

Leica HER2 FISH System – 30 Test

Instrukcja obsługi

Do stosowania w systemie Leica Biosystems' BOND-MAX i BOND-III.

TA9217 to produkt do fluorescencyjnej hybrydacji *in situ*, przeznaczony do wykonania 30 Test (30 szkiełek barwionych LSI HER2/CEP17 Dual Probe).



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



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

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

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

Rx only

Spis treści

Przeznaczenie	3
Do zastosowania diagnostycznego <i>in vitro</i>	3
Wymagane przeszkolenie	3
Podsumowanie i objaśnienia	3
Wprowadzenie	3
Podsumowanie zgodności klinicznej BOND-MAX System	4
Podsumowanie zgodności klinicznej BOND-III System	4
Zasada procedury	5
Załączone składniki	5
Instrukcje obsługi	5
Przechowywanie i stabilność	6
Przygotowanie preparatów	6
Ostrzeżenia	6
Procedura	6
A. Odczynniki wymagane, lecz niedołączone	6
B. Sprzęt wymagany, lecz niedołączony	7
C. Metodologia	7
D. Bond Enzyme Obróbka wstępna	7
E. Standardowy protokół znakowania	7
F. Kroki procedury	8
G. Przechowywanie szkiełek	9
Ocena i pomiar sygnału	10
Zalecana metoda określenia współczynnika LSI HER2 do CEP17	11
Leica HER2 FISH System – 30 Test Instrukcja interpretacji	12
Karta zliczeń	13
Kontrola jakości	14
Ograniczenia	15
A. Ograniczenia ogólne	15
B. Ograniczenia produktu	15
Zgodność kliniczna Leica HER2 FISH System – 30 Test z Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Sutek	15
Wyniki zgodności 2x2 BOND-MAX System - Sutek	16
Wyniki zgodności 2x2 BOND-III System - Sutek	17
Zgodność kliniczna produktów Leica HER2 FISH System - 30 Test z Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Żołądek	18
2x2 Wyniki zgodności systemu BOND-MAX System - Żołądek	18
Testowanie precyzji – system BOND-MAX	20
A. Badanie precyzji w ramach partii materiału	20
B. Badanie precyzji urządzenia	20
C. Badanie precyzji na różnych partiach materiału	20
D. Badanie precyzji różnych laboratoriów	20
E. Badanie precyzji różnych obserwatorów	20
F. Badanie precyzji różnych partii odczynników	21
Testowanie precyzji – system BOND-III	21
G. Badanie precyzji w ramach partii materiału	21
H. Badanie precyzji urządzenia	21
I. Badanie precyzji na różnych partiach materiału	21
J. Badanie precyzji różnych laboratoriów	22
K. Badanie precyzji różnych obserwatorów	22
L. Badanie precyzji różnych partii odczynników	22
Powtarzalność testu	22
Usuwanie problemów	24
Literatura	26
Umowa licencyjna	27

Przeznaczenie

Do zastosowania diagnostycznego *in vitro*

Leica HER2 FISH System – 30 Test jest przeznaczony do wykrywania amplifikacji genu HER2/neu za pomocą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) w utrwalonych za pomocą formaliny, zatopionych w parafinie próbkach ludzkich tkanek raka sutka i gruczolakoraka żołądka (w tym połączenia żołądkowo-przelykowego). Leica HER2 FISH System – 30 Test jest pomyślany jako pomoc w ocenie pacjentów, u których rozważane jest leczenie preparatem Herceptin® (trastuzumab) (patrz ulotka Herceptin). Leica HER2 FISH System – 30 Test nie jest przeznaczony do badań przesiewowych ani diagnostyki raka sutka. Konieczne jest także wzięcie pod uwagę wszystkich innych dostępnych danych klinicznych, takich jak wielkość guza, liczba zajętych węzłów chłonnych i status receptorów steroidowych. Nie wolno podejmować decyzji o leczeniu raka sutka jedynie na podstawie statusu amplifikacji genu HER2.

Uwaga: Wszyscy pacjenci w Herceptinbadaniach klinicznych dotyczących preparatu zostali wybrani przy pomocy eksperymentalnego testu immunocytochemicznego Clinical Trial Assay (CTA). Żaden z tych pacjentów nie był wybrany na podstawie Leica HER2 FISH System – 30 Test. Leica HER2 FISH System – 30 Test został porównany do zestawu Abbott Molecular PathVysion® HER-2 DNA Probe Kit na podstawie niezależnej puli próbek. Stwierdzono, że zapewnia on dopuszczalny poziom zgodnych wyników, co wykazano w podsumowaniu zgodności klinicznej. Nie ustalono rzeczywistej korelacji wyników Leica HER2 FISH System – 30 Test z efektem klinicznym.

Wszyscy pacjenci w badaniach klinicznych dotyczących zaawansowanego raka żołądka Herceptin (ToGA) zostali wybrani na podstawie testu Dako HercepTest. Żaden z tych pacjentów nie był wybrany na podstawie Leica HER2 FISH System - 30 Test. System Leica HER2 FISH System - 30 Test został porównany z zestawem Abbott Molecular PathVysion* HER-2 DNA Probe Kit na podstawie niezależnej puli próbek. Stwierdzono, że zapewnia on dopuszczalny poziom zgodnych wyników, co wykazano w podsumowaniu zgodności klinicznej. Nie ustalono rzeczywistej korelacji wyników systemu Leica HER2 FISH System - 30 Test z efektem klinicznym.

* Herceptin® jest znakiem handlowym Genentech, Inc. ,a F. Hoffmann-La Roche Ltd. PathVysion® jest znakiem handlowym Abbott Molecular Inc. Wszystkie prawa zastrzeżone. Wykorzystano na podstawie licencji.

Wymagane przeszkolenie

Leica Biosystems zapewnia szkolenie w zakresie przygotowania preparatów, procedury testu i interpretacji testu FISH genu HER2 dla wszystkich użytkowników.

Podsumowanie i objaśnienia

Wprowadzenie

Gen HER2, znany również jako neu lub c-erbB2, jest umiejscowiony na ramieniu długim chromosomu 17, w pozycji 17q11-12 (1). Zarówno gen HER2 jak i kodowane przez niego białko 185 kD odgrywają ważną rolę w transformacji nowotworowej i progresji raka sutka (2).

HER2 funkcjonuje jako marker rokowniczy, ponieważ zarówno amplifikacja genu jak i nadekspresja białka są związane z podwyższoną częstością nawrotu choroby i większą śmiertelnością. HER2 jest również markerem predykcyjnym dla niektórych rodzajów chemoterapii i terapii celowanej (3). Wykazano, że amplifikacja genu HER2 jest wskaźnikiem złego rokowania w raku sutka zajmującym węzły chłonne (4-8). Co więcej, jedno z badań przemawia za tym, że wartość prognostyczna HER2 jest większa wśród pacjentów leczonych chemoterapią (7). Jednakże przy przewidywaniu przeżycia bez nawrotu i całkowitego u poszczególnych pacjentów należy również brać pod uwagę inne uznane czynniki rokownicze, takie jak wielkość guza, liczba pozytywnych węzłów chłonnych i status receptorów steroidowych.

Nadekspresja onkoproteiny HER2 jako wynik amplifikacji genu stwierdzanej w komórkach raka sutka, sugeruje HER2 jako cel terapii opartej na przeciwciałach (3) - podczas gdy wyniki badania ToGA jednoznacznie wskazują, że zastosowanie Herceptin w raku żołądka razem

z chemioterapią stanowi skuteczne leczenie, które poprawia ogólne przeżycie w przypadku HER2 pozytywnego raka żołądka (9). Herceptin (trastuzumab), humanizowane przeciwciało monoklonalne (10) wiążące się z dużym powinowactwem z onkoproteiną HER2 blokuje proliferację ludzkich komórek nowotworowych wykazujących nadekspresję onkoproteiny HER2, zarówno *in vitro* jak i *in vivo* (11-13). Od czasu wynalezienia preparatu Herceptin, wykrywanie genu HER2 i białka stały się podstawowymi narzędziami w ocenie guzów sutka, kierującymi zarówno doбором terapii jak i mającymi wpływ na prowadzenie pacjenta (14,15).

W liniach komórkowych pochodzących z ludzkiego raka sutka, zarówno w interfazie jak i metafazie, FISH służy do wykazania amplifikacji genu HER2 (16-19). HER2 Jeśli chodzi o oznaczenie ilościowe amplifikacji genu HER2, ocenia poziom amplifikacji FISH bezpośrednio w komórkach nowotworowych. Charakterystyczna morfologia tkanki i dystrybucja przestrzenna kopii onkogenu w poszczególnych niehodowlanych pierwotnych komórkach raka sutka są zachowane. Również aberracja w licznie kopii chromosomu 17 (aneusomia) jest często stwierdzana w raku sutka. Może się ona przejawiać jako delecja lub zwielokrotnienie kopii chromosomu (polisomia). Tego rodzaju zmiany chromosomowe mają duży wpływ na interpretację i wykazywanie statusu amplifikacji genu HER2. Dlatego też pomiar liczby kopii chromosomu 17 oraz HER2 jest bardzo istotny (4).

Leica HER2 FISH System – 30 Test zawiera sondę DNA LSI HER2, sondę DNA 226 Kb SpectrumOrange™ bezpośrednią znakowaną fluorescencyjnie, swoistą dla locus genu HER2 (17q11.2-q12) oraz sondę DNA CEP17, sondę DNA 5,4 Kb SpectrumGreen™ bezpośrednio znakowaną fluorescencyjnie, swoistą dla satelitarnej sekwencji DNA alfa w centromerowym regionie chromosomu 17 (17p11.1-q11.1). Roztwór sond jest specjalnie przygotowany i zwalidowany do użycia w systemie BOND-MAX i BOND-III i nie powinien być modyfikowany ani wykorzystywany w oznaczeniach ręcznych.

