

# Leica HER2 FISH System - 30 Test

## Οδηγίες χρήσης

Για χρήση σε σύστημα Leica Biosystems BOND-MAX and BOND-III.

Το TA9217 είναι ένα προϊόν φθορίζοντος υβριδισμού *in situ*, σχεδιασμένο για τη χρώση 30 εξετάσεων (30 αντικειμενοφόροι πλάκες χρωσμένες με 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

# Περιεχόμενα

<b>Προοριζόμενη χρήση</b> .....	<b>3</b>
Για <i>in vitro</i> διαγνωστική χρήση .....	3
Απαιτούμενη κατάρτιση .....	3
<b>Σύνοψη και επεξήγηση</b> .....	<b>3</b>
Βασικές αρχές .....	3
Σύνοψη κλινικής συμφωνίας BOND-MAX System .....	4
Σύνοψη κλινικής συμφωνίας BOND-III System .....	4
Αρχή της διαδικασίας .....	5
Παρεχόμενα συστατικά .....	5
Οδηγίες χρήσης .....	5
Φύλαξη και σταθερότητα .....	5
Προετοιμασία δειγμάτων .....	6
Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις .....	6
<b>Διαδικασία</b> .....	<b>6</b>
A. Απαιτούμενα αντιδραστήρια που δεν παρέχονται .....	6
B. Απαιτούμενος εξοπλισμός που δεν παρέχεται .....	7
Γ. Μεθοδολογία .....	7
Δ. Προπαρασκευαστική ενζυμική επεξεργασία BOND .....	7
E. Τυπικό πρωτόκολλο χρώσης .....	7
ΣΤ. Βήματα διαδικασίας .....	8
Z. Φύλαξη αντικειμενοφόρων πλακών .....	9
<b>Αξιολόγηση και μέτρηση των σημάτων</b> .....	<b>10</b>
Συνιστώμενη μέθοδος για τον καθορισμό του λόγου LSI HER2 προς CEP17 .....	11
<b>Οδηγός ερμηνείας Leica HER2 FISH System - 30 Test</b> .....	<b>12</b>
<b>Δείγμα φύλλο αγώνα</b> .....	<b>13</b>
<b>Ποιοτικός έλεγχος</b> .....	<b>14</b>
<b>Χρήση αντικειμενοφόρων πλακών-μαρτύρων</b> .....	<b>14</b>
<b>Περιορισμοί</b> .....	<b>15</b>
A. Γενικοί περιορισμοί .....	15
B. Ειδικό για το προϊόν περιορισμοί .....	15
<b>Κλινική συμφωνία του Leica HER2 FISH System - 30 Test με το Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Μαστός</b> .....	<b>16</b>
Αποτελέσματα συμφωνίας 2x2 BOND-MAX System - Μαστός .....	17
Αποτελέσματα συμφωνίας 2x2 BOND-III System - Μαστός .....	18
<b>Κλινική συμφωνία της εξέτησης του Leica HER2 FISH System - 30 Test με το Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Γαστρικός</b> .....	<b>19</b>
2x2 Αποτελέσματα συμφωνίας BOND-MAX System - Γαστρικός .....	19
<b>Έλεγχος ακρίβειας – BOND-MAX System</b> .....	<b>20</b>
A. Μελέτη ακρίβειας εντός της εκτέλεσης .....	20
B. Μελέτη ακρίβειας εντός του οργάνου .....	20
Γ. Μελέτη ακρίβειας μεταξύ εκτελέσεων .....	20
Δ. Μελέτη ακρίβειας μεταξύ εργαστηρίων .....	20
E. Μελέτη ακρίβειας μεταξύ γνωματευόντων .....	21
ΣΤ. Μελέτη ακρίβειας από παρτίδα σε παρτίδα .....	21
<b>Έλεγχος ακρίβειας – BOND-III System</b> .....	<b>21</b>
Z. Μελέτη ακρίβειας εντός της εκτέλεσης .....	21
H. Μελέτη ακρίβειας εντός του οργάνου .....	21
Θ. Μελέτη ακρίβειας μεταξύ εκτελέσεων .....	22
I. Μελέτη ακρίβειας μεταξύ εργαστηρίων .....	22
ΙΑ. Μελέτη ακρίβειας μεταξύ γνωματευόντων .....	22
ΙΒ. Μελέτη ακρίβειας από παρτίδα σε παρτίδα .....	22
<b>Αντοχή του προσδιορισμού</b> .....	<b>23</b>
<b>Αντιμετώπιση προβλημάτων</b> .....	<b>24</b>
<b>Βιβλιογραφία</b> .....	<b>26</b>
<b>Άδεια χρήσης</b> .....	<b>27</b>
<b>Προσθήκες στην προηγούμενη έκδοση</b> .....	<b>27</b>
<b>Ημερομηνία έκδοσης</b> .....	<b>27</b>
<b>Ερμηνεία των συμβόλων</b> .....	<b>27</b>

## Προοριζόμενη χρήση

### Για *in vitro* διαγνωστική χρήση

Το Leica HER2 FISH System - 30 Test έχει σχεδιαστεί για την ανίχνευση της ενίσχυσης του γονιδίου HER2/neu μέσω φθορίζοντος υβριδισμού *in situ* (FISH) σε, μονιμοποιημένα με φορμαλδεΐδη και εγκλεισμένα σε παραφίνη, εγκλεισμένα σε παραφίνη δείγματα ανθρώπινου καρκίνου του μαστού και αδενοκαρκινωμάτων του στομάχου (συμπεριλαμβανομένης της γαστροοισοφαγικής συμβολής). Το Leica HER2 FISH System - 30 Test προορίζεται για χρήση ως βοήθημα στην αξιολόγηση ασθενών, για τις οποίες/οποίους εξετάζεται το ενδεχόμενο θεραπείας με Herceptin® (trastuzumab) (βλ. φύλλο οδηγιών χρήσης Herceptin). Το Leica HER2 FISH System - 30 Test δεν προορίζεται για χρήση ως εργαλείο προληπτικής εξέτασης ή διάγνωσης του καρκίνου του μαστού. Υπόψη θα πρέπει να ληφθούν επίσης όλες οι άλλες διαθέσιμες κλινικές πληροφορίες, όπως το μέγεθος του όγκου ο αριθμός των προσβεβλημένων λεμφαδένων και η κατάσταση υποδοχών στεροειδών. Η λήψη θεραπευτικών αποφάσεων σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού δεν θα πρέπει να λαμβάνεται αποκλειστικά με βάση την κατάσταση ενίσχυσης του γονιδίου HER2.

