

Leica HER2 FISH System - 30 Test

Bruksanvisning

Brukes i Leica Biosystems BOND-MAX and BOND-III system.

TA9217 er et produkt for fluorescens *in situ* hybridisering som er utviklet for å farge 30 tester (30 objektglass farget med LSI HER2/CEP17 Dual Probe).

Norsk



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



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

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

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

Innhold

Tiltent bruk	3
Til <i>in vitro</i> -diagnostisk bruk	3
Nødvendig opplæring	3
Oppsummering og forklaring	3
Bakgrunn	3
Oppsummering av klinisk konkordans, BOND-MAX System	4
Oppsummering av klinisk konkordans, BOND-III System	4
Prosedyreprinsipp	5
Medfølgende komponenter	5
Retningslinjer for bruk	5
Oppbevaring og stabilitet	5
Klærgjøring av prøver	5
Advarsler og forholdsregler	5
Prosedyre	6
A. Nødvendige reagenser som ikke følger med	6
B. Nødvendig utstyr som ikke følger med	6
C. Metodikk	6
D. Forbehandling med BOND-Enzyme	7
E. Standard fargingsprotokoll	7
F. Prosedyretrinn	7
G. Oppbevaring av objektglass	8
Vurdering og optelling av signaler	9
Anbefalt metode for å fastsette forholdet mellom LSI HER2 og CEP17	10
Tolkningsveiledning for Leica HER2 FISH System - 30 Test	11
Telleskjema for prøver	12
Kvalitetskontroll	13
Begrensninger	14
A. Generelle begrensninger	14
B. Produktspesifikke begrensninger	14
Klinisk konkordans for Leica HER2 FISH System - 30 Test med Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Bryst	14
2x2-konkordansresultater for BOND-MAX System - Bryst	15
2x2-konkordansresultater for BOND-III System - Bryst	16
Test av klinisk konkordans for Leica HER2 FISH System - 30 Test med Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Mage	17
2x2-konkordansresultater BOND-MAX System - Mage	17
Presisjonstesting – BOND-MAX System	18
A. Presisjonsstudie under kjøring	18
B. Presisjonsstudie i instrument	18
C. Presisjonsstudie mellom kjøringer	18
D. Presisjonsstudie mellom laboratorier	18
E. Presisjonsstudie mellom observatører	18
F. Presisjonsstudie mellom partier	19
Presisjonstesting – BOND-III System	19
G. Presisjonsstudie under kjøring	19
H. Presisjonsstudie i instrument	19
I. Presisjonsstudie mellom kjøringer	19
J. Presisjonsstudie mellom laboratorier	19
K. Presisjonsstudie mellom observatører	20
L. Presisjonsstudie mellom partier	20
Analysestyrke	21
Feilsøking	22
Referanser	24
Lisensavtale	25
Endringer i forhold til forrige utgave	25
Utgivelsesdato	25
Symbolforklaring	25

Tiltent bruk

Til *in vitro*-diagnostisk bruk

Leica HER2 FISH System - 30 Test er utviklet for å påvise amplifisering av HER2/neu-genet via fluorescens *in situ* hybridisering (FISH) i formalinfikserte, parafininnstøpte vevsprøver av brystkreft hos mennesker og adenokarsinomer i magen (inkludert gastroøsofagal overgang). Leica HER2 FISH System - 30 Test er et hjelpemiddel for å bedømme pasienter som vurderes å behandles med Herceptin® (trastuzumab) (se pakningsvedlegget til Herceptin). Leica HER2 FISH System - 30 Test er ikke beregnet for screening eller diagnostisering av brystkreft. All annen klinisk informasjon, som tumorstørrelse, antall involverte lymfeknuter og steroidreseptorstatus, skal også tas med i betraktningen. Det skal ikke tas beslutninger om behandling av brystkreftpasienter kun på bakgrunn av HER2-genets amplifiseringsstatus.

Merk: Alle pasientene i de kliniske Herceptin-forsøkene ble valgt ut med en undersøkende immuncytokjemisk, klinisk forsøksanalyse (CTA). Ingen av pasientene i disse undersøkelsene ble valgt ut ved hjelp av Leica HER2 FISH System - 30 Test. Leica HER2 FISH System - 30 Test har blitt sammenlignet med analysen Abbott Molecular PathVysion® HER-2 DNA Probe Kit på et uavhengig prøvesett, og har gitt akseptable konkordansresultater, som vist i den kliniske konkordansoppsummeringen. Den faktiske korrelasjonen av resultatene fra Leica HER2 FISH System - 30 Test i forhold til det kliniske utfallet er ikke avklart.

Alle pasientene i de kliniske Herceptin-undersøkelsene av fremskreden magekreft (ToGA) ble valgt ut ved hjelp av Dako HercepTest. Ingen av pasientene i disse undersøkelsene ble valgt ut ved hjelp av Leica HER2 FISH System - 30 Test. Leica HER2 FISH System - 30 Test har blitt sammenlignet med analysen Abbott Molecular PathVysion® HER-2 DNA Probe Kit på et uavhengig prøvesett, og har gitt akseptable konkordansresultater, som vist i den kliniske konkordansoppsummeringen. Den faktiske korrelasjonen av resultatene fra Leica HER2 FISH System - 30 Test i forhold til det kliniske utfallet er ikke avklart.

** Herceptin® er et varemerke som tilhører Genentech, Inc. og F. Hoffmann-La Roche Ltd. PathVysion® er et varemerke som tilhører Abbott Molecular Inc. Med enerett. Brukes med lisens.*

Nødvendig opplæring

Leica Biosystems sørger for opplæring i klargjøring av prøver, analyseprosedyre og tolkning av FISH-testing av HER2-genet for alle brukere.

Oppsummering og forklaring

Bakgrunn

HER2-genet, også kjent som "neu" eller "c-erbB2", er plassert på den lange armen til kromosom 17 i posisjonen 17q11-12 (1). Det er vist at både HER2-genet og dets 185 kD-kodede protein spiller en viktig rolle i malign transformasjon og tumorprogresjon i brystkreft (2).

HER2 fungerer som en prognostisk markør hvor genamplifisering og overuttrykk av protein knyttes til økt sykdomstilbakefall og høyere dødelighet. HER2 fungerer også som en prediktiv markør for utvalgt systemisk kjemoterapi og målrettede behandlinger (3). Det har vist seg at amplifisering av HER2-genet er en indikator for dårlige prognoser for nodepositiv brystkreft (4-8). En studie indikerer dessuten at den prognostiske verdien av HER2 er sterkere hos pasienter som behandles med kjemoterapi (7). Man skal likevel ta hensyn til andre etablerte prognostiske faktorer, som tumorstørrelse, antall positive lymfeknuter og steroidreseptorstatus, for å kunne forutse muligheten for sykdomsfri og total overlevelse hos den enkelte pasient.

Overuttrykk av HER2-onkoprotein som resultat av genamplifisering funnet i brystkreftceller, antyder at HER2 kan være mål for en antistoff-basert terapi (3) - mens resultater fra ToGA-undersøkelsen klart indikerer at bruken av Herceptin ved magekreft ved siden av kjemoterapi er en effektiv behandling som øker sannsynligheten for overlevelse ved HER2-positiv magekreft (9). Det er påvist at Herceptin (trastuzumab), et humanisert monoklonalt antistoff (10) som binder seg med høy affinitet til HER2-onkoproteinet, hemmer spredningen av humane tumorceller som overuttrykker HER2-onkoproteinet, både *in vitro* og *in vivo* (11-13). Etter at Herceptin ble utviklet,

har påvisning av både HER2-genet og -proteinet blitt svært viktige verktøyer i bedømmelsen av brystkreftsvulster. De er til hjelp både ved valg av terapiform og etterfølgende pasienthåndtering (14, 15).

FISH er blitt brukt for å vise amplifisering av HER2-genet både i interfase- og metafaseceller fra cellelinjer med humane brystkarsinomer (16-19). Ved kvantifisering av HER2-genamplifisering vurderer FISH nivået av HER2-genamplifiseringen direkte i tumorcellene. Vevets karakteristiske morfologi og den romlige fordelingen av onkogene kopier i individuelle, udyrkede, primære brystkarsinomer opprettholdes. Avvik i antall kopier av kromosom 17 (aneusomi) finnes også ofte i brystkreftsvulster. De kan forekomme som reduksjon eller økning (polysomi) av antall kromosomer. Denne kromosomvariasjonen har avgjørende betydning for tolkningen og rapporteringen av HER2-genets amplifiseringsstatus. Det er derfor svært viktig å måle kopinummeret av kromosom 17 sammen med HER2 (4).