Podsumowanie zgodności klinicznej BOND-MAX System

Leica HER2 FISH System – 30 Test został opracowany w celu zapewnienia w pełni automatycznej alternatywy dla obecnych technik stosowanych w celu określenia statusu amplifikacji genu HER2. Funkcjonowanie Leica HER2 FISH System – 30 Test w systemie BOND-MAX oceniano w niezależnym badaniu, porównującym wyniki Leica HER2 FISH System – 30 Test z zestawem Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit na 300 próbkach raka sutka oraz na 109 gruczolakorakach żołądka (w tym połączenia żołądkowo-przelykowego). Żadna z próbek guza nie została uzyskana od pacjenta z badań klinicznych Herceptin. Wyniki uzyskane na tkance sutka wskazywały na zgodność 99,33% w analizie 2x2 (przedział ufności 95%: 97,61–99,92%). Wyniki z gruczolakoraka żołądka (w tym połączenia żołądkowo-przelykowego) wskazywały na zgodność 98,17% w analizie 2x2 (przedział ufności 95%: 93,53–99,78%). Dane zgodności wykazały, że istnieje bardzo duże prawdopodobieństwo, iż wynik pozytywny w teście Leica HER2 FISH System – 30 Test będzie korespondował z wynikiem pozytywnym testu Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit. Wynik testu Leica HER2 FISH System – 30 Test jest interpretowany jako negatywny dla amplifikacji genu HER2, gdy współczynnik genów HER2:CEP17 jest mniejszy niż 2,0, a pozytywny, gdy współczynnik genów HER2:CEP17 jest większy lub równy 2,0. Niejednoznaczne (graniczne) wyniki pojawiają się wtedy, gdy współczynnik genów HER2:CEP17 jest między 1,8-2,2. Takie przypadki należy interpretować ostrożnie. Policzyć dodatkowe 20 jąder i przeliczyć współczynnik.

Podsumowanie zgodności klinicznej BOND-III System

Leica HER2 FISH System – 30 Test został opracowany w celu zapewnienia w pełni automatycznej alternatywy dla obecnych technik stosowanych w celu określenia statusu amplifikacji genu HER2. Funkcjonowanie Leica HER2 FISH System – 30 Test w systemie BOND-III oceniano w niezależnym badaniu, porównującym wyniki Leica HER2 FISH System – 30 Test z testem Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit na 300 próbkach guza sutka.

Żadna z próbek guza nie została uzyskana od pacjenta z badań klinicznych Herceptin. Wyniki wykazały zgodność na poziomie 99,67% przy analizie 2x2 (przedział ufności 95%: 98,16-99,99%). Dane zgodności wykazały, że istnieje bardzo duże prawdopodobieństwo, iż wynik pozytywny w teście Leica HER2 FISH System – 30 Test będzie korespondował z wynikiem pozytywnym testu Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit. Wynik testu Leica HER2 FISH System – 30 Test jest interpretowany jako negatywny dla amplifikacji genu HER2, gdy współczynnik genów HER2:CEP17 jest mniejszy niż 2,0, a pozytywny, gdy współczynnik genów HER2:CEP17 jest większy lub równy 2,0. Niejednoznaczne (graniczne) wyniki pojawiają się wtedy, gdy współczynnik genów HER2:CEP17 jest między 1,8-2,2. Takie przypadki należy interpretować ostrożnie. Policzyć dodatkowe 20 jąder i przeliczyć współczynnik.

Zasada procedury

Leica HER2 FISH System – 30 Test zawiera składniki potrzebne do wykonania procedury barwienia fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* na utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie tkankach. Po odpowiedniej obróbce wstępnej, inkubacji z gotową do użycia sondą LSI HER2/CEP17 Dual Probe i odpowiednim przepłukaniu, skrawki tkanek są odwadniane i zamykane w DAPI. Wyniki są interpretowane przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego i zalecanych filtrów o odpowiednich długościach fali.

Leica HER2 FISH System – 30 Test przeznaczony jest do użycia wyłącznie w systemie BOND-MAX i BOND-III.

Załączone składniki

Wymienione poniżej materiały (Tabela 1) są wystarczające do oznakowania 30 Test (30 szkiełek barwionych LSI HER2/CEP17 Dual Probe).

LSI HER2/CEP17 Probe 6,6 ml	Zawiera gotową do użycia LSI HER2/CEP17 Dual Probe. Zawiera <60% (v/v) formamidu.
Post Hybridization Wash 2 9 ml	Zawiera gotowy do użycia roztwór do płukania po hybrydyzacji. Zawiera <50% (v/v) formamidu.
BOND Enzyme Concentrate 2 1 ml	Zawiera roztwór proteinazy K w stężeniu 1,7 mg/ml.
BOND Enzyme Diluent 65 ml	Zawiera roztwór do rozpuszczania enzymu. Zawiera 0,035% 2-metyloizotiazol-3(2H)-on.
BOND Open Container 3 x 7 ml	BOND Open Container na Enzyme 5.

Tabela 1: Leica HER2 FISH System – 30 Test Składniki

Więcej informacji dotyczących bezpieczeństwa produktów znaleźć można w poszczególnych MSDS dostępnych na stronie www.LeicaBiosystems.com/TA9217-IFU

Instrukcja obsługi

Wszystkie załączone odczynniki są przygotowane specjalnie do użycia w niniejszym teście. Numery partii odpowiadają danemu testowi Leica HER2 FISH System – 30 Test. Aby test dał wiarygodne wyniki, nie wolno zamieniać żadnych odczynników.

Przechowywanie i stabilność

Przechowywać w temperaturze 2–8 °C. Nie zamrażać. Wstawić do temp. 2–8 °C natychmiast po użyciu. Wszelkie odstępstwa od tych warunków spowodują niewiarygodność testu. Upewnić się, że test Leica HER2 FISH System – 30 Test jest stosowany przed datą przydatności do użycia. Objawami zanieczyszczenia i/lub niestabilności Leica HER2 FISH System – 30 Test są zmętnienie roztworów (oprócz roztworu sond) i pojawienie się zapachu. Użytkownik musi sprawdzić, czy warunki przechowywania nie różnią się od powyższych.

Przygotowanie preparatów

Do wszystkich preparatów należy zastosować standardowe metody obróbki tkanek (20). Zaleca się, by tkanki były przygotowane w utrwalaczach na bazie formaliny, rutynowo opracowywane i zatapiane w parafinie. Na przykład, próbki można pokroić na grubość 3–4 mm i utrwalać przez 18–24 godzin w 10 % neutralnej parafinie. Następnie tkanki należy odwozić w kolejnych rozcieńczeniach alkoholu i przeprowadzić przez ksylen, zaimpregnować w roztopionej parafinie, w temperaturze nie wyższej niż 60 °C. Próbki tkanek należy pociąć na grubość 4–6 µm.

Skrawki tkanek nałożone na specjalnie przygotowane szkiełka (BOND Plus Slides – nr katalogowy S21.2113 lub Apex BOND Slides nr katalogowy 3800040) można przechowywać przez maks. 12 miesięcy w temp. 2–8 °C przed barwieniem. Zaleca się, by po pocięciu skrawki inkubować przez godzinę w temp. 60 °C. Znakowane skrawki należy przechowywać w temperaturze -20 °C, aby zachować sygnał fluorescencyjny i zapobiec blednięciu. Przed odczytem należy upewnić się, że szkiełka osiągnęły temperaturę pokojową.

Ostrzeżenia

Wyłącznie do użytku specjalistycznego.

Jeden lub więcej składników produktu jest niebezpieczny i może spowodować uszkodzenie nienarodzonego płodu.

Z zasady, osoby w wieku poniżej 18 lat nie powinny pracować z tym produktem. Użytkownicy powinni być szczegółowo przeszkoleni pod względem prawidłowych procedur roboczych, niebezpiecznych właściwości produktu oraz odpowiednich procedur bezpieczeństwa.

Preparaty, przed i po utrwaleniu, oraz wszystkie materiały narażone na kontakt z nimi, powinny być traktowane jako potencjalne źródło zakażenia i utylizowane z zachowaniem odpowiednich procedur.

Nie wolno w żadnym wypadku pipetować odczynników za pomocą ust. Należy unikać kontaktu skóry i błon śluzowych z odczynnikami i preparatami. Jeśli odczynniki lub preparaty zetkną się z obszarami wrażliwymi, należy przemyć je dużą ilością wody. Udać się na konsultację do lekarza. Sprawdzić w przepisach krajowych, regionalnych lub lokalnych instrukcje dotyczące utylizacji wszelkich potencjalnie toksycznych składników.

Należy minimalizować skażenie mikrobiologiczne preparatów, ponieważ w przeciwnym razie może dojść do barwienia niespecyficznego.