Σημείωση: Όλες/όλοι οι ασθενείς στις κλινικές δοκιμές του Herceptin επιλέχθηκαν βάση ενός ερευνητικού ανοσοκυταροχημικού Προσδιορισμού κλινικής δοκιμής (CTA). Καμία/κανένας από τις/τους ασθενείς σε αυτές τις δοκιμές δεν επιλέχθηκε με χρήση του Leica HER2 FISH System - 30 Test. Το Leica HER2 FISH System - 30 Test έχει συγκριθεί με τον προσδιορισμό Abbott Molecular PathVysion® HER-2 DNA Probe Kit σε ανεξάρτητη ομάδα δειγμάτων και φάνηκε να παράγει αποδεκτά αποτελέσματα συμφωνίας, όπως φαίνεται στη Σύνοψη κλινικής συμφωνίας. Η πραγματική συσχέτιση των αποτελεσμάτων του Leica HER2 FISH System - 30 Test με την κλινική έκβαση δεν έχει καταδειχθεί.

Όλοι οι ασθενείς στις κλινικές μελέτες προχωρημένου καρκίνου του στομάχου Herceptin (ToGA) επιλέχθηκαν με χρήση του Dako HercepTest. Καμία/κανένας από τις/τους ασθενείς σε αυτές τις δοκιμές δεν επιλέχθηκε με χρήση του Leica HER2 FISH System - 30 Test. Το Leica HER2 FISH System - 30 Test έχει συγκριθεί με τον προσδιορισμό Abbott Molecular PathVysion® HER-2 DNA Probe Kit σε ανεξάρτητη ομάδα δειγμάτων και φάνηκε να παράγει αποδεκτά αποτελέσματα συμφωνίας, όπως φαίνεται στη Σύνοψη κλινικής συμφωνίας. Η πραγματική συσχέτιση των αποτελεσμάτων του Leica HER2 FISH System - 30 Test με την κλινική έκβαση δεν έχει καταδειχθεί.

\* Το Herceptin® είναι εμπορικό σήμα της Genentech, Inc. και της F. Hoffmann-La Roche Ltd. Το PathVysion® είναι εμπορικό σήμα της Abbott Molecular Inc. Με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος. Χρησιμοποιείται κατόπιν άδειας.

### Απαιτούμενη κατάρτιση

Η Leica Biosystems θα παράσχει σε όλους τους χρήστες υπηρεσίες κατάρτισης σχετικά με την προετοιμασία των δειγμάτων, τη διαδικασία του προσδιορισμού και την ερμηνεία των εξετάσεων FISH του γονιδίου HER2.

### Σύνοψη και επεξήγηση

#### Βασικές αρχές

Το γονίδιο HER2, επίσης γνωστό ως neu ή c-erbB2, βρίσκεται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 17, στη θέση 17q11-12 (1). Έχει φανεί πως τόσο το γονίδιο HER2 όσο και η πρωτεΐνη 185 kD που κωδικοποιεί, διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην κακοήθη εξαλλαγή και εξέλιξη του καρκίνου του μαστού (2).

Το HER2 λειτουργεί ως προγνωστικός δείκτης, με την ενίσχυση του γονιδίου και την υπερέκφραση της πρωτεΐνης να σχετίζονται με αυξημένο ποσοστό υποτροπής της νόσου και αυξημένης θνησιμότητας. Το HER2 λειτουργεί επίσης ως προγνωστικός δείκτης για επιλεγμένες συστηματικές χημειοθεραπείες και στοχευμένες αγωγές (3). Συγκεκριμένα έχει φανεί πως η ενίσχυση του γονιδίου HER2 αποτελεί ένδειξη πτωχής πρόγνωσης σε καρκίνο του μαστού με θετικούς λεμφαδένες (4-8). Επιπλέον, μία μελέτη υποδεικνύει πως η προγνωστική αξία του HER2 είναι μεγαλύτερη σε ασθενείς που υποβάλλονται σε χημειοθεραπεία (7). Παρόλ' αυτά, για την πρόβλεψη της ελεύθερης νόσου επιβίωσης και της συνολικής επιβίωσης σε μεμονωμένες/-ουσασθενείς, θα πρέπει να ληφθούν υπόψη και άλλοι καθιερωμένοι προγνωστικοί παράγοντες, όπως το μέγεθος του όγκου, ο αριθμός των θετικών λεμφαδένων και η κατάσταση των υποδοχών στεροειδών.

Η υπερέκφραση της ογκοπρωτεΐνης HER2, ως αποτέλεσμα ενίσχυσης γονιδίου σε κύτταρα καρκίνου του μαστού καθιστά το HER2 πιθανό στόχο μίας βασιζόμενης σε αντισώματα θεραπείας (3) - ενώ τα αποτελέσματα από τη μελέτη ToGA καταδεικνύουν σαφώς ότι η χρήση του Herceptin παράλληλα με τη χημειοθεραπεία αποτελεί μία αποτελεσματική θεραπεία που βελτιώνει τη γενική επιβίωση στις περιπτώσεις HER2 θετικών καρκίνων του στομάχου (9). Το Herceptin (trastuzumab) είναι ένα ανθρωποποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα (10) που προσδένεται με υψηλή συγγένεια στην ογκοπρωτεΐνη HER2 και έχει φανεί πως αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό ανθρώπινων νεοπλασματικών κυττάρων που υπερεκφράζουν την ογκοπρωτεΐνη HER2 τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (11-13). Από την ανάπτυξη του Herceptin, η ανίχνευση τόσο του γονιδίου όσο και της πρωτεΐνης HER2 έχει καταστεί βασικό εργαλείο για την αξιολόγηση καρκίνων του μαστού, καθοδηγώντας τόσο την επιλογή της θεραπείας όσο και τη συνοδή διαχείριση των ασθενών (14,15).

Η τεχνική FISH έχει χρησιμοποιηθεί για την κατάδειξη ενίσχυσης του γονιδίου HER2 τόσο σε μεσοφασικά όσο και σε μεταφασικά κύτταρα, τα οποία λήφθηκαν από ανθρώπινες κυτταρικές γραμμές καρκίνου του μαστού (16-19). Για την ποσοτικοποίηση της ενίσχυσης του γονιδίου HER2, η FISH προσδιορίζει το επίπεδο της ενίσχυσης του γονιδίου HER2 απευθείας στα νεοπλασματικά κύτταρα. Η χαρακτηριστική μορφολογία του ιστού και η χωρική κατανομή των αντιγράφων ογκογενούς διατηρούνται στα μεμονωμένα, μη καλλιεργημένα πρωτοπαθή καρκινώματα του μαστού. Στους όγκους του μαστού ανευρίσκονται επίσης συχνά ανωμαλίες του αριθμού αντιγράφων του χρωμοσώματος 17 (ανευπλοειδία). Μπορούν να παρουσιάζονται ως διαγραφές ή προσθήκες χρωμοσωμάτων (πολυσωμία). Αυτή η χρωμοσωμική παραλλαγή έχει ουσιώδη αντίκτυπο στην ερμηνεία και αναφορά την κατάστασης ενίσχυσης του γονιδίου HER2. Επομένως, η μέτρηση του αριθμού αντιγράφων του χρωμοσώματος 17 μαζί με το HER2 είναι ουσιώδους σημασίας (4).