Leica HER2 FISH System - 30 Test inneholder DNA-proben LSI HER2, en direktemerket SpectrumOrange™ fluorescent DNA-probe på 226 Kb som er beregnet spesifikt for HER2-genlocus (17q11.2-q12), og CEP17 DNA-proben, en direktemerket SpectrumGreen™ fluorescent DNA-probe på 5,4 Kb som er beregnet spesifikt for alfasatellitt-DNA-sekvensen i det sentromeriske området av kromosom 17 (17p11.1-q11.1). Probeløsningen er spesielt utformet og godkjent for bruk på BOND-MAX og BOND-III System, og skal ikke modifiseres eller brukes i manuell sammenheng.

Oppsummering av klinisk konkordans, BOND-MAX System

Leica HER2 FISH System - 30 Test ble utviklet for å gi et helautomatisk alternativ til gjeldende metoder som benyttes for å fastsette HER2-genets amplifiseringsstatus. Ytelsen til Leica HER2 FISH System - 30 Test på BOND-MAX System ble evaluert i en uavhengig studie som sammenlignet resultatene fra Leica HER2 FISH System - 30 Test og Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit Assay op 300 brystkreftprøver og 109 adenokarsinomer i magen (inkludert gastroøsofagal overgang). Ingen av disse tumorprøvene stammet fra pasienter i de kliniske Herceptin-studiene. Resultatene på brystvev viste 99,33 % konkordans i en 2x2-analyse (95 %-konfidensintervaller på 97,61–99,92 %). Resultatene på adenokarsinomer i magen (inkludert gastroøsofagal overgangsvev) viste 98,17 % konkordans i en 2x2-analyse (95 %-konfidensintervaller på 93,53–99,78 %). Konkordansdataene viser også at det er svært sannsynlig at et positivt resultat med Leica HER2 FISH System - 30 Test samsvarer med et positivt resultat av analysering med Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit. Leica HER2 FISH System - 30 Test tolkes som negativ for HER2-genamplifisering når HER2:CEP17-genforholdet er mindre enn 2,0, og positiv når HER2:CEP17-genforholdet er høyere enn eller lik 2,0. Tvetydige resultater (grensetilfeller) hvor HER2:CEP17-genforholdet er mellom eller lik 1,8-2,2, skal tolkes med varsomhet. Tell 20 kjerner til og beregn forholdet på nytt.

Oppsummering av klinisk konkordans, BOND-III System

Leica HER2 FISH System - 30 Test ble utviklet for å gi et helautomatisk alternativ til gjeldende metoder som benyttes for å fastsette HER2-genets amplifiseringsstatus. Ytelsen til Leica HER2 FISH System - 30 Test på BOND-III System ble evaluert i en uavhengig studie som sammenlignet resultatene fra Leica HER2 FISH System - 30 Test og Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit Assay på 300 brystkreftprøver. Ingen av disse tumorprøvene stammet fra pasienter i de kliniske Herceptin-studiene. Resultatene viste 99,67 % konkordans i en 2x2-analyse (95 %-konfidensintervaller på 98,16–99,99 %). Konkordansdataene viser også at det er svært sannsynlig at et positivt resultat med Leica HER2 FISH System - 30 Test samsvarer med et positivt resultat av analysering med Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit. Leica HER2 FISH System - 30 Test tolkes som negativ for HER2-genamplifisering når HER2:CEP17-genforholdet er mindre enn 2,0, og positiv når HER2:CEP17-genforholdet er høyere enn eller lik 2,0. Tvetydige resultater (grensetilfeller) hvor HER2:CEP17-genforholdet er mellom eller lik 1,8-2,2, skal tolkes med varsomhet. Tell 20 kjerner til og beregn forholdet på nytt.

Prosedyreprinsipp

Leica HER2 FISH System - 30 Test inneholder komponenter som trengs for å utføre en fargingsprosedyre basert på fluorescens *in situ*-hybridisering for formalinfiksert, parafininnstøpt vev. Etter hensiktsmessig forbehandling, inkubering med bruksklar LSI HER2/CEP17 Dual Probe og korrekt stringensvask, dehydreres vevssnittene og monteres med DAPI. Resultatene tolkes ved hjelp av fluorescensmikroskopi med anbefalte filtre og riktige bølgelengder.

Leica HER2 FISH System - 30 Test skal bare brukes på BOND-MAX and BOND-III System.

Medfølgende komponenter

Materialene nedenfor (tabell 1) er tilstrekkelig for å farge 30 tester (30 objektglass farget med LSI HER2/CEP17 Dual Probe).

LSI HER2/CEP17 Probe 6,6 ml	Inneholder bruksklar LSI HER2/CEP17 Dual Probe. Inneholder < 60 % (v/v) formamid.
Post Hybridization Wash 2 9 ml	Inneholder bruksklar løsning for posthybridiseringsvask. Inneholder < 50 % (v/v) formamid.
BOND Enzyme Concentrate 2 1 ml	Inneholder Proteinase K-løsning på 1,7 mg/ml.
BOND Enzyme Diluent 65 ml	Inneholder enzymfortynner.
BOND Open Container 3 x 7 ml	BOND Open Container brukt til Enzyme 5.

Tabell 1: Komponentene i Leica HER2 FISH System - 30 Test

Mer produksikkerhetsinformasjon finnes i egne sikkerhetsdatablader, som er tilgjengelige på nettsiden www.LeicaBiosystems.com/TA9217-IFU.

Retningslinjer for bruk

Alle leverte reagenser er sammensatt spesifikt for å brukes sammen med denne analysen, og partinumrene er spesifikke for hvert Leica HER2 FISH System - 30 Test. For at analysen skal være gyldig, skal det ikke foretas utskiftninger.

Oppbevaring og stabilitet

Oppbevares ved 2–8 °C. Skal ikke fryses. Returneres til 2–8 °C umiddelbart etter bruk. Analysen er ugyldig hvis disse betingelsene ikke oppfylles. Forviss deg om at Leica HER2 FISH System - 30 Test brukes innen den angitte utløpsdatoen. Tegn som indikerer kontaminering og/eller ustabilitet i Leica HER2 FISH System - 30 Test: løsningenes turbiditet (unntatt probeløsningen) og luktutvikling. Brukeren skal kontrollere om oppbevaringsforholdene avviker fra det som er spesifisert ovenfor.

Klargjøring av prøver

Standardmetoder for vevsbehandling skal benyttes for alle prøver (20). Det anbefales at vevet klargjøres i formalinbaserte fiksativer, behandles rutinemessig og støpes inn i parafin. For eksempel bør prøver tas ut i en tykkelse på 3–4 mm og fikseres i 18–24 timer i 10 % nøytralbufret formalin. Vevet skal deretter dehydreres i en alkoholserie, renses med xylene og deretter impregneres med smeltet parafinvoks (temperaturen skal ikke overstige 60 °C). Vevsprøvene skal skjæres i snitt mellom 4–6 µm.

Vevssnitt som er montert på ladete objektglass (BOND Plus Slides S21.2113), kan oppbevares i inntil 12 måneder ved 2–8 °C før farging. Etter snitting er det anbefalt at objektglassene

inkuberes ved 60 °C i en time. Fargede snitt bør lagres ved -20 °C for å bevare de fluorescerende signalene og forhindre blekning. La oppbevarte objektglass oppnå romtemperatur før du leser dem av.

Advarsler og forholdsregler

Skal kun brukes av fagpersoner.

En eller flere av produktkomponentene er skadelig(e) og kan forårsake fosterskader.

Personer under 18 år har i prinsippet ikke tillatelse til å arbeide med dette produktet. Brukerne skal få grundig opplæring i riktig arbeidsprosedyre, produktets farlige egenskaper samt nødvendige sikkerhetsinstruksjoner.

Prøver (før og etter fiksering) og alt materiale som eksponeres for dem, skal behandles som potensielt smittefarlig og avhendes i samsvar med aktuelle forholdsregler.

Hold aldri pipetter med reagens i munnen, og unngå at hud og slimhinner kommer i kontakt med reagenser og prøver. Hvis reagenser eller prøver kommer i kontakt med følsomme områder, skal de skylles med rikelig vann. Kontakt lege. Følg nasjonale og lokale forskrifter for avhending av komponenter som kan være giftige.

Reduser mikrobiell kontaminering av reagensene til et minimum, ellers kan det forekomme økt uspesifisert farging.

