

# Leica HER2 FISH System - 30 Test

## Istruzioni per l'uso

Da usare sul sistema Leica Biosystems' BOND-MAX and BOND-III.

TA9217 è un prodotto per l'ibridazione fluorescente *in situ* concepito per colorare 30 test (30 vetrini colorati con 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

# Indice

<b>Utilizzo previsto</b> .....	<b>3</b>
Per uso diagnostico <i>in vitro</i> .....	3
Training necessario .....	3
<b>Riassunto e spiegazione</b> .....	<b>3</b>
Contesto .....	3
Riassunto Concordanza Clinica BOND-MAX System.....	4
Riassunto Concordanza Clinica BOND-III System.....	4
Principio di procedura.....	5
Componenti forniti .....	5
Indicazioni sull'utilizzo .....	5
Conservazione e stabilità .....	5
Preparazione dei campioni.....	5
Avvertenze e precauzioni .....	6
<b>Procedura</b> .....	<b>6</b>
A. Reagenti necessari ma non forniti .....	6
B. Attrezzature necessarie ma non fornite .....	6
C. Metodologia .....	7
D. Pretrattamento enzimatico BOND .....	7
E. Protocollo di colorazione predefinito.....	7
F. Fasi di procedura .....	7
G. Conservazione dei vetrini .....	8
<b>Valutazione ed enumerazione dei segnali</b> .....	<b>9</b>
Metodo consigliato per la determinazione del rapporto LSI HER2 / CEP17 .....	10
<b>Leica HER2 FISH System - 30 Test Guida interpretativa</b> .....	<b>11</b>
<b>Leica HER2 FISH System - 30 Test Foglio segnalpunti</b> .....	<b>12</b>
<b>Controllo qualità</b> .....	<b>13</b>
<b>Uso dei vetrini di controllo</b> .....	<b>13</b>
<b>Limitazioni</b> .....	<b>14</b>
A. Limitazioni generali .....	14
B. Limitazioni specifiche del prodotto .....	14
<b>Concordanza clinica di Leica HER2 FISH System - 30 Test rispetto a Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Mammario</b> .....	<b>15</b>
Risultati concordanza 2x2 BOND-MAX System - Mammario.....	15
Risultati concordanza 2x2 BOND- III System - Mammario .....	16
<b>Concordanza clinica di Leica HER2 FISH System - 30 Test rispetto a Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Gastrico</b> .....	<b>17</b>
Risultati concordanza 2x2 BOND MAX System - Gastrico .....	17
<b>Test di precisione – BOND-MAX System</b> .....	<b>18</b>
A. Studio di precisione intra-seduta.....	18
B. Studio di precisione intra-strumento .....	18
C. Studio di precisione inter-seduta .....	18
D. Studio di precisione inter-laboratorio .....	18
E. Studio di precisione inter-osservatore.....	18
F. Studio di precisione lotto per lotto .....	19
<b>Test di precisione – BOND-III System</b> .....	<b>19</b>
G. Studio di precisione intra-seduta .....	19
H. Studio di precisione intra-strumento .....	19
I. Studio di precisione inter-seduta .....	19
J. Studio di precisione inter-laboratorio .....	20
K. Studio di precisione inter-osservatore.....	20
L. Studio di precisione lotto per lotto .....	20
<b>Robustezza dell'analisi</b> .....	<b>20</b>
<b>Risoluzione dei problemi</b> .....	<b>22</b>
<b>Bibliografia</b> .....	<b>24</b>
<b>Contratto di licenza</b> .....	<b>25</b>
<b>Emendamenti alla precedente uscita</b> .....	<b>25</b>
<b>Data di pubblicazione</b> .....	<b>25</b>
<b>Identificazione dei simboli</b> .....	<b>25</b>

## Utilizzo previsto

### Per uso diagnostico *in vitro*

Il Leica HER2 FISH System - 30 Test è stato concepito per rilevare l'amplificazione del gene HER2/neu mediante un'ibridazione fluorescente *in situ* (FISH) su campioni di tessuto umano cancro al seno invasivo e adenocarcinomi dello stomaco (incluso il giunto gastroesofageo) fissati in formalina e conservati in paraffina. Il Leica HER2 FISH System - 30 Test è indicato come ausilio nella valutazione dei pazienti per i quali viene considerato un trattamento a base di Herceptin® (trastuzumab) (si vedano le istruzioni della confezione di Herceptin). L'utilizzo previsto del Leica HER2 FISH System - 30 Test non prevede l'esame o la diagnosi del tumore al seno. Occorre tenere conto anche di tutte le altre informazioni cliniche, come la dimensione del tumore, il numero di linfonodi coinvolti e lo stato del recettore steroideo. Nessuna decisione relativa al trattamento dei pazienti affetti da tumore al seno deve basarsi unicamente sullo stato di amplificazione del gene HER2.

Nota: tutti i pazienti dei test clinici a base di Herceptin® sono stati selezionati mediante un CTA (Clinical Trial Assay) immunocitochimico investigativo. Nessuno dei pazienti in quei test è stato selezionato utilizzando il Leica HER2 FISH System - 30 Test. Il Leica HER2 FISH System - 30 Test è stato messo a confronto con il Abbott Molecular PathVysion® HER-2 DNA Probe Kit su un insieme di campioni indipendenti e ha mostrato di ottenere risultati concordanti accettabili, come indicato nel riassunto della Concordanza Clinica. L'effettiva correlazione tra i risultati del Leica HER2 FISH System - 30 Test e il risultato clinico non è ancora stata stabilita.

Tutti i pazienti dei test clinici del carcinoma gastrico avanzato (ToGA) a base di Herceptin® sono stati selezionati mediante il Dako HercepTest. Nessuno dei pazienti in quei test è stato selezionato utilizzando il Leica HER2 -FISH System - 30 Test. Il Leica HER2 FISH System - 30 Test è stato messo a confronto con l'Abbott Molecular PathVysion®\* HER-2 DNA Probe Kit su un insieme di campioni indipendenti e ha mostrato di ottenere risultati concordanti accettabili, come indicato nel riassunto della Concordanza Clinica. L'effettiva correlazione tra i risultati del Leica HER2 FISH System - 30 Test e il risultato clinico non è ancora stata stabilita.

\* Herceptin® è un marchio registrato di Genentech, Inc. e F. Hoffmann-La Roche Ltd. PathVysion® è un marchio registrato di Abbott Molecular Inc. Tutti i diritti riservati. Utilizzato sotto licenza.

### Training necessario

Leica Biosystems fornirà a tutti gli utilizzatori un training per la preparazione dei campioni, la procedura di analisi e l'interpretazione del test FISH del gene HER2.

## Riassunto e spiegazione

### Contesto

Il gene HER2, noto anche come neu o c-erbB2, è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 17, nella posizione 17q11-12 (1). Si è osservato che sia il gene HER2 che la sua proteina codificata 185 kD giocano un ruolo decisivo nella trasformazione maligna e nella progressione tumorale del tumore al seno (2).

L'HER2 funziona come un marcatore prognostico, essendo l'amplificazione del gene e la sovraespressione della proteina correlate ad una più frequente ricorrenza della malattia e ad un più alto tasso di mortalità. L'HER2 funziona anche come marcatore predittivo per chemioterapie sistemiche e trattamenti mirati selezionati (3). In modo particolare, si è osservato che l'amplificazione del gene HER2 rappresenta un indicatore di prognosi infausta nei tumori al seno nodo-positivi (4-8). Inoltre, uno studio ha indicato che il valore prognostico di HER2 è più affidabile tra i pazienti trattati con chemioterapia (7). Per poter prevedere l'assenza della malattia e la generale sopravvivenza dei singoli pazienti occorre tenere conto di altri fattori prognostici come la dimensione del tumore, il numero di linfonodi positivi e lo stato del recettore steroideo.

La sovraespressione dell'oncoproteina HER2 riscontrata nelle cellule tumorali del seno suggerisce che l'HER2 possa costituire lo scopo di una terapia a base di anticorpi (3) - mentre i risultati del test ToGA indicano chiaramente che l'uso di Herceptin® nel tumore gastrico in combinazione con la chemioterapia rappresenta un trattamento efficace che migliora in generale la sopravvivenza nel caso di tumori gastrici positivi all'HER2 (9). L'Herceptin (trastuzumab), un anticorpo monoclonale umanizzato (10) che si lega con grande affinità all'oncoproteina HER2, ha mostrato la capacità di inibire la proliferazione delle cellule tumorali umane che sovraesprimono l'oncoproteina HER2 sia *in vitro* che *in vivo* (11-13). Da quando è stata sviluppata l'Herceptin, la rilevazione sia del gene che della proteina HER2 è diventata uno strumento essenziale nella valutazione dei tumori al seno, uno strumento che influenza sia la selezione della terapia che la successiva gestione del paziente (14,15).

La FISH è stata utilizzata per mostrare l'amplificazione del gene HER2 (16-19) nelle cellule derivate da linee cellulari di carcinoma mammario umano sia in interfase che in anafase. Per quantificare l'amplificazione del gene HER2, FISH valuta il livello di amplificazione del gene HER2 direttamente nelle cellule tumorali. La peculiare morfologia del tessuto e la distribuzione spaziale delle copie dell'oncogene nei singoli carcinomi mammari primari vengono conservate. Nei tumori al seno si riscontrano comunemente anche delle aberrazioni nel numero di copie del cromosoma 17 (aneusomia). Tali aberrazioni si possono presentare sotto forma di delezioni o aumenti dei componenti cromosomici (polisomie). Questa variazione cromosomica ha un impatto cruciale sull'interpretazione e il rapporto clinico dello stato di amplificazione del gene HER2. Pertanto la misurazione del numero di copie del cromosoma 17 in relazione all'HER2 assume un'importanza fondamentale (4).