Το Leica HER2 FISH System - 30 Test περιέχει τον ανιχνευτή DNA LSI HER2, έναν απευθείας σημασμένο με SpectrumOrange™ φθορίζοντα ανιχνευτή DNA των 226 Kb, ειδικό για τη θέση του γονιδίου HER2 (17q11.2-q12) και τον ανιχνευτή DNA CEP17, έναν απευθείας σημασμένο με SpectrumGreen™ φθορίζοντα ανιχνευτή DNA των 5,4 Kb, ειδικό για την ακολουθία του άλφα δορυφορικού DNA στην κεντρομεριδιακή περιοχή του χρωμοσώματος 17 (17p11.1-q11.1). Το διάλυμα ανιχνευτή έχει παρασκευαστεί και επικυρωθεί ειδικά για τη χρήση στο BOND System και δεν πρέπει να τροποποιείται ή να χρησιμοποιείται σε χειροκίνητες εκτελέσεις.

## Σύνοψη κλινικής συμφωνίας BOND-MAX System

Το Leica HER2 FISH System - 30 Test αναπτύχθηκε ως μία πλήρως αυτοματοποιημένη εναλλακτική στις τρέχουσες μεθόδους για τον καθορισμό της κατάστασης ενίσχυσης του γονιδίου HER2. Η απόδοση του Leica HER2 FISH System - 30 Test στο BOND-MAX System αξιολογήθηκε σε μία ανεξάρτητη μελέτη, στην οποία συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα του Leica HER2 FISH System - 30 Test με το Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit Assay σε 300 δείγματα καρκίνου του μαστού και σε 109 δείγματα αδενοκαρκινωμάτων του στομάχου (συμπεριλαμβανομένης της γαστροοισοφαγικής συμβολής). Κανένα από αυτά τα δείγματα όγκων δεν λήφθηκε από ασθενείς των κλινικών δοκιμών του Herceptin. Τα αποτελέσματα για το μαζικό ιστό κατέδειξαν συμφωνία 99,33% στο πλαίσιο ανάλυσης 2x2 (διαστήματα αξιοπιστίας 95% από 97,61–99,92%). Τα αποτελέσματα για τα δείγματα αδενοκαρκινωμάτων του στομάχου (συμπεριλαμβανομένης της γαστροοισοφαγικής συμβολής) κατέδειξαν συμφωνία 98,17% στο πλαίσιο ανάλυσης 2x2 (διαστήματα αξιοπιστίας 95% από 93,53–99,78%). Τα δεδομένα συμφωνίας υποδεικνύουν επίσης πως ένα θετικό αποτέλεσμα με το Leica HER2 FISH System - 30 Test σχετίζεται πιθανότατα με θετικό αποτέλεσμα στον προσδιορισμό Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit. Το Leica HER2 FISH System - 30 Test ερμηνεύεται ως αρνητικό για την ενίσχυση του γονιδίου HER2 όταν ο λόγος γονιδίων HER2:CEP17 είναι μικρότερος του 2,0 και ως θετικό όταν ο λόγος γονιδίων HER2:CEP17 είναι μεγαλύτερος ή ίσος του 2,0. Τα αμφίβολα (οριακά) αποτελέσματα, όπου ο λόγος γονιδίων HER2:CEP17 είναι μεταξύ ή ίσος με 1,8-2,2, θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή. Μετρήστε 20 επιπλέον πυρήνες και υπολογίστε ξανά το λόγο.

## Σύνοψη κλινικής συμφωνίας BOND-III System

Το Leica HER2 FISH System - 30 Test αναπτύχθηκε ως μία πλήρως αυτοματοποιημένη εναλλακτική στις τρέχουσες μεθόδους για τον καθορισμό της κατάστασης ενίσχυσης του γονιδίου HER2. Η απόδοση του Leica HER2 FISH System - 30 Test στο BOND-III System αξιολογήθηκε σε μία ανεξάρτητη μελέτη, στην οποία συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα του Leica HER2 FISH System - 30 Test με εκείνα του Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit Assay σε 300 δείγματα όγκου μαστού. Κανένα από αυτά τα δείγματα όγκων δεν λήφθηκε από ασθενείς των κλινικών δοκιμών του Herceptin. Τα αποτελέσματα υπέδειξαν συμφωνία 99,67% σε ανάλυση 2x2 (διαστήματα αξιοπιστίας κατά 95% από 98,16–99,99%). Τα δεδομένα συμφωνίας υποδεικνύουν επίσης πως ένα θετικό αποτέλεσμα με το Leica HER2 FISH System - 30 Test σχετίζεται πιθανότατα με θετικό αποτέλεσμα στον προσδιορισμό Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit. Το Leica HER2 FISH System - 30 Test ερμηνεύεται ως αρνητικό για την ενίσχυση του γονιδίου HER2 όταν ο λόγος γονιδίων HER2:CEP17 είναι μικρότερος του 2,0 και ως θετικό όταν ο λόγος γονιδίων HER2:CEP17 είναι μεγαλύτερος ή ίσος του 2,0. Τα αμφίβολα (οριακά) αποτελέσματα, όπου ο λόγος γονιδίων HER2:CEP17 είναι μεταξύ ή ίσος με 1,8-2,2, θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή. Μετρήστε 20 επιπλέον πυρήνες και υπολογίστε ξανά το λόγο.

## Αρχή της διαδικασίας

Το Leica HER2 FISH System - 30 Test περιέχει συστατικά που απαιτούνται για την ολοκλήρωση μίας διαδικασίας χρώσης με βάση τον φθορίζοντα υβριδισμό *in situ* σε ιστούς που έχουν μονιμοποιηθεί σε φορμαλδεΐδη και εγκλειστεί σε παραφίνη. Έπειτα από την κατάλληλη προπαρασκευαστική επεξεργασία, την επώαση με το έτοιμο για χρήση LSI HER2/CEP17 Dual Probe και την ενδεδειγμένη σχολαστική πλύση, οι τομές ιστού αφυδατώνονται και προσκολλώνται με DAPI. Τα αποτελέσματα ερμηνεύονται με μικροσκοπία φθορισμού, χρησιμοποιώντας τα προτεινόμενα φίλτρα στα ενδεδειγμένα μήκη κύματος.

Το Leica HER2 FISH System - 30 Test προορίζεται για χρήση μόνο στο BOND-MAX και το σύστημα BOND-III.

## Παρεχόμενα συστατικά

Τα παρακάτω υλικά (Πίνακας 1) επαρκούν για τη χρώση 30 εξετάσεων (30 αντικειμενοφόροι πλάκες, χρωσμένες με LSI HER2/CEP17 Dual Probe).