Procedura

A. Odczynniki wymagane, lecz niedołączone

- BOND Dewax Solution (AR9222)
- BOND Epitope Retrieval Solution 1 (AR9961)
- BOND Wash Solution x10 Concentrate (AR9590)
- Standardowe rozpuszczalniki stosowane w testach opartych na fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (np. etanol, absolutny i rozcieńczony)
- Woda destylowana lub dejonizowana
- DAPI Barwnik
- Leica HER2 FISH Control Slides (TA9123)
- BOND Aspirating Probe Cleaning System (CS9100)

B. Sprzęt wymagany, lecz niedołączony

- Pipety (odmierzające objętość 1-20 µl i 100 – 1000 µl)
- Szkiełka naładowane (BOND Plus Slides – nr katalogowy S21.2113 lub Apex BOND Slides nr katalogowy 3800040)
- BOND-MAX (21.0051) lub BOND-III (21.2201)
- BOND Universal Covertiles™ (S21.2001, S21.4583 or S21.4611)
- BOND Mixing Stations (S21.1971)
- BOND Slide Label & Print Ribbon (S21.4564)
- Szkiełka nakrywkowe
- Piec do suszenia (utrzymujący temperaturę 60 °C)
- Mikroskop fluorescencyjny (obiektyw 60–100x) z odpowiednim źródłem światła. Należy rejestrować liczbę godzin pracy żarówki i wymieniać ją przed upływem czasu żywotności. Upewnić się, że lampa jest właściwie obsadzona.
- Odpowiedni zestaw filtrów do fluorescencji (SpectrumOrange™ – maksimum wzbudzenia 559 nm, maksimum emisji 588 nm, SpectrumGreen™ – maksimum wzbudzenia 497 nm, maksimum emisji 524 nm i DAPI – maksimum wzbudzenia 367 nm, maksimum emisji 452 nm). Do większości modeli mikroskopów dostępne są zestawy filtrów fluorescencyjnych multipasmowoprzepustowych zoptymalizowanych do użycia z Leica HER2 FISH System – 30 Test. Zalecane zestawy filtrów dla Leica HER2 FISH System – 30 Test to DAPI/9-Orange dual bandpass, DAPI/Green dual bandpass, Green/Orange(V.2) dual bandpass i DAPI/Green/Orange (V.2) triple bandpass.

C. Metodologia

- Przed skorzystaniem z poniższej metodologii użytkownicy powinni być odpowiednio przeszkoleni pod kątem zautomatyzowanej techniki fluorescencji *in situ*.
- Każdy skrawek znakowany LSI HER2/CEP17 Dual Probe umożliwi analizę komórek pod względem sygnału HER2 jak i regionu centromerowego chromosomu 17. Uzyskany w ten sposób współczynnik sygnału HER2 do chromosomu 17 pozwoli na przypisanie próbce wartości ilościowej oznaczającej wynik negatywny (brak amplifikacji) lub pozytywny (amplifikacja). Niejednoznaczne (graniczne) wyniki (1,8-2,2) powinny być interpretowane z rozważą. Policzyć dodatkowe 20 jąder i przeliczyć współczynnik.

D. BOND Obróbka enzymatyczna

Przed znakowaniem rozcieńczyć dołączony BOND Enzyme Concentrate 2 do rozcieńczenia 1:300 przy użyciu obecnego w zestawie BOND Enzyme Diluent w jednym z otwartych pojemników BOND. Na przykład, aby wyznaczyć 10 szkiełek należy przygotować 3 ml roboczego roztworu enzymu poprzez rozcieńczenie 10 µl BOND Enzyme Concentrate 2 w 2990 µl BOND Enzyme Diluent. Zaleca się, by enzym był przygotowywany na świeżo przed każdym znakowaniem, oraz by na każdą partię znakowania przygotować minimum 900 µl.

E. Standardowy protokół znakowania

Zaleca się, by stosować Leica HER2 FISH System – 30 Test wraz ze standardowym protokołem znakowania przedstawionym w Tabeli 2 poniżej.

Typ protokołu	Nazwa protokołu
Znakowanie	*FISH Protocol A
Preparation (Przygotowanie)	*Dewax
HIER	*HIER 25 min with ER1 (97)
Enzym	*Enzyme 5 for 25 min
Denaturacja	*D10
Hybrydyzacja	*ISH Hybridization (12Hr)

Tabela 2: Standardowy protokół znakowania Leica HER2 FISH System – 30 Test

F. Kroki procedury

Poniższe instrukcje należy czytać razem z instrukcją obsługi BOND-MAX System i BOND-III. Do każdego szkiełka należy stosować nowe BOND Universal Covertile.

Zastosowanie nakładek BOND Universal Covertiles, które były wcześniej wykorzystane do immunohistochemii lub hybrydyzacji *in situ* nie zostało zwalidowane w niniejszym teście.

1. Upewnić się, że w systemie BOND-MAX i BOND-III pojemniki zbiorcze i pojemniki na odpady mają wystarczającą pojemność, by wykonać odpowiednią ilość znakowań.
2. Upewnić się, że w pojemnikach zbiorczych jest wystarczająca ilość alkoholu, wody destylowanej lub dejonizowanej, BOND Dewax Solution, BOND Epitope Retrieval Solution 1 i BOND Wash Solution, aby przeprowadzić wymagane kroki znakowania.
3. Upewnić się, że zainstalowana jest czysta stacja BOND Mixing Station.
4. Włączyć system BOND-MAX i BOND-III.
5. Włączyć komputer podłączony do BOND-MAX System i BOND-III.
6. Uruchomić oprogramowanie BOND.
7. W przypadku nowego zestawu Leica HER2 FISH System – 30 Test, zeskanować kod kreskowy tacy odczynników za pomocą skanera ręcznego, aby wprowadzić do BOND inwentarza odczynników (Single tylko kod kreskowy).
8. Przygotować BOND Enzyme 5 w dostarczonym BOND Open Container w rozcieńczeniu 1:300. Na przykład, na 10 szkiełek dodać 10 µl BOND Enzyme Concentrate 2 do 2990 µl BOND Enzyme Diluent.
9. Zeskanować dostarczony BOND Open Container i zarejestrować jako **Bond Enzyme 5**.
10. Przejść do ekranu konfiguracji szkiełek i kliknąć na **Add case**.
11. Wprowadzić szczegóły pierwszego pudełka. Upewnić się, że objętość dozownika ustawiono na **150 µL** a wybrany protokół to ***Dewax**. Kliknąć na **OK**.
12. Przy pudełku podświetlonym na ekranie konfiguracji szkiełek, kliknąć na **Add slide**.
13. Najpierw dodać szkiełka testowe pacjentów. Upewnić się, że typ tkanki ustawiono na **Test tissue**.
14. Wybrać tryb znakowania **Single**.
15. Wybrać proces **ISH**.
16. Wybrać ***LSI HER2/CEP17 Dual Probe – 30 Test** z listy sond. Zakładka Protocols zawiera odpowiedni protokół barwienia (***FISH Protocol A**), HIER protokół (***HIER 25 min with ER1 (97)**), EIER protokół (***Enzyme 5 for 25 min**), denaturacja (***D10**) i hybrydyzacja (***ISH Hybridization (12Hr)**).
17. Powtarzać kroki 10 do 16, aż utworzone zostaną wszystkie szkiełka testowe pacjentów i kontrole (Leica HER2 FISH Control Slides i/lub kontrole wewnętrzne). Wydrukować etykiety szkiełek.
18. Nałożyć etykiety na szkiełka.
19. Otworzyć pokrywy wszystkich pojemników Leica HER2 FISH System – 30 Test i włożyć tacę odczynników do BOND-MAX System i BOND-III.
20. Nałożyć nowe nakładki Covertiles na każde szkiełko.
21. Załadować tacę z preparatami do BOND-MAX System i BOND-III i nacisnąć przycisk **Load/Unload**.
22. Potwierdzić, że szkiełka zostały zeskanowane i kliknąć przycisk **Run (Play)** w ekranie stanu systemu, aby rozpocząć natychmiast obróbkę (w przypadku Leica HER2 FISH System – 30 Test zaleca się, by test uruchamiany był na noc, z wykorzystaniem funkcji opóźnionego startu).
23. Upewnić się, że w polu wskaźnikowym tacy wyświetla się **Proc (OK)** numer partii i czas zakończenia.

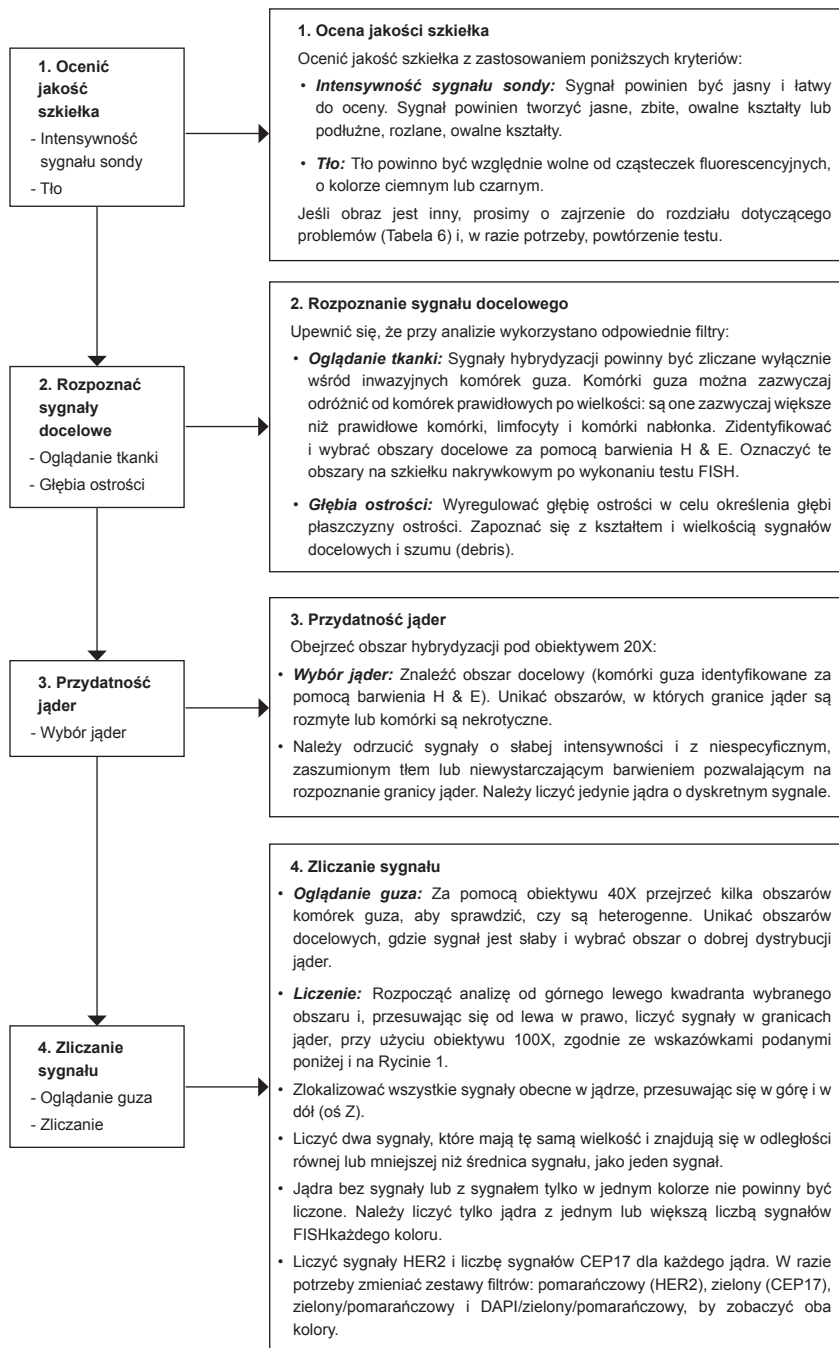
24. Kiedy obróbka zakończy się, nacisnąć przycisk **Load/Unload** i wyjąć tacę szkiełek z BOND-MAX System i BOND-III.
25. Zdjąć nakładki Covertile i przepłukać szkiełka wodą dejonizowaną.
26. Odwodnić szybko w dwóch podmianach alkoholu i pozostawić do wysuszenia na powietrzu.
27. Nałożyć 20 µl DAPI bezpośrednio na próbkę.
28. Nałożyć szkiełko nakrywkowe i pozwolić, by roztwór się rozlał, zwracając uwagę, by nie pozostały żadne pęcherzyki powietrza.
29. Zamknąć krawędzie szkiełka nakrywkowego lakierem do paznokci lub innym uszczelniaczem.
30. Przed obejrzeniem szkiełek pod fluorescencją, umieścić szkiełka w ciemności, by umożliwić pojawienie się sygnału.
31. Aby zachować intensywność sygnału, przechowywać znakowane szkiełka w temp. -20 °C.

G. Przechowywanie szkiełek

Przechowywać wyznakowane szkiełka w temp. -20 °C, w ciemności. Po wyjęciu z temperatury -20 °C przed oglądaniem szkiełka muszą osiągnąć temperaturę pokojową.

Ocena i pomiar sygnału

Aby ocenić siłę sygnału i zmierzyć sygnały HER2 i CEP17 należy przeprowadzić poniższy proces:



Zalecana metoda określenia współczynnika LSI HER2 do CEP17

Aby określić współczynnik LSI HER2 do CEP17, należy zastosować następującą metodę:

1. Zarejestrować i określić liczbę sygnałów LSI HER2 i CEP17 w 20 jądrach (patrz Rycina 2 Leica HER2 FISH System – 30 Test - karta zliczeń).
2. Podsumować liczbę sygnałów LSI HER2. Jest to liczba wszystkich sygnałów LSI HER2 dla zliczenia, np. 143.
3. Podsumować liczbę sygnałów CEP17. Jest to liczba wszystkich sygnałów CEP17 dla zliczenia, np. 48.
4. Aby obliczyć ostateczny wynik, skorzystać z następującego wzoru:

Suma sygnałów LSI HER2 podzielona przez sumę sygnałów CEP17, np. $143/48$ równa się współczynnikowi 2,98, co oznacza wynik pozytywny dla amplifikacji HER2.

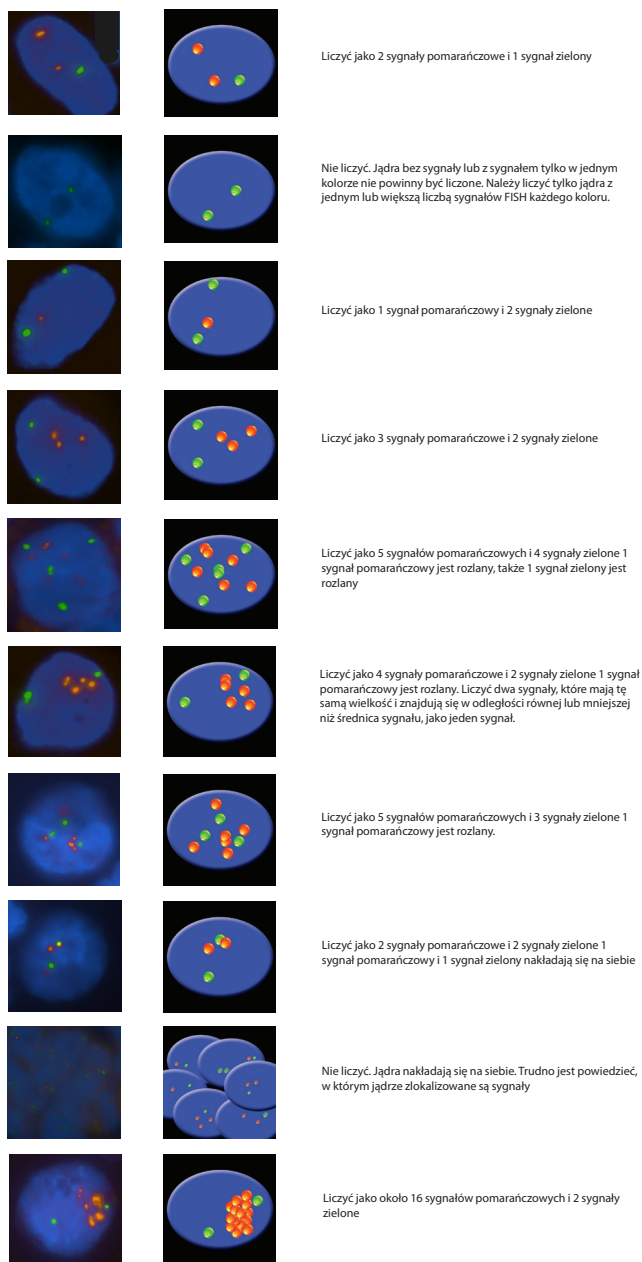
Ważna uwaga: Jeśli współczynnik LSI HER2 do CEP17 jest niejednoznaczny (1,80 - 2,20), należy zliczyć dodatkowych 20 jąder i przeliczyć współczynnik.

Wyniki należy podawać w następującej postaci:

1. Jeśli współczynnik jest <2 , nie zaobserwowano amplifikacji genu HER2
2. Jeśli współczynnik jest ≥ 2 , zaobserwowano amplifikację genu HER2

Ważna uwaga: Współczynnik na granicy lub z bliskimi granicami (1,80 - 2,20) należy interpretować z rozwagą, jak wspomniano powyżej.

Leica HER2 FISH System – 30 Test Wskazówki do interpretacji



Rycina 1: Wskazówki do interpretacji

Leica HER2 FISH System – 30 Test Karta zliczeń

Zliczenia sygnałów z 20 jąder

Jądro nr	HER2 Liczba kopii	CEP17 Liczba kopii	Jądro nr	HER2 Liczba kopii	CEP17 Liczba kopii
1			11		
2			12		
3			13		
4			14		
5			15		
6			16		
7			17		
8			18		
9			19		
10			20		
Razem 1-10			Razem 11-20		

	HER2	CEP17	HER2:CEP17 Współczynnik amplifikacji
Razem 1-20			
Średnio na komórkę			

Rycina 2: Karta zliczeń próbki

Zautomatyzowana metoda Ariol do oznaczania HER2 FISH

Wykorzystanie aplikacji Ariol PathVysion® do cyfrowej oceny punktowej jako pomoc w interpretacji obrazów zostało niezależnie potwierdzone w różnych porównawczych badaniach kohortowych pod kątem korzystania z Leica HER2 FISH System. Aplikacja Ariol PathVysion do cyfrowej oceny punktowej wykorzystywana w połączeniu z Leica HER2 FISH System jest przeznaczona do badań diagnostycznych in vitro. Aby korzystać z aplikacji Ariol PathVysion do cyfrowej oceny punktowej w połączeniu z Leica HER2 FISH System, należy ją skalibrować za pomocą próbek kontrolnych tkanek, a nie za pomocą Leica HER2 FISH Control Slides (TA9123). **Wszystkie decyzje diagnostyczne są podejmowane przez wykwalifikowanego lekarza.** Więcej informacji na ten temat można znaleźć w Instrukcji obsługi Ariol.

Kontrola jakości

Zastosowanie szkiełek kontrolnych

Zaleca się, by Leica HER2 FISH Control Slide dołączać do każdej partii testu, w celu monitorowania poprawności wykonania testu oraz oceny dokładności pomiaru sygnału. Szkiełka kontrolne powinny być dodawane do każdej partii barwienia w systemie BOND-MAX i BOND-III oraz do każdej nowej partii odczynników. Dodatkowo użytkownicy mogą dodawać własny materiał kontrolny.

Oceniać jakość szkiełka kontrolnego i dokonywać zliczeń sygnałów zgodnie z instrukcjami podanymi w rozdziale **Ocena i pomiar sygnału**. Aby wynik testu mógł być zaakceptowany, muszą być spełnione kryteria jakości preparatu, a wartość współczynnika HER2:CEP17 musi mieścić się w ustalonych granicach. Patrz Tabela 3, gdzie podano kryteria akceptacji Leica HER2 FISH Control Slides.

Linia komórkowa	Bond Oracle HER2 IHC System Profil	HER2 Ilość receptora na komórkę*	Leica HER2 FISH System – 30 Test HER2:CEP17 Kryteria akceptacji
SKBr-3	3+	$4,3 \times 10^5$	HER2 stwierdzono amplifikację
MDA-MB-453	2+	$1,4 \times 10^5$	HER2/CEP17współczynnik amplifikacji powinien wynosić między 1,5 – 2,5
MDA-MB-175	1+	$6,3 \times 10^4$	HER2 nie stwierdzono amplifikacji
MDA-MB-231	0	$9,3 \times 10^3$	HER2 nie stwierdzono amplifikacji

*HER2 analiza ilości receptora oceniana za pomocą cytometrii przepływowej.

Tabela 3: Leica HER2 FISH Interpretacja preparatu kontrolnego.

Jeśli kontrole testu zawiodą, wyniki FISH dla tego pudełka nie powinny być podawane. Jeśli szkiełka kontrolne nie spełnią kryteriów akceptacji szkiełek, możliwe, że Leica HER2 FISH System – 30 Test nie działał prawidłowo. W takim przypadku należy powtórzyć test ze świeżymi szkiełkami kontrolnymi i szkiełkami próbek pacjentów. Jeśli wyniki są poza podanym zakresem, lecz szkiełka kontrolne spełniają kryteria akceptacji pod względem jakości, należy powtórzyć przeglądanie preparatu, ponieważ istnieje szansa, że niewłaściwie policzono sygnały. W przypadku niepowodzenia hybrydyzacji na szkiełkach kontrolnych lub testowych, prosimy o zapoznanie się z rozdziałem dotyczącym problemów (Tabela 6).

W przypadku próbek klinicznych, kiedy sygnał hybrydyzacji jest trudny do interpretacji, a próbka nie jest wystarczająco duża, by wykonać jeszcze jeden preparat, uznaje się, że test jest niewiarygodny. Jeśli liczba komórek do analizy nie jest wystarczająca, test nie jest wiarygodny. Preparaty pacjenta powinny być kontrolowane za pomocą standardowych procedur laboratoryjnych. Jakość sygnału i wyniki zliczeń należy udokumentować na odpowiednim formularzu.

Ograniczenia

A. Ograniczenia ogólne

FISH to technika wymagająca przeszkolenia specjalistycznego we wszystkich aspektach procedury (w tym wybór odpowiednich odczynników, tkanki, utrwalania, obróbki i przygotowania szkiełka) i interpretacji. Znakowanie tkanki zależy od jej obróbki, utrwalania i przetwarzania przed znakowaniem. Niewłaściwe utrwalanie, mrożenie, rozmrażanie, przemywanie, suszenie, ogrzewanie, cięcie lub skażenie innymi tkankami lub płynami może spowodować artefakty morfologiczne, degradację kwasów nukleinowych, fluorescencję tła lub fałszywie negatywne wyniki. Sprzeczne wyniki mogą być wynikiem różnic w utrwalaniu, zatapianiu lub niejednorodności tkanki (21). Również zbyt silne lub słabe barwienie może wpłynąć na właściwą interpretację wyników.

Znakowanie niespecyficzne jako wynik niezwiązania się sondy daje obraz rozszany, ziarnisty i jest obserwowane w miejscu odległym od oczekiwanego miejsca hybrydyzacji. Do interpretacji wyników znakowania należy wykorzystywać komórki nienaruszone. Komórki nekrotyczne lub zdegenerowane mogą znakować się niespecyficznie (22). Nieoczekiwane znakowanie FISH lub różnice w znakowaniu mogą być wynikiem zmian w poziomie ekspresji genów kodujących. Wszelkie zmiany w oczekiwanym wzorze znakowania powinny być interpretowane w połączeniu ze wszystkimi innymi badaniami diagnostycznymi. Interpretację znakowania należy uzupełnić badaniami morfologicznymi oraz zastosowaniem odpowiedniego materiału kontrolnego, oraz ocenić w kontekście historii klinicznej pacjenta i innych badań diagnostycznych. Oceny powinien dokonać wykwalifikowany patolog.

Wykonanie testu (tzn. ocenę prawidłowości materiałów kontrolnych) oraz interpretację znakowania lub jego braku należy przeprowadzić w akredytowanym/licencjonowanym laboratorium, pod nadzorem odpowiednio wykwalifikowanego i doświadczonego patologa, który jest odpowiedzialny za ogólną ocenę testu hybrydyzacji *in situ* i jego interpretację. Wyniki fałszywie dodatnie FISH mogą wynikać z reakcji krzyżowej sondy z innymi sekwencjami kwasów nukleinowych i/lub wiązania niespecyficznego. Należy wykorzystać i udokumentować odpowiednie kontrole. Przy wykonywaniu testu należy wziąć pod uwagę terminy przydatności.

Odstępstwa techniczne i interpretacyjne mogą pojawiać się, gdy technika FISH jest wykonywana na materiałach pochodzących z linii komórkowych (23).

B. Specyficzne ograniczenia produktu

Produkt nie jest przeznaczony do zastosowania w żadnych innych testach diagnostycznych wykorzystujących DNA.

Nie zamieniać odczynników Leica HER2 FISH System – 30 Test na jakiegokolwiek inne odczynniki dostarczone przez firmę Leica Biosystems lub innych producentów. Działanie takie spowoduje niewiarygodność testu. Użytkownik musi zwalidować wszelkie odchylenia od zalecanych procedur.

Zaleca się, by do testu wykorzystywać tylko tkanki utrwalane w utrwalaczach na bazie formaliny. Użycie jakiegokolwiek innego utrwalacza może sprawić, że wyniki będą niewiarygodne.

Skrawki tkanek pocięte na grubość inną niż zalecana nie były walidowane. Użycie jakiegokolwiek innej grubości skrawków może sprawić, że wyniki będą niewiarygodne.

Zgodność kliniczna systemu HER2 FISH – 30 Test z Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Sutek

Badanie to określało przydatność Leica HER2 FISH System – 30 Test jako pomocy przy podejmowaniu decyzji o leczeniu preparatem Herceptin (trastuzumab). Badanie zostało zaprojektowane w taki sposób, by sprawdzić zgodność między Leica HER2 FISH System – 30 Test i wcześniej zatwierdzonym rozwiązaniem diagnostycznym, Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, stosowanym jako „złoty standard” dla tego testu na tkance sutka. Kryterium akceptacji testu mówiło, że niższy limit jednostronnego przedziału ufności 95 % musi być większy od 90 % między Leica HER2 FISH System – 30 Test i ręcznym Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, pośród pozytywnych (amplifikacja) i negatywnych (brak amplifikacji) utrwalanych w formalinie i zatapianych w parafinie (FFPE) próbek inwazyjnego raka sutka.

Badanie przeprowadzono jako trójśrodkową, zamaskowaną ocenę klinicznie inwazyjnych próbek raka sutka. Do każdego z ośrodków badawczych dostarczono zarchiwizowane, utrwalone w formalinie, zatapiane w parafinie bloczki tkanek inwazyjnego raka sutka o znanym poziomie ekspresji onkoproteiny HER2. Wybrano kohortę 300 próbek, zawierających 75, 0/1+ wcześniej scharakteryzowanych za pomocą IHC przypadków; 150, 2+ wcześniej scharakteryzowanych za pomocą IHC przypadków; i 75, 3+ wcześniej scharakteryzowanych za pomocą IHC przypadków, które rozdzielono po równo do wszystkich trzech ośrodków badawczych.

Wszystkie przypadki oznakowano ręcznie testem Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, zgodnie z instrukcjami producenta podanymi w ulotce informacyjnej. Następnie kolejne skrawki z każdego przypadku wyznakowano Leica HER2 FISH System – 30 Test w systemie BOND-MAX i BOND-III.

Wszystkie wyznakowane szkiełka zamaskowano i przeanalizowano w sposób randomizowany przy pomocy jednego wyszkolonego obserwatora w każdym z trzech ośrodków badawczych. Wynik uznawano za negatywny przy współczynniku genów HER2/CEP17 $<2,0$ i pozytywny przy współczynniku HER2/CEP17 $\geq 2,0$. Następnie dane przeanalizowano pod kątem zgodności, zgodności znakowania pozytywnego i zgodności znakowania negatywnego.

2x2 Wyniki zgodności BOND-MAX System - Sutek

Dane zgrupowano jako negatywne ($<2,00$) lub pozytywne ($\geq 2,00$) w analizie 2x2. Obserwowana zgodność dla 300 próbek między oboma testami w analizie 2x2 wyniosła 99,33% (298/300) przy CI 95%: 97,61-99,92% dla BOND-MAX

Odsetek zgodności pozytywnej (czułość), czyli zdolności testu Leica HER2 FISH System – 30 Test do prawidłowej identyfikacji przypadków uznanych przez test Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit za pozytywne (odsetek próbek uznanych za pozytywne przez Leica HER2 FISH System – 30 Test i ręczny Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit spośród wszystkich próbek pozytywnych w Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) wyniósł 99,03% (102/103).

Odsetek zgodności negatywnej (specyfność), czyli zdolności testu do prawidłowej identyfikacji przypadków negatywnych w Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (odsetek próbek uznanych za negatywne przez test Leica HER2 FISH System – 30 Test i Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit spośród wszystkich próbek negatywnych w Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) wyniósł 99,49% (196/197). Patrz tabela 4

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

Ogólna zgodność (95% CI) = 99,33% (97,61 – 99,92%)

Tabela 4. Zgodność 2x2 testu Leica HER2 FISH System – 30 Test w systemie BOND-MAX System z zestawem Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit na tkance sutka.

2x2 Wyniki zgodności BOND-III System - Sutek

Dane zgrupowano jako negatywne (<2,00) lub pozytywne (≥2,00) w analizie 2x2. Obserwowana zgodność dla 300 próbek między oboma testami w analizie 2x2 wyniosła 99,67% (299/300) przy CI 95%: 98,16-99,99% dla BOND-III

Odsetek zgodności pozytywnej (czułość), czyli zdolności testu Leica HER2 FISH System – 30 Test do prawidłowej identyfikacji przypadków uznanych przez test Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit za pozytywne (odsetek próbek uznanych za pozytywne przez Leica HER2 FISH System – 30 Test i ręczny Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit spośród wszystkich próbek pozytywnych w Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) wyniósł 99,03% (102/103).

Odsetek zgodności negatywnej (swoistość), czyli zdolności testu do prawidłowej identyfikacji przypadków uznanych przez Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit za negatywne (odsetek próbek negatywnych w Leica HER2 FISH System – 30 Test i Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit spośród wszystkich próbek negatywnych w Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) wyniósł 100% (197/197). Patrz tabela 5.

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

Ogólna zgodność (95% CI) = 99,67% (98,16 - 99,99%)

Tabela 5. Zgodność 2x2 testu Leica HER2 FISH System – 30 Test w systemie BOND-III z zestawem Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit na tkance sutka.

Podsumowując można stwierdzić, dane uzyskane z badania przemawiają za tym, że Leica HER2 FISH System – 30 Test może być wykorzystywany jako wsparcie oceny pacjentów, u których rozważana jest terapia preparatem Herceptin (trastuzumab), co wynika z wysokiej zgodności z Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, testem wcześniej stosowanym do tego celu.

Zgodność kliniczna systemów Leica HER2 FISH System - 30 Test z Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Żołądek

Badanie to określało przydatność systemu Leica HER2 FISH System - 30 Test jako pomocy przy podejmowaniu decyzji o leczeniu preparatem Herceptin (trastuzumab). Badanie zostało zaprojektowane w taki sposób, by sprawdzić zgodność między systemem Leica HER2 FISH System - 30 Test i wcześniej zatwierdzonym rozwiązaniem diagnostycznym, Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, stosowanym jako "złoty standard" dla tego testu na tkankach żołądka. Kryterium akceptacji testu mówiło, że niższy limit jednostronnego przedziału ufności 95% musi być większy od 90% między Leica HER2 FISH System - 30 Test i ręcznym Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, spośród pozytywnych (amplifikacja) i negatywnych (brak amplifikacji) utrwalanych w formalinie i zatapiających w parafinie (FFPE) próbek gruczolakoraka żołądka (w tym połączenia żołądkowo-przelykowego). Badanie zostało przeprowadzone jako ocena próbek klinicznie inwazyjnego gruczolakoraka żołądka. Testy wykonano na zarchiwizowanych, utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie bloczkach gruczolakoraka żołądka, przy znanym poziomie ekspresji genu HER2. Wybrano kohortę 109 próbek, obejmujących 50 przypadki z amplifikacją i 59 przypadków bez amplifikacji.

Wszystkie przypadki zabarwiono ręcznie testem Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, zgodnie z instrukcjami producenta podanymi w ulotce informacyjnej. Następnie kolejne skrawki z każdego przypadku zabarwiono Leica HER2 FISH System - 30 Test w systemie BOND-MAX System.

Wszystkie zabarwione szkiełka zostały ocenione w sposób randomizowany przez jednego przeszkolonego obserwatora. Wyniki były interpretowane jako negatywne przy obliczonym stosunku ekspresji HER2/CEP17 $<2,0$ i pozytywne przy obliczonym stosunku ekspresji HER2/CEP17 $\geq 2,0$. Następnie dane przeanalizowano pod kątem zgodności, zgodności znakowania pozytywnego i zgodności znakowania negatywnego.

2x2 Wyniki zgodności systemu BOND-MAX System - Żołądek

Dane zgrupowane jako negatywne ($<2,00$) lub pozytywne ($\geq 2,00$) w analizie 2x2. Obserwowana zgodność dla 109 próbek między oboma testami w analizie 2x2 wykazała zgodność na poziomie 98,17% (107/109) przy 95% CI 93,53–99,78% dla systemu BOND-MAX System.

Odsetek zgodności pozytywnej (czułość) czyli zdolności testu Leica HER2 FISH System - 30 Test do prawidłowej identyfikacji przypadków uznanych przez test Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit za pozytywne (odsetek próbek uznanych za pozytywne przez Leica HER2 FISH System - 30 Test i ręczny zestaw Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit spośród wszystkich próbek pozytywnych w Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) wyniósł 96,00% (48/50).

Odsetek zgodności negatywnej (swoistość), czyli zdolności testu do prawidłowej identyfikacji przypadków negatywnych w Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (odsetek próbek uznanych za negatywne przez test Leica HER2 FISH System - 30 Test i Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit spośród wszystkich próbek negatywnych w Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) wyniósł 100% (59/59). Patrz Tabela 6.

		Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit		
		Negatywny (<2,0)	Pozytywny (≥2,0)	Razem
Leica HER2 FISH System - 30 Test BOND-MAX	Negatywny (<2,0)	59	2	61
	Pozytywny (≥2,0)	0	48	48
	Razem	59	50	109

Ogólna zgodność (95% CI) = 98,17% (93,53 -99,78%)

Tabela 6. Zgodność 2x2 systemu Leica HER2 FISH System - 30 Test w systemie BOND-MAX System z Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit na tkance żołądkowej.

Testowanie precyzji – system BOND-MAX

A. Badanie precyzji w ramach partii materiału

Badanie precyzji w ramach partii materiału zostało przeprowadzone w sposób randomizowany i zaślepiiony. Badanie precyzji Leica HER2 FISH System – 30 Test w ramach partii materiału przeprowadzono w jednym ośrodku badawczym na 540 wcześniej scharakteryzowanych pod względem HER2 próbkach TMA zawierających utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie przypadki raka sutka. Zastosowanie TMA do określenia precyzji w ramach partii materiału umożliwiło opracowanie większej liczby przypadków oferujących większy zakres ekspresji HER2 w jednym doświadczeniu na jednym urządzeniu.

Przy zliczaniu szkiełek znakowanych w ramach badania precyzji w partii, 532/540 opracowane przypadki dały zgodny wynik, co oznacza ogólną zgodność na poziomie 98,52 %, przy dolnym limicie 95 % CI: 97,10 %.

B. Badanie precyzji urządzenia

Badanie precyzji urządzenia zostało przeprowadzone w sposób randomizowany i zaślepiiony. Badanie precyzji Leica HER2 FISH System – 30 Test w ramach urządzenia przeprowadzono w jednym ośrodku badawczym na 1620 wcześniej scharakteryzowanych pod względem HER2 próbkach TMA zawierających utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie przypadki raka sutka. Zastosowanie TMA do określenia precyzji w ramach urządzenia umożliwiło opracowanie większej liczby przypadków oferujących większy zakres ekspresji HER2 w wielu doświadczeniach na jednym urządzeniu.

Przy zliczaniu szkiełek znakowanych w ramach badania precyzji w urządzeniu, 1620/1620 opracowanych przypadków dało zgodny wynik, co oznacza ogólną zgodność na poziomie 100 %, przy dolnym limicie 95 % CI: 99,82 %.

C. Badanie precyzji na różnych partiach materiału

Badanie precyzji w ramach różnych partii materiału zostało przeprowadzone w sposób randomizowany i zaślepiiony. Badanie precyzji Leica HER2 FISH System – 30 Test w ramach różnych partii materiału przeprowadzono w jednym ośrodku badawczym na 900 wcześniej scharakteryzowanych pod względem HER2 próbkach TMA zawierających utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie przypadki raka sutka. Zastosowanie TMA do określenia precyzji w ramach różnych partii, w codziennej eksploatacji, umożliwiło opracowanie większej liczby przypadków oferujących większy zakres ekspresji HER2w różnych partiach, opracowanych w różne dni.

Przy zliczaniu szkiełek znakowanych w ramach badania precyzji w różnych partiach, 894/900 opracowane przypadki dały zgodny wynik, co oznacza ogólną zgodność na poziomie 99,33 %, przy dolnym limicie 95 % CI: 98,55 %.

D. Badanie precyzji różnych laboratoriów

Badanie precyzji w ramach różnych laboratoriów zostało przeprowadzone w sposób randomizowany i zaślepiiony. Badanie precyzji Leica HER2 FISH System – 30 Test w różnych laboratoriach przeprowadzono w trzech ośrodkach badawczych na 513 wcześniej scharakteryzowanych pod względem HER2 próbkach TMA zawierających utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie przypadki raka sutka. Zastosowanie TMA do określenia precyzji w ramach różnych laboratoriów umożliwiło opracowanie większej liczby przypadków oferujących większy zakres ekspresji HER2w różnych partiach, na różnych urządzeniach.

Przy zliczaniu szkiełek znakowanych w ramach badania precyzji w różnych laboratoriach, 510/513 opracowanych przypadków dało zgodny wynik, co oznacza ogólną zgodność na poziomie 99,42 %, przy dolnym limicie 95 % CI: 98,30 %.

E. Badanie precyzji różnych obserwatorów

Badanie precyzji w ramach różnych obserwatorów zostało przeprowadzone w sposób randomizowany i zaślepiiony. Badanie powtarzalności Leica HER2 FISH System – 30 Test w ramach różnych obserwatorów przeprowadzono w trzech ośrodkach badawczych. W

każdym z ośrodków badawczych wykorzystano jednego doświadczonego obserwatora. Do oceny precyzji w ramach obserwatorów zastosowano osiemnaście przypadków raka sutka, odzwierciedlających typy tkanek spotykane w praktyce klinicznej.

Przy zliczaniu szkiełek znakowanych w ramach badania precyzji różnych obserwatorów, 53/54 opracowanych przypadków dało zgodny wynik, co oznacza ogólną zgodność na poziomie 98,15 %, przy dolnym limicie 95 % CI: 90,11 %.

F. Badanie precyzji różnych partii odczynników

Badanie precyzji w ramach różnych partii odczynników zostało przeprowadzone w sposób randomizowany i zaślepiiony. Precyzję w ramach różnych partii odczynników określano na trzech wyprodukowanych niezależnie partiach Leica HER2 FISH System – 30 Test, produkowanych zgodnie z Dobrą Praktyką Produkcyjną (Good Manufacturing Practice, GMP). Każda partia była testowana w jednym ośrodku badawczym na 540 wcześniej scharakteryzowanych pod względem HER2 próbkach TMA zawierających utwalone w formalinie i zatopione w parafinie przypadki raka sutka. Zastosowanie TMA do określenia precyzji w ramach różnych partii odczynników umożliwiło opracowanie większej liczby przypadków oferujących większy zakres ekspresji HER2 przebadanych na różnych partiach. Przy zliczaniu szkiełek znakowanych w ramach badania precyzji w różnych partiach odczynników, 534/540 opracowane przypadki dały zgodny wynik, co oznacza ogólną zgodność na poziomie 98,89 %, przy dolnym limicie 95 % CI: 97,60 %.

Testowanie precyzji – system BOND-III

G. Badanie precyzji w ramach partii materiału

Badanie precyzji w ramach partii materiału zostało przeprowadzone w sposób randomizowany i zaślepiiony. Badanie precyzji Leica HER2 FISH System – 30 Test w ramach partii materiału przeprowadzono w jednym ośrodku badawczym na 540 wcześniej scharakteryzowanych pod względem HER2 próbkach TMA zawierających utwalone w formalinie i zatopione w parafinie przypadki raka sutka. Zastosowanie TMA do określenia precyzji w ramach partii materiału umożliwiło opracowanie większej liczby przypadków oferujących większy zakres ekspresji HER2 w jednym doświadczeniu na jednym urządzeniu.

Przy zliczaniu szkiełek znakowanych w ramach badania precyzji w partii, 540/540 opracowanych przypadków dało zgodny wynik, co oznacza ogólną zgodność na poziomie 100 %, przy dolnym limicie 95 % CI: 99,45 %.

H. Badanie precyzji urządzenia

Badanie precyzji urządzenia zostało przeprowadzone w sposób randomizowany i zaślepiiony. Badanie precyzji Leica HER2 FISH System – 30 Test w ramach urządzenia przeprowadzono w jednym ośrodku badawczym na 1620 wcześniej scharakteryzowanych pod względem HER2 próbkach TMA zawierających utwalone w formalinie i zatopione w parafinie przypadki raka sutka. Zastosowanie TMA do określenia precyzji w ramach urządzenia umożliwiło opracowanie większej liczby przypadków oferujących większy zakres ekspresji HER2 w wielu doświadczeniach na jednym urządzeniu.

Przy zliczaniu szkiełek znakowanych w ramach badania precyzji w partii, 1620/1620 opracowanych przypadków dało zgodny wynik, co oznacza ogólną zgodność na poziomie 100 %, przy dolnym limicie 95 % CI: 99,82 %.

I. Badanie precyzji na różnych partiach materiału

Badanie precyzji w ramach różnych partii materiału zostało przeprowadzone w sposób randomizowany i zaślepiiony. Badanie precyzji Leica HER2 FISH System – 30 Test w ramach różnych partii materiału przeprowadzono w jednym ośrodku badawczym na 900 wcześniej scharakteryzowanych pod względem HER2 próbkach TMA zawierających utwalone w formalinie i zatopione w parafinie przypadki raka sutka. Zastosowanie TMA do określenia precyzji w ramach różnych partii, w codziennej eksploatacji, umożliwiło opracowanie większej liczby przypadków oferujących większy zakres ekspresji HER2w różnych partiach, opracowanych w różne dni.

Przy zliczaniu szkiełek znakowanych w ramach badania precyzji w różnych partiach, 891/900 opracowane przypadki dały zgodny wynik, co oznacza ogólną zgodność na poziomie 99,00 %, przy dolnym limicie 95 % CI: 98,11 %.

J. Badanie precyzji różnych laboratoriów

Badanie precyzji w ramach różnych laboratoriów zostało przeprowadzone w sposób randomizowany i zaślepiiony. Badanie precyzji Leica HER2 FISH System – 30 Test w różnych laboratoriach przeprowadzono w trzech ośrodkach badawczych na 513 wcześniej scharakteryzowanych pod względem HER2 próbkach TMA zawierających utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie przypadki raka sutka. Zastosowanie TMA do określenia precyzji w ramach różnych laboratoriów umożliwiło opracowanie większej liczby przypadków oferujących większy zakres ekspresji HER2w różnych partiach, na różnych urządzeniach.

Przy zliczaniu szkiełek znakowanych w ramach badania precyzji w różnych laboratoriach, 511/513 opracowanych przypadków dało zgodny wynik, co oznacza ogólną zgodność na poziomie 99,61 %, przy dolnym limicie 95 % CI: 98,60 %.

K. Badanie precyzji różnych obserwatorów

Badanie precyzji w ramach różnych obserwatorów zostało przeprowadzone w sposób randomizowany i zaślepiiony. Badanie powtarzalności Leica HER2 FISH System – 30 Test w ramach różnych obserwatorów przeprowadzono w trzech ośrodkach badawczych. W każdym z ośrodków badawczych wykorzystano jednego doświadczonego obserwatora. Do oceny precyzji w ramach obserwatorów zastosowano osiemnaście przypadków raka sutka, odzwierciedlających typy tkanek spotykane w praktyce klinicznej.

Przy zliczaniu szkiełek znakowanych w ramach badania precyzji różnych obserwatorów, 53/54 opracowanych przypadków dało zgodny wynik, co oznacza ogólną zgodność na poziomie 98,15 %, przy dolnym limicie 95 % CI: 90,11 %.

L. Badanie precyzji różnych partii odczynników

Badanie precyzji w ramach różnych partii odczynników zostało przeprowadzone w sposób randomizowany i zaślepiiony. Precyzję w ramach różnych partii odczynników określano na trzech wyprodukowanych niezależnie partiach Leica HER2 FISH System – 30 Test, produkowanych zgodnie z Dobrą Praktyką Produkcyjną (Good Manufacturing Practice, GMP). Każda partia była testowana w jednym ośrodku badawczym na 540 wcześniej scharakteryzowanych pod względem HER2 próbkach TMA zawierających utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie przypadki raka sutka. Zastosowanie TMA do określenia precyzji w ramach różnych partii odczynników umożliwiło opracowanie większej liczby przypadków oferujących większy zakres ekspresji HER2 przebadanych na różnych partiach.

Przy zliczaniu szkiełek znakowanych w ramach badania precyzji w różnych partiach odczynników, 540/540 opracowane przypadki dały zgodny wynik, co oznacza ogólną zgodność na poziomie 100 %, przy dolnym limicie 95 % CI: 99,45 %.

Powtarzalność testu

Badanie powtarzalności przeprowadzono na systemie BOND-MAX i BOND-III, w celu określenia zakresu tolerancji testu na czas odbioru ciepła i temperaturę; czas odbioru enzymu, temperaturę i stężenie; czas i temperaturę denaturacji; czas i temperaturę hybrydyzacji; oraz czas i temperaturę płukania. Badania powtarzalności z użyciem standardowego protokołu w systemie BOND-MAX i BOND-III zostały również przeprowadzone poza zalecanymi limitami zdefiniowanymi w wytycznych FDA/ORA: ORA LAB5.3 Rev 1.7 dla temperatury i wilgotności.

- Nie zaobserwowano różnic w statusie amplifikacji, gdy standardowa temperatura dla każdego kroku zależnego od temperatury została podwyższona o 4 °C lub obniżona o 4 °C, w porównaniu do protokołu Leica HER2 FISH System – 30 Test protokół. Najwyższa jakość wyników obserwowana była przy temperaturze domyślnej i ta właśnie temperatura jest zalecana.
- Nie zaobserwowano różnic w statusie amplifikacji, gdy czas odsłonięcia epitopów pod wpływem temperatury (HIER) wyniósł 20 minut i 30 minut w temp. 97 °C z zastosowaniem

roztworu BOND ER1, w porównaniu do standardowego protokołu Leica HER2 FISH System – 30 Test. Najwyższą jakość wyników obserwowano przy standardowym czasie 25 minut i ten czas inkubacji jest zalecany.

- Nie zaobserwowano różnic w statusie amplifikacji, gdy czas odślaniania epitopów pod wpływem enzymu (EIER) wyniósł 15 minut i 35 minut w temp. 37 °C, w porównaniu do standardowego protokołu Leica HER2 FISH System – 30 Test. Najwyższą jakość wyników obserwowano przy standardowym czasie 25 minut i ten czas inkubacji jest zalecany.
- Nie zaobserwowano różnic w statusie amplifikacji, gdy stężenie enzymu w czasie odślaniania epitopów pod wpływem enzymu (EIER) zmieniało się w zakresie od 1:200 (koncentrat enzymu/ rozpuszczalnik enzymu) do 1:500, przy zastosowaniu standardowego protokołu Leica HER2 FISH System – 30 Test. Najwyższą jakość wyników obserwowano przy standardowym stężeniu 1: 300 minut i to rozcieńczenie jest zalecane.
- Nie zaobserwowano różnic w statusie amplifikacji, gdy czas denaturacji wynosił 5 minut lub 15 minut, w porównaniu do standardowego protokołu Leica HER2 FISH System – 30 Test. Najwyższą jakość wyników obserwowano przy standardowym czasie 10 minut i ten czas denaturacji jest zalecany.
- Nie zaobserwowano różnic w statusie amplifikacji, gdy czas hybrydyzacji wynosił 9 godzin lub 15 godzin, w porównaniu do standardowego protokołu Leica HER2 FISH System – 30 Test. Najwyższą jakość wyników obserwowano przy standardowym czasie 12 godzin i ten czas hybrydyzacji jest zalecany.
- Nie zaobserwowano różnic w statusie amplifikacji, gdy czas płukania po hybrydyzacji wynosił 2, 5 lub 7 minut, w porównaniu do standardowego protokołu Leica HER2 FISH System – 30 Test. Najwyższą jakość obserwowano przy standardowym czasie 4 minut i ten czas płukania po hybrydyzacji jest zalecany.
- Nie zaobserwowano różnic w statusie amplifikacji, gdy test Leica HER2 FISH System – 30 Test został wykonany w temp. 28 °C i wilgotności względnej 30 % lub 16 °C i 80 % wilgotności względnej, w porównaniu do standardowego protokołu Leica HER2 FISH System – 30 Test przeprowadzonego w warunkach otoczenia.

Odchylenia inne, niż opisane w przeprowadzonych badaniach powtarzalności nie zostały zwalidowane. Użycie jakiegokolwiek innego parametru może sprawić, że wyniki będą niewiarygodne.

Powyższy tekst opisuje przetestowane warunki i wyniki badania. Prosimy zwrócić uwagę, że Leica nie testowała wszystkich możliwych kombinacji warunków i nie zaleca stosowania niestandardowych parametrów wszystkich warunków. Standardowy protokół Leica HER2 FISH opisano w Tabeli 2.

Usuwanie problemów

Problem	Możliwa przyczyna	Rozwiązanie
Brak lub słaby sygnał/ znakowanie fluorescencyjne	Niewłaściwe utrwalenie lub obróbka preparatu testowego	Upewnić się, że stosowany jest utrwalacz na bazie formaliny oraz że harmonogramy obróbki są właściwe dla próbki poddawanej testowi.
	Leica HER2 FISH System – 30 Test jest wykorzystywany po upływie terminu przydatności	Upewnić się, że test Leica HER2 FISH System – 30 Test jest stosowany przed datą przydatności do użycia.
	Niewłaściwy wybór protokołu	Upewnić się, że wartość domyślna *FISH Protocol A znajduje się w polu protokołu barwienia, okna dialogowego Add slide.
	Wstawiono niewłaściwe pojemniki zbiorcze odczynników	Upewnić się, że wszystkie odczynniki BOND zostały przypisane do odpowiednich pojemników zbiorczych i umieszczone w odpowiednich pozycjach urządzenia.
	Niewystarczające usunięcie parafiny ze szkiełek	Upewnić się, że w polu Preparation okna dialogowego Add slide wybrany jest tryb *Dewax .
	Niewłaściwa obróbka wstępna	Upewnić się, że wybrano standardowe protokoły obróbki wstępnej (HIER i Enzymatic Digestion). Jeśli zachodzi taka potrzeba, zmienić protokół obróbki wstępnej (HIER lub Enzymatic Digestion).
	Niewłaściwa denaturacja	Upewnić się, że wybrano standardową denaturację *D10 .
	Niewłaściwa hybrydyzacja	Upewnić się, że wybrano odpowiednią, standardową hybrydyzację *H12 . Jeśli potrzeba, wydłużyć czas denaturacji.
	Nadmierne płukanie po hybrydyzacji	Skrócić czas inkubacji płukania po hybrydyzacji.
	Obróbka przerwana przed końcem	Przy użyciu oprogramowania BOND, potwierdzić obecność błędów w czasie procesu znakowania i wyeliminować ich przyczynę, zgodnie z instrukcjami podanymi przez oprogramowanie BOND.
Niewłaściwy sprzęt do mikroskopii fluorescencyjnej	Upewnić się, że cały sprzęt do mikroskopii fluorescencyjnej jest właściwy dla wykonywanego testu. Potwierdzić: <ul style="list-style-type: none"> • Odpowiedni zestaw filtrów • Odpowiednia lampa • Zużyta lampa • Odpowiedni olejek do stosowania w mikroskopii immersyjnej 	

Problem	Możliwa przyczyna	Rozwiązanie
Brak lub słaby sygnał/ znakowanie fluorescencyjne	Nadmierna ekspozycja na światło UV (zblednięcie)	Przed i po ocenie przechowywać szkiełka w ciemności, aby zachować sygnał fluorescencyjny. Aby zachować sygnał przez dłuższy czas, przechowywać szkiełka w temp. -20°C.
Niespecyficzny fluorescencyjny sygnał/ znakowanie tła	Niewystarczające płukanie po hybrydyzacji	Wydłużyć czas inkubacji po hybrydyzacji.
	Wstawiono niewłaściwe pojemniki zbiorcze odczynników	Upewnić się, że wszystkie odczynniki BOND zostały przypisane do odpowiednich pojemników zbiorczych i umieszczone w odpowiednich pozycjach urządzenia.
	Niewystarczające usunięcie parafiny ze szkiełek	Upewnić się, że w polu przygotowania (Preparation) okna dialogowego dodawania szkiełek (Add slide) wybrano tryb *Dewax .
	Niespecyficzna reakcja krzyżowa w obszarach nekrozy tkanek	Upewnić się, że stosowany jest utrwalacz na bazie formaliny oraz że harmonogramy obróbki są właściwe dla próbki poddawanej testowi. Jeśli to możliwe, ponownie przetestować pudełko z użyciem innego bloczka. Jeśli nie jest to możliwe, oceniać razem z odpowiednim barwieniem H&E i wybierać obszary o najlepszym wzorze utrwalenia.
Słabe zachowanie morfologii tkanki	Skrawki przyklejone do szkiełek za pomocą nieodpowiedniego kleju	Stosować szkiełka BOND Plus Slides – nr katalogowy S21.2113 lub Apex BOND Slides nr katalogowy 3800040)
	Niewłaściwe utrwalenie i obróbka tkanek	Upewnić się, że stosowany jest utrwalacz na bazie formaliny oraz że harmonogramy obróbki są właściwe dla próbki poddawanej testowi. Jeśli to możliwe, ponownie przetestować pudełko z użyciem innego bloczka. Jeśli nie jest to możliwe, oceniać razem z odpowiednim barwieniem H&E i wybierać obszary o najlepszym wzorze utrwalenia.
	Niewłaściwa obróbka wstępna	Skorygować protokół obróbki wstępnej (HIER lub Enzymatic Digestion).

Tkanka odkleja się od szkiełka pacjenta/kontrolnego	Zastosowano niewłaściwy typ szkiełek lub niewłaściwe odsączenie skrawków	Upewnić się, że do skrawków pacjenta/kontrolnych użyto odpowiednich szkiełek (np. BOND Plus Slides – nr katalogowy S21.2113 lub Apex BOND Slides nr katalogowy 3800040) Upewnić się, że szkiełka zostały odpowiednio odsączone i inkubowane przez 1 godzinę w temp. 60°C.
---	--	---

Tabela 7. Leica HER2 FISH System – 30 Test Wskazówki do usuwania problemów.

Jeśli jakiegokolwiek problemy z systemem Leica HER2 FISH System – 30 Test nie zostały opisane w powyższym zestawieniu, prosimy o skontaktowanie się z lokalnym serwisem Leica Biosystems lub dystrybutorem.

Literatura

- Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA. The neu oncogene encodes an epidermal growth factor related protein. *Nature* 1986;319:226–30.
- 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.
- Wolff A.C., Hammond E.H., Schwartz J.N., et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 25, 1-28, 2007.
- Slamon DJ, Clark GM, 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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
- 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.
- 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.

Umowa licencyjna

Niniejszy produkt zawiera sondy PathVysion FISH dostarczone przez Abbott Molecular Inc.

PathVysion, LSI i CEP są znakami handlowymi Abbott Molecular Inc. Wszelkie prawa zastrzeżone. Wykorzystano na podstawie licencji.

Zmiany w stosunku do poprzedniego wydania

Dostarczone komponenty, identyfikacja symboli.

Data wydania

28 września 2020

Identyfikacja symbolowa

	Kod partii		Przechowywanie		Numer katalogowy
	Urządzenie medyczne diagnostyczne <i>in vitro</i>		Producent	SN	Numer seryjny
	eFU - patrz instrukcja obsługi		Zawiera ilość wystarczającą na <n> testów		Należy zużyć przed RRRR-MM-DD
Rx Only	Tylko na receptę				

Herceptin jest znakiem handlowym Genentech, Inc. i F. Hoffmann-La Roche Ltd.