Anna säilytettyjen preparaattien saavuttaa huonelämpötila ennen lukeman ottoa.

## Varoitukset ja huomautukset

*Vain ammattilaisten käyttöön.*

Yksi tai useampi tuotteen osa on vaarallinen ja saattaa vahingoittaa syntymätöntä lasta.

Säännönmukaisesti alle 18-vuotiaat eivät saa työskennellä tällä tuotteella. Käyttäjää on huolellisesti ohjeistettava koskien asianmukaista työmenetelmää, tuotteen vaarallisia ominaisuuksia ja tarpeellisia turvatoimia.

Näytteet ennen ja jälkeen fiksaation ja kaikki niille altistuneet materiaalit on käsiteltävä infektion välittämiseen kykenevinä aineina ja hävitettävä asianmukaisin varotoimin.

Älä koskaan pipetoi reagensseja suulla ja vältä reagenssien ja näytteiden iho- ja limakalvokosketusta. Jos reagenssi pääsee kosketuksiin herkkien alueiden kanssa, pese runsaalla määrällä vettä. Hakeudu lääkärin hoitoon. Noudata valtion ja paikallisia määräyksiä koskien mahdollisesti toksisten aineiden hävitystä.

Minimoi reagenssien mikrobikontaminaatio. Muutoin voi tapahtua ei-spesifisen värjäytymisen lisääntyminen.

## Menettely

### A. Tarvittavat, mutta ei toimitetut reagenssit

- BOND Dewax Solution (AR9222)
- BOND Epitope Retrieval Solution 1 (AR9961)
- BOND Wash Solution x10 Concentrate (AR9590)
- Vakioliuottimet, joita käytetään fluoresenssille *in situ* -hybridisaatiopohjaisissa analyyseissä (esim. etanoli, absoluuttinen ja porrastettu)
- Tislattu tai ionipoistettu vesi
- DAPI-vastavärjäys
- Leica HER2 FISH Control Slides (TA9123)
- BOND Aspirating Probe Cleaning System (CS9100)

### B. Tarvittavat, mutta ei toimitetut laitteet

- Pipetit (kykeneviä mittaamaan tilavuuksia 1–20 µl ja 100 – 1000 µl)
- Ladatut preparaatit (BOND Plus Slides – S21.2113)
- BOND-MAX (21.0051) tai BOND-III (21.2201)
- BOND Universal Covertiles™ (S21.2001, S21.4583 or S21.4611)
- BOND Mixing Stations (S21.1971)
- BOND Slide Label & Print Ribbon (S21.4564)
- Peitelasit
- Kuivausuuni (kykenevä ylläpitämään lämpötilan 60 °C)
- Fluoresenssimikroskooppi (60–100x objektiivi) asianmukaisella valolähteellä varustettuna. Kirjaa lampun käyttötunnit ja vaihda lamppu ennen sen nimellisaikaa. Varmista, että lamppu on suunnattu oikein.
- Asianmukainen fluoresenssisuodatinsarja (SpectrumOrange™ – virityspiikki aallonpituudella 559 nm, päästöpiikki aallonpituudella 588 nm, SpectrumGreen™ – virityspiikki aallonpituudella 497 nm, päästöpiikki aallonpituudella 524 nm ja DAPI –

virityspiikki aallonpituudella 367 nm, päästöpiikki aallonpituudella 452 nm). Monialueisen fluoresenssimikroskoopin suodatinsarjat, jotka on optimoitu käytettäväksi Leica HER2 FISH System - 30 Test kanssa, ovat saatavissa useimmille mikroskooppimalleille. Suositellut suodatinsarjat Leica HER2 FISH System - 30 Test ovat DAPI/9-oranssi kaksoisalueläpäisy, DAPI/vihreä kaksoisalueläpäisy, vihreä/oranssi(V.2) kaksoisalueläpäisy ja DAPI/vihreä/oranssi (V.2) kolmialueläpäisy.

## C. Metodiikka

- Ennen tämän metodiikan käyttöä käyttäjät on koulutettava riittävästi automaattiseen *in situ* -fluoresenssitekniikkaan.
- Kukin LSI HER2/CEP17 Dual Probe värjätty testisektio mahdollistaa saman solun analyysin sekä HER2- että sentromeerisille kromosomi 17 -signaaleille. Peräkkäisten HER2 / kromosomi 17 -signaalien suhde mahdollistaa kvantitatiivisen arvon määrittämisen näytteelle, osoittaen joko negatiivisen (amplifioitumaton) tai positiivisen (amplifioitunut) tuloksen. Rajatuloksia (1,8-2,2) on tulkittava varovaisuudella. Laske lisää 20 tumaketta ja laske suhde uudelleen.

## D. BOND -entsyymien esikäsittely

Ennen toimitetun BOND Enzyme Concentrate 2 värjäystä 1:300 laimennuksella käyttäen toimitettua BOND Enzyme Diluent yhdessä toimitetuista avoimista BOND Open Containers. Esimerkiksi, värjää 10 preparaattia valmistamalla 3 ml työentsyymiliuosta laimentamalla 10 µl BOND Enzyme Concentrate 2 2990 µl:an BOND Enzyme Diluent. On suositeltavaa, että entsyymi on valmistettu juuri ennen kutakin värjäystä ja että kuhunkin värjäykseen käytetään vähintään 900 µl.

## E. Oletus värjäysprotokolla

Leica HER2 FISH System - 30 Test käyttöä suositellaan käytettäväksi alla taulukossa 2 näytetyssä suositellussa oletusvärjäysprotokollassa.

| Protokollan tyyppi | Protokollan nimi           |
|--------------------|----------------------------|
| Värjäys            | *FISH Protocol A           |
| Valmistelu         | *Dewax                     |
| HIER               | *HIER 25 min with ER1 (97) |
| Entsyymi           | *Enzyme 5 for 25 min       |
| Denaturointi       | *D10                       |
| Hybridisaatio      | *ISH Hybridization (12Hr)  |

Taulukko 2: Leica HER2 FISH System - 30 Test oletusvärjäysprotokolla

## F. Toimenpiteen vaiheet

Nämä ohjeet on luettava yhdessä BOND-MAX- ja BOND-III System käyttöohjekirjan kanssa. Uutta BOND Universal Covertiles on käytettävä kunkin preparaatin kanssa.

BOND Universal Covertiles käyttöä, joita on aiemmin käytetty joko immunohistokemiallisessa tai *in situ* -hybridisaatiovärjäyksessä, ei ole validoitu tämän testin kanssa.

1. Varmista BOND-MAX- ja BOND-III System, että bulkki- ja vaarallisen jätteen astioilla on riittävä tilavuus vaadittavien värjäysten suorittamiseen.
2. Varmista, että on riittävästi alkoholia, tislattua tai ionipoistettua vettä, BOND Dewax Solution, BOND Epitope Retrieval Solution 1 ja BOND Wash Solution bulkkireagenssiastioissa tarvittavien värjäysten suorittamiseen.
3. Varmista, että puhdas BOND Mixing Station on asennettu.
4. Käynnistä BOND-MAX- ja BOND-III System.