<b>LSI HER2/CEP17 Probe</b> <b>6,6 ml</b>	Περιέχει έτοιμο για χρήση LSI HER2/CEP17 Dual Probe. Περιέχει <60% (v/v) φορμαμίδη.
<b>Post Hybridization Wash 2</b> <b>9 ml</b>	Περιέχει έτοιμο για χρήση διάλυμα πλύσης μετά τον υβριδισμό. Περιέχει <50% (v/v) φορμαμίδη.
<b>BOND Enzyme Concentrate 2</b> <b>1 ml</b>	Περιέχει διάλυμα Πρωτεΐνης Κ στα 1,7 mg/ml.
<b>BOND Enzyme Diluent</b> <b>65 ml</b>	Περιέχει Αραιωτικό ενζύμου.
<b>BOND Open Container</b> <b>3 x 7 ml</b>	BOND Open Container που χρησιμοποιείται για Enzyme 5.

Πίνακας 1: Συστατικά του Leica HER2 FISH System - 30 Test

Ανατρέξτε στα επιμέρους φύλλα δεδομένων ασφάλειας υλικού (MSDS) για περισσότερες πληροφορίες ασφάλειας των προϊόντων. Διατίθενται από τη Leica στην ιστοσελίδα, [www.LeicaBiosystems.com/TA9217-IFU](http://www.LeicaBiosystems.com/TA9217-IFU)

## Οδηγίες χρήσης

Όλα τα παρεχόμενα αντιδραστήρια έχουν παρασκευαστεί ειδικά για χρήση με αυτόν τον προσδιορισμό και οι αριθμοί παρτίδας είναι ειδικοί για κάθε Leica HER2 FISH System - 30 Test. Για να είναι έγκυρος ο προσδιορισμός, δεν επιτρέπονται τα υποκατάστατα.

## Φύλαξη και σταθερότητα

Να φυλάσσεται στους 2–8 °C. Να μην καταψύχεται. Να επιστρέφεται στους 2–8 °C αμέσως μετά τη χρήση. Οποιαδήποτε απόκλιση από αυτές τις συνθήκες θα καταστήσει άκυρο τον προσδιορισμό. Βεβαιωθείτε πως το Leica HER2 FISH System - 30 Test χρησιμοποιείται πριν από την ημερομηνία λήξης του. Η θολότητα των διαλυμάτων (εκτός από το διάλυμα ανιχνευτή) και η δημιουργία οσμής αποτελούν ενδείξεις επιμόλυνσης και/ή αστάθειας του Leica HER2 FISH System - 30 Test. Τυχόν διαφορετικές συνθήκες φύλαξης από αυτές που καθορίζονται παραπάνω, θα πρέπει να επικυρώνονται από το χρήστη.

## Προετοιμασία δειγμάτων

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πρότυπες μέθοδοι επεξεργασίας ιστού για όλα τα δείγματα (20). Συνιστάται η προετοιμασία των ιστών σε μονιμοποιητικά με βάση τη φορμαλδεΐδη, η τυπική επεξεργασία τους και η σκλήνωσή τους σε παραφίνη. Τα δείγματα θα πρέπει, για παράδειγμα, να λαμβάνονται με πάχος 3–4 mm και να μονιμοποιούνται για 18–24 ώρες σε ουδέτερη ρυθμισμένη φορμαλδεΐδη 10%. Οι ιστοί θα πρέπει κατόπιν να αφυδατώνονται σε σειρές αλκοόλης και να διαυγάζονται σε ξυλένιο. Κατόπιν πρέπει να εγκλείονται σε ρευστή παραφίνη, σε θερμοκρασία που δεν υπερβαίνει τους 60 °C. Το πάχος τομής των δειγμάτων θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 4–6 μm.

Οι τομές ιστού που έχουν προσκολληθεί σε φορτισμένες αντικειμενοφόρους πλάκες (BOND Plus Slides – κωδικός προϊόντος S21.2113 'H Apex BOND Slides κωδικός προϊόντος 3800040) διατηρούνται για έως και 12 μήνες στους 2–8 °C πριν από τη χρώση. Μετά τη λήψη τομών, συνιστάται η επώαση των αντικειμενοφόρων πλακών για μία ώρα στους 60 °C. Οι χρωσμένες τομές θα πρέπει να φυλαχθούν στους -20 °C για τη διατήρηση των σημάτων φθορισμού και την αποτροπή εξασθένησής τους. Πριν από την ανάγνωση, αφήστε τις αντικειμενοφόρους πλάκες να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου.

## Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

*Μόνο για επαγγελματική χρήση.*

Ένα ή περισσότερα συστατικά του προϊόντος είναι επιβλαβή και μπορούν να προκαλέσουν βλάβη υγείας σε έμβρυα.

Ως γενικός κανόνας, δεν επιτρέπεται η εργασία ατόμων ηλικίας κάτω των 18 ετών με αυτό το προϊόν. Στους χρήστες πρέπει να δοθούν προσεκτικές οδηγίες σχετικά με την ενδεδειγμένη διαδικασία εργασίας, τις επιβλαβείς ιδιότητες του προϊόντος και τις αναγκαίες οδηγίες ασφαλείας.

Ο χειρισμός των δειγμάτων, πριν και μετά τη μονιμοποίηση, και όλων των υλικών που εκτίθενται σε αυτά, θα πρέπει να γίνεται σαν αυτά να μπορούν να μεταδώσουν λοίμωξη. Θα πρέπει να απορρίπτονται με τις ενδεδειγμένες προφυλάξεις.

Ποτέ μη διανέμετε αντιδραστήρια αναρροφώντας με το στόμα και αποφύγετε την επαφή των αντιδραστηρίων και των δειγμάτων με το δέρμα και με βλεννογόρους. Εάν τα αντιδραστήρια ή τα δείγματα έλθουν σε επαφή με ευαίσθητες περιοχές, εκπλύνετε με άφθονο νερό. Αναζητήστε ιατρική βοήθεια. Ανατρέξτε στις εθνικές/νομαρχιακές ή τοπικές διατάξεις σχετικά με την απόρριψη οποιουδήποτε δυνητικά τοξικού συστατικού.

Ελαχιστοποιήστε την μικροβιακή επιμόλυνση αντιδραστηρίων. Διαφορετικά μπορεί να ενισχυθεί η μη ειδική χρώση.