Prosedyre

A. Nødvendige reagenser som ikke følger med

- BOND Dewax Solution (AR9222)
- BOND Epitope Retrieval Solution 1 (AR9961)
- BOND Wash Solution x10 Concentrate (AR9590)
- Standardløsninger brukt i analyser basert på fluorescens *in situ* hybridisering (f.eks. etanol; ren og utblandet)
- Destillert eller avionisert vann
- DAPI-motfarge
- Leica HER2 FISH Control Slides (TA9123)
- BOND Aspirating Probe Cleaning System (CS9100)

B. Nødvendig utstyr som ikke følger med

- Pipetter (målekapasitet: 1-20 µl og 100-1000 µl)
- Ladede objektglass (BOND Plus Slides – S21.2113)
- BOND-MAX (21.0051) or BOND-III (21.2201)
- BOND Universal Covertiles™ (S21.2001, S21.4583 eller S21.4611)
- BOND Mixing Stations (S21.1971)
- BOND Slide Label & Print Ribbon (S21.4564)
- Dekkglass
- Tørkeovn (som kan holde 60 °C)
- Fluorescensmikroskop (60–100x objektiv) med egnet lyskilde. Noter hvor mange timer pæren har vært i bruk, og skift den før det angitte timeantallet overskrides. Forviss deg om at lampen er justert riktig.
- Korrekt fluorescensfiltersett (SpectrumOrange™ – eksitasjonstopp ved 559 nm, emisjonstopp ved 588 nm, SpectrumGreen™ – eksitasjonstopp ved 497 nm, emisjonstopp ved 524 nm og DAPI – eksitasjonstopp ved 367 nm, emisjonstopp ved 452 nm). Multibåndpassfiltersett til fluorescensmikroskop optimalt for bruk med Leica HER2 FISH System - 30 Test er tilgjengelig for de fleste mikroskopmodeller. Det anbefalte filtersettet for Leica HER2 FISH System - 30 Test er DAPI/9-Orange dobbelt båndpass, DAPI/Green dobbelt båndpass, Green/Orange(V.2) dobbelt båndpass og DAPI/Green/Orange (V.2) trippelt båndpass.

C. Metodikk

- Før denne metodikken anvendes, skal brukerne ha fått relevant opplæring i automatisert *in situ*-fluorescenceteknikk.
- Hvert testsnitt som er farget med LSI HER2/CEP17 Dual Probe, gjør det mulig å foreta samme celleanalyse av både HER2- og sentromeriske kromosom 17-signaler. Forholdet mellom antall HER2- og kromosom 17-signaler gjør det deretter mulig å gi prøven en kvantitativ verdi, som viser et negativt (ikke amplifisert) eller positivt (amplifisert) resultat. Tvetydige resultater (grensetilfeller) (1,8-2,2) skal tolkes med varsomhet. Tell 20 kjerner til og beregn forholdet på nytt.

D. Forbehandling med BOND-Enzyme

Før fargingen skal du tynne ut BOND Enzyme Concentrate 2 (medfølger) til 1:300 med BOND Enzyme Diluent (medfølger) i en BOND Open Containers (medfølger). Eksempel: For å farge 10 objektglass forberedes 3 ml arbeidsenzymløsning ved å tynne ut 10 µl BOND Enzyme Concentrate 2 i 2990 µl BOND Enzyme Diluent. Det anbefales at enzymet gjøres klart rett før hver fargekjøring og at det brukes minst 900 µl per kjøring.

E. Standard fargingsprotokoll

Det anbefales at Leica HER2 FISH System - 30 Test brukes med den anbefalte standardprotokollen for farging, som vist i tabell 2 nedenfor.

Protokolltype	Protokollnavn
Farging	*FISH Protocol A
Klargjøring	*Dewax
HIER	*HIER 25 min with ER1 (97)
Enzym	*Enzyme 5 for 25 min
Denaturering	*D10
Hybridisering	*ISH Hybridization (12Hr)

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

F. Prosedyretrinn

Disse instruksjonene skal leses sammen med brukerhåndboken for BOND-MAX and BOND-III System. Det skal brukes en ny BOND Universal Covertile for hvert objektglass.

Bruken av BOND Universal Covertiles som allerede har vært brukt ved enten immunhistokjemisk farging eller *in situ* hybridisering-farging, er ikke godkjent for denne testen.

1. Sørg for at beholderne for bulk- og spesialavfall på BOND-MAX and BOND-III System har tilstrekkelig kapasitet til å utføre fargekjøringene som trengs.
2. Sørg for at det er nok alkohol, destillert eller avionisert vann, BOND Dewax Solution, BOND Epitope Retrieval Solution 1 og BOND Wash Solution i beholderne med bulkreagens slik at de nødvendige fargekjøringene kan utføres.
3. Forviss deg om at det er montert en ren BOND Mixing Station.
4. Slå på BOND-MAX and BOND-III System.
5. Slå på PC-en som er koblet til BOND-MAX and BOND-III System.
6. Åpne BOND-programvaren.
7. Hvis Leica HER2 FISH System - 30 Test settet er nytt, skanner du reagensbrettets strekkode med den håndholdte skanneren, slik at systemet registreres i BONDS reagensliste (kun enkle strekkoder).
8. Klargjør BOND Enzyme 5 i BOND Open Container (medfølger) ved en fortykning på 1:300. Eksempel: For 10 objektglass tilsetter du 10 µl BOND Enzyme Concentrate 2 til 2990 µl BOND Enzyme Diluent.

9. Skann inn BOND Open Container (medfølger) og registrer den som **Bond Enzyme 5**.
10. Gå til skjermbildet for objektglassinnstillinger og klikk på **Add case**.
11. Legg inn opplysningene for det første tilfellet. Forviss deg om at doseringsvolumet er satt til **150 µl** og at prepareringsprotokollen er ***Dewax**. Klikk på **OK**.
12. Når det aktuelle elementet er uthevet i innstillingsskjermbildet, klikker du på **Add slide**.
13. Legg først til pasientens testobjektglass. Kontroller at vevstypen er satt til **Test tissue**.
14. Velg fargemodusen **Single**.
15. Velg prosessen **ISH**.
16. Velg ***LSI HER2/CEP17 Dual Probe - 30 Test** fra probelisten. Protokollfanen er forhåndsinnstilt til å gå til riktig fargeprotokoll (***FISH Protocol A**), HIER-protokoll (***HIER 25 min with ER1 (97)**), EIER-protokoll (***Enzyme 5 for 25 min**), denaturering (***D10**) og hybridisering (***ISH Hybridization (12Hr)**).
17. Gjenta trinn 10-16 til du har opprettet pasientens test- og kontrollobjektglass (Leica HER2 FISH-kontrollobjektglass og/eller interne kontroller). Skriv ut objektglassetikettene.
18. Merk objektglassene med riktige etiketter.
19. Åpne lokkene til alle Leica HER2 FISH System - 30 Test beholderne og sett reagensbrettet i BOND-MAX and BOND-III System.
20. Legg nye Covertiles på hvert objektglass.
21. Sett brettet med objektglass i BOND-MAX and BOND-III System og trykk på **Load/Unload**-knappen.
22. Bekreft at objektglassene har blitt skannet, og klikk på **Run (Play)**-knappen i systemstatusskjermbildet for å starte kjøringen umiddelbart (for Leica HER2 FISH System - 30 Test anbefales det at denne analysen kjøres over natten ved hjelp av funksjonen for forsinket start).
23. Kontroller at brettindikatoren viser **Proc (OK)** og at batchnummeret og sluttiden vises.
24. Når kjøringen er ferdig, trykker du på **Load/Unload**-knappen og tar objektglassbrettet ut av BOND-MAX and BOND-III System.
25. Fjern Covertiles og skyll objektglassene i avionisert vann.
26. Dehydrer dem raskt i to omganger med alkohol og la dem lufttørke.
27. Hell 20 µl DAPI direkte på prøven.
28. Legg på dekkglass og la løsningen spre seg helt ut. Pass på å fjerne eventuelle luftbobler.
29. Forsegl kanten av dekkglasset med neglelakk eller lignende.
30. La objektglassene ligge mørkt for å fremme signalutviklingen før du ser på dem under fluorescensmikroskopet.
31. De fargede objektglassene skal oppbevares ved -20 °C for å bevare signalintensiteten.

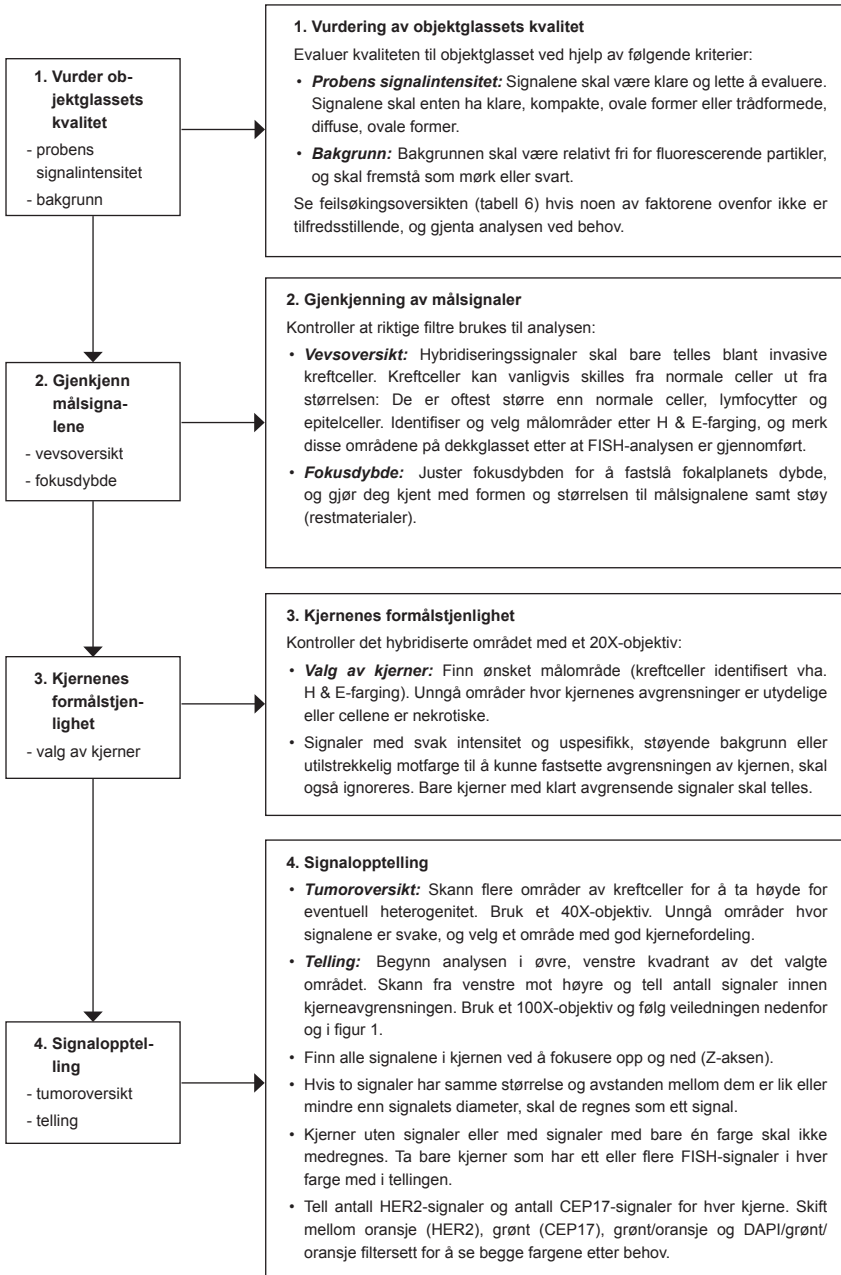
G. Oppbevaring av objektglass

Oppbevar fargede objektglass mørkt ved -20 °C. La objektglassene nå romtemperatur før du ser på dem når de hentes fra -20 °C.

Vurdering og optelling av signaler

Følg denne prosedyren for å vurdere signalkvaliteten og telle HER2- og CEP17-signalene:

Norsk



Anbefalt metode for å fastsette forholdet mellom LSI HER2 og CEP17

Bruk følgende metode for å fastsette forholdet mellom LSI HER2 og CEP17:

1. Registrer og fastsett antall LSI HER2- og CEP17-signaler i 20 kjerner (se figur 2, Telleskjema for Leica HER2 FISH System - 30 Test , nedenfor).
2. Legg sammen alle LSI HER2-signalene. Dette representerer det totale antallet LSI HER2-signaler i tellingen, f.eks. 143.
3. Legg sammen alle CEP17-signalene. Dette representerer det totale antallet CEP17-signaler i tellingen, f.eks. 48.
4. Bruk denne formelen for å regne ut det endelige resultatet: Totalt antall LSI HER2-signaler dividert på totalt antall CEP17-signaler. Eksempel: $143/48$ gir et forholdstall på 2,98, som er positivt for HER2-genamplifisering.

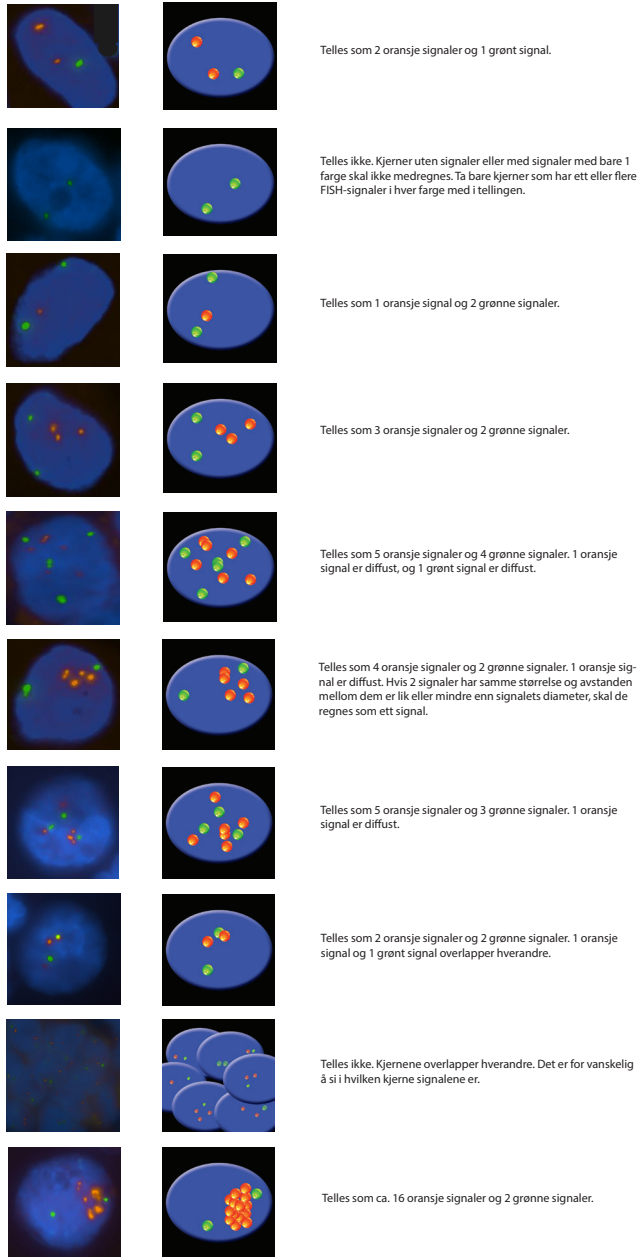
NB: Hvis forholdet mellom LSI HER2 og CEP17 er usikkert (1,80-2,20), skal du telle 20 kjerner til og beregne forholdet på nytt.

Resultatene skal rapporteres på denne måten:

1. Hvis forholdstallet er <2 , ble det ikke observert HER2-genamplifisering.
2. Hvis forholdstallet er ≥ 2 , ble det observert HER2-genamplifisering.

NB: Forholdstall som er lik eller nær grensen (1,80-2,20), skal tolkes med forsiktighet (som beskrevet ovenfor).

Leica HER2 FISH System - 30 Test Tolkningsveiledning



Figur 1: Tolkningsveiledning

Telleskjema for Leica HER2 FISH System - 30 Test

Signaltelling for 20 kjerner					
Kjerne nr.	Antall HER2-kopier	Antall CEP17-kopier	Kjerne nr.	Antall HER2-kopier	Antall CEP17-kopier
1			11		
2			12		
3			13		
4			14		
5			15		
6			16		
7			17		
8			18		
9			19		
10			20		
Totalt 1-10			Totalt 11-20		

	HER2	CEP17	Forholdstall for amplifisering, HER2:CEP17
Totalsum 1-20			
Gjennomsnitt per celle			

Figur 2: Telleskjema for prøver

Automatisert Ariol-metode for HER2 FISH-bestemmelse

Bruken av det digitale poengberegningsprogrammet Ariol PathVysion® som et hjelpemiddel i tolkning ble uavhengig validert på en rekke prøver som ble brukt med Leica HER2 FISH System. Det digitale poengberegningsprogrammet Ariol PathVysion er ment for in vitro-diagnostisk bruk når det brukes med Leica HER2 FISH System. Når det brukes med Leica HER2 FISH System skal Ariol PathVysion-programmet kalibreres for bruk med objektglass for vevskontroll, **ikke** Leica HER2 FISH Control Slides (TA9123).

Alle diagnostiske avgjørelser tas av den kvalifiserte kliniker.

For mer informasjon, kan du se Ariol-bruksanvisningen.

Kvalitetskontroll

Bruk av kontrollobjektglass

Det anbefales at et kontrollobjektglass av typen Leica HER2 FISH Control Slide brukes i hver testkjøring for å overvåke analysens funksjonalitet og bedømme signalopptellingens nøyaktighet. Kontrollobjektglass skal kjøres for hver fargebatch på BOND-MAX and BOND-III System og med hvert nytt reagensparti. Den enkelte bruker kan dessuten velge å bruke eget kontrollmateriale.

Vurder kontrollobjektglassets kvalitet og utfør signalopptellingen i henhold til instruksjonene i avsnittet **Vurdering og opptelling av signaler**. Kriteriene for objektglassenes kvalitet skal være oppfylt, og resultatet av HER2:CEP17-forholdet skal være innenfor det fastsatte området for akseptabel testutførelse. Akseptkriteriene for Leica HER2 FISH Control Slides finnes i tabell 3.

Cellelinje	Bond Oracle HER2 IHC System-profil	HER2- reseptorbelastning per celle*	HER2:CEP17-akseptkriterier for Leica HER2 FISH System - 30 Test
SKBr-3	3+	$4,3 \times 10^5$	HER2-amplifisering er observert.
MDA-MB-453	2+	$1,4 \times 10^5$	HER2/CEP17-genforholdet skal være mellom 1,5–2,5.
MDA-MB-175	1+	$6,3 \times 10^4$	HER2-amplifisering er ikke observert.
MDA-MB-231	0	$9,3 \times 10^3$	HER2-amplifisering er ikke observert.

*HER2-reseptorbelastning, analyse som fastsatt gjennom flowcytometri.

Tabell 3: Tolkning av Leica HER2 FISH Control Slide.

Hvis analysekontrollene mislykkes, skal FISH-resultatene for det aktuelle tilfellet ikke rapporteres. Hvis kontrollobjektglassene ikke oppfyller objektglassenes akseptkriterier, kan Leica HER2 FISH System - 30 Test ha blitt utført feil. I så fall må testen gjentas med nye kontrollobjektglass og objektglass med vevsprøver fra pasienten. Hvis resultatet er utenfor det spesifiserte området og kontrollobjektglassene oppfyller akseptkriteriene, kan det være nødvendig å gjenta screeningen av det samme objektglasset ettersom opptellingen kan være feil. Se feilsøkingsoversikten (tabell 6) hvis det oppstår hybridiseringsfeil med enten vevsprøve- eller kontrollobjektglassene.

For kliniske prøver er testen uten utfall hvis tolkningen av hybridiseringssignalene er vanskelig og det ikke fins nok prøver til å utføre en ny test. Testen er også uten utfall hvis det er for få celler til å utføre analysen.

Pasientprøver skal kontrolleres i henhold til standard laboratorieprosedyrer. Signalkvaliteten og opptellingsresultatene skal dokumenteres i et eget rapportskjema.

Begrensninger

A. Generelle begrensninger

FISH er en teknikk som krever spesialopplæring i alle aspektene ved prosedyren (inkludert valg av egnede reagenser, vev, fiksering, behandling og klargjøring av objektglass) og tolkningen. Fargingen av vevet avhenger av håndteringen, fikseringen og behandlingen av vevet før det farges. Feil fiksering, frysing, tining, vasking, tørking, oppvarming, snitting eller kontaminering med annet vev eller væsker kan gi morfologiske artefakter, nedbryting av nukleinsyre, bakgrunnsfluorescens eller falske negative resultater. Inkonsekvente resultater kan skyldes variasjoner ved fiksering eller innstøpningsmetoder eller iboende uregelmessigheter i vevet (21). Overdreven eller ufullstendig motfarging kan også gjøre det vanskelig å tolke resultatene riktig.

Uspesifikk farging som resultat av ubunden probe, har et spredt, granulert utseende, og kan ses ved eller langt i fra det forventede hybridiseringspunktet. Bruk intakte celler for å tolke fargerresultatene. Nekrotiske eller degenererte celler kan farges uspesifikt (22). Uventet FISH-farging eller fargevariasjoner kan skyldes endringer i uttrykksnivåene til de kodede genene. Enhver endring i de forventede fargemønstrene skal tolkes sammen med alle andre diagnostiske undersøkelser. Tolkningen av fargingen skal kompletteres med morfologiske studier og bruk av egnet kontrollmateriale, og skal evalueres av en kvalifisert patolog i lys av pasientens kliniske historie og eventuelle andre diagnostiske tester.

Utførelsen av analysen (dvs. vurdering av kontrollmaterialets relevans) og tolkningen av farging og mangel på sådan skal utføres i et offisielt godkjent laboratorium med lisens under oppsyn av en kvalifisert, erfaren patolog, som er ansvarlig for den helhetlige vurderingen av *in situ*-hybridiseringsanalysen og tolkningen av den. Falske positive resultater i FISH kan skyldes kryssreaksjoner mellom proben og andre nukleinsyresekvenser og/eller uspesifikk binding. Egnede kontrollere skal brukes og dokumenteres, og testene skal ta hensyn til alle relevante utløpsdatoer.

Teknisk og tolkningsmessig variasjon kan også forekomme når FISH brukes på materiale avledet fra cellelinjer (23).

B. Produktspesifikke begrensninger

Dette produktet er ikke designet for bruk i andre DNA-baserte diagnoseanalyser.

Ikke erstatt Leica HER2 FISH System - 30 Test reagenser med andre komponenter, verken fra Leica Biosystems eller andre produsenter. Dette vil gjøre analysen ugyldig. Brukeren må selv godkjenne eventuelle avvik fra de anbefalte prosedyrene.

Det anbefales at det bare brukes vev som er fiksert på formalinbaserte fiksativer i analysen. Bruk av andre typer fiksativer kan gjøre analysen ugyldig.

Vevssnitt utenfor det anbefalte tykkelsesområdet godkjennes ikke. Bruk av andre snittykkelser kan gjøre analysen ugyldig.

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

Denne studien undersøkte hvor egnet Leica HER2 FISH System - 30 Test er som hjelpemiddel for å fastsette behandling med Herceptin (trastuzumab). Studien hadde som mål å undersøke konkordansen mellom Leica HER2 FISH System - 30 Test og tidligere godkjent diagnostisk utstyr, Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, som anses som "gullstandarden" for denne analysen av brystvev. Akseptkriteriene for testen var at den nedre grensen for det ensidige 95 %-konfidensintervallet er over 90 % mellom Leica HER2 FISH System - 30 Test og det manuelle settet Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit mellom positive (amplifiserte) og negative (ikke-amplifiserte) formalinfiksede, parafininnstøpte (FFPE) vevsprøver av invasiv brystkreft.

Studien ble utført som en maskert evaluering av klinisk invasive brystkarsinomprøver på tre teststeder. Hvert teststed fikk utlevert arkiverte, formalinfikserte, parafininnstøpte blokker av invasivt brystkarsinomvev med kjente uttryksnivåer for HER2-onkoprotein. En gruppe på 300 prøver med 75, 0/1+ tidligere karakteriserte IHC-tilfeller, 150, 2+ tidligere karakteriserte IHC-tilfeller og 75, 3+ tidligere karakteriserte IHC-tilfeller ble valgt og fordelt likt mellom de tre teststedene.

Alle tilfellene ble farget med det manuelle settet Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit Assay i henhold til produsentens bruksanvisning slik det er spesifisert i pakningsvedlegget. Sekvensielle snitt fra hvert tilfelle ble deretter farget med Leica HER2 FISH System - 30 Test på BOND-MAX and BOND-III System.

Alle de fargede objektglassene ble maskert og vurdert ved hjelp av en randomisert metode av én kvalifisert observatør ved hvert av de tre teststedene. Verdiene ble tolket som negative når det beregnede HER2/CEP17-genforholdet var $<2,0$ og positive når det beregnede HER2/CEP17- genforholdet var $\geq 2,0$. Dataene ble deretter analysert for konkordans og positiv og negativ fargeoverensstemmelse.

2x2-konkordansresultater for BOND-MAX System - Bryst

Dataene ble gruppert som negative ($<2,00$) eller positive ($\geq 2,00$) for en 2x2-analyse. Den observerte overensstemmelsen for 300 prøver mellom de to testene i en 2x2-analyse viser en konkordans på 99,33 % (298/300) med et 95 %-konfidensintervall på 97,61–99,92 % for BOND-MAX System.

Prosentdelen positiv overensstemmelse (sensitivitet), eller Leica HER2 FISH Systems - 30 Test evne til å identifisere positive tilfeller fra Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe-analysen (prosentdelen av prøver som fikk positivt utslag med både Leica HER2 FISH System - 30 Test og det manuelle settet Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit av alle positive tilfeller i Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit), var 99,03 % (102/103).

Prosentdelen negativ overensstemmelse (spesifisitet), eller testens evne til å identifisere de negative tilfellene fra Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit på korrekt måte (prosentdelen av prøver som fikk negativt utslag med Leica HER2 FISH System - 30 Test og Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit av alle negative tilfeller i Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit), var 99,49 % (196/197). Se tabell 4.

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

Total konkordans (95 %-konfidensintervall) = 99,33 % (97,61–99,92 %)

Tabell 4. 2x2-konkordans for Leica HER2 FISH System - 30 Test på BOND-MAX System med Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit på brystvev.

2x2-konkordansresultater for BOND-III System - Bryst

Dataene ble gruppert som negative (<2,0) eller positive (≥2,0) for en 2x2-analyse. Den observerte overensstemmelsen for 300 prøver mellom de to testene i en 2x2-analyse viser en konkordans på 99,67 % (299/300) med et 95 %-konfidensintervall på 98,16–99,99 % for BOND-III System.

Prosentdelen positiv overensstemmelse (sensitivitet), eller Leica HER2 FISH Systems - 30 Test evne til å identifisere positive tilfeller fra Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit-analysen (prosentdelen av prøver som fikk positivt utslag med både Leica HER2 FISH System - 30 Test og det manuelle settet Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit av alle positive tilfeller i Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit), var 99,03 % (102/103).

Prosentdelen negativ overensstemmelse (spesifisitet), eller testens evne til å identifisere de negative tilfellene fra Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit på korrekt måte (prosentdelen av prøver som fikk negativt utslag med Leica HER2 FISH System - 30 Test og Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit av alle negative tilfeller i Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit), var 100 % (197/197). Se tabell 5.

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

Total konkordans (95 %-konfidensintervall) = 99,67 % (98,16–99,99 %)

Tabell 5. 2x2-konkordans for Leica HER2 FISH System - 30 Test på BOND-III System med Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit på brystvev.

Konklusjon: Dataene fra denne studien viser at Leica HER2 FISH System - 30 Test kan brukes som et hjelpemiddel for å bedømme pasienter som vurderes å behandles med Herceptin (trastuzumab). Dette er basert på den høye konkordansen med Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, en diagnostisk test som allerede er godkjent for denne indikasjonen.

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

Denne studien undersøkte hvor egnet Leica HER2 FISH System - 30 Test er som hjelpemiddel for å fastsette behandling med Herceptin (trastuzumab). Studien hadde som mål å undersøke konkordansen mellom Leica HER2 FISH System - 30 Test og tidligere godkjent diagnostisk utstyr, Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, som anses som "gullstandarden" for denne analysen av gastrisk vev. Akseptkriteriene for testen var at den nedre grensen for det ensidige 95 %-konfidensintervallet er over 90 % mellom Leica HER2 FISH System - 30 Test og det manuelle settet Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit mellom positive (amplifiserte) og negative (ikke-amplifiserte) formalinfikserte, paraffinnstøpte (FFPE) vevsprøver av adenokarsinomer i magen (inkludert gastroøsofagal overgang).

Studien ble utført som en evaluering av klinisk invasive prøver av adenokarsinomer i magen. Testingen ble utført på arkivert, formalinfikserte, paraffinnstøpte blokker av gastrisk adenokarsinomvev med kjente uttrykksnivåer for HER2-genet. En gruppe på 109 prøver med 50 amplifiserte og 59 ikke-amplifiserte tilfeller.

Alle tilfellene ble farget med det manuelle settet Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit Assay i henhold til produsentens bruksanvisning slik det er spesifisert i pakningsvedlegget. Sekvensielle snitt fra hvert tilfelle ble deretter farget med Leica HER2 FISH System - 30 Test på BOND-MAX System.

Alle de fargede objektglassene ble vurdert ved hjelp av en randomisert metode av én kvalifisert observatør. Verdiene ble tolket som negative når det beregnede HER2/CEP17-genforholdet var $<2,0$ og positive når det beregnede HER2/CEP17-genforholdet var $\geq 2,0$. Dataene ble deretter analysert for konkordans og positiv og negativ fargeoverensstemmelse.

2x2-konkordansresultater BOND-MAX System - Mage

Dataene ble gruppert som negative ($<2,00$) eller positive ($\geq 2,00$) for en 2x2-analyse. Den observerte overensstemmelsen for 109 prøver mellom de to testene i en 2x2-analyse viser en konkordans på 98,17 % (107/109) med et 95 %-konfidensintervall på 93,53–99,78 % for BOND-MAX System.

Prosentdelen positiv overensstemmelse (sensitivitet) eller Leica HER2 FISH System - 30 Test sin evne til å identifisere positive tilfeller fra Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe-analysen (prosentdelen av prøver som fikk positivt utslag med både Leica HER2 FISH System - 30 Test og det manuelle settet Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit av alle positive tilfeller i Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit), var 96,00 % (48/50).

Prosentdelen negativ overensstemmelse (spesifisitet), eller testens evne til å identifisere de negative tilfellene fra Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit på korrekt måte (prosentdelen av prøver som fikk negativt utslag med Leica HER2 FISH System - 30 Test og Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit av alle negative tilfeller i Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit), var 100 % (59/59). Se tabell 6.

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

Total konkordans (95 %-konfidensintervall) = 98,17 % (93,53–99,78 %)

Tabell 6. 2x2-konkordans for Leica HER2 FISH System - 30 Test på BOND-MAX System med Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit på magevev.

Presisjonstesting – BOND-MAX System

A. Presisjonsstudie under kjøring

Presisjonsstudien under kjøring ble utført randomisert og blindet. Presisjonstesten av Leica HER2 FISH System - 30 Test under kjøring ble evaluert ved ett teststed på 540 tidligere HER2-karakteriserte TMA-prøver med formalinfikserte, parafininnstøpte brystkrefttilfeller. Det at TMA-prøver ble brukt for å bedømme presisjonen under kjøring, gjorde det mulig å bruke en større mengde tilfeller, som dekket et bredere område med HER2-uttrykk, i den samme kjøringen på ett instrument.

Under opptellingen av objektglassene som var farget i presisjonsstudien under kjøring, viste 532/540 evaluerte tilfeller et konkordansresultat som ga en samlet konkordans på 98,52 % med et nedre 95 %-konfidensintervall på 97,10 %.

B. Presisjonsstudie i instrument

Presisjonsstudien i instrument ble utført randomisert og blindet. Presisjonstesten av Leica HER2 FISH System - 30 Test i instrumentet ble evaluert ved ett teststed på 1620 tidligere HER2-karakteriserte TMA-prøver med formalinfikserte, parafininnstøpte brystkrefttilfeller. Det at TMA-prøver ble brukt for å bedømme presisjonen i instrumentet, gjorde det mulig å bruke en større mengde tilfeller, som dekket et bredere område med HER2-uttrykk, i flere kjøringer på ett instrument.

Under opptellingen av objektglassene som var farget i presisjonsstudien i instrument, viste 1620/1620 evaluerte tilfeller et konkordansresultat som ga en samlet konkordans på 100 % med et nedre 95 %-konfidensintervall på 99,82 %.

C. Presisjonsstudie mellom kjøringer

Presisjonsstudien mellom kjøringer ble utført randomisert og blindet. Presisjonstesten av Leica HER2 FISH System - 30 Test mellom kjøringer ble evaluert ved ett teststed på 900 tidligere HER2-karakteriserte TMA-prøver med formalinfikserte, parafininnstøpte brystkrefttilfeller. Det at TMA-prøver ble brukt for å bedømme daglig presisjonstesting mellom kjøringer, gjorde det mulig å teste en større mengde tilfeller, som dekket et bredere område med HER2-uttrykk, mellom kjøringer på ulike dager.

Under opptellingen av objektglassene som var farget i presisjonsstudien mellom kjøringer, viste 894/900 evaluerte tilfeller et konkordansresultat som ga en samlet konkordans på 99,33 % med et nedre 95 %-konfidensintervall på 98,55 %.

D. Presisjonsstudie mellom laboratorier

Presisjonsstudien mellom laboratorier ble utført randomisert og blindet. Presisjonstesten av Leica HER2 FISH System - 30 Test mellom laboratorier ble evaluert ved tre teststeder på 513 tidligere HER2-karakteriserte TMA-prøver med formalinfikserte, parafininnstøpte brystkrefttilfeller. Det at TMA-prøver ble brukt for å bedømme presisjon mellom laboratorier, gjorde det mulig å teste en større mengde tilfeller, som dekket et bredere område med HER2-uttrykk, mellom kjøringer på flere instrumenter.

Under opptellingen av objektglassene som var farget i presisjonsstudien mellom laboratorier, viste 510/513 evaluerte tilfeller et konkordansresultat som ga en samlet konkordans på 99,42 % med et nedre 95 %-konfidensintervall på 98,30 %.

E. Presisjonsstudie mellom observatører

Presisjonsstudien mellom observatører ble utført randomisert og blindet. Reproduerbarhetstesten mellom observatører av Leica HER2 FISH System - 30 Test ble evaluert ved tre teststeder. Det ble benyttet én kvalifisert observatør ved hvert av de tre teststedene. Atten komplette snitt fra brystkrefttilfeller ble brukt for å bedømme presisjonen mellom observatørene, noe som gjenspeiler prøvetyperne som brukes i klinisk sammenheng.

Under opptellingen av objektglassene som var farget i presisjonsstudien mellom observatører, viste 53/54 evaluerte tilfeller et konkordansresultat som ga en samlet konkordans på 98,15 % med et nedre 95 %-konfidensintervall på 90,11 %.

F. Presisjonsstudie mellom partier

Presisjonsstudien mellom partier ble utført randomisert og blindet. Presisjonen mellom partier ble bestemt ved hjelp av tre partier av Leica HER2 FISH System - 30 Test, som ble fremstilt separat og i samsvar med god tilvirkningspraksis (GMP). Hvert parti ble testet på ett teststed på 540 tidligere HER2-karakteriserte TMA-prøver med formalinfikserte, parafininnstøpte brystkrefttilfeller. Det at TMA-prøver ble brukt for å fastsette reproduserbarheten mellom partier, gjorde det mulig å teste en større mengde tilfeller, som dekket et bredere område med HER2-uttrykk, mellom partiene.

Under opptellingen av objektglassene som var farget i presisjonsstudien mellom partier, viste 534/540 evaluerte tilfeller et konkordansresultat som ga en samlet konkordans på 98,89 % med et nedre 95 %-konfidensintervall på 97,60 %.

Presisjonstesting – BOND-III System

G. Presisjonsstudie under kjøring

Presisjonsstudien under kjøring ble utført randomisert og blindet. Presisjonstesten av Leica HER2 FISH System - 30 Test under kjøring ble evaluert ved ett teststed på 540 tidligere HER2-karakteriserte TMA-prøver med formalinfikserte, parafininnstøpte brystkrefttilfeller. Det at TMA-prøver ble brukt for å bedømme presisjonen under kjøring, gjorde det mulig å bruke en større mengde tilfeller, som dekket et bredere område med HER2-uttrykk, i den samme kjøringen på ett instrument.

Under opptellingen av objektglassene som var farget i presisjonsstudien under kjøring, viste 530/540 evaluerte tilfeller et konkordansresultat som ga en samlet konkordans på 100 % med et nedre 95 %-konfidensintervall på 99,45 %.

H. Presisjonsstudie i instrument

Presisjonsstudien i instrument ble utført randomisert og blindet. Presisjonstesten av Leica HER2 FISH System - 30 Test i instrumentet ble evaluert ved ett teststed på 1620 tidligere HER2-karakteriserte TMA-prøver med formalinfikserte, parafininnstøpte brystkrefttilfeller. Det at TMA-prøver ble brukt for å bedømme presisjonen i instrumentet, gjorde det mulig å bruke en større mengde tilfeller, som dekket et bredere område med HER2-uttrykk, i flere kjøringer på ett instrument.

Under opptellingen av objektglassene som var farget i presisjonsstudien under kjøring, viste 1620/1620 evaluerte tilfeller et konkordansresultat som ga en samlet konkordans på 100 % med et nedre 95 %-konfidensintervall på 99,82 %.

I. Presisjonsstudie mellom kjøringer

Presisjonsstudien mellom kjøringer ble utført randomisert og blindet. Presisjonstesten av Leica HER2 FISH System - 30 Test mellom kjøringer ble evaluert ved ett teststed på 900 tidligere HER2-karakteriserte TMA-prøver med formalinfikserte, parafininnstøpte brystkrefttilfeller. Det at TMA-prøver ble brukt for å bedømme daglig presisjonstesting mellom kjøringer, gjorde det mulig å teste en større mengde tilfeller, som dekket et bredere område med HER2-uttrykk, mellom kjøringer på ulike dager.

Under opptellingen av objektglassene som var farget i presisjonsstudien mellom kjøringer, viste 891/900 evaluerte tilfeller et konkordansresultat som ga en samlet konkordans på 99,00 % med et nedre 95 %-konfidensintervall på 98,11 %.

J. Presisjonsstudie mellom laboratorier

Presisjonsstudien mellom laboratorier ble utført randomisert og blindet. Presisjonstesten av Leica HER2 FISH System - 30 Test mellom laboratorier ble evaluert ved tre teststeder på 513 tidligere HER2-karakteriserte TMA-prøver med formalinfikserte, parafininnstøpte brystkrefttilfeller. Det at TMA-prøver ble brukt for å bedømme presisjon mellom laboratorier, gjorde det mulig å teste en større mengde tilfeller, som dekket et bredere område med HER2-uttrykk, mellom kjøringer på flere instrumenter.

Under opptellingen av objektglassene som var farget i presisjonsstudien mellom laboratorier, viste 511/513 evaluerte tilfeller et konkordansresultat som ga en samlet konkordans på 99,61 % med et nedre 95 %-konfidensintervall på 98,60 %.

K. Presisjonsstudie mellom observatører

Presisjonsstudien mellom observatører ble utført randomisert og blindet. Reproduerbarhetstesten mellom observatører av Leica HER2 FISH System - 30 Test ble evaluert ved tre teststeder. Det ble benyttet én kvalifisert observatør ved hvert av de tre teststedene. Atten komplette snitt fra brystkrefttilfeller ble brukt for å bedømme presisjonen mellom observatørene, noe som gjenspeiler prøvetypene som brukes i klinisk sammenheng. Under opptellingen av objektglassene som var farget i presisjonsstudien mellom observatører, viste 53/54 evaluerte tilfeller et konkordansresultat som ga en samlet konkordans på 98,15 % med et nedre 95 %-konfidensintervall på 90,11 %.

L. Presisjonsstudie mellom partier

Presisjonsstudien mellom partier ble utført randomisert og blindet. Presisjonen mellom partier ble bestemt ved hjelp av tre partier av Leica HER2 FISH System - 30 Test, som ble fremstilt separat og i samsvar med god tilvirkningspraksis (GMP). Hvert parti ble testet på ett teststed på 540 tidligere HER2-karakteriserte TMA-prøver med formalinfikserte, parafininnstøpte brystkrefttilfeller. Det at TMA-prøver ble brukt for å fastsette reproduerbarheten mellom partier, gjorde det mulig å teste en større mengde tilfeller, som dekket et bredere område med HER2-uttrykk, mellom partiene.

Under opptellingen av objektglassene som var farget i presisjonsstudien mellom partier, viste 540/540 evaluerte tilfeller et konkordansresultat som ga en samlet konkordans på 100 % med et nedre 95 %-konfidensintervall på 99,45 %.

Analysstyrke

Det er foretatt analysestyrkestudier av BOND-MAX and BOND-III System for å fastslå analysens toleranseområde for HIER-tid og -temperatur, EIER-tid, -temperatur og -konsentrasjon, denatureringstid og -temperatur, hybridiseringstid og -temperatur samt tid og temperatur for stringensvask. Analysestyrkestudier med standardprotokollen for BOND-MAX and BOND- III System ble også foretatt utenfor de anbefalte temperatur- og fuktighetsgrensene som defineres i FDA/ORA-veiledningen ORA LAB5.3 Rev1.7.

- Det ble ikke observert forskjeller i amplifiseringsstatusen når standardtemperaturen for hvert varmeavhengig trinn ble økt eller redusert med 4 °C i forhold til standardprotokollen for Leica HER2 FISH System - 30 Test. Vurderingene hadde høyest kvalitet ved standardtemperaturene, og disse temperaturene anbefales.
- Det ble ikke observert forskjeller i amplifiseringsstatusen når HIER-tiden (heat induced epitope retrieval) var 20 minutter og 30 minutter ved 97 °C med BOND ER1-løsning sammenlignet med standardprotokollen for Leica HER2 FISH System - 30 Test. Vurderingene hadde høyest kvalitet ved standardtiden på 25 minutter, og denne inkuberingstiden anbefales.
- Det ble ikke observert forskjeller i amplifiseringsstatusen når EIER-tiden (enzyme induced epitope retrieval) var 15 minutter og 35 minutter ved 37 °C sammenlignet med standardprotokollen for Leica HER2 FISH System - 30 Test. Vurderingene hadde høyest kvalitet ved standardtiden på 25 minutter, og denne inkuberingstiden anbefales.
- Det ble ikke observert forskjeller i amplifiseringsstatusen når EIER-enzymkonsentrasjonen ble utført med enzymkonsentrat-/enzymfortynningsløsninger på 1:200 og 1:500 ved bruk av standardprotokollen for Leica HER2 FISH System - 30 Test. Vurderingene hadde høyest kvalitet ved standardkonsentrasjonen på 1:300, og denne løsningen anbefales.
- Det ble ikke observert forskjeller i amplifiseringsstatusen når denatureringstiden som ble benyttet, var 5 minutter og 15 minutter sammenlignet med standardprotokollen for Leica HER2 FISH System - 30 Test. Vurderingene hadde høyest kvalitet ved standardtiden på 10 minutter, og denne denatureringstiden anbefales.
- Det ble ikke observert forskjeller i amplifiseringsstatusen når hybridiseringstiden som ble benyttet, var 9 timer og 15 timer sammenlignet med standardprotokollen for Leica HER2 FISH System - 30 Test. Vurderingene hadde høyest kvalitet ved standardtiden på 12 timer, og denne hybridiseringstiden anbefales.
- Det ble ikke observert forskjeller i amplifiseringsstatusen når tiden for posthybridiseringsvask var 2 minutter, 5 minutter og 7 minutter sammenlignet med standardprotokollen for Leica HER2 FISH System - 30 Test. Vurderingene hadde høyest kvalitet ved standardtiden på 4 minutter, og denne tiden for posthybridiseringsvask anbefales.
- Det ble ikke observert forskjeller i amplifiseringsstatusen når Leica HER2 FISH System - 30 Test ble utført ved 28 °C og 30 % relativ fuktighet og ved 16 °C og 80 % relativ fuktighet sammenlignet med når standardprotokollen for Leica HER2 FISH System - 30 Test ble utført ved romtemperatur og -fuktighet.

Prosesser utført utenfor de anbefalte analysestyrkeparametrene som ble kontrollert, er ikke godkjent. Bruk av andre analyseparametre kan gjøre testen ugyldig.

Teksten ovenfor beskriver betingelsene som ble testet og resultatene fra studien. Vær oppmerksom på at Leica ikke testet alle mulige kombinasjoner av betingelsene. Det anbefales ikke å bruke verdier som ikke samsvarer med standarden for de ulike betingelsene. Standard Leica HER2 FISH Staining Protocol er oppgitt i tabell 2.

Feilsøking

Problem	Sannsynlig årsak	Tiltak
Ingen eller svakt fluorescerende signaler/farging	Feil fiksering eller behandling av testobjekt	Pass på at et formalin-basert fiksativ brukes og at behandlingsplanene passer for prøven som testes.
	Leica HER2 FISH System - 30 Test brukes utenom den angitte utløpsdatoen.	Forviss deg om at Leica HER2 FISH System - 30 Test brukes innen den angitte utløpsdatoen.
	Feil valg av protokoll	Forviss deg om at *FISH Protocol A er satt som standard i protokollfeltet for farging i dialogen Add slide.
	Feil dosering av bulkreagenser	Forviss deg om at BOND-reagenser har blitt tilordnet passende bulkbeholdere og plassert i riktige posisjoner i instrumentet.
	Utilstrekkelig deparafinering av objektglass	Forviss deg om at *Dewax mode er valgt i feltet Klargjøring i dialogen Add slide.
	Feil forbehandling	Forviss deg om at standard forbehandlingsprotokoller (HIER og Enzymatic Digestion) er valgt. Juster forbehandlingsprotokollen (HIER eller Enzymatic Digestion) om nødvendig.
	Utilstrekkelig denaturering	Forviss deg om at standard denaturering *D10 er valgt.
	Utilstrekkelig hybridisering	Forviss deg om at passende standard hybridisering *H12 er valgt. Utvid hybridiseringstid om nødvendig.
	Overflødig posthybridisering vask	Reduser inkuberingstiden for posthybridiseringsvask.
	Kjøring avbrutt før fullført	Bruk BOND-programvaren til å bekrefte at rapporterbare feil oppstod under fargekjøringen og følg instruksjonene som angitt av BOND-programvaren, for å rette feilen.
	Feil fluorescensmikroskopiutstyr <ul style="list-style-type: none"> • Feil filtersett • Feil lampe • Utgått lampe • Feil oljetype 	Forviss deg om at fluorescensmikroskopiutstyret som brukes, passer til analysen som utføres, bekreft: <ul style="list-style-type: none"> • Korrekt filtersett • Korrekt lampe • God lampestyrke • Korrekt olje for bruk til oljeneddypingsmikroskopi
	Overeksponering for UV-lys (fotobleking)	Oppbevar objektglass i mørke omgivelser før og etter vurdering for å opprettholde fluorescente signaler. Oppbevar objektglass ved -20 °C for å opprettholde signalet over lengre tid.

Problem	Sannsynlig årsak	Tiltak
Uspesifikt fluorescerende signal/farging av bakgrunn	Utilstrekkelig posthybridisering vask	Utvid inkuberingsrommet for posthybridiseringsvask.
	Feil dosering av bulkreagenser	Forviss deg om at BOND-reagenser har blitt tilordnet passende bulkbeholdere og plassert i riktige posisjoner i instrumentet.
	Utilstrekkelig deparafinering av objektglass	Forviss deg om at *Dewax-modus er valgt i feltet Klargjøring i dialogen Add slide.
	Ikke-spesifikk kryssreaksjon med områder med dødt vev	Pass på at et formalin-basert fiksativ brukes og at behandlingsplanene passer for prøven som testes. Om mulig, test tilfellet på nytt med en annen blokk. Hvis dette ikke er mulig, vurder sammen med et korresponderende H & E-farget snitt, og velg områdene med de beste fikseringsmønstrene.
	Snitt festes til objektglass ved hjelp av alternative klebestoffer	Bruk BOND Plus Slides (S21.2113).
Dårlig bevaring av vevsmorfologi	Utilstrekkelig vevsfiksering og behandling	Pass på at et formalin-basert fiksativ brukes og at behandlingsplanene passer for prøven som testes. Om mulig, test tilfellet på nytt med en annen blokk. Hvis dette ikke er mulig, vurder sammen med et korresponderende H & E-farget snitt, og velg områdene med de beste fikseringsmønstrene.
	Feil forbehandling	Juster forbehandlingsprotokollen (HIER eller Enzymatic Digestion).
Vev løsner fra pasient-/kontrollobjektglass	Bruk av feil type objektglass eller utilstrekkelig drenering av snitt	Forviss deg om at riktige objektglass brukes for pasient-/kontrollsnitt (f.eks. BOND Plus Slides S21.2113). Forviss deg om at objektglass dreneres tilstrekkelig og inkuberes i 1 time ved 60 °C.

Tabell 7: Feilsøkingsoversikt for Leica HER2 FISH System - 30 Test.

Hvis det oppstår problemer med Leica HER2 FISH System - 30 Test som ikke finnes i feilsøkingsoversikten, kan du kontakte din lokale Leica Biosystems-serviceavdeling eller -forhandler for å få hjelp.

Referanser

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.

Lisensavtale

Dette produktet inneholder PathVysion FISH-prober fra Abbott Molecular Inc.

PathVysion, LSI og CEP er varemerker som tilhører Abbott Molecular Inc. Med enerett. Brukes med lisens.









Endringer i forhold til forrige utgave

Mage data lagt.

Utgivelsesdato

17 juli 2015

Symbolforklaring

 LOT	Batchkode		Oppbevaring	 REF	Katalognummer
 IVD	<i>In vitro</i> -diagnostisk medisinsk utstyr		Produsent	SN	Serienummer
	Se bruksanvisningen		Innholdet er tilstrekkelig for <n> tester		Brukes innen / utløpsdato (år-måned-dag)

Herceptin er et varemerke som tilhører Genentech, Inc. og F. Hoffmann-La Roche Ltd.