5. Käynnistä BOND-MAX- ja BOND-III System liitetty PC.
6. Avaa BOND Software.
7. Skannaa uudella Leica HER2 FISH System - 30 Test pakkauksella reagenssialustan viivakoodi kädessä pidettävällä skannerilla järjestelmä BOND -reagenssi-inventaariin (vain yksittäinen viivakoodi).
8. Valmista BOND Enzyme 5 toimitetussa avoimessa BOND Open Container laimennussuhteella 1:300. Esimerkiksi, 10 preparaattia varten lisää 10 µl BOND Enzyme Concentrate 2 2990 µl:an BOND Enzyme Diluent.
9. Skannaa toimitetussa avoimessa BOND Open Container ja rekisteröi **Bond Enzyme 5**.
10. Mene preparaatin asetusnäyttöön ja napsauta **Lisää tapaus**.
11. Annaensimmäisentapauksentiedot. Varmista, että annostilavuus on asetettu arvoon **150µl** ja valmisteluprotokolla on **\*Dewax**. Napsauta **OK**.
12. Tapaus korostettuna preparaatin asetusnäytössä, napsauta **Lisää preparaatti**.
13. Ensiksi, lisää potilaan testipreparaatit. Varmista, että kudostyyppi on asetettu **Testikudos**.
14. Valitse värjäysmuodoksi **Yksittäinen**.
15. Valitse prosessiksi **ISH**.
16. Valitse **\*LSI HER2/CEP17 Dual Probe – 30 Test** ilmaisluettelosta. Protokollat-välilehti menee oletuksena oikeaan värjäysprotokollaan (**\*FISH Protocol A**), HIER-protokolla (**\*HIER 25 min with ER1 (97)**), EIER-protokolla (**\*Enzyme 5 for 25 min**), denaturointi (**\*D10**) ja hybridisaatio (**\*ISH Hybridization (12 h)**).
17. Toista vaiheet 10 - 16, kunnes potilastestipreparaatit ja valvontapreparaatit (Leica HER2 FISH -valvontapreparaatit ja/tai talon sisäiset valvonnat) on luotu. Tulosta preparaattietiketit.
18. Etiketöi preparaatiit asianmukaisesti.
19. Avaa kaikkien Leica HER2 FISH System - 30 Test astioiden kannet ja lataa reagenssialusta BOND-MAX- ja BOND-III System.
20. Käytä uutta Covertilea kullekin preparaatile.
21. Lataa preparaattialusta BOND-MAX- ja BOND-III System ja paina **Load/Unload** painiketta.
22. Vahvista, että preparaatiit on skannattu ja napsauta **Run (Play)** painiketta Järjestelmän tila -näytöllä suorituksen aloittamiseksi välittömästi (Leica HER2 FISH System - 30 Test suositellaan, että tämä analyysi suoritetaan yön aikana käyttäen viivästettyä käynnistystoimintaa).
23. Varmista, että alustan osoitinkenttä näyttää **Proc (OK)** ja, että eränumero ja lopetusaika näytetään.
24. Kun suoritus on valmis, paina **Load/Unload** painiketta ja poista preparaattialusta BOND-MAX- ja BOND-III System.
25. Poista Covertilet ja puhdistaa preparaatiit ionipoistetussa vedessä.
26. Kuivaa nopeasti kahdessa alkoholissa, ilmakuivaa.
27. Levitä 20 µl DAPI:a suoraan näytteeseen.
28. Laita päällyslasi paikalleen ja anna liuoksen levitä täysin ja huolehdi kaikkien ilmakuplien poistosta.
29. Tiivistä päällyslasin reuna kynsilakalla tai vastaavalla tiivistaineella.
30. Laita preparaatiit pimeään signaalin kehittymistä varten ennen katselua fluoresenssimikroskoopilla.
31. Säilytä signaalin intensiteetti säilyttämällä värjätyt preparaatiit -20 °C:n lämpötilassa.

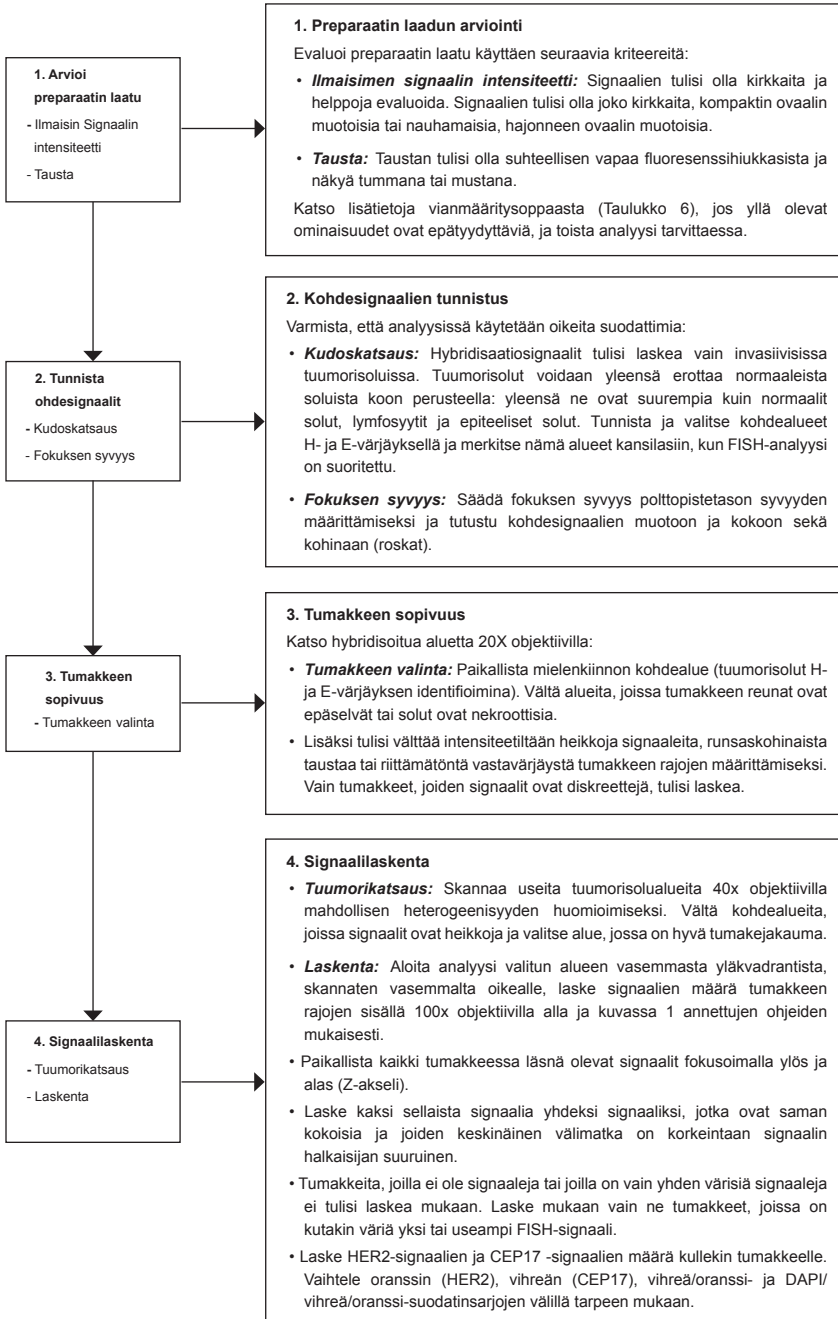
## G. Preparaatin säilytys

Säilytä värjätyt preparaatiit -20 °C:n lämpötilassa pimeässä. Anna preparaattien saavuttaa huonelämpötila ennen katselua sen jälkeen kun preparaatiit on poistettu -20 °C:n lämpötilasta.



# Signaalin arviointi ja laskenta

Signaalin laadun ja laskennan arvioimiseksi HER2- ja CEP17-signaalit noudattavat alla olevaa prosessia:



## Suositteltu menetelmä LSI HER2 - CEP17 -suhteen määrittämiseksi

Käytä seuraavaa menetelmää LSI HER2 - CEP17 -suhteen määrittämiseksi:

1. Kirjaa ja määritä LSI HER2- ja CEP17-signaalien määrä 20 tumakkeessa (ks. kuva 2 Leica HER2 FISH System - 30 Test pistesivu alla).
2. Laske yhteen kaikki LSI HER2 -signaalit. Tämä on laskennan kokonaismäärä LSI HER2 -signaaleja, esim. 143.
3. Laske yhteen kaikki CEP 17 -signaalit. Tämä on laskennan kokonaismäärä CEP17 -signaaleja, esim. 48.
4. Laske lopullinen tulos seuraavalla laskennalla:

LSI HER2 -signaalien kokonaismäärä jaettuna CEP17 -signaalien kokonaismäärällä, esim. 143/48 antaa suhteeksi 2,98, joka on positiivinen HER2-amplifikaatiolle.

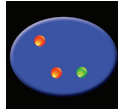
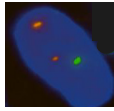
**Tärkeä huomautus: Jos LSI HER2 / CEP17 -suhde on rajatapaus (1,80 - 2,20), laske lisää 20 tumaketta ja laske suhde uudestaan.**

Tulokset tulisi raportoida seuraavasti:

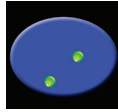
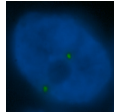
1. Jos suhde on  $<2$ , HER2-geeniampifikaatiota ei havaittu
2. Jos suhde on  $\geq 2$ , HER2-geeniampifikaatiota havaittiin

**Tärkeä huomautus: Rajatapaussuhdetta (1,80 - 2,20) on tulkittava varovaisuudella yllä kuvatun mukaisesti.**

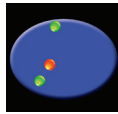
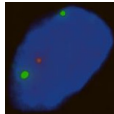
# Leica HER2 FISH System - 30 Test tulkintaopas



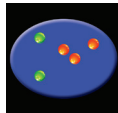
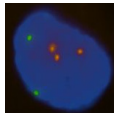
Laske 2:na oranssit signaalit ja 1 vihreä signaali



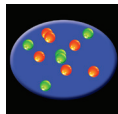
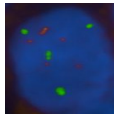
Älä laske. Tumakkeita, joilla ei ole signaaleja tai joilla on vain yhden värisiä signaaleja ei tulisi laskea mukaan. Laske mukaan vain ne tumakkeet, joissa on kutakin väriä yksi tai useampi FISH-signaali.



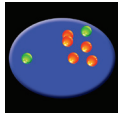
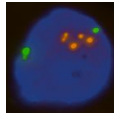
Laske 1:na oranssi signaali ja 2 vihreää signaalia



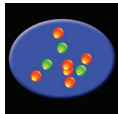
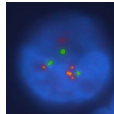
Laske 3:na oranssit signaalit ja 2 vihreää signaalia



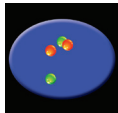
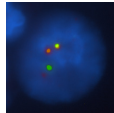
Laske 5:na oranssit signaalit ja 4 vihreää signaalia. 1 oranssi signaali on diffuusi ja 1 vihreä signaali on diffuusi



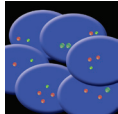
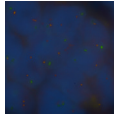
Laske 4:na oranssit signaalit ja 2 vihreää signaalia. 1 oranssi signaali on diffuusi. Laske 2 sellaista signaalia yhdeksi signaaliksi, jotka ovat saman kokoisia ja joiden keskinäinen välimatka on korkeintaan signaalin halkaisijan suuruinen.



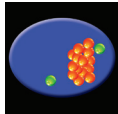
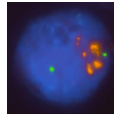
Laske 5:na oranssit signaalit ja 3 vihreää signaalia. 1 oranssi signaali on diffuusi.



Laske 2:na oranssit signaalit ja 2 vihreää signaalia. 1 oranssi signaali ja 1 vihreä signaali ovat päällekkäisiä



Älä laske. tumakkeet ovat päällekkäisiä. On liian vaikeaa määrittää, missä tumakkeessa signaalit sijaitsevat



Laske noin 16:na oranssia signaalia ja 2 vihreää signaalia

# Leica HER2 FISH System - 30 Test Esimerkkipistesivu

| 20 tumakkeen signaalilaskenta |                 |                  |                   |                 |                  |
|-------------------------------|-----------------|------------------|-------------------|-----------------|------------------|
| Tumake nro                    | HER2-kopiomäärä | CEP17-kopiomäärä | Tumake nro        | HER2-kopiomäärä | CEP17-kopiomäärä |
| 1                             |                 |                  | 11                |                 |                  |
| 2                             |                 |                  | 12                |                 |                  |
| 3                             |                 |                  | 13                |                 |                  |
| 4                             |                 |                  | 14                |                 |                  |
| 5                             |                 |                  | 15                |                 |                  |
| 6                             |                 |                  | 16                |                 |                  |
| 7                             |                 |                  | 17                |                 |                  |
| 8                             |                 |                  | 18                |                 |                  |
| 9                             |                 |                  | 19                |                 |                  |
| 10                            |                 |                  | 20                |                 |                  |
| Yhteensä<br>1-10              |                 |                  | Yhteensä<br>11-20 |                 |                  |

|                          | HER2 | CEP17 | HER2 / CEP17<br>-amplifikaatiosuhde |
|--------------------------|------|-------|-------------------------------------|
| Kokonaispisteet 1-20     |      |       |                                     |
| Keskimäärin solua kohden |      |       |                                     |

Kuva 2: Esimerkkipistesivu

## Automatisoitu Ariol-menetelmä HER2 FISH määritykseen

Digitaalisen Ariol PathVysion® -pisteytyssovelluksen käyttö tulkinnan apuna validoitin riippumattomasti joukolla Leica HER2 FISH System kanssa käytettävillä näytteillä. Digitaalinen Ariol PathVysion -pisteytyssovellus on tarkoitettu In Vitro diagnostiseen käyttöön yhdessä Leica HER2 FISH System kanssa. Leica HER2 FISH System kanssa käytettynä Ariol PathVysion -sovellus on käyttökälibroitava kudoskontrollinäytteillä, ei Leica HER2 FISH Control Slides (TA9123).

**Pätevän klinikon on tehtävä kaikki diagnostiset päätökset.**

Katso lisätiedot Ariol-käyttöohjekirjasta.

## Laadunvalvonta

### Valvontapreparaattien käyttö

On suositeltavaa, että Leica HER2 FISH Control Slide on mukana jokaisessa testisuorituksessa analyysin suorituskyvyn seuraamiseksi ja signaalilaskennan tarkkuuden arvioimiseksi. Valvontapreparaatteja tulisi käyttää jokaiselle värjäyserälle BOND-MAX- ja BOND-III System ja jokaiselle uudelle reagenssierälle. Lisäksi käyttäjät voivat valita oman valvontamateriaalin käytön.

Arvioi valvontapreparaatin laatu ja suorita signaalilaskenta ohjeiden mukaan, jotka on annettu **Signaalin arviointi ja laskenta** -osiossa. Preparaatin laatuksiteerit on täytettävä ja HER2 / CEP17 -suhteen tulokset on oltava testin hyväksyttävien rajojen puitteissa. Katso Leica HER2 FISH Control Slides hyväksymiskriteerit taulukosta 3.

| Solurivi   | Bond Oracle HER2 IHC System profiili | HER2-reseptorikuorma / solu* | Leica HER2 FISH System - 30 Test HER2 / CEP17 -hyväksymiskriteerit |
|------------|--------------------------------------|------------------------------|--|
| SKBr-3     | 3+                                   | $4,3 \times 10^5$            | HER2-amplifikaatio on havaittu                                     |
| MDA-MB-453 | 2+                                   | $1,4 \times 10^5$            | HER2 / CEP17 -geenisuhteen tulisi olla 1,5 – 2,5                   |
| MDA-MB-175 | 1+                                   | $6,3 \times 10^4$            | HER2-amplifikaatiota ei ole havaittu                               |
| MDA-MB-231 | 0                                    | $9,3 \times 10^3$            | HER2-amplifikaatiota ei ole havaittu                               |

\*HER2-reseptorikuorman analyysi virtausytometrialla Taulukko 3: Leica HER2 FISH -valvontapreparaatin tulkinta

Jos analyysivalvonta epäonnistuu, ko. tapauksen FISH-tuloksia ei tulisi raportoida. Jos valvontapreparaatit eivät täytä preparaatin hyväksymiskriteereitä, Leica HER2 FISH System - 30 Test on mahdollisesti toiminut epätydyttävästi. Tässä tapauksessa on suoritettava uusi testi tuoreilla valvontapreparaateilla ja potilasnäytteillä. Jos tulokset ovat määritetyn alueen ulkopuolella, mutta valvontapreparaatit täyttävät laadun hyväksymiskriteerit, saman preparaatin toistoseulonta saattaa olla asianmukainen, koska laskentaa ei kenties ole suoritettu oikein. Hybridisaatiovian yhteydessä katso vianmääritysopasta (taulukko 6), koskien joko näytettä tai valvontapreparaatteja.

Kliinisille näytteille, kun hybridisaatiosignaalin tulkinta on vaikeaa ja uutta analysointia varten ei ole riittävästi näytettä, testi ei ole tietoja antava. Jos soluja ei ole riittävästi analyysiin, testi ei ole tietoja antava.

Potilasnäytteitä on valvottava normaalien laboratorikäytäntöjen mukaisesti. Signaalin laatu- ja laskentatulokset on dokumentoitava asianomaiseen raporttilomakkeeseen.

## Rajoitukset

### A. Yleiset rajoitukset

FISH-tekniikka edellyttää erikoiskoulutusta koskien toimenpiteen kaikkia näkökohtia (ml. asianmukaisten reagenssien valinta, kudoksen fiksaatio, käsittely ja preparaatin valmistelu) ja tulkintaa. Kudoksen värjäys riippuu käsittelystä, fiksaatiosta ja kudoksen käsittelystä ennen värjäystä. Väärä fiksaatio, jäätyminen, sulatus, pesu, kuivaus, lämmitys, sektiointi tai kontaminaatio muiden kudosten tai nesteiden kanssa saattaa aiheuttaa morfologisia artefakteja, tumakkeen hapon heikentymistä, taustafluoresenssia tai vääriä negatiivisia tuloksia. Epäyhtenäiset tulokset saattavat johtua variaatioista fiksaatioissa, upotusmenetelmissä tai luontaisista epäsäännöllisyyksistä kudoksessa (21). Liiallinen tai epätätydellinen vastavärjäys saattaa myös estää tulosten oikean tulkinnan.

Ei-spesifisellä värjäyksellä tuloksena sitomattomasta ilmaisimesta on hajonnut, granulaarinen ulkonäkö ja se voidaan havaita joko odotetussa hybridisaatiokohdassa tai etäällä siitä. Käytä koskemattomia soluja värjäystulosten tulkintaan. Nekroottiset tai degeneroituneet solut voivat värjäytyä ei-spesifisesti (22). Odottamaton FISH-värjäytymisen vaihtelu värjäytymisessä saattavat johtua koodausgeenien ilmaisutasojen vaihteluista. Kaikki muutokset odotetussa värjäytymisessä on tulkittava yhdessä muiden diagnostisten tutkimusten yhteydessä. Pätevän patologin on täydennettävä värjäytymistulkintaa morfologisilla tutkimuksilla ja sopivien valvontamateriaalien käytöllä ja arvioitava tuloksia ottaen huomioon potilaan kliininen historia ja kaikki muut mahdolliset diagnostiset testit.

Pätevöityneen ja kokeneen patologin on suoritettava analyysi (so. valvontamateriaalien asianmukaisuuden arviointi) ja värjäytymisen tai sen puuttumisen tulkinta hyväksytyssä/luvattu omistavassa laboratoriossa. Patologi on kokonaisvastuussa *in situ* -hybridisaatioanalyyseistä ja sen tulkinnasta. Väärät positiiviset tulokset FISH-testissä saattavat johtua ilmaisimen ristireaktiivisuudesta muihin tumakehapposekvensseihin ja/tai ei-spesifiseen sitoutumiseen. Asianmukaisia valvontoja on käytettävä ja ne on kirjattava. Tuloksissa on otettava huomioon relevantit tuotteiden viimeiset käyttöpäivämäärät.

Teknisiä ja tulkinnallisia variaatioita saattaa olla myös nähtävissä käytettäessä FISH-testiä solurivistä johdetuissa materiaaleissa (23).

### B. Tuotespesifiset rajoitukset

Tämä tuote ei ole tarkoitettu käytettäväksi missään muussa DNA-pohjaisessa diagnostisessa analyysissä.

Älä korvaa Leica HER2 FISH System - 30 Test reagensseja millään muilla joko Leica Biosystems tai muiden valmistajien toimittamilla aineilla. Se mitätöi analyysin. Käyttäjän on valdoidtava kaikki poikkeamat suositelluista menetelmistä.

On suositeltavaa, että analyysissä käytetään vain formaliinipohjaisissa fiksaatioissa kiinnitettyjä kudoksia. Muun tyyppisen fiksaatiivin käyttö voi mitätöidä analyysin.

Suosittelun paksuuden ulkopuolella olevia kudossektiopaksuuksia ei ole valdoidtu. Muun paksuisen sektorin käyttö voi mitätöidä analyysin.

## Leica HER2 FISH System - 30 Test kliininen yhtäpitävyys Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Rinta

Tämä tutkimus tutki Leica HER2 FISH System - 30 Test sopivuutta käytettäväksi apuna Herceptin (trastuzumab) -hoidon määrittämisessä. Tutkimus oli suunniteltu tutkimaan Leica HER2 FISH System - 30 Test ja aiemmin hyväksytyyn diagnostiseen laitteeseen, tämän analyysin "kultaisena standardina" rintarauhaskudokseen pidetyn Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit tulosten yhtäpitävyyttä. Testauksen hyväksymiskriteerinä oli, että yksipuolisen luottamustasvälillä 95 % alaraja on yli 90 % Leica HER2 FISH System - 30 Test ja manuaalisen Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit välillä, positiivisten (amplifioituneiden) ja negatiivisten (amplifioitumattomien) formaliini-kiinnitettyjen, parafiiniin upotettujen (FFPE) invasiivisten rintasyöpätapausten välillä.

Tutkimus suoritettiin kolmen paikan kliinisten invasiivisten rintakarsinomanäytteiden sokkoevaluatona. Jokaiseen tutkimuspaikkaan toimitettiin arkistoituja formaliini-kiinnitettyjä

parafiiniin upotettuja invasiivisen rintakarsinooman lohkoja, joiden HER2-onkoproteiinitasot tunnettiin. 300 näytteen joukko sisältäen 75, 0/1+ aiemmin karakteroitua IHC-tapausta; 150, 2+ aiemmin karakteroitua IHC-tapausta ja 75, 3+ aiemmin karakteroitua IHC-tapausta valittiin ja jaettiin tasaisesti kolmen tutkimuskoepaikan kesken.

Kaikki tapaukset värjäyttiin manuaalisella Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit valmistajan pakkauksessa olevien käyttöohjeiden mukaisesti. Peräkkäiset sekotit kustakin tapauksesta värjäyttiin sitten Leica HER2 FISH System - 30 Test IIä BOND-MAX- ja BOND-III System.

Yksi koulutettu havainnoitsija kussakin kolmessa tutkimuskoepaikassa sokkoutti ja pisteytti satunnaisella tavalla kaikki värjätyt preparaattit. Pisteet tulkittiin negatiiviseksi lasketun HER2 / CEP17 -geenisuhteen ollessa <2,0 ja positiiviseksi lasketun HER2 / CEP17 -geenisuhteen ollessa  $\geq 2,0$ . Tiedot analysoitiin sitten koskien yhtäpitävyyttä, positiivista värjäystä ja negatiivista värjäystä.

## 2 x 2 yhtäpitävyytulokset, BOND-MAX System - Rinta

Tiedot ryhmitettiin negatiivisiksi (<2.00) tai positiivisiksi ( $\geq 2.00$ ) 2 x 2 analyysiä varten. 300 näytteen havaittu kahden testin yhtäpitävyys 2 x 2 analyysissä oli 99,33 % (298/300) (95 % luottamusväli, 97,61–99,92 %) BOND-MAX System.

Positiivisen tuloksen (herkkyys) tai Leica HER2 FISH System - 30 Test kyky tunnistaa oikein Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit positiiviset tapaukset (positiivisesti pisteytettyjen näytteiden prosenttimäärä sekä Leica HER2 FISH System - 30 Test:ssä että manuaalisessa Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit kaikista Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit tapauksista) oli 99,03 % (102/103).

Negatiivisten tulosten prosenttimäärä (spesifisyys) tai testin kyky tunnistaa oikein Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit negatiiviset tapaukset (negatiivisesti pisteytettyjen näytteiden prosenttimäärä sekä Leica HER2 FISH System - 30 Test:ssä että Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit kaikista Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit negatiivisista tapauksista) oli 99,49 % (196/197). Katso taulukko 4

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

Kokonaisyhtäpitävyys (95 % luottamusväli) = 99,33 % (97,61 – 99,92 %)

Taulukko 4. Leica HER2 FISH System - 30 Test 2 x 2 yhtäpitävyys Leica HER2 FISH System - 30 Test BOND-MAX System, jossa Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit rintakudoksen testauksessa. .

## 2 x 2 yhtäpitävyytulokset, BOND-III System - Rinta

Tiedot ryhmitettiin negatiiviseksi (<2.00) tai positiiviseksi (≥2.00) 2 x 2 analyysiä varten. 300 näytteen havaittu kahden testin yhtäpitävyys 2 x 2 analyysissä oli 99,67 % (299/300) (95 % luottamusväli, 98,16-99,99 %) BOND-III System.

HER2 FISH System - 30 -testin kyky tunnistaa oikein Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit positiiviset tapaukset (positiivisesti pisteytettyjen näytteiden prosenttimäärä sekä Leica HER2 FISH System - 30 Test:ssä että manuaalisessa Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit kaikista Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit tapauksista) oli 99,03 % (102/103).

Negatiivisten tulosten prosenttimäärä (spesifisyys) tai testin kyky tunnistaa oikein Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit negatiiviset tapaukset (negatiivisesti pisteytettyjen näytteiden prosenttimäärä sekä Leica HER2 FISH System - 30 Test:ssä että Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit kaikista Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit negatiivisista tapauksista) oli 100 % (197/197). Katso taulukko 5.

|   |                     | Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit |                     |          |
|---|---------------------|---|---------------------|----------|
|   |                     | Negatiivinen (<2,0)                             | Positiivinen (≥2,0) | Yhteensä |
| Leica HER2 FISH System - 30 Test BOND-III | Negatiivinen (<2,0) | 197   | 1                   | 198      |
|   | Positiivinen (≥2,0) | 0   | 102                 | 102      |
|   | Yhteensä            | 197   | 103                 | 300      |

Kokonaisyhtäpitävyys (95 % luottamusväli) = 99,67 % (98,16 – 99,99 %)

Taulukko 5. BOND-III System suoritettuna Leica HER2 FISH System - 30 Test 2 x 2 yhtäpitävyys Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit rintakudoksen testauksessa.

Yhteenvetona voidaan sanoa tässä tutkimuksessa saatujen tietojen osoittavan, että Leica HER2 FISH System - 30 Test voidaan käyttää apuna arvioimaan potilaita, joille harkitaan Herceptin (trastuzumab) -hoitoa, perustuen testin suureen yhtäpitävyyteen aiemmin tähän indikaatioon hyväksytyyn diagnostiikkatestin, Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit.



## **Leica HER2 FISH System - 30 Test -laitteen klininen yhtäpitävyys Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit -laitteen kanssa - Mahalaukku**

Tutkimuksessa selvitettiin HER2 FISH System - 30 Test -tuotteen soveltuvuutta Herceptin (trastutumabi) -hoitotulosten määrittämisen apuvälineenä. Tutkimuksen tarkoituksena oli tutkia konkordanssia Leica HER2 FISH System - 30 Test -tuotteen ja aikaisemmin hyväksytyyn diagnostiseen laitteeseen, Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, välillä. Kyseistä laitetta pidetään parhaana mahdollisena standardina mahalaukun kudoksen testauksessa. Testauksen hyväksymisperusteena oli, että 95 %:n toispuolisen luottamusvälin alaraja on yli 90% Leica HER2 FISH System - 30 Test -tuotteen ja Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit -laitteen välillä mahan positiivisten (vahvistettujen) ja negatiivisten (ei-vahvistettujen) formaliinilla fiksoitujen, parafiiniin valettujen (FFPE) adenokarsinoomien (ruokatorven ja mahalaukun raja-alue mukaan luettuna) välillä.

Tutkimus suoritettiin kliinisten invasiivisten mahalaukun adenokarsinoomanäytteiden arviointina. Testaus suoritettiin arkistoidulla formaliinilla fiksoiduilla, parafiiniin valetuilla mahalaukun adenokarsinoomien kudosebloeilla tunnetuilla HER2-geenien ilmentymistasoilla. Valittiin 109 näytteen kohortti, joka koostuu 50 vahvistetusta tapauksesta ja 59 ei-vahvistetusta tapauksesta.

Kaikki tapaukset värjättiin Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit Assay -laitteella valmistajan käyttöohjeessa kuvatulla tavalla pakkausselosteen määritysten mukaisesti. Peräkkäiset kappaleet värjättiin sitten Leica HER2 FISH System - 30 Test -laitteella BOND-MAX System-automaateilla.

Yksi asiantunteva havainnoitsija arvosteli värjätty näytelasit satunnaistetulla tavalla. Tulokset tulkittiin negatiivisiksi, kun laskettu HER2/CEP17-geeniosuus oli  $<2,0$ , ja positiivisiksi, kun HER2/CEP17-geeniosuus oli  $\geq 2,0$ . Sen jälkeen data analysoitiin yhtäpitävyyden, positiivisen värjäyksen yhtenevyyden ja negatiivisen värjäyksen yhtenevyyden suhteen.

### **2x2 yhtäpitävyydustulokset BOND-MAX System - Mahalaukku**

Data ryhmiteltiin negatiiviseksi ( $<2,00$ ) tai positiiviseksi ( $\geq 2,00$ ) 2x2-analyysiä varten. 109 näytteen havaittu yhtenevyys kahden testin välillä 2x2 analyysissä osoittaa 98,17%:n yhtäpitävyyden (107/109) 95 %:n luottamusväillä 93,53–99,78 % BOND-MAX System -automaatille.

Positiivisen yhtenevyyden prosenttiluku (herkkyys) ja Leica HER2 FISH System - 30 Test -laitteen kyky tunnistaa oikein Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe -välineen positiiviset tapaukset (sekä Leica HER2 FISH System - 30 Test -laitteen että manuaalisen Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit välineen positiivisiksi luokittelemien näytteiden prosenttimäärä kaikista Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit -välineen positiivisista tapauksista) oli 96,00 % (48/50).

Negatiivisen yhtenevyyden prosenttiluku (tarkkuus) ja Leica FISH System Test -laitteen kyky tunnistaa oikein Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe -välineen negatiiviset tapaukset (sekä Leica HER2 FISH System - 30 Test -laitteen että manuaalisen Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit välineen negatiivisiksi luokittelemien näytteiden prosenttimäärä kaikista Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit -välineen negatiivisista tapauksista) oli 100 % (59/59). Katso taulukko 6.

|   |                     | Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit |                     |          |
|---|---------------------|---|---------------------|----------|
|   |                     | Negatiivinen (<2.0)                             | Positiivinen (≥2.0) | Yhteensä |
| Leica HER2 FISH System - 30 Test BOND-MAX | Negatiivinen (<2.0) | 59  | 2                   | 61       |
|   | Positiivinen (≥2.0) | 0   | 48                  | 48       |
|   | Yhteensä            | 59  | 50                  | 109      |

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

*Taulukko 6. Leica HER2 FISH System - 30 Test -väliineen 2x2 yhtäpitävyys BOND-MAX System -automaatissa Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit -väliineen kanssa mahalaukun kudoksen testauksessa.*

# Tarkkuustestaus – BOND-MAX System

## A. Suorituskohtaisen tarkkuuden tutkimus

Suorituskohtaisen tarkkuuden tutkimus suoritettiin satunnais- ja sokkotutkimuksena. Leica HER2 FISH System - 30 Test suorituskohtainen tarkkuus evaluoitiin yhdessä tutkimuskohteessa 540:llä aiemmin HER2-karakteroidulla TMA-näytteellä sisältäen formaliini-kiinnitettyjä, parafiiniin upotettuja rintasyöpätapauksia. TMA:den käyttö suorituskohtaisen tarkkuuden määrittämiseksi mahdollisti suuremman määrän tapauksia kattaaen laajan HER2-ilmaisualueen yhdellä suorituksella yhdessä instrumentissa.

Suorituskohtaisen tarkkuuden tutkimuksessa värjättyjen preparaattien laskennassa evaluoitiin 532/540 tapausta. Tulokset osoittivat 98,52 % kokonaisyhtäpitävyyttä (alempi 95 % luottamusväli, 97,10 %).

## B. Instrumentikohtaisen tarkkuuden tutkimus

Instrumentikohtaisen tarkkuuden tutkimus suoritettiin satunnais- ja sokkotutkimuksena. Leica HER2 FISH System - 30 Test instrumentikohtainen tarkkuus evaluoitiin yhdessä tutkimuskohteessa 1620:llä aiemmin HER2-karakteroidulla TMA-näytteellä sisältäen formaliini-kiinnitettyjä, parafiiniin upotettuja rintasyöpätapauksia. TMA:den käyttö instrumentikohtaisen tarkkuuden määrittämiseksi mahdollisti suuremman määrän tapauksia kattaaen laajan HER2-ilmaisualueen usealla suorituksella yhdessä instrumentissa.

Instrumentikohtaisen tarkkuuden tutkimuksessa värjättyjen preparaattien laskennassa evaluoitiin 1620/1620 tapausta. Tulokset osoittivat 100 % kokonaisyhtäpitävyyttä (alempi 95 % luottamusväli 99,82 %:sta).

## C. Suoritusten välisen tarkkuuden tutkimus

Suoritusten välisen tarkkuuden tutkimus suoritettiin satunnais- ja sokkotutkimuksena. Leica HER2 FISH System - 30 Test suoritusten välinen tarkkuus evaluoitiin yhdessä tutkimuskohteessa 900:lla aiemmin HER2-karakteroidulla TMA-näytteellä sisältäen formaliini-kiinnitettyjä, parafiiniin upotettuja rintasyöpätapauksia. TMA:den käyttö suoritusten välisen päivästä toiseen tarkkuuden määrittämiseksi mahdollisti suuremman määrän tapauksia kattaaen laajan HER2-ilmaisualueen testattavaksi eri suorituskertoilla eri päivinä.

Suoritusten välisen tarkkuuden tutkimuksessa värjättyjen preparaattien laskennassa evaluoitiin 894/900 tapausta. Tulokset osoittivat 99,33 % kokonaisyhtäpitävyyttä (alempi 95 % luottamusväli 98,55 %:sta).

## D. Laboratorioiden välisen tarkkuuden tutkimus

Laboratorioiden välisen tarkkuuden tutkimus suoritettiin satunnais- ja sokkotutkimuksena. Leica HER2 FISH System - 30 Test laboratorioiden välinen tarkkuus evaluoitiin yhdessä tutkimuskohteessa 513:sta aiemmin HER2-karakteroidulla TMA-näytteellä sisältäen formaliini-kiinnitettyjä, parafiiniin upotettuja rintasyöpätapauksia. TMA:den käyttö laboratorioiden välisen tarkkuuden määrittämiseksi mahdollisti suuremman määrän tapauksia kattaaen laajan HER2-ilmaisualueen testattavaksi suorituskertojen välillä useilla instrumenteilla.

Laboratorioiden välisen tarkkuuden tutkimuksessa värjättyjen preparaattien laskennassa evaluoitiin 510/513 tapausta. Tulokset osoittivat 99,42 % kokonaisyhtäpitävyyttä (alempi 95 % luottamusväli 98,30 %:sta).

## E. Havainnoitsijoiden välisen tarkkuuden tutkimus

Havainnoitsijoiden välisen tarkkuuden tutkimus suoritettiin satunnais- ja sokkotutkimuksena. Havainnoitsijoiden välisen Leica HER2 FISH System - 30 Test toistettavuus evaluoitiin kolmessa tutkimuskohteessa. Kussakin tutkimuspaikassa käytettiin yhtä kokenutta havainnoitsijaa. Kahdeksaatoista kokosektio rintasyöpätapausta käytettiin havainnoitsijoiden väliseen tarkkuuteen heijastaen kliinisessä asetuksessa käytettyjä näytetyyppejä.

Havainnoitsijoiden välisen tarkkuuden tutkimuksessa värjättyjen preparaattien laskennassa evaluoitiin 53/54 tapausta. Tulokset osoittivat 98,15 % kokonaisyhtäpitävyyttä (alempi 95 % luottamusväli 90,11 %:sta).

## F. Erien välisen tarkkuuden tutkimus

Erien välisen tarkkuuden tutkimus suoritettiin satunnais- ja sokkotutkimuksena. Erien välinen tarkkuus määritettiin kolmella erikseen valmistetulla erällä Leica HER2 FISH System - 30 Test. Valmistus tapahtui hyvän valmistustavan (GMP) mukaisesti. Kukin erä testattiin yhdessä tutkimuspaikassa 540:llä aiemmin HER2-karakteroidulla TMA-näytteellä sisältäen formaliini-kiinnitettyjä, parafiiniin upotettuja rintasyöpätapauksia. TMA:den käyttö erien välisen tarkkuuden määrittämiseksi mahdollisti suuremman määrän tapauksia kattaen laajan HER2-ilmaisualueen testattavaksi erien välillä.

Erien välisen tarkkuuden tutkimuksessa värjättyjen preparaattien laskennassa evaluoitiin 534/540 tapausta. Tulokset osoittivat 98,89 % kokonaisyhtäpitävyyttä (alempi 95 % luottamusväli 97,60 %:sta).

## Tarkkuustestaus – BOND-III System

### G. Suorituskohtaisen tarkkuuden tutkimus

Suorituskohtaisen tarkkuuden tutkimus suoritettiin satunnais- ja sokkotutkimuksena. Leica HER2 FISH System - 30 Test suorituskohtainen tarkkuus evaluoitiin yhdessä tutkimuskohteessa 540:llä aiemmin HER2-karakteroidulla TMA-näytteellä sisältäen formaliini-kiinnitettyjä, parafiiniin upotettuja rintasyöpätapauksia. TMA:den käyttö suorituskohtaisen tarkkuuden määrittämiseksi mahdollisti suuremman määrän tapauksia kattaen laajan HER2-ilmaisualueen yhdellä suorituskella yhdessä instrumentissa.

Suorituskohtaisen tarkkuuden tutkimuksessa värjättyjen preparaattien laskennassa evaluoitiin 540/540 tapausta. Tulokset osoittivat 100 % kokonaisyhtäpitävyyttä (alempi 95 % luottamusväli 99,45 %:sta).

### H. Instrumenttikohtaisen tarkkuuden tutkimus

Instrumenttikohtaisen tarkkuuden tutkimus suoritettiin satunnais- ja sokkotutkimuksena. Leica HER2 FISH System - 30 Test instrumenttikohtainen tarkkuus evaluoitiin yhdessä tutkimuskohteessa 1620:llä aiemmin HER2-karakteroidulla TMA-näytteellä sisältäen formaliini-kiinnitettyjä, parafiiniin upotettuja rintasyöpätapauksia. TMA:den käyttö instrumenttikohtaisen tarkkuuden määrittämiseksi mahdollisti suuremman määrän tapauksia kattaen laajan HER2-ilmaisualueen useilla suorituksilla yhdessä instrumentissa.

Suorituskohtaisen tarkkuuden tutkimuksessa värjättyjen preparaattien laskennassa evaluoitiin 1620/1620 tapausta. Tulokset osoittivat 100 % kokonaisyhtäpitävyyttä (alempi 95 % luottamusväli 99,82 %:sta).

### I. Suoritusten välisen tarkkuuden tutkimus

Suoritusten välisen tarkkuuden tutkimus suoritettiin satunnais- ja sokkotutkimuksena. Leica HER2 FISH System - 30 Test suoritusten välinen tarkkuus evaluoitiin yhdessä tutkimuskohteessa 900:lla aiemmin HER2-karakteroidulla TMA-näytteellä sisältäen formaliini-kiinnitettyjä, parafiiniin upotettuja rintasyöpätapauksia. TMA:den käyttö suoritusten välisen päivästä toiseen tarkkuuden määrittämiseksi mahdollisti suuremman määrän tapauksia kattaen laajan HER2-ilmaisualueen testattavaksi eri suorituseroilla eri päivinä.

Suoritusten välisen tarkkuuden tutkimuksessa värjättyjen preparaattien laskennassa evaluoitiin 891/900 tapausta. Tulokset osoittivat 99,00 % kokonaisyhtäpitävyyttä (alempi 95 % luottamusväli 98,11 %:sta).

### J. Laboratorioiden välisen tarkkuuden tutkimus

Laboratorioiden välisen tarkkuuden tutkimus suoritettiin satunnais- ja sokkotutkimuksena. Leica HER2 FISH System - 30 Test laboratorioiden välinen tarkkuus evaluoitiin yhdessä tutkimuskohteessa 513:sta aiemmin HER2-karakteroidulla TMA-näytteellä sisältäen formaliini-kiinnitettyjä, parafiiniin upotettuja rintasyöpätapauksia. TMA:den käyttö laboratorioiden välisen tarkkuuden määrittämiseksi mahdollisti suuremman määrän tapauksia kattaen laajan HER2-ilmaisualueen testattavaksi suorituskertojen välillä useilla instrumenteilla.

Laboratorioiden välisen tarkkuuden tutkimuksessa värjättyjen preparaattien laskennassa evaluoitiin 511/513 tapausta. Tulokset osoittivat 99,61 % kokonaisyhtäpitävyyttä (alempi 95 % luottamusväli 98,60 %:sta).

## K. Havainnoitsijoiden välisen tarkkuuden tutkimus

Havainnoitsijoiden välisen tarkkuuden tutkimus suoritettiin satunnais- ja sokkotutkimuksena. Leica HER2 FISH System - 30 Test havainnoitsijoiden välinen toistettavuus evaluoitiin kolmen tutkimuspaikan välillä. Kussakin tutkimuspaikassa käytettiin yhtä kokenutta havainnoitsijaa. Kahdeksaatoista kokosektio rintasyöpätapausta käytettiin havainnoitsijoiden väliseen tarkkuuteen heijastaen kliinisessä asetuksessa käytettyjä näytetyyppejä.

Havainnoitsijoiden välisen tarkkuuden tutkimuksessa värjättyjen preparaattien laskennassa evaluoitiin 53/54 tapausta. Tulokset osoittivat 98,15 % kokonaisyhtäpitävyyttä (alempi 95 % luottamusväli, 90,11 %:sta).

## L. Erien välisen tarkkuuden tutkimus

Erien välisen tarkkuuden tutkimus suoritettiin satunnais- ja sokkotutkimuksena. Erien välinen tarkkuus määritettiin kolmella erikseen valmistetulla erällä Leica HER2 FISH System - 30 Test. Valmistus tapahtui hyvän valmistustavan (GMP) mukaisesti. Kukin erä testattiin yhdessä tutkimuspaikassa 540:llä aiemmin HER2-karakteroidulla TMA-näytteellä sisältäen formaliini-kiinnitettyjä, parafiiniin upotettuja rintasyöpätapauksia. TMA:den käyttö erien välisen tarkkuuden määrittämiseksi mahdollisti suuremman määrän tapauksia kattaen laajan HER2-ilmaisualueen testattavaksi erien välillä.

Erien välisen tarkkuuden tutkimuksessa värjättyjen preparaattien laskennassa evaluoitiin 540/540 tapausta. Tulokset osoittivat 100 % kokonaisyhtäpitävyyttä (alempi 95 % luottamusväli 99,45 %:sta).

## Analyysin luotettavuus

Luotettavuustutkimukset suoritettiin BOND-MAX- ja BOND-III-System

analyysitoleranssialueen määrittämiseksi lämmön takaisinsantiajalle ja lämpötilalle;

entsyymin takaisinsantiajalle, lämpötilalle ja pitoisuudelle; denaturointiajalle ja

lämpötilalle; hybridisaatioajalle ja lämpötilalle ja huolelliselle pesuajalle ja lämpötilalle.

Luotettavuustutkimukset, käyttäen oletuksena BOND-MAX- ja BOND-III-System protokollaa, suoritettiin myös FDA/ORA-opasasiakirjoissa ORA LAB5.3 Rev1.7 määritettyjen lämpötila- ja kosteusrajojen ulkopuolella.

- Mitään eroa ei havaittu amplifikaatiotilassa, kun oletuslämpötilaa nostettiin tai laskettiin jokaiselle lämpöriippuvaiselle vaiheelle 4 °C oletukseen verrattuna. Leica HER2 FISH System - 30 Test protokolla Korkeimmat laatuluokitukset havaittiin oletuslämpötiloissa ja näitä lämpötiloja suositellaan.
- Mitään eroa ei havaittu amplifikaatiotilassa, kun lämmön aiheuttamaa epitopin takaisinsantia (HIER) suoritettiin 20 minuuttia ja 30 minuuttia 97 °C:n lämpötilassa BOND ER1 -liuoksella verrattuna Leica HER2 FISH System - 30 Test protokollaan. Korkeimmat laatuluokitukset havaittiin 25 minuutin oletusajalla ja tätä inkubaatioaikaa suositellaan.
- Mitään eroa ei havaittu amplifikaatiotilassa, kun entsyymin aiheuttamaa epitopin takaisinsantia (EIER) suoritettiin 15 minuuttia ja 35 minuuttia 37 °C:n lämpötilassa verrattuna oletus Leica HER2 FISH System - 30 Test protokollaan. Korkeimmat laatuluokitukset havaittiin 25 minuutin oletusajalla ja tätä inkubaatioaikaa suositellaan.
- Mitään eroa ei havaittu amplifikaatiotilassa, kun entsyymin aiheuttamaa epitopin takaisinsannin (EIER) entsyymikonsentraatiota suoritettiin entsyymikonsentraatilla/entsyymilaimennussuhteilla 1:200 ja 1:500 käyttäen Leica HER2 FISH System - 30 Test -oletustestiprotokollaa. Korkeimmat laatuluokitukset havaittiin oletuskonsentraatiolla 1:300 ja tätä laimennusta suositellaan.
- Mitään eroa ei havaittu amplifikaatiotilassa, kun denaturointia suoritettiin 5 minuuttia ja 15 minuuttia verrattuna Leica HER2 FISH System - 30 Test protokollaan. Korkeimmat laatuluokitukset havaittiin 10 minuutin oletusajalla ja tätä denaturointiaikaa suositellaan.
- Mitään eroa ei havaittu amplifikaatiotilassa, kun hybridisaatiota suoritettiin 9 tuntia ja 15 tuntia verrattuna Leica HER2 FISH System - 30 Test protokollaan. Korkeimmat laatuluokitukset havaittiin 12 tunnin oletusajalla ja tätä hybridisaatioaikaa suositellaan.

- Mitään eroa ei havaittu amplifikaatiotilassa, kun hybridisaation jälkeistä pesua suoritettiin 2, 5 ja 7 minuuttia verrattuna Leica HER2 FISH System - 30 Test protokollaan. Korkeimmat laatuoluokitus havaittiin 4 minuutin oletusajalla ja tätä hybridisaation jälkeistä pesuaikaa suositellaan.
- Mitään eroa ei havaittu amplifikaatiotilassa, kun Leica HER2 FISH System - 30 Test suoritettiin 28 °C:n lämpötilassa ja 30 % suhteellisessa kosteudessa ja 16 °C:n lämpötilassa ja 80 % suhteellisessa kosteudessa verrattuna Leica HER2 FISH System - 30 Test protokollaan suoritettuna ympäristöolosuhteissa.

Testatun analyysin luotettavuuden suositeltujen parametrien ulkopuolella suoritettuja toimintoja ei ole validoitu. Minkä tahansa muun testausparametrin käyttö voi mitätöidä analyysin.

Yllä oleva teksti kuvaa testatut olosuhteet ja tutkimuksen tulokset. Huomaa, että Leica ei testannut kaikkia mahdollisia olosuhdeyhdistelmiä, eikä suosittele oletuksista poikkeavien alueiden käyttöä. Oletus Leica HER2 FISH -värjäysprotokolla on esitetty taulukossa 2.

## Vianmääritys

| Ongelma  | Todennäköinen syy   | Korjaustoimenpide  |
|--|---|--|
| Ei ollenkaan tai huono fluoresenssignaali/värjäytyminen  | Väärä fiksaatio tai testinäytteen käsittely   | Varmista, että formaliinipohjaista fiksaatiivia käytetään ja että käsittelyaikataulut ovat sopivia testattavalle näytteelle.   |
|  | Leica HER2 FISH System - 30 Test käytetään viimeisen käyttöpäivämäärän jälkeen  | Varmista, että käytetty Leica HER2 FISH System - 30 Test on ennen viimeistä käyttöpäivämäärää ajan puitteissa.   |
|  | Väärä protokollavalinta   | Varmista asianmukainen oletus *FISH Protocol A Lisää preparaatti -dialogin värjäysprotokollakentässä.  |
|  | Väriä bulkireagensseja levitetty  | Varmista, että kaikki BOND -reagenssit on allokoitu asianmukaisiin bulkkiastioihin ja asetettu asianmukaisiin paikkoihin instrumentissa.                                       |
|  | Riittämätön preparaattien parafiinin poisto   | Varmista, että *Dewax -muoto on valittu Lisää preparaatti -dialogin Valmistelu-kentässä.   |
|  | Väärä esikäsitely   | Varmista, että oletusesikäsitelyprotokollat (HIER ja Entsymaattinen pilkkominen) on valittu. Säädä esikäsitelyprotokollaa (HIER tai entsyymaattinen pilkkominen) tarvittaessa. |
|  | Riittämätön denaturointi  | Varmista asianmukainen oletus denaturointi *D10 on valittu.  |
|  | Riittämätön hybridisaatio   | Varmista asianmukainen oletus hybridisaatio *H12 on valittu. Jatka hybridisaatioaikaa tarvittaessa.  |
|  | Liiallinen hybridisaation jälkeinen pesu  | Vähennä hybridisaation jälkeisen pesun inkubaatioaikaa.  |
|  | Keskeytä suoritus ennen sen valmistumista.  | Vahvista BOND Software käyttäen kaikki raportoitavissa olevat virheet värjäyksen suorituksen aikana ja suorita BOND Software esittämät toimenpiteet.                           |
| Väärä fluoresenssimikroskopialaite <ul style="list-style-type: none"> <li>• Väärä suodatinsarja</li> <li>• Väärä lamppu</li> <li>• Vanhentunut lamppu</li> <li>• Väärä öljytyyppi</li> </ul> | Varmista, että kaikki käytetyt fluoresenssimikroskopialaitteet ovat asianmukaisia suoritettavalla analyysille, vahvista: <ul style="list-style-type: none"> <li>• asianmukainen suodatinsarja</li> <li>• asianmukainen lamppu</li> <li>• hyvä lampun voimakkuus</li> <li>• asianmukainen öljy öljyputusmikroskopiassa.</li> </ul> |  |
| Liika altistuminen UV-valolle (valokuvavalkaisu)   | Säilytä preparaattit ennen arviointia ja sen jälkeen pimeässä fluoresenssignaalin säilyttämiseksi. Signaalin ylläpitämiseksi pitkän aikaa säilytä preparaattit -20 °C lämpötilassa.   |  |

| Ongelma  | Todennäköinen syy  | Korjaustoimenpide  |
|--|--|--|
| Ei-spesifinen taustan luoesenssisignaali/värjäys | Riittämätön hybridisaation jälkeinen pesu                                    | Lisää hybridisaation jälkeisen pesun inkubaation aikaa.  |
|  | Vääriä bulkireagensseja levitetty  | Varmista, että kaikki BOND -reagenssit on allokoitu asianmukaisiin bulkkiastioihin ja asetettu asianmukaisiin paikkoihin instrumentissa.   |
|  | Riittämätön preparaattien parafiinin poisto                                  | Varmista, että parafiinin poisto (Dewax) on valittu Lisää preparaatti -dialogin Valmistelu-kentässä.   |
|  | Ei-spesifinen ristireaktio kudoksetuotteen kanssa.                           | Varmista, että formaliinipohjaista fiksatiivia käytetään ja että käsittelyaikataulut ovat sopivia testattavalle näytteelle. Jos mahdollista, testaa uudelleen käyttäen toista lohkoa. Jos tämä ei ole mahdollista, arvioi yhdessä vastaavan H- ja E-värjätyksen yhteydessä ja valitse alueita, jotka näyttävät parhaat fiksaatiokuvot. |
| Kudosmorfologian huono säilytys                  | Preparaatteihin kiinnitetyt sektiot käyttäen vaihtoehtoisia kiinnitysaineita | Käytä BOND Plus Slides (S21.2113).   |
|  | Riittämätön kudosfiksaatio ja käsittely                                      | Varmista, että formaliinipohjaista fiksatiivia käytetään ja että käsittelyaikataulut ovat sopivia testattavalle näytteelle. Jos mahdollista, testaa uudelleen käyttäen toista lohkoa. Jos tämä ei ole mahdollista, arvioi yhdessä vastaavan H- ja E-värjätyksen yhteydessä ja valitse alueita, jotka näyttävät parhaat fiksaatiokuvot. |
| Kudos irronnut potilaasta/valvontapreparaatista  | Väärä esikäsittely   | Säädi esikäsittelyprotokollaa (HIER tai entsyymaattinen pilkkominen).  |
|  | Värien preparaattityyppien käyttö tai riittämätön sektion tyhjennys          | Varmista, että asianmukaisia preparaatteja käytetään potilas-/valvontasektioihin (esim. BOND Plus Slides S21.2113). Varmista, että preparaatit saavat riittävän tyhjennyksen ja että niitä inkuboidaan 1 tunti 60 °C lämpötilassa.   |

Taulukko 7. Leica HER2 FISH System - 30 Test vianmääritysopas

Jos jokin Leica HER2 FISH System - 30 Test in liittyvä ongelma on vianmääritysoppaan kattamien aiheiden ulkopuolella, ota yhteys paikallisen Leica Biosystems -yhtiön teknisten palvelujen osastoon tai jakelijaan apua varten.



## Viitteet

1. Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA. The neu oncogene encodes an epidermal growth factor related protein. *Nature* 1986;319:226–30.
2. Lonardo F, Di Marco E, King CR, Pierce JH, Segatto O, Aaronson SA, et al. The normal erbB-2 product is an atypical receptor-like tyrosine kinase with constitutive activity in the absence of ligand. *New Biologist* 1990; 2: 992–1003.
3. Wolff A.C., Hammond E.H., Schwartz J.N., et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 25, 1-28, 2007.
4. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235:177-182.
5. Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 1992;10:7:1049-1056.
6. Gullick WJ, Love SB, Wright C, et al. c-erbB-2 protein overexpression in breast cancer is a risk factor in patients with involved and uninvolved lymph nodes. *British Journal of Cancer* 1991;63:434-438.
7. Borg A, Tandon AK, Sigurdsson H, et al. HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. *Cancer Research* 1990;50:4332-4337.
8. Tandon AK, Clark GM, Chamness AU, et al. HER-2/neu oncogene protein and prognosis in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 1989; 7:1120-1128.
9. Van Cutsem E, Kang Y, Chung H, Shen L, Sawaki A, Lordick F et. al. Efficacy results from the ToGA trial: A phase III study of trastuzumab added to standard chemotherapy (CT) in first-line human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive advanced gastric cancer (GC). *Journal of Clinical Oncology* 2009; 27: LBA4509.
10. Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JBB, Henner D, Wong WLT, et al. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 1992; 89: 4285–9.
11. Hudziak RM, Lewis GD, Winget M, Fendly BM, Shepard HM, Ullrich A. p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Molecular & Cell Biology* 1989; 9: 1165–72.
12. Lewis GD, Figari I, Fendly B, Wong WL, Carter P, Gorman C, et al. Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185HER2 monoclonal antibodies. *Cancer Immunology and Immunotherapy* 1993; 37: 255–63.
13. Baselga J, Norton L, Albanell J, Kim Y-M, Mendelsohn J. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Research* 1998; 58: 2825–31.
14. Ellis I.O., Bartlett J., Dowsett M., Humphreys S., Jasani B., Miller K., Pinder S.E., Rhodes A. and Walker R. Best practise No. 176: Updated recommendations for Her-2 testing in the UK. *Journal of Clinical Pathology* 57; 233-237, 2004.
15. Walker R.A, Bartlett J., Dowsett M., Ellis, I., Hanby, A., Jasani, Miller, K., Pinder, S. HER2 Testing in the UK – further update to recommendations. *Journal of Clinical Pathology* 2007.054866
16. Press MF, Zhou JY, Ma Y, et al. Evaluation of HER-2/neu gene amplification by fluorescence in situ hybridization in invasive breast carcinoma. In: *FISH: Clinical Applications in Cancer and Genetics* February 8-11, 1994; Lake Tahoe, CA.
17. Pauletti G, Singh R, Press MF, et al. HER-2/neu gene amplification detected by fluorescence in situ hybridization: A comparative study with other techniques. Abstract 3247, *Proceedings of the American Association for Cancer Research* 1994 35:545.
18. Szöllösi J, Balázs M, Feuerstein BG, et al. Phenotype genotype relationship in erbB-2 amplification. *International Society for Analytical Cytology* 1994 Abstracts. 92. Abstract 536D.
19. Kallioniemi O, Kallioniemi A, Kurisu W, et al. ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1992;89:5321-5325.
20. The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Quality assurance for immunocytochemistry; Approved guideline. NCCLS document MM4-A (1-56238-396-5) NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 1999; 19087–1898: USA
21. Nadji, M. and Morales, A. R. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. *Laboratory Medicine* 1983; 14: 767.
22. Jackson P. 2007. Quality Assurance in Immunohistochemistry. In: *Immunohistochemistry, 2007* (ed. Renshaw S), PP 205–237. Scion Publishing Ltd.
23. 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.

## Lisenssisopimus

Tämä tuote sisältää Abbott Molecular Inc.:in toimittamia PathVysion FISH -ilmaisimia.

PathVysion, LSI ja CEP ovat Abbott Molecular Inc.:in tavaramerkkejä. Kaikki oikeudet pidätetään. Käytetään lisenssillä.

## Muutokset edelliseen julkaisuun

Mahalaukun data lisäsi.

## Julkaisupäivämäärä

20 heinäkuu 2015

## Symbolitunniste

|   |   |   |                                   |   |   |
|---|---|---|-----------------------------------|---|---|
|  | Eräkoodi  |  | Säilytys                          |  | Tuoteluettelonumero                     |
|  | <i>In vitro</i><br>diagnostinen<br>lääketieteellinen<br>laite |  | Valmistaja                        | <b>SN</b>   | Sarjanumero                             |
|  | Katso käyttöohje  |  | Sisältää riittävästi<br>testeihin |  | Käytettävä<br>viimeistään<br>VVVV-KK-PP |

Herceptin on Genentech Inc.:in ja F. Hoffmann-La Roche Ltd.:n tavaramerkki.