## Διαδικασία

### A. Απαιτούμενα αντιδραστήρια που δεν παρέχονται

- BOND Dewax Solution (AR9222)
- BOND Epitope Retrieval Solution 1 (AR9961)
- BOND Wash Solution x10 Concentrate (AR9590)

- Πρότυποι διαλύτες που χρησιμοποιούνται σε προσδιορισμούς φθορίζοντος υβριδισμού *in situ* (π.χ. αιθανόλη, απόλυτη ή διαβαθμισμένη)
- Απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό
- Αντιχρωστική DAPI
- Leica HER2 FISH Control Slides (TA9123)
- BOND Aspirating Probe Cleaning System (CS9100)

## B. Απαιτούμενος εξοπλισμός που δεν παρέχεται

- Πιπέτες (με ικανότητα μέτρησης όγκων 1-20 µL και 100 – 1000 µL)
- Φορτισμένες αντικειμενοφόροι πλάκες (BOND Plus Slides – κωδικός προϊόντος S21.2113 'H Apex BOND Slides κωδικός προϊόντος 3800040)
- BOND-MAX (21.0051) or BOND-III (21.2201)
- BOND Universal Covertiles™ (S21.2001, S21.4583 ή S21.4611)
- BOND Mixing Stations (S21.1971)
- BOND Slide Label & Print Ribbon (S21.4564)
- Καλυπτρίδες
- Κλίβανος ξήρασης, (με ικανότητα διατήρησης 60 °C)
- Μικροσκόπιο φθορισμού (αντικειμενικός φακός 60–100x) με κατάλληλη φωτεινή πηγή. Καταγράψτε τον αριθμό ωρών που έχει χρησιμοποιηθεί ο λαμπτήρας και αντικαταστήστε τον προτού υπερβεί την ονομαστική διάρκεια χρήσης. Βεβαιωθείτε πως ο λαμπτήρας έχει ευθυγραμμιστεί σωστά.
- Κατάλληλο σετ φίλτρων φθορισμού (SpectrumOrange™ – μέγιστο διέγερσης στα 559nm, μέγιστο εκπομπής στα 588nm, SpectrumGreen™ – μέγιστο διέγερσης στα 497nm, μέγιστο εκπομπής στα 524nm και DAPI – μέγιστο διέγερσης στα 367nm, μέγιστο εκπομπής στα 452nm). Σετ φίλτρων διέλευσης πολλαπλών ζωνών συχνοτήτων (ζωνοπερατά, multi-bandpass) για μικροσκόπια φθορισμού, βελτιστοποιημένα για χρήση με το Leica HER2 FISH System - 30 Test είναι διαθέσιμα για τα περισσότερα μοντέλα μικροσκοπίων. Τα συνιστώμενα σετ φίλτρων για το Leica HER2 FISH System - 30 Test είναι το διπλό ζωνοπερατό DAPI/9-Orange, το διπλό ζωνοπερατό DAPI/Green, το διπλό ζωνοπερατό Green/Orange(V.2) και το τριπλό ζωνοπερατό DAPI/Green/Orange (V.2).

## Γ. Μεθοδολογία

- Πριν από την εκτέλεση αυτής της μεθοδολογίας, οι χρήστες υποχρεούνται να καταρτιστούν επαρκώς στην τεχνική του αυτοματοποιημένου φθορισμού *in situ*.
- Κάθε τομή εξέτασης που χρωματίζεται με το LSI HER2/CEP17 Dual Probe επιτρέπει την ίδια κυτταρική ανάλυση των σημάτων τόσο του HER2 όσο και του κεντρομεριδιακού χρωμοσώματος 17. Ο προκύπτων λόγος σημάτων HER2 προς χρωμόσωμα 17 επιτρέπει την αντιστοίχιση μίας ποσοτικής τιμής στο δείγμα, επισημαίνοντας ένα αρνητικό (μη ενισχυμένο) ή θετικό (ενισχυμένο) αποτέλεσμα. Τα αμφίβολα (οριακά) αποτελέσματα (1,8-2,2) θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή. Μετρήστε 20 επιπλέον πυρήνες και υπολογίστε ξανά το λόγο.

## Δ. Προπαρασκευαστική ενζυμική επεξεργασία BOND

Πριν από τη χρήση, αραιώστε το παρεχόμενο BOND Enzyme Concentrate 2 σε αναλογία 1:300 χρησιμοποιώντας το παρεχόμενο BOND Enzyme Diluent σε ένα από τα παρεχόμενα δοχεία BOND Open Containers. Για παράδειγμα, για τη χρώση 10 αντικειμενοφόρων πλακών παρασκευάστε 3 ml ενζυμικού διαλύματος εργασίας, αραιώνοντας 10 µL του BOND Enzyme Concentrate 2 σε 2990 µL του BOND Enzyme Diluent. Συνιστούμε να προετοιμάζετε το ένζυμο μόλις πριν από κάθε εκτέλεση χρώσης και να χρησιμοποιείτε ελάχιστο όγκο 900 µL ανά εκτέλεση.

## E. Τυπικό πρωτόκολλο χρώσης

Συνιστάται η χρήση του Leica HER2 FISH System - 30 Test μαζί με το προτεινόμενο, τυπικό πρωτόκολλο χρώσης που παρατίθεται στον Πίνακα 2 που ακολουθεί.

Τύπος πρωτοκόλλου	Όνομασία πρωτοκόλλου
Χρώση	*FISH Protocol A
Προετοιμασία	*Dewax
HIER	*HIER 25 min with ER1 (97)
Ένζυμο	*Enzyme 5 for 25 min
Μετουσίωση	*D10
Υβριδισμός	*ISH Hybridization (12Hr)

Πίνακας 2: Τυπικό πρωτόκολλο Leica HER2 FISH Staining - 30 Test Protocol

## ΣΤ. Βήματα διαδικασίας

Αυτές οι οδηγίες θα πρέπει να διαβαστούν μαζί με το εγχειρίδιο χρήσης του BOND-MAX and BOND III System. Για κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα πρέπει να χρησιμοποιείται νέο BOND Universal Covertile.

Η χρήση των BOND Universal Covertiles, τα οποία έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί σε ανοσοϊστοχημική χρώση ή χρώση *in situ* υβριδισμού, δεν έχει επικυρωθεί για αυτήν την εξέταση.