Il Leica HER2 FISH System - 30 Test contiene la sonda di DNA LSI HER2, una sonda fluorescente lunga 226 Kb direttamente marcata con SpectrumOrange™ e specifica per il locus del gene HER2 (17q11.2-q12) e la sonda di DNA CEP17, una sonda fluorescente lunga 5,4 Kb direttamente marcata con SpectrumGreen™ e specifica per la sequenza di DNA alfa satellite nella regione del centromero del cromosoma 17 (17p11.1-q11.1). La soluzione della sonda è stata appositamente formulata e approvata per il BOND-MAX and BOND-III System, pertanto non deve essere modificata o utilizzata con altre apparecchiature manuali.

### **Riassunto Concordanza Clinica BOND-MAX System**

Il Leica HER2 FISH System - 30 Test è stato sviluppato per fornire un'alternativa completamente automatizzata alle attuali metodologie utilizzate per determinare lo stato di amplificazione del gene HER2. Il rendimento del Leica HER2 FISH System - 30 Test sul BOND-MAX System è stato valutato in uno studio indipendente che metteva a confronto i risultati del Leica HER2 FISH System - 30 Test all'Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit su 300 campioni di tumore al seno e su 109 adenocarcinomi dello stomaco (incluso il giunto gastroesofageo). Nessuno di questi campioni di tumori è stato ottenuto da pazienti partecipanti agli studi clinici con Herceptin. I risultati del tessuto mammario hanno indicato una concordanza del 99,33% in un'analisi 2x2 (intervalli di confidenza tra il 97,61 e il 99,92%). I risultati degli adenocarcinomi dello stomaco (incluso il giunto gastroesofageo) hanno indicato una concordanza del 98,17% in un'analisi 2x2 (intervalli di confidenza del 95% tra il 93,53 e il 99,78%). I dati di concordanza indicano anche che un risultato positivo del Leica HER2 FISH System - 30 Test ha un'ottima possibilità di corrispondere ad un risultato positivo dell'Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit assay. Il Leica HER2 FISH System - 30 Test viene interpretato come negativo per l'amplificazione del gene HER2 quando il rapporto HER2:CEP17 è inferiore a 2,0, e positivo quando il rapporto HER2:CEP17 è superiore o pari a 2,0. I risultati incerti (limite), dove il rapporto HER2:CEP17 è compreso o è pari a 1,8-2,2, devono essere interpretati con cautela. Include altri 20 nuclei e ricalcolate il rapporto.

### **Riassunto Concordanza Clinica BOND-III System**

Il Leica HER2 FISH System - 30 Test è stato sviluppato per fornire un'alternativa completamente automatizzata alle attuali metodologie utilizzate per determinare lo stato di amplificazione del gene HER2. Il rendimento del Leica HER2 FISH System - 30 Test sul BOND-III System è stato valutato in uno studio indipendente che metteva a confronto i risultati del Leica HER2 FISH

System - 30 Test con quelli dell'Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit Assay su 300 campioni di tumore al seno. Nessuno di questi campioni di tumori è stato ottenuto da pazienti partecipanti agli studi clinici con Herceptin. I risultati indicavano una concordanza del 99,67% in un'analisi 2x2 (intervalli di confidenza del 95% tra il 98,16 e il 99,99%). I dati di concordanza indicano anche che un risultato positivo del Leica HER2 FISH System - 30 Test ha un'ottima possibilità di corrispondere ad un risultato positivo dell'Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit assay. Il Leica HER2 FISH System - 30 Test viene interpretato come negativo per l'amplificazione del gene HER2 quando il rapporto HER2:CEP17 è inferiore a 2,0, e positivo quando il rapporto HER2:CEP17 è superiore o pari a 2,0. I risultati incerti (limite), dove il rapporto HER2:CEP17 è compreso o è pari a 1,8-2,2, devono essere interpretati con cautela. Includete altri 20 nuclei e ricalcolate il rapporto.

## Principio di procedura

Il Leica HER2 FISH System - 30 Test contiene i componenti necessari per completare una procedura di colorazione mediante ibridazione fluorescente *in situ* per tessuti fissati in formalina e conservati in paraffina. In seguito ad un adeguato pretrattamento, un'incubazione con LSI HER2/CEP17 Dual Probe pronta all'uso e un lavaggio di stringenza, le sezioni tissutali vengono disidratate e montate con DAPI. I risultati vengono interpretati mediante microscopio a fluorescenza usando i filtri raccomandati a lunghezze d'onda adeguate.

Il Leica HER2 FISH System - 30 Test è da utilizzare solo sul BOND-MAX and BOND-III System.

## Componenti forniti

I materiali sotto elencati (Tabella 1) sono sufficienti per colorare 30 test (30 vetrini colorati con LSI HER2/CEP17 Dual Probe).

<b>LSI HER2/CEP17 Probe</b> <b>6,6 ml</b>	Contiene LSI HER2/CEP17 Dual Probe pronta all'uso. Contiene <60% (v/v) formammide.
<b>Post Hybridization Wash 2</b> <b>9 ml</b>	Contiene soluzione di lavaggio post-ibridazione pronta all'uso. Contiene <50% (v/v) formammide.
<b>BOND Enzyme Concentrate 2</b> <b>1 ml</b>	Contiene soluzione Proteinase K a 1,7 mg/mL.
<b>BOND Enzyme Diluent</b> <b>65 ml</b>	Contiene diluente per enzima.
<b>BOND Open Container</b> <b>3 x 7 ml</b>	BOND Open Container utilizzato per Enzyme 5.

Tabella 1: Componenti Leica HER2 FISH System - 30 Test

Fare riferimento alla singola MSDS per ulteriori informazioni sulla sicurezza del prodotto, disponibili sul sito [www.LeicaBiosystems.com/TA9217](http://www.LeicaBiosystems.com/TA9217) - IFU

## Indicazioni sull'utilizzo

Tutti i reagenti forniti sono formulati per essere usati nello specifico con questa analisi e i numeri di lotto sono specifici per ciascun Leica HER2 FISH System - 30 Test. Per garantire la validità di questa analisi, non deve essere eseguita alcuna sostituzione.

## Conservazione e stabilità

Conservare a temperature tra 2 e 8 °C. Non congelare. Riportare a 2–8 °C subito dopo l'uso. Qualsiasi discostamento da queste condizioni invaliderà l'analisi. Accertarsi che il Leica HER2 FISH System - 30 Test utilizzato non sia già scaduto. I segnali indicanti contaminazione e/o instabilità del Leica HER2 FISH System - 30 Test sono torbidità delle soluzioni (tranne che per la soluzione della sonda) e sviluppo di odori. Le condizioni di conservazione diverse da quelle specificate devono essere verificate dall'utilizzatore.

## Preparazione dei campioni

I metodi standard per l'elaborazione dei tessuti devono essere applicati a tutti i campioni (20). Si raccomanda di preparare i tessuti in fissativi a base di formalina, di trattarli normalmente e includerli in paraffina. Ad esempio, i campioni dovrebbero essere raccolti ad uno spessore di 3–4 mm e fissati per 18–24 ore in formalina tamponata neutra al 10%. I tessuti devono quindi essere disidratati in una serie di alcoli e puliti mediante xilene, seguito da impregnazione con cera paraffinica fusa, conservata a non più di 60 °C. I campioni di tessuto vanno sezionati tra 4–6 µm. Le sezioni tissutali montate sui vetrini (BOND Plus Slides - codice prodotto S21.2113 o Apex BOND Slides codice prodotto 3800040) possono essere conservate per 12 mesi a 2–8 °C prima della colorazione. In seguito al sezionamento, si raccomanda di incubare i vetrini per 1 ora a 60 °C. Le sezioni colorate devono essere conservate a -20 °C per preservare il segnale di fluorescenza ed evitare lo scolorimento. Portare i vetrini conservati a temperatura ambiente prima della lettura.

## Avvertenze e precauzioni

*Solo per utilizzatori professionisti.*

Uno o più componenti nel prodotto sono pericolosi e possono provocare danni alle donne in gravidanza.

Di norma, ai minorenni non è consentito lavorare con questo prodotto. Gli utilizzatori devono essere adeguatamente istruiti sulla corretta procedura di lavorazione, sulle proprietà pericolose del prodotto e sulle necessarie disposizioni di sicurezza.

I campioni, pre e post fissazione, e tutti i materiali ad essi esposti, vanno maneggiati come oggetti potenzialmente in grado di trasmettere infezioni e smaltiti con precauzione.

Non pipettare mai i reagenti con la bocca ed evitare il contatto dei reagenti e dei campioni con la pelle e le mucose. Qualora i reagenti o i campioni entrassero in contatto con aree sensibili, lavare queste ultime con abbondante acqua. Rivolgersi ad un medico. Consultare la normativa federale, statale o locale in materia di smaltimento di componenti potenzialmente tossici.

Ridurre la contaminazione microbica dei reagenti, altrimenti si potrebbe verificare un aumento della colorazione aspecifica.

## Procedura

### A. Reagenti necessari ma non forniti

- BOND Dewax Solution (AR9222)
- BOND Epitope Retrieval Solution 1 (AR9961)
- BOND Wash Solution x10 Concentrate (AR9590)
- Solventi standard utilizzati in analisi con ibridazione fluorescente *in situ* (es. etanolo, assoluto e graduato)
- Acqua distillata o deionizzata
- Colorante di contrasto DAPI
- Leica HER2 FISH Control Slides (TA9123)
- BOND Aspirating Probe Cleaning System (CS9100)

### B. Attrezzature necessarie ma non fornite

- Provette (in grado di misurare volumi di 1-20 µl e 100 – 1000 µl)
- Vetrini (BOND Plus Slides - codice prodotto S21.2113 o Apex BOND Slides codice prodotto 3800040)
- BOND-MAX (21.0051) or BOND-III (21.220.1)
- BOND Universal Covertiles™ (S21.2001, S21.4583 o S21.4611)
- BOND Mixing Stations (S21.1971)
- BOND Slide Label & Print Ribbon (S21.4564)
- Vetrini coprioggetti
- Forno essiccante (in grado di mantenere una temperatura pari a 60 °C)
- Microscopio a fluorescenza (obiettivo 60–100x) con fonte luminosa adeguata. Registrare il numero di ore di utilizzo del bulbo e sostituirlo prima che superi il tempo limite. Accertarsi che la lampada sia correttamente allineata.

- Adeguato set di filtri per fluorescenza (SpectrumOrange™ – picco di eccitazione a 559 nm, picco di emissione a 588 nm, SpectrumGreen™ – picco di eccitazione a 497 nm, picco di emissione a 524 nm e DAPI – picco di eccitazione a 367 nm, picco di emissione a 452 nm). I set di filtri multi-bandpass per microscopio a fluorescenza ottimizzati per l'uso con il Leica HER2 FISH System - 30 Test sono disponibili per la maggior parte dei modelli di microscopio. I set di filtri consigliati per il Leica HER2 FISH System - 30 Test sono DAPI/9-Orange dual bandpass, DAPI/Green dual bandpass, Green/Orange(V.2) dual bandpass e DAPI/Green/Orange (V.2) triple bandpass.

### C. Metodologia

- Prima di applicare questa metodologia, gli utilizzatori devono imparare adeguatamente la tecnica delle fluorescenza automatizzata *in situ*.
- Ciascuna sezione test colorata con LSI HER2/CEP17 Dual Probe rende possibile la stessa analisi cellulare dei segnali sia di HER2 che del centromero del cromosoma 17. Un rapporto successivo tra i segnali di HER2 e quelli del cromosoma 17 consentirà di assegnare un valore quantitativo al campione, indicando un risultato negativo (non-amplificato) o positivo (amplificato). I risultati incerti (limite) (1,8-2,2) devono essere interpretati con cautela. Include altri 20 nuclei e ricalcolate il rapporto.

### D. Pretrattamento enzimatico BOND

Prima della colorazione, diluire il BOND Enzyme Concentrate 2 fornito a 1:300 utilizzando il BOND Enzyme Diluent in uno dei BOND Open Containers forniti. Ad esempio, per colorare 10 vetrini, preparare 3 mL di soluzione enzimatica pronto uso diluendo 10 µl di BOND Enzyme Concentrate 2 in 2990 µl di BOND Enzyme Diluent. Si raccomanda di preparare l'enzima prima di ogni seduta di colorazione e di utilizzare un volume minimo di 900 µl per ogni seduta.

### E. Protocollo di colorazione predefinito

Si raccomanda di usare il Leica HER2 FISH System - 30 Test con il protocollo di colorazione predefinito indicato nella Tabella 2 qui sotto.

Tipo Protocollo	Nome Protocollo
Colorazione	*FISH Protocol A
Preparazione	*Dewax
HIER	*HIER 25 min with ER1 (97)
Enzima	*Enzyme 5 for 25 min
Denaturazione	*D10
Ibridazione	*ISH Hybridization (12Hr)

Tabella 2: Leica HER2 FISH System - 30 Test Staining Protocol predefinito

### F. Fasi di procedura

Queste istruzioni vanno lette insieme al manuale d'uso del BOND-MAX and BOND-III System. Un nuovo BOND Universal Covertile deve essere usato per ciascun vetrino. L'utilizzo di BOND Universal Covertiles, precedentemente usati per la colorazione per ibridazione *in situ* o immunocitochimica, non è stato validato dal presente test.

1. Sul BOND-MAX and BOND-III System, accertatevi che i contenitori per rifiuti sfusi e pericolosi abbiano la capacità sufficiente per le sedute di colorazione necessarie.
2. Accertatevi che vi sia sufficiente alcol, acqua distillata o deionizzata, BOND Dewax Solution, BOND Epitope Retrieval Solution 1 e BOND Wash Solution nei contenitori di reagenti sfusi per eseguire le sedute di colorazione necessarie.
3. Verificate che sia stata installata una BOND Mixing Station pulita.
4. Accendete il BOND-MAX and BOND-III System.
5. Accendete il PC collegato al BOND-MAX and BOND-III System.
6. Aprite il software BOND.

7. Per un nuovo kit Leica HER2 FISH System - 30 Test, scansionate il codice a barre del vassoio dei reagenti con lo scanner manuale per inserire il sistema nell'inventario dei reagenti BOND (solo codice a barre singolo).
8. Preparate il BOND Enzyme 5 nel BOND Open Container fornito, diluito a 1:300. Ad esempio per 10 vetrini aggiungete 10 µl di BOND Enzyme Concentrate 2 a 2990 µl di BOND Enzyme Diluent.
9. Scansionate il BOND Open Container fornito e registrate come **Bond Enzyme 5**.
10. Andate alla schermata di impostazione Vetrino e fate clic su **Aggiungi caso**.
11. Inserite i dettagli riguardanti il primo caso. Verificate che il volume dispensato sia pari a **150 µl** e che il protocollo di preparazione sia **\*Dewax**. Fate clic su **OK**.
12. Con il caso evidenziato nella schermata di impostazione Vetrino, fate clic su **Agg. Vetr.**
13. Per prima cosa, aggiungete i vetrini test del paziente. Verificate che il tipo di tessuto sia impostato come **Tessuto per il test**.
14. Selezionate la modalità colorazione **Singola**.
15. Selezionate processo **ISH**.
16. Selezionate **\*LSI HER2/CEP17 Dual Probe – 30 Test** dall'elenco sonde. Il tab dei Protocolli si sposta automaticamente sul protocollo di colorazione corretto (**\*FISH Protocol A**), protocollo HIER (**\*HIER 25 min with ER1 (97)**), protocollo EIER (**\*Enzyme 5 for 25 min**), denaturazione (**\*D10**) e ibridazione (**\*ISH Hybridization (12Hr)**).
17. Ripetete le fasi da 10 a 16 finché non vengono creati i vetrini e i controlli test dei pazienti (vetrini di controllo e/o controlli interni Leica HER2 FISH). Stampate le etichette del vetrino.
18. Etichettate i vetrini in maniera corretta.
19. Aprite i coperchi di tutti i contenitori Leica HER2 FISH System - 30 Test e caricate il vassoio dei reagenti nel BOND-MAX and BOND-III System.
20. Applicare i nuovi Covertilette a ciascun vetrino.
21. Caricate il vassoio dei vetrini nel BOND-MAX and BOND-III System e premete il pulsante **Carica/Scarica**.
22. Confermate che i vetrini sono stati scansionati e cliccate su **Run (Play)** nella schermata stato sistema per avviare immediatamente la seduta (per il Leica HER2 FISH System si raccomanda di eseguire questa analisi durante la notte utilizzando la funzione di avvio programmato automatico).
23. Verificate che nel campo indicatore vassoio compaia **Proc (OK)** e che vengano visualizzati il numero di lotto e l'ora di fine.
24. Quando la seduta è completa premete il pulsante **Carica/Scarica** e rimuovete i vassoi dei vetrini dal BOND-MAX and BOND-III System.
25. Rimuovete i Covertilette e risciacquate i vetrini con acqua deionizzata.
26. Disidratate rapidamente in due passaggi di alcol, asciugate.
27. Dispensate 20µl di DAPI direttamente sul campione.
28. Applicare il vetrino coprioggetti e fate in modo che la soluzione si spanda completamente, facendo attenzione a rimuovere eventuali bolle d'aria.
29. Sigillate il bordo del vetrino coprioggetti con del mastice, o con un prodotto analogo.
30. Collocate i vetrini al buio per facilitare lo sviluppo del segnale prima di esaminarli con un microscopio a fluorescenza.
31. Per preservare l'intensità del segnale, conservate i vetrini colorati ad una temperatura di -20 °C.

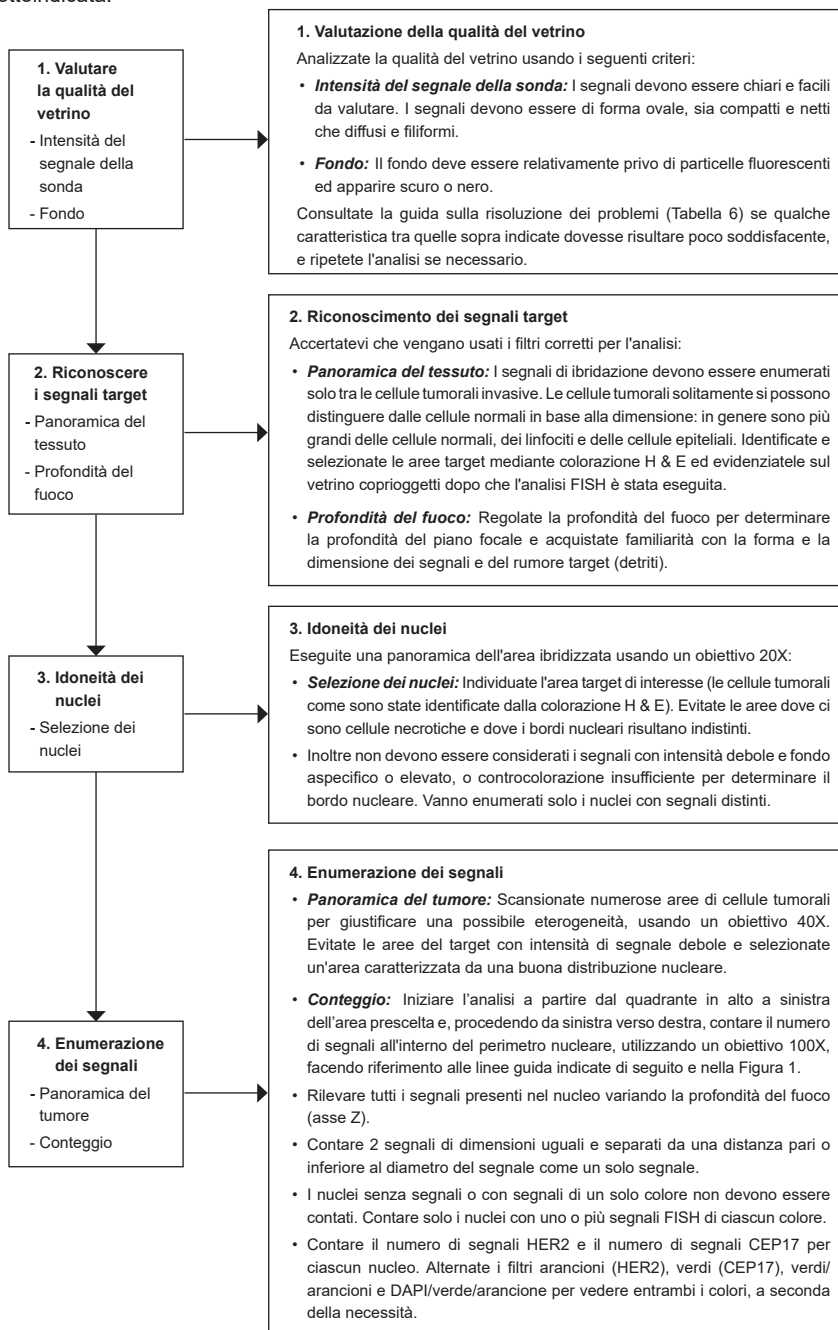
## G. Conservazione dei vetrini

Conservare i vetrini al buio e ad una temperatura di -20 °C. Portare i vetrini da -20 °C a temperatura ambiente prima di esaminarli.



# Valutazione ed enumerazione dei segnali

Per valutare la qualità del segnale ed enumerare i segnali HER2 e CEP17, seguite la procedura sottoindicata:



## Metodo consigliato per la determinazione del rapporto LSI HER2 / CEP17

Per determinare il rapporto LSI HER2 / CEP17, usate il seguente metodo:

1. Registrate e determinate il numero dei segnali LSI HER2 e CEP17 in 20 nuclei (vedi Figura 2 qui sotto Leica HER2 FISH System - 30 Test foglio segnapunti).
2. Sommate tutti i segnali LSI HER2. Questa cifra rappresenta i segnali LSI HER2 totali per il conteggio, es. 143.
3. Sommate tutti i segnali CEP17. Questa cifra rappresenta i segnali CEP17 totali per il conteggio, es. 48.
4. Per ottenere il risultato finale, calcolate come segue:

Dividere il numero totale di segnali LSI HER2 per il numero totale di segnali CEP17, es.  $143/48$  equivale ad un rapporto 2,98, che è positivo per l'amplificazione di HER2.

**Nota importante: Se il rapporto LSI HER2 / CEP17 è ambiguo (1,80 - 2,20), contare altri 20 nuclei e ricalcolare il rapporto.**

I risultati vanno registrati nel modo seguente:

1. Se il rapporto è  $<2$ , l'amplificazione del gene HER2 non è osservata
2. Se il rapporto è  $\geq 2$ , l'amplificazione del gene HER2 è osservata

**Nota importante: Un rapporto con un valore di cut-off (1,80 - 2,20) deve essere interpretato con cautela, come descritto sopra.**

# Leica HER2 FISH System - 30 Test Guida interpretativa

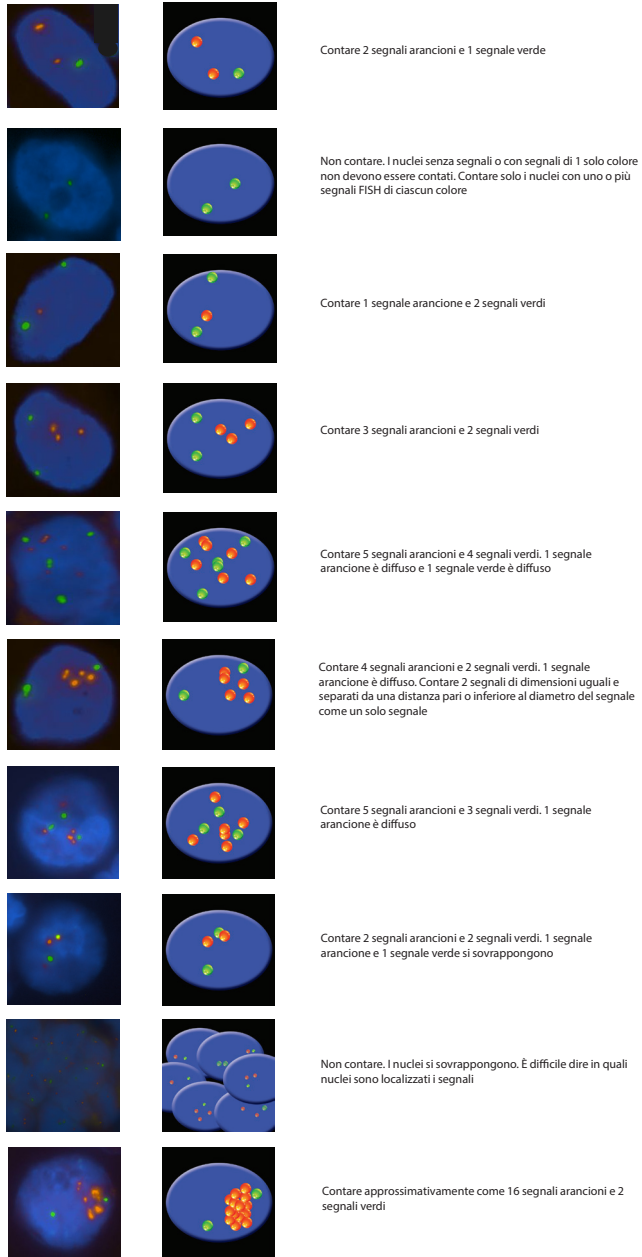


Figura 1: Guida Interpretativa

# Leica HER2 FISH System - 30 Test Foglio segnapunti

Conteggio segnali 20 nuclei					
Nucleo #	Numero copia HER2	Numero copia CEP17	Nucleo #	Numero copia HER2	Numero copia CEP17
1			11		
2			12		
3			13		
4			14		
5			15		
6			16		
7			17		
8			18		
9			19		
10			20		
Totale 1-10			Totale 11-20		

	HER2	CEP17	Rapporto di amplificazione HER2:CEP17
Punteggio totale 1-20			
Media per cellula			

Figura 2: Foglio punti campione

## Metodo Ariol automatizzato per la determinazione HER2 FISH

L'uso dell'applicazione di classificazione digitale Ariol PathVysion® come ausilio nell'interpretazione è stata convalidata indipendentemente su una moltitudine di campioni utilizzabili con il Leica HER2 FISH System. L'applicazione di classificazione digitale Ariol PathVysion, se utilizzata congiuntamente al Leica HER2 FISH System serve per le diagnosi in-vitro. Quando utilizzata con il Leica HER2 FISH System, l'applicazione Ariol PathVysion deve essere calibrata per l'uso con vetrini di controllo dei tessuti, non con Leica HER2 FISH Control Slides (TA9123).

**Tutte le decisioni diagnostiche vengono prese da uno specialista clinico qualificato.**

Per ulteriori informazioni, vedere il manuale dell'operatore Ariol.

### Controllo qualità

#### Uso dei vetrini di controllo

Si raccomanda di includere un Leica HER2 FISH Control Slide in ciascuna seduta test per monitorare la performance del campione e valutare l'accuratezza dell'enumerazione del segnale. I vetrini di controllo dovrebbero essere inseriti per ciascun lotto di colorazione nel BOND-MAX and BOND-III System e con ogni nuovo lotto di reagenti. I singoli utilizzatori possono scegliere di usare il proprio materiale di controllo.

Valutare la qualità del vetrino di controllo ed eseguire l'enumerazione dei segnali in base alle istruzioni nella sezione **Valutazione ed enumerazione dei segnali**. I criteri per la qualità del vetrino devono essere soddisfatti e i risultati del rapporto HER2:CEP17 compresi nei range stabiliti per una performance accettabile del test. Vedi Tabella 3 per i criteri di accettazione dei Leica HER2 FISH Control Slides.

Linea cellulare	Profilo Bond Oracle HER2 IHC System	Carico recettore per cellula* HER2	Criteri di accettazione Leica HER2 FISH System - 30 Test HER2:CEP17
SKBr-3	3+	$4,3 \times 10^5$	Amplificazione HER2 osservata
MDA-MB-453	2+	$1,4 \times 10^5$	Il rapporto del gene HER2/CEP17 dovrebbe essere compreso tra 1,5 – 2,5
MDA-MB-175	1+	$6,3 \times 10^4$	Amplificazione HER2 non osservata
MDA-MB-231	0	$9,3 \times 10^3$	Amplificazione HER2 non osservata

\*Analisi del carico del recettore HER2 come valutata dalla citometria a flusso.

Tabella 3: Leica HER2 FISH Control Slide Interpretazione.

Se i controlli del saggio non vanno a buon fine, i risultati FISH per questo caso non devono essere registrati. Se i vetrini di controllo non soddisfano i criteri di accettazione, il Leica HER2 FISH System - 30 Test potrebbe non aver funzionato correttamente. In questo caso sarà necessario ripetere il test con vetrini di controllo e vetrini di campione(i) dei pazienti. Se i risultati non rientrano nel range specificato ma i vetrini di controllo soddisfano i criteri di accettazione per la qualità, può essere opportuno ripetere lo screening dello stesso vetrino in quanto l'enumerazione potrebbe essere stata eseguita in maniera non corretta. Consultare la guida della risoluzione dei problemi (Tabella 6) in caso di ibridazione fallita sia con i vetrini(o) del campione che con i vetrini(o) di controllo.

Per i campioni clinici, quando l'interpretazione del segnale di ibridazione è difficoltosa e il campione per la ri-analisi insufficiente, il test non è indicativo. Se le cellule per l'analisi sono insufficienti, il test non è indicativo.

I campioni dei pazienti dovrebbero essere controllati seguendo le procedure operative standard di laboratorio. I risultati della qualità e dell'enumerazione dei segnali devono essere documentati su un modulo appropriato.

## Limitazioni

### A. Limitazioni generali

FISH è una tecnica che richiede una formazione specializzata in tutti gli aspetti procedurali (inclusa la selezione di reagenti appropriati, tessuti, fissazione, trattamento e preparazione del vetrino) e nell'interpretazione. La colorazione del tessuto dipende dal modo in cui i tessuti sono stati maneggiati, fissati e lavorati prima della colorazione. Una fissazione errata, un congelamento, decongelamento, lavaggio, essiccazione, riscaldamento, sezionamento o contaminazione con altri tessuti o fluidi può produrre artefatti morfologici, degradazione degli acidi nucleici, fluorescenza del fondo o risultati falsi negativi. I risultati incoerenti possono essere imputabili a variazioni nella fissazione, ai metodi di inclusione o a irregolarità inerenti al tessuto (21). Una controcolorazione eccessiva o incompleta può inoltre compromettere la corretta interpretazione dei risultati.

Una colorazione aspecifica dovuta ad una sonda non combinata ha un aspetto non compatto e granulare, e può essere visualizzata sul sito di ibridazione previsto o lontano da esso. Utilizzate cellule intatte per l'interpretazione dei risultati della colorazione. Le cellule necrotiche o degenerate possono presentare una colorazione aspecifica (22). Una colorazione FISH inattesa o variazioni nella colorazione possono essere il risultato di alterazioni nei livelli di espressione dei geni codificanti. Qualsiasi cambiamento nei modelli di colorazione previsti deve essere interpretato in associazione alle altre indagini diagnostiche. L'interpretazione della colorazione deve essere completata da studi morfologici e dall'uso di materiali di controllo appropriati e valutata nel contesto della storia clinica del paziente e qualsiasi altro test diagnostico da parte di un patologo qualificato.

L'esecuzione dell'analisi (ossia la valutazione dell'adeguatezza dei materiali di controllo) e l'interpretazione di un'eventuale colorazione o la sua assenza devono essere condotte in laboratori accreditati/autorizzati sotto la supervisione di un patologo competente ed esperto, responsabile dell'intera valutazione dell'analisi di ibridazione *in situ* e della sua interpretazione. I risultati falsi positivi nella FISH possono essere dovuti alla cross-reattività della sonda rispetto alle altre sequenze di acido nucleico e/o ad un legame aspecifico. Devono essere impiegati e documentati materiali di controllo appropriati, e i test dovrebbero tenere in considerazione tutte le relative date di scadenza.

Viene inoltre osservata una variazione interpretativa e tecnica quando la FISH è utilizzata su materiali derivati da una linea cellulare (23).

### B. Limitazioni specifiche del prodotto

Questo prodotto non va utilizzato in nessun'altra analisi diagnostica a base di DNA.

Non sostituite i reagenti Leica HER2 FISH System - 30 Test con qualsiasi altro componente fornito da Leica Biosystems o da altri produttori. Questo renderebbe nulla l'analisi. L'utilizzatore deve convalidare eventuali variazioni rispetto alle procedure consigliate.

Si raccomanda di utilizzare durante l'analisi tessuti fissati soltanto con fissativi a base di formalina. L'uso di qualsiasi altro tipo di fissativo renderà nulla l'analisi.

Le sezioni tissutali tagliate al di fuori dell'intervallo di spessore raccomandato non sono valide. L'utilizzo di qualsiasi altro spessore per la sezione potrebbe rendere nulla l'analisi.

## Concordanza clinica di Leica HER2 FISH System - 30 Test rispetto a Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Mammario

Questo studio esaminava l'adeguatezza del Leica HER2 FISH System - 30 Test per essere usato come ausilio nel determinare il trattamento con la terapia di Herceptin (trastuzumab). Lo studio è stato concepito per esaminare la concordanza tra il Leica HER2 FISH System - 30 Test e un dispositivo diagnostico precedentemente approvato, l'Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, considerato come lo standard di riferimento per questa analisi del tessuto mammario. Il criterio di accettazione per il test era che il limite inferiore dell'intervallo di confidenza unilaterale 95% fosse superiore al 90% tra il Leica HER2 FISH System - 30 Test e l'Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit manuale, tra i casi di cancro al seno invasivo fissati in formalina e conservati in paraffina (FFPE) positivi (amplificati) e negativi (non amplificati).

Lo studio è stato condotto come valutazione mascherata su tre siti di campioni clinici di carcinoma mammario invasivo. A ciascun sito di indagine sono stati forniti blocchi di tessuti con carcinoma mammario invasivo fissati in formalina e conservati in paraffina con livelli di espressione dell'oncoproteina HER2 noti. Una coorte era formata da 300 campioni, rappresentati da 75 casi IHC precedentemente classificati come 0/1+; 150 casi IHC precedentemente classificati come 2+; e 75 casi IHC precedentemente classificati come 3+, che sono stati selezionati e suddivisi equamente tra i tre siti di indagine.

Tutti i casi sono stati colorati con l'Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit Assay manuale secondo le istruzioni del produttore come specificato nella confezione. Le sezioni sequenziali di ogni caso sono state quindi colorate con il Leica HER2 FISH System - 30 Test sul BOND System.

Tutti i vetrini colorati sono stati mascherati e valutati in maniera casuale da un osservatore qualificato in ognuno dei tre siti di indagine. I punteggi sono stati interpretati come negativi quando il rapporto HER2/CEP17 era  $<2,0$  e positivi quando il rapporto HER2/CEP17 era  $\geq 2,0$ . I dati sono quindi stati analizzati in termini di concordanza di colorazione positiva e negativa.

### Risultati concordanza 2x2 BOND-MAX System - Mammario

I dati sono stati raggruppati come negativi ( $<2,00$ ) o positivi ( $\geq 2,00$ ) per un'analisi 2x2. L'accordo rispettato per i 300 campioni tra i due test in un'analisi 2x2 mostra una concordanza del 99,33% (298/300) con un CI del 95% tra il 97,61 e il 99,92% per il BOND-MAX System.

La percentuale di Accordo Positivo (sensibilità) o la capacità del Leica HER2 FISH System - 30 Test di individuare correttamente i casi positivi Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe (la percentuale dei campioni giudicati positivi sia dal Leica HER2 FISH System - 30 Test sia dall'Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit manuale su tutti i casi positivi Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) era pari al 99,03% (102/103).

La percentuale di Accordo Negativo (specificità) o la capacità del test di individuare correttamente i casi negativi Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (la percentuale di campioni giudicati negativi dal Leica HER2 FISH System - 30 Test e dall'Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit su tutti i casi negativi Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) era pari al 99,49% (196/197). Cfr. Tabella 4.

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

Concordanza complessiva (CI del 95%) = 99,33% (97,61 – 99,92%)

Tabella 4. Concordanza 2x2 di Leica HER2 FISH System - 30 Test sul BOND-MAX System con Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit su tessuto mammario.

## Risultati concordanza 2x2 BOND-III System - Mammario

I dati sono stati raggruppati come negativi (<2,00) o positivi (≥2,00) per un'analisi 2x2. L'accordo rispettato per i 300 campioni tra i due test in un'analisi 2x2 mostra una concordanza del 99,67% (299/300) con un CI del 95% tra il 98,16 e il 99,99% per il BOND-III System.

La percentuale di Accordo Positivo (sensibilità) o la capacità del Leica HER2 FISH System - 30 Test di individuare correttamente i casi positivi dell'analisi Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (la percentuale dei campioni giudicati positivi sia dal Leica HER2 FISH System - 30 Test sia dall'Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit manuale su tutti i casi positivi Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) era pari al 99,03% (102/103).

La percentuale di Accordo Negativo (specificità) o la capacità del test di individuare correttamente i casi negativi Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (la percentuale dei campioni giudicati negativi dal Leica HER2 FISH System - 30 Test e dall'Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) era pari al 100% (197/197). Cfr. Tabella 5.

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

Concordanza complessiva (CI del 95%) = 99,67% (98,16 – 99,99%).

*Tabella 5. Concordanza 2x2 di Leica HER2 FISH System - 30 Test sul BOND-III System con Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit su tessuto mammario.*

In conclusione, i dati ottenuti in questo studio dimostrano che il Leica HER2 FISH System - 30 Test può essere utilizzato come strumento di ausilio nella valutazione dei pazienti per i quali viene considerato un trattamento a base di Herceptin (trastuzumab) in virtù della sua elevata concordanza con l'Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, un test diagnostico precedentemente approvato per questi casi.



## Concordanza clinica di Leica HER2 FISH System - 30 Test rispetto a Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Gastrico

Questo studio esaminava l'adeguatezza del Leica HER2 FISH System - 30 Test per essere usato come ausilio nel determinare il trattamento con la terapia di Herceptin (trastuzumab). Lo studio è stato concepito per esaminare la concordanza tra il Leica HER2 FISH System - 30 Test e un dispositivo diagnostico precedentemente approvato, l'Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, considerato come lo standard di riferimento per quest'analisi del tessuto gastrico. Il criterio di accettazione per il test era che il limite inferiore dell'intervallo di confidenza unilaterale, pari al 95%, fosse superiore al 90% tra il Leica HER2 FISH System - 30 Test e l'Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit manuale, tra i casi di adenocarcinoma dello stomaco (incluso il giunto gastroesofageo), fissati in formalina e conservati in paraffina (FFPE) positivi (amplificati) e negativi (non amplificati).

Lo studio è stato condotto come valutazione dei campioni clinici di adenocarcinoma gastrico invasivo. Il test è stato eseguito su blocchi di tessuto di adenocarcinoma gastrico fissato in formalina e conservato in paraffina con livelli di espressione genica HER2 noti. Una coorte era formata da 109 campioni, rappresentati da 50 casi amplificati e 59 casi non amplificati.

Tutti i casi sono stati colorati con l'Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit Assay manuale secondo le istruzioni del produttore come specificato nella confezione. Le sezioni sequenziali di ogni caso sono state quindi colorate con il Leica HER2 FISH System - 30 Test sul BOND-MAX System.

Tutti i vetrini colorati sono stati valutati in maniera casuale da un osservatore qualificato in ognuno dei tre siti di indagine. I punteggi sono stati interpretati come negativi quando il rapporto HER2/CEP17 era  $<2,0$  e positivi quando il rapporto HER2/CEP17 era  $\geq 2,0$ . I dati sono quindi stati analizzati in termini di concordanza di colorazione positiva e negativa.

### Risultati concordanza 2x2 BOND MAX System- Gastrico

I dati sono stati raggruppati come negativi ( $<2,00$ ) o positivi ( $\geq 2,00$ ) per un'analisi 2x2. L'accordo rispettato per i 109 campioni tra i due test in un'analisi 2x2 mostra una concordanza del 98,17% (107/109) con un CI del 95% tra il 93,53 e il 99,78% per il BOND-MAX System.

La percentuale di Accordo Positivo (sensibilità) o la capacità del Leica HER2 FISH System - 30 Test di individuare correttamente i casi positivi Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe (la percentuale dei campioni giudicati positivi sia dal Leica HER2 FISH System - 30 Test sia dall'Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit manuale su tutti i casi positivi Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) era pari al 96,00% (48/50).

La percentuale di Accordo Negativo (specificità) o la capacità del test di individuare correttamente i casi negativi Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (la percentuale di campioni giudicati negativi dal Leica HER2 FISH System - 30 Test e dall'Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit su tutti i casi negativi Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) era pari al 100% (59/59). Cfr. Tabella 6.

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

Concordanza complessiva (CI del 95%) = 98,17% (93,53 –99,78%)

Tabella 6. Concordanza 2x2 di Leica HER2 FISH System - 30 Test sul BOND Max System con Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit su tessuto gastrico.

# Test di precisione – BOND-MAX System

## A. Studio di precisione intra-seduta

Lo studio di precisione intra-seduta è stato eseguito in maniera randomizzata e alla cieca. Il test di precisione intra-seduta del Leica HER2 FISH System - 30 Test è stato valutato in un unico sito di indagine su 540 campioni TMA precedentemente caratterizzati da HER2 comprendenti casi di tumore al seno fissati in formalina e conservati in paraffina. L'uso dei TMA per la determinazione della precisione intra-seduta ha permesso di inserire un maggior numero di casi che coprivano una più ampia gamma di espressione di HER2 all'interno di una singola seduta su un singolo strumento.

Per quanto riguarda l'enumerazione dei vetrini colorati nello studio di precisione intra-seduta, 532 casi su 540 sono risultati concordi, mostrando una concordanza complessiva del 98,52% con un CI del 95% inferiore pari al 97,10%.

## B. Studio di precisione intra-strumento

Lo studio di precisione intra-strumento è stato eseguito in maniera randomizzata e alla cieca. Il test di precisione intra-strumento del Leica HER2 FISH System - 30 Test è stato valutato in un unico sito di indagine su 1620 campioni TMA precedentemente caratterizzati da HER2 comprendenti casi di tumore al seno fissati in formalina e conservati in paraffina. L'uso dei TMA per la determinazione della precisione intra-strumento ha permesso di inserire un maggior numero di casi che coprivano una più ampia gamma di espressione di HER2 all'interno di sedute multiple su un singolo strumento.

Per quanto riguarda l'enumerazione dei vetrini colorati nello studio di precisione intra-strumento, 1620 casi su 1620 sono risultati concordi, mostrando una concordanza complessiva del 100% con un CI del 95% inferiore pari al 99,82%.

## C. Studio di precisione inter-seduta

Lo studio di precisione inter-seduta è stato eseguito in maniera randomizzata e alla cieca. Il test di precisione inter-seduta del Leica HER2 FISH System - 30 Test è stato valutato in un unico sito di indagine su 900 campioni TMA precedentemente caratterizzati da HER2 comprendenti casi di tumore al seno fissati in formalina e conservati in paraffina. L'uso dei TMA per la determinazione del test di precisione quotidiana inter-seduta ha permesso di testare un maggior numero di casi che coprivano una più ampia gamma di espressione di HER2 tra diverse sedute in giorni differenti.

Per quanto riguarda l'enumerazione dei vetrini colorati nello studio di precisione inter-seduta, 894 casi su 900 sono risultati concordi, mostrando una concordanza complessiva del 99,33% con un CI del 95% inferiore pari al 98,55%.

## D. Studio di precisione inter-laboratorio

Lo studio di precisione inter-laboratorio è stato eseguito in maniera randomizzata e alla cieca. Il test di precisione inter-laboratorio del Leica HER2 FISH System - 30 Test è stato valutato tra i 3 siti di indagine su 513 campioni TMA precedentemente caratterizzati da HER2 comprendenti casi di tumore al seno fissati in formalina e conservati in paraffina. L'uso dei TMA per la determinazione del test di precisione inter-laboratorio ha permesso di testare un maggior numero di casi che coprivano una più ampia gamma di espressione di HER2 tra diverse sedute su molteplici strumenti.

Per quanto riguarda l'enumerazione dei vetrini colorati nello studio di precisione inter-laboratorio, 510 casi su 513 sono risultati concordi, mostrando una concordanza complessiva del 99,42% con un CI del 95% inferiore pari al 98,30%.

## E. Studio di precisione inter-osservatore

Lo studio di precisione inter-osservatore è stato eseguito in maniera randomizzata e alla cieca. Il test della riproducibilità inter-osservatore del Leica HER2 FISH System - 30 Test è stato valutato tra i tre siti di indagine. È stato utilizzato un unico osservatore esperto in ciascun sito di indagine. 18 sezioni intere di casi di tumore al seno sono state utilizzate per la precisione inter-osservatore, riflettendo i tipi di campione usati nel setting clinico.

Per quanto riguarda l'enumerazione dei vetrini colorati nello studio di precisione inter-osservatore, 53 casi su 54 sono risultati concordi, mostrando una concordanza complessiva del 98,15% con un CI del 95% inferiore pari al 90,11%.

## F. Studio di precisione lotto per lotto

Lo studio di precisione lotto per lotto è stato eseguito in maniera randomizzata e alla cieca. La precisione lotto per lotto è stata determinata su tre lotti di produzione indipendente del Leica HER2 FISH System - 30 Test, prodotti in conformità alla Good Manufacturing Practice (GMP). Ciascun lotto è stato testato in un unico sito di indagine su 540 campioni TMA precedentemente caratterizzati da HER2 comprendenti casi di tumore al seno fissati in formalina e conservati in paraffina. L'uso dei TMA per la determinazione della riproducibilità lotto-per-lotto permette di testare un maggior numero di casi che coprono una più ampia gamma di espressione di HER2 tra diversi lotti.

Per quanto riguarda l'enumerazione dei vetrini colorati nello studio di precisione lotto-per-lotto, 534 casi su 540 sono risultati concordi, mostrando una concordanza complessiva del 98,89% con un CI del 95% inferiore pari al 97,60%.

## Test di precisione – BOND-III System

### G. Studio di precisione intra-seduta

Lo studio di precisione intra-seduta è stato eseguito in maniera randomizzata e alla cieca. Il test di precisione intra-seduta del Leica HER2 FISH System - 30 Test è stato valutato in un unico sito di indagine su 540 campioni TMA precedentemente caratterizzati da HER2 comprendenti casi di tumore al seno fissati in formalina e conservati in paraffina. L'uso dei TMA per la determinazione della precisione intra-seduta ha permesso di inserire un maggior numero di casi che coprivano una più ampia gamma di espressione di HER2 all'interno di una singola seduta su un singolo strumento.

Per quanto riguarda l'enumerazione dei vetrini colorati nello studio di precisione intra-seduta, 540 casi su 540 sono risultati concordi, mostrando una concordanza complessiva del 100% con un CI del 95% inferiore pari al 99,45%.

### H. Studio di precisione intra-strumento

Lo studio di precisione intra-strumento è stato eseguito in maniera randomizzata e alla cieca. Il test di precisione intra-strumento del Leica HER2 FISH System - 30 Test è stato valutato in un unico sito di indagine su 1620 campioni TMA precedentemente caratterizzati da HER2 comprendenti casi di tumore al seno fissati in formalina e conservati in paraffina. L'uso dei TMA per la determinazione della precisione intra-strumento ha permesso di inserire un maggior numero di casi che coprivano una più ampia gamma di espressione di HER2 all'interno di sedute multiple su un singolo strumento.

Per quanto riguarda l'enumerazione dei vetrini colorati nello studio di precisione intra-seduta, 1620 casi su 1620 sono risultati concordi, mostrando una concordanza complessiva del 100% con un CI del 95% inferiore pari al 99,82%.

### I. Studio di precisione inter-seduta

Lo studio di precisione inter-seduta è stato eseguito in maniera randomizzata e alla cieca. Il test di precisione inter-seduta del Leica HER2 FISH System - 30 Test è stato valutato in un unico sito di indagine su 900 campioni TMA precedentemente caratterizzati da HER2 comprendenti casi di tumore al seno fissati in formalina e conservati in paraffina. L'uso dei TMA per la determinazione del test di precisione quotidiana inter-seduta ha permesso di testare un maggior numero di casi che coprivano una più ampia gamma di espressione di HER2 tra diverse sedute in giorni differenti.

Per quanto riguarda l'enumerazione dei vetrini colorati nello studio di precisione inter-seduta, 891 casi su 900 sono risultati concordi, mostrando una concordanza complessiva del 99,00% con un CI del 95% inferiore pari al 98,11%.

## J. Studio di precisione inter-laboratorio

Lo studio di precisione inter-laboratorio è stato eseguito in maniera randomizzata e alla cieca. Il test di precisione inter-laboratorio del Leica HER2 FISH System - 30 Test è stato valutato tra i 3 siti di indagine su 513 campioni TMA precedentemente caratterizzati da HER2 comprendenti casi di tumore al seno fissati in formalina e conservati in paraffina. L'uso dei TMA per la determinazione del test di precisione inter-laboratorio ha permesso di testare un maggior numero di casi che coprivano una più ampia gamma di espressione di HER2 tra diverse sedute su molteplici strumenti.

Per quanto riguarda l'enumerazione dei vetrini colorati nello studio di precisione inter-laboratorio, 511 casi su 513 sono risultati concordi, mostrando una concordanza complessiva del 99,61% con un CI del 95% inferiore pari al 98,60%.

## K. Studio di precisione inter-osservatore

Lo studio di precisione inter-osservatore è stato eseguito in maniera randomizzata e alla cieca. Il test della riproducibilità inter-osservatore del Leica HER2 FISH System - 30 Test è stato valutato tra i tre siti di indagine. È stato utilizzato un unico osservatore esperto in ciascun sito di indagine. 18 sezioni intere di casi di tumore al seno sono state utilizzate per la precisione inter-osservatore, riflettendo i tipi di campione usati nel setting clinico.

Per quanto riguarda l'enumerazione dei vetrini colorati nello studio di precisione inter-osservatore, 53 casi su 54 sono risultati concordi, mostrando una concordanza complessiva del 98,15% con un CI del 95% inferiore pari al 90,11%.

## L. Studio di precisione lotto per lotto

Lo studio di precisione lotto per lotto è stato eseguito in maniera randomizzata e alla cieca. La precisione lotto per lotto è stata determinata su tre lotti di produzione indipendente del Leica HER2 FISH System - 30 Test, prodotti in conformità con la Good Manufacturing Practice (GMP). Ciascun lotto è stato testato in un unico sito di indagine su 540 campioni TMA precedentemente caratterizzati da HER2 comprendenti casi di tumore al seno fissati in formalina e conservati in paraffina. L'uso dei TMA per la determinazione della riproducibilità lotto-per-lotto permette di testare un maggior numero di casi che coprono una più ampia gamma di espressione di HER2 tra diversi lotti.

Per quanto riguarda l'enumerazione dei vetrini colorati nello studio di precisione lotto-per-lotto, 540 casi su 540 sono risultati concordi, mostrando una concordanza complessiva del 100% con un CI del 95% inferiore pari al 99,45%.

## Robustezza dell'analisi

Gli studi sulla robustezza sono stati eseguiti sul BOND-MAX and BOND-III System per determinare la gamma di tolleranza dei campioni per il tempo di recupero del calore e la temperatura, il tempo di recupero degli enzimi, la temperatura e la concentrazione, il tempo di denaturazione e la temperatura, il tempo di ibridazione e la temperatura, il tempo di lavaggio di stringenza e la temperatura. Inoltre, sono stati eseguiti studi di robustezza usando il protocollo predefinito BOND-MAX and BOND-III System al di fuori dei limiti raccomandati come indicato nel documento guida FDA/ORA ORA LAB5.3 Rev1.7 per la temperatura e l'umidità.

- Non è stata osservata alcuna differenza nello stato dell'amplificazione quando la temperatura predefinita per ciascuno step dipendente dal calore è stata aumentata di 4 °C o diminuita di 4 °C, in confronto al protocollo predefinito Leica HER2 FISH System - 30 Test. I più alti livelli di qualità sono stati osservati alle temperature predefinite e queste temperature sono raccomandate.
- Non è stata osservata alcuna differenza nello stato dell'amplificazione quando il recupero di epitopi con induzione di calore (HIER) è stato eseguito per 20 minuti e 30 minuti a 97 °C mediante la soluzione BOND ER1, in confronto al protocollo predefinito Leica HER2 FISH System - 30 Test. Il tempo predefinito di 25 minuti è quello che ha fatto registrare i risultati migliori ed è il tempo di incubazione consigliato.
- Non è stata osservata alcuna differenza nello stato dell'amplificazione quando il recupero di epitopi con induzione enzimatica (EIER) è stato eseguito per 15 minuti e 35 minuti a 37 °C,

in confronto al protocollo predefinito Leica HER2 FISH System - 30 Test. Il tempo predefinito di 25 minuti è quello che ha fatto registrare i risultati migliori ed è il tempo di incubazione consigliato.

- Non è stata osservata alcuna differenza nello stato dell'amplificazione quando la concentrazione enzimatica del recupero di epitopi con induzione enzimatica (EIER) è stata eseguita con rapporti concentrato enzima/diluente enzima a 1:200 e 1:500 usando il protocollo predefinito Leica HER2 FISH System - 30 Test protocol. La concentrazione predefinita 1:300 è quella che ha fatto registrare i risultati migliori, ed è la diluizione consigliata.
- Non è stata osservata alcuna differenza nello stato dell'amplificazione quando la denaturazione è stata eseguita per 5 minuti e 15 minuti, in confronto al protocollo predefinito Leica HER2 FISH System - 30 Test. Il tempo predefinito di 10 minuti è quello che ha fatto registrare i risultati migliori, ed è il tempo di denaturazione consigliato.
- Non è stata osservata alcuna differenza nello stato dell'amplificazione quando l'ibridazione è stata eseguita per 9 ore e 15 ore, in confronto al protocollo predefinito Leica HER2 FISH System - 30 Test. Il tempo predefinito di 12 ore è quello che ha fatto registrare i risultati migliori, ed è il tempo di ibridazione consigliato.
- Non è stata osservata alcuna differenza nello stato dell'amplificazione quando la post-ibridazione è stata eseguita per 2 minuti, 5 minuti e 7 minuti, in confronto al protocollo predefinito Leica HER2 FISH System - 30 Test. Il tempo predefinito di 4 minuti è quello che ha fatto registrare i risultati migliori, ed è il tempo di post-ibridazione consigliato.
- Non è stata osservata alcuna differenza nello stato dell'amplificazione quando il Leica HER2 FISH System - 30 Test è stato eseguito a 28 °C e con il 30% di umidità relativa e 16 °C e l'80% di umidità relativa, in confronto al protocollo predefinito Leica HER2 FISH System - 30 Test eseguito alle condizioni ambientali.

Le operazioni eseguite al di fuori dei parametri raccomandati relativi alla robustezza del campione testato non sono state convalidate. L'utilizzo di qualsiasi altro parametro per il test potrebbe rendere nulla l'analisi.

Il suddetto testo descrive le condizioni testate e i risultati derivanti dallo studio. Occorre specificare che Leica non ha testato tutte le possibili combinazioni di condizioni e non raccomanda l'utilizzo di range non predefiniti in tutte le condizioni. Il protocollo predefinito Leica HER2 FISH Staining Protocol è descritto nella tabella 2.

## Risoluzione dei problemi

Problema	Probabile causa	Azione correttiva
Segnale/ colorazione fluorescente assente o debole	Fissazione o lavorazione errata dei campioni test	Accertatevi che venga utilizzato un fissativo a base di formalina e che i tempi di lavorazione siano idonei per il test a cui è sottoposto il campione.
	Il Leica HER2 FISH System - 30 Test è stato utilizzato oltre la data di scadenza	Accertatevi che il Leica HER2 FISH System - 30 Test utilizzato non sia già scaduto.
	Selezione protocollo errata	Verificate che vi sia il default corretto su *FISH Protocol A nel campo protocollo di colorazione della finestra di dialogo Agg. vetrino.
	Distribuzione di reagenti sfusi errati	Verificate che tutti i reagenti BOND siano stati assegnati ai contenitori sfusi appropriati e messi in posizione corretta sullo strumento.
	Deparaffinizzazione inadeguata dei vetrini	Accertatevi che sia selezionata la modalità *Dewax nel campo Preparazione della finestra di dialogo Agg. vetrino.
	Pretrattamento non adatto	Accertatevi che siano stati selezionati i protocolli di pretrattamento predefiniti (HIER e Digestione Enzimatica). Regolare il protocollo di pretrattamento (HIER o Digestione Enzimatica), se necessario.
	Denaturazione inadeguata	Accertatevi che sia stata selezionata la denaturazione predefinita *D10.
	Ibridazione inadeguata	Accertatevi che sia stata selezionata l'ibridazione predefinita *H12. Estendere il tempo di ibridazione, se necessario.
	Eccesso lavaggio post-ibridazione	Ridurre il tempo di incubazione lavaggio post-ibridazione.
	Seduta interrotta prima del completamento	Utilizzando il software BOND, confermate la presenza di qualsiasi errore riportabile durante la seduta di colorazione e agite come indicato dal software BOND.
	Attrezzatura di microscopia a fluorescenza non adatta <ul style="list-style-type: none"> <li>• Set filtri non adatto</li> <li>• Lampada non corretta</li> <li>• Lampada scaduta</li> <li>• Tipo di olio non corretto</li> </ul>	Accertatevi che tutta l'attrezzatura di microscopia a fluorescenza utilizzata sia appropriata per l'analisi che si deve eseguire, confermate: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Set filtri adatto</li> <li>• Lampada adatta</li> <li>• Potenza lampada buona</li> <li>• Olio adatto per microscopia ad immersione</li> </ul>
	Esposizione eccessiva alla luce UV (photobleaching)	Conservate i vetrini al buio prima e dopo la valutazione per preservare i segnali fluorescenti. Per una preservazione a lungo termine del segnale, conservate i vetrini a -20 °C.

<b>Problema</b>	<b>Probabile causa</b>	<b>Azione correttiva</b>
Colorazione/ segnale fluorescente di fondo aspecifico	Lavaggio post-ibridazione inadeguato	Aumentare il tempo di incubazione lavaggio post-ibridazione.
	Distribuzione di reagenti sfusi errati	Verificate che tutti i reagenti BOND siano stati assegnati ai contenitori sfusi appropriati e messi in posizione corretta sullo strumento.
	Deparaffinizzazione inadeguata dei vetrini	Accertatevi che sia selezionato *Dewax nel campo Preparazione della finestra di dialogo Agg. vetrino.
	Reazione incrociata non specifica con aree di necrosi dei tessuti	Accertatevi che venga utilizzato un fissativo a base di formalina e che i tempi di lavorazione siano idonei per il test a cui è sottoposto il campione. Se possibile, sottoponete il caso ad un nuovo test utilizzando un altro blocco. Se ciò non è possibile, valutate insieme alla sezione colorata con H&E corrispondente e selezionate le aree che mostrano i migliori modelli di fissazione.
	Sezioni applicate ai vetrini con adesivi alternativi	Utilizzate BOND Plus Slides - codice prodotto S21.2113 o Apex BOND Slides codice prodotto 3800040)
Scarsa preservazione della morfologia tissutale	Fissazione e lavorazione dei tessuti inadeguate	Accertatevi che venga utilizzato un fissativo a base di formalina e che i tempi di lavorazione siano idonei per il test a cui è sottoposto il campione. Se possibile, sottoponete il caso ad un nuovo test utilizzando un altro blocco. Se ciò non è possibile, valutate insieme alla sezione colorata con H&E corrispondente e selezionate le aree che mostrano i migliori modelli di fissazione.
	Pretrattamento inadeguato	Regolare il protocollo di pretrattamento (HIER o Digestione Enzimatica).
Tessuto staccato dal(i) vetrino(i) paziente/controllo	Utilizzo dei tipi di vetrino errato o drenaggio inadeguato della sezione	Verificate che vengano utilizzati i vetrini giusti per le sezioni paziente/controllo (ad es. BOND Plus Slides - codice prodotto S21.2113 o Apex BOND Slides codice prodotto 3800040) Accertatevi che i vetrini vengano drenati adeguatamente e incubati per 1 ora a 60 °C.

Tabella 6. Leica HER2 FISH System - 30 Test Guida della risoluzione dei problemi.

In caso di problemi associati al Leica HER2 FISH System - 30 Test non elencati nella presente guida di risoluzione dei problemi, siete pregati di contattare il vostro Ufficio Tecnico locale o

## Bibliografia

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 and prognosis in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 1989; 7:1120-1128.
9. Van Cutsem E, Kang Y, Chung H, Shen L, Sawaki A, Lordick F et. al. Efficacy results from the ToGA trial: A phase III study of trastuzumab added to standard chemotherapy (CT) in first-line human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive advanced gastric cancer (GC). *Journal of Clinical Oncology* 2009; 27: LBA4509.
10. Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JBB, Henner D, Wong WLT, et al. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 1992; 89: 4285–9.
11. Hudziak RM, Lewis GD, Winget M, Fendly BM, Shepard HM, Ullrich A. p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Molecular & Cell Biology* 1989; 9: 1165–72.
12. Lewis GD, Figari I, Fendly B, Wong WL, Carter P, Gorman C, et al. Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185HER2 monoclonal antibodies. *Cancer Immunology and Immunotherapy* 1993; 37: 255–63.
13. Baselga J, Norton L, Albanell J, Kim Y-M, Mendelsohn J. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Research* 1998; 58: 2825–31.
14. Ellis I.O., Bartlett J., Dowsett M., Humphreys S., Jasani B., Miller K., Pinder S.E., Rhodes A. and Walker R. Best practise No. 176: Updated recommendations for Her-2 testing in the UK. *Journal of Clinical Pathology* 57; 233-237, 2004.
15. Walker R.A, Bartlett, J., Dowsett, M., Ellis, I., Hanby, A., Jasani, Miller, K., Pinder, S. HER2 Testing in the UK – further update to recommendations. *Journal of Clinical Pathology* 2007.054866
16. Press MF, Zhou JY, Ma Y, et al. Evaluation of HER-2/neu gene amplification by fluorescence in situ hybridization in invasive breast carcinoma. In: *FISH: Clinical Applications in Cancer and Genetics* February 8-11, 1994; Lake Tahoe, CA.
17. Pauletti G, Singh R, Press MF, et al. HER-2/neu gene amplification detected by fluorescence in situ hybridization: A comparative study with other techniques. Abstract 3247, *Proceedings of the American Association for Cancer Research* 1994 35:545.
18. Szöllösi J, Balázs M, Feuerstein BG, et al. Phenotype genotype relationship in erbB-2 amplification. *International Society for Analytical Cytology* 1994 Abstracts. 92. Abstract 536D.
19. Kallioniemi O, Kallioniemi A, Kurisu W, et al. ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1992;89:5321-5325.
20. The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Quality assurance for immunocytochemistry; Approved guideline. NCCLS document MM4-A (1-56238-396-5) NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 1999; 19087–1898: USA
21. Nadji, M. and Morales, A. R. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. *Laboratory Medicine* 1983; 14: 767.
22. Jackson P. 2007. Quality Assurance in Immunohistochemistry. In: *Immunohistochemistry*, 2007 (ed. Renshaw S), PP 205–237. Scion Publishing Ltd.



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

## Contratto di licenza

Questo prodotto contiene sonde FISH PathVysion fornite da Abbott Molecular Inc.

PathVysion, LSI e CEP sono un marchio registrato di Abbott Molecular Inc. Tutti i diritti riservati. Utilizzato sotto licenza.









## Emendamenti alla precedente uscita

Dati gastriche aggiunto.

## Data di pubblicazione

26 Febbraio 2020

## Identificazione dei simboli

	Codice Lotto		Conservazione		Numero catalogo
	Dispositivomedico di diagnosi <i>in vitro</i>		Produttore	<b>SN</b>	Numero di serie
	Leggere le istruzioni prima dell'uso		Contiene sufficiente per <n> test		Da utilizzare entro il GG-MM-AAAA

Herceptin è un marchio registrato di Genentech, Inc. e F. Hoffmann-La Roche Ltd.