1. Στο BOND-MAX and BOND-III System, βεβαιωθείτε πως οι περιέκτες ασυσκεύαστων προϊόντων και μολυσματικών αποβλήτων διαθέτουν επαρκή χωρητικότητα για τη διενέργεια των απαιτούμενων εκτελέσεων χρώσης.
2. Βεβαιωθείτε πως υπάρχουν επαρκείς ποσότητες αλκοόλης, απεσταγμένου ή αποιονισμένου νερού, BOND Dewax Solution, BOND Epitope Retrieval Solution 1 και BOND Wash Solution στους περιέκτες ασυσκεύαστων αντιδραστήριων, για τη διενέργεια των απαιτούμενων εκτελέσεων χρώσης.
3. Βεβαιωθείτε πως έχει εγκατασταθεί ένα καθαρό BOND Mixing Station.
4. Ενεργοποιήστε το BOND-MAX and BOND-III System.
5. Ενεργοποιήστε τον H/Y που έχει προσαρτηθεί στο BOND-MAX and BOND-III System.
6. Ανοίξτε το λογισμικό BOND.
7. Για ένα νέο kit Leica HER2 FISH System - 30 Test, σαρώστε το γραμμωτό κώδικα του συρταριού αντιδραστήριου με το σαρωτή χειρός για να καταχωρίσετε το σύστημα στον κατάλογο αντιδραστήριων του BOND (μόνο μεμονωμένος γραμμωτός κώδικας).
8. Παρασκευάστε BOND Enzyme 5 στον παρεχόμενο περιέκτη BOND Open Container με αραιώση 1:300. Για παράδειγμα, για 10 αντικειμενοφόρους πλάκες προσθέστε 10μL του BOND Enzyme Concentrate 2 σε 2990 μL του BOND Enzyme Diluent.
9. Σαρώστε τον παρεχόμενο περιέκτη BOND Open Container και καταχωρίστε τον ως Bond Enzyme 5.
10. Ανοίξτε την οθόνη ρύθμισης παραμέτρων Αντικειμενοφόρων πλακών και κάντε κλικ στο **Προσθήκη περίπτωσης**.
11. Καταχωρίστε τις λεπτομέρειες για το πρώτο περιστατικό. Βεβαιωθείτε πως ο όγκος διανομής έχει ρυθμιστεί στα 150 μL και πως ως πρωτόκολλο προετοιμασίας έχει επιλεγεί το πρωτόκολλο \*Dewax. Κάντε κλικ στο **OK**.
12. Έχοντας επισημάνει το περιστατικό στην οθόνη Ρύθμισης παραμέτρων Αντικειμενοφόρων πλακών, κάντε κλικ στο **Προσθ. πλακ.**
13. Καταρχήν, προσθέστε τις αντικειμενοφόρους πλάκες εξέτασης ασθενών. Βεβαιωθείτε πως ως τύπος ιστού έχει επιλεγεί **Ιστός εξέτασης**.
14. Ως τρόπο λειτουργίας χρώσης επιλέξτε **Μονή**.
15. Επιλέξτε τη διαδικασία **ISH**.



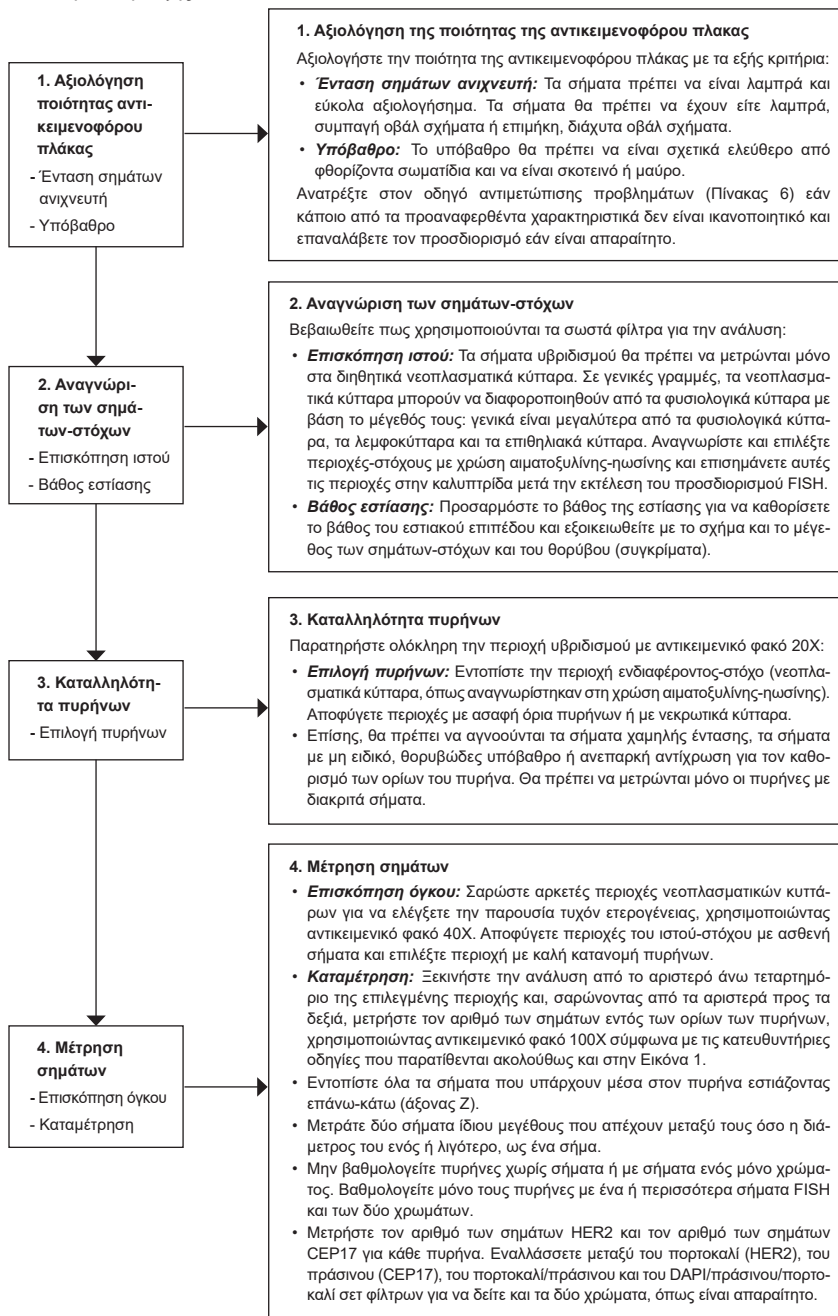
16. Από τη λίστα ανιχνευτών, επιλέξτε **\*LSI HER2/CEP17 Dual Probe – 30 Test**. Η καρτέλα Protocols προεπιλέγει το σωστό πρωτόκολλο χρώσης (\*FISH Protocol A), πρωτόκολλο HIER (**\*HIER 25 min with ER1 (97)**), πρωτόκολλο EIER (**\*Enzyme 5 for 25 min**), μετουσίωση (**\*D10**) και υβριδισμό (**\*ISH Hybridization (12Hr)**).
17. Επαναλάβετε τα βήματα 10 έως 16 ώσπου να δημιουργηθούν οι αντικειμενοφόροι πλάκες εξέτασης ασθενών και οι μάρτυρες (αντικειμενοφόροι πλάκες-μάρτυρες Leica HER2 FISH και/ ή μάρτυρες του εργαστηρίου). Εκτυπώστε τις επικέτες των αντικειμενοφόρων πλακών.
18. Τοποθετήστε τις σωστές επικέτες στις αντικειμενοφόρους πλάκες.
19. Ανοίξτε τα καλύμματα όλων των περιεκτών του Leica HER2 FISH System - 30 Test και φορτώστε το συρτάρι αντιδραστηρίων στο BOND-MAX and BOND-III System.
20. Εφαρμόστε καινούργια πλακίδια κάλυψης Covertile σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα.
21. Φορτώστε το συρτάρι αντικειμενοφόρων πλακών στο BOND-MAX and BOND-III System και πατήστε το πλήκτρο **Φόρτωση/Εκφόρτωση**.
22. Επιβεβαιώστε πως έχουν σαρωθεί όλες οι αντικειμενοφόροι πλάκες και κάντε κλικ στο πλήκτρο **Run (Play)** στην οθόνη Κατάστασης συστήματος, για να ξεκινήσετε αμέσως την εκτέλεση (για το Leica HER2 FISH System - 30 Test συνιστάται η εκτέλεση αυτού του προσδιορισμού κατά τη διάρκεια της νύχτας με χρήση της λειτουργίας καθυστερημένες εκκίνησης).
23. Βεβαιωθείτε πως στο πεδίο ένδειξης του συρταριού προβάλλεται η ένδειξη **Επεξεργασία (OK)**, ο αριθμός παρτίδας και ο χρόνος ολοκλήρωσης.
24. Μόλις ολοκληρωθεί η εξέταση, πατήστε το πλήκτρο **Φόρτωση/Εκφόρτωση** και αφαιρέστε το συρτάρι αντικειμενοφόρων πλακών από το BOND-MAX and BOND-III System.
25. Αφαιρέστε τα πλακίδια κάλυψης Covertile και εκπλύνετε τις αντικειμενοφόρους πλάκες σε απιονισμένο νερό.
26. Αφυδατώστε γρήγορα με δύο αλλαγές αλκοόλης και στεγνώματος στον αέρα.
27. Προσθέστε 20μL DAPI απευθείας επάνω στο δείγμα.
28. Εφαρμόστε καλυπτρίδα και αφήστε το διάλυμα να απλωθεί πλήρως, και φροντίστε να αφαιρέσετε τυχόν φυσαλίδες αέρα.
29. Σφραγίστε την ακμή της καλυπτρίδας με βερνίκι νυχιών ή παρόμοιο υλικό σφράγισης.
30. Τοποθετήστε τις αντικειμενοφόρους πλάκες στο σκοτάδι για να διευκολύνετε την ανάπτυξη των σημάτων, προτού κοιτάξετε μέσα από μικροσκόπιο φθορισμού.
31. Για τη διατήρηση της έντασης των σημάτων, φυλάξτε τις αντικειμενοφόρους πλάκες στους -20 °C.

## Z. Φύλαξη αντικειμενοφόρων πλακών

Φυλάσσετε τις χρωσμένες αντικειμενοφόρους πλάκες στους -20 °C, στο σκοτάδι. Για την ανάγνωση, βγάλτε τις αντικειμενοφόρους πλάκες από τους -20 °C και αφήστε τις να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου.

# Αξιολόγηση και μέτρηση των σημάτων

Για την αξιολόγηση της ποιότητας των σημάτων και την μέτρηση των σημάτων HER2 και CEP17 ακολουθήστε την εξής διαδικασία:



## Συνιστώμενη μέθοδος για τον καθορισμό του λόγου LSI HER2 προς CEP17

Για να καθορίσετε το λόγο LSI HER2 προς CEP17, χρησιμοποιήστε την ακόλουθη μέθοδο:

1. Καταγράψτε και καθορίστε τον αριθμό των σημάτων LSI HER2 και CEP17 σε 20 πυρήνες (βλ. Εικόνα 2 παρακάτω, φύλλο βαθμολογίας Leica HER2 FISH System - 30 Test).
2. Αθροίστε όλα τα σήματα LSI HER2. Αυτός ο αριθμός αντιπροσωπεύει τα συνολικά σήματα LSI HER2 για τη μέτρηση, π.χ. 143.
3. Αθροίστε όλα τα σήματα CEP17. Αυτός ο αριθμός αντιπροσωπεύει τα συνολικά σήματα CEP17 για τη μέτρηση, π.χ. 48.
4. Για τον υπολογισμό του τελικού αποτελέσματος, χρησιμοποιήστε την ακόλουθη εξίσωση:  
Συνολικός αριθμός σημάτων LSI HER2 δια του συνολικού αριθμού των σημάτων CEP17, π.χ.  $143/48$  ισοδυναμεί με λόγο 2,98, που είναι θετικός για ενίσχυση του HER2.

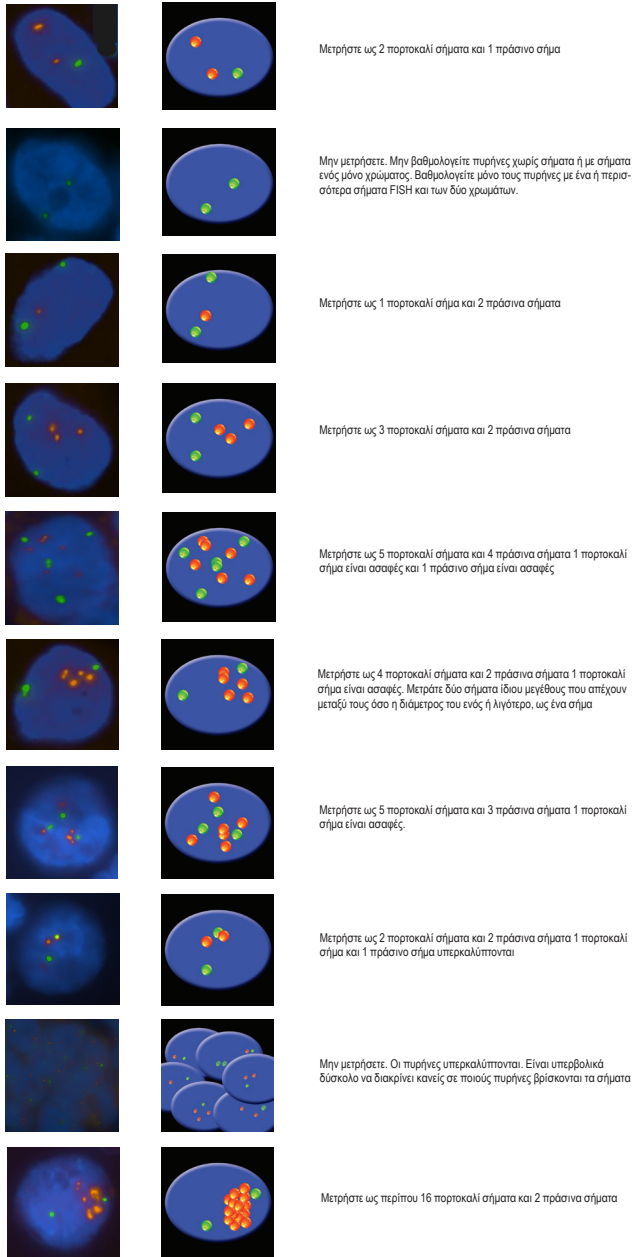
**Σημαντική σημείωση: Εάν ο λόγος LSI HER2 προς CEP17 είναι αμφίβολος (1,80 - 2,20), μετρήστε 20 ακόμη πυρήνες και υπολογίστε ξανά το λόγο.**

Τα αποτελέσματα θα πρέπει να αναφέρονται ως εξής:

1. Σε λόγο  $<2$ , δεν παρατηρήθηκε ενίσχυση του γονιδίου HER2
2. Σε λόγο  $\geq 2$ , παρατηρήθηκε ενίσχυση του γονιδίου HER2

**Σημαντική σημείωση: Λόγος στην τιμή αποκοπής ή κοντά στην τιμή αποκοπής (1,80 - 2,20) θα πρέπει να ερμηνεύεται με προσοχή, όπως περιγράφεται παραπάνω.**

# Οδηγός ερμηνείας Leica HER2 FISH System - 30 Test



Εικόνα 1: Οδηγός ερμηνείας

# Δείγμα φύλλο αγώνα

Μέτρηση σημάτων από 20 πυρήνες					
Αρ. πυρήνα	Αριθμός αντιγράφων HER2	Αριθμός αντιγράφων CEP17	Αρ. πυρήνα	Αριθμός αντιγράφων HER2	Αριθμός αντιγράφων CEP17
1			11		
2			12		
3			13		
4			14		
5			15		
6			16		
7			17		
8			18		
9			19		
10			20		
Σύνολο 1-10			Σύνολο 11-20		

	HER2	CEP17	Λόγος ενίσχυσης HER2:CEP17
<b>Συνολική βαθμολογία 1-20</b>			
<b>Μέσος όρος ανά κύτταρο</b>			

Εικόνα 2: Φύλλο βαθμολογίας δείγματος

## Αυτοματοποιημένη μέθοδος Ariol για τον προσδιορισμό HER2 FISH

Η χρήση της ψηφιακής εφαρμογής κατάταξης αποτελεσμάτων Ariol PathVysion® ως βοήθημα στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων επικυρώθηκε ανεξάρτητα με διαφορετική κοόρτη δειγμάτων για χρήση με το Leica HER2 FISH System. Η ψηφιακή εφαρμογή κατάταξης αποτελεσμάτων Ariol PathVysion, όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με το Leica HER2 FISH System προορίζεται για in vitro διαγνωστική χρήση. Όταν χρησιμοποιείται με το Leica HER2 FISH System, η εφαρμογή Ariol PathVysion πρέπει να βαθμονομείται για χρήση με πλακίδια μάρτυρα, **όχι** με τα πλακίδια Leica HER2 FISH Control Slides (TA9123).

**Όλες οι διαγνωστικές αποφάσεις πρέπει να λαμβάνονται από τον ειδικό κλινικό ιατρό.** Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήσης του συστήματος Ariol.

### Ποιοτικός έλεγχος

#### Χρήση αντικειμενοφόρων πλακών-μαρτύρων

Συνιστάται η συμπερίληψη ενός Leica HER2 FISH Control Slide σε κάθε εκτέλεση εξέτασης για την παρακολούθηση της απόδοσης του προσδιορισμού και την αξιολόγηση της ακρίβειας μέτρησης των σημάτων. Οι αντικειμενοφόροι πλάκες-μάρτυρες θα πρέπει να εκτελούνται για κάθε παρτίδα χρώσης στο BOND-MAX and BOND-III System και με κάθε νέα παρτίδα αντιδραστηρίων. Εκτός αυτού, ο κάθε χρήστης μπορεί να επιλέξει τη χρήση υλικού-μάρτυρα του ίδιου του εργαστηρίου.

Αξιολογήστε την ποιότητα της αντικειμενοφόρου πλάκας-μάρτυρα και μετρήστε τα σήματα σύμφωνα με τις οδηγίες στην ενότητα **Αξιολόγηση και μέτρηση των σημάτων**. Θα πρέπει να πληρούνται τα κριτήρια ποιότητας αντικειμενοφόρων πλακών, ενώ τα αποτελέσματα του λόγου HER2:CEP17 θα πρέπει να βρίσκονται εντός των καθιερωμένων ευρών για την αποδεκτή απόδοση εξέτασης. Βλ. Πίνακα 3 για τα κριτήρια αποδοχής των Leica HER2 FISH Control Slides.

Κυτταρική σειρά	Προφίλ Bond Oracle HER2 IHC System	Φορτίο υποδοχέα HER2 ανά κύτταρο*	Κριτήρια αποδοχής Leica HER2 FISH System - 30 Test HER2:CEP17
SKBr-3	3+	$4,3 \times 10^5$	Παρατηρήθηκε ενίσχυση του HER2
MDA-MB-453	2+	$1,4 \times 10^5$	Ο λόγος HER2/CEP17 πρέπει να βρίσκεται μεταξύ 1,5 – 2,5
MDA-MB-175	1+	$6,3 \times 10^4$	Δεν παρατηρήθηκε ενίσχυση του HER2
MDA-MB-231	0	$9,3 \times 10^3$	Δεν παρατηρήθηκε ενίσχυση του HER2

*Ανάλυση φορτίου υποδοχέα \*HER2 όπως αξιολογήθηκε με κυτταρομετρία ροής  
Πίνακας 3: Ερμηνεία Leica HER2 FISH Control Slide.*

Σε περίπτωση αστοχίας των μαρτύρων του προσδιορισμού, είναι αδύνατη η αναφορά των αποτελεσμάτων FISH γι' αυτό το περιστατικό. Εάν οι αντικειμενοφόροι πλάκες-μάρτυρες δεν πληρούν τα κριτήρια αποδοχής αντικειμενοφόρων πλακών, πρόκειται ενδεχομένως για λανθασμένη απόδοση του Leica HER2 FISH System - 30 Test. Σε αυτήν την περίπτωση, απαιτείται επαναληπτική εξέταση με καινούργιες αντικειμενοφόρους πλάκες-μάρτυρες και αντικειμενοφόρο/-ους πλάκα/-ες δειγμάτων ασθενούς. Εάν τα αποτελέσματα βρίσκονται εκτός του καθορισμένου εύρους, αλλά οι αντικειμενοφόροι πλάκες πληρούν τα κριτήρια αποδοχής για την ποιότητα, ενδεχομένως θα πρέπει να επαναλάβετε την μέτρηση αυτής της αντικειμενοφόρου πλάκας, διότι η μέτρηση μπορεί να εκτελέστηκε λανθασμένα. Συμβουλευτείτε τον οδηγό αντιμετώπισης προβλημάτων (Πίνακας 6) σε περίπτωση αστοχίας του υβριδισμού, είτε με το δείγμα είτε με την αντικειμενοφόρο ή αντικειμενοφόρους πλάκες.

Για τα κλινικά δείγματα, όταν η ερμηνεία του σήματος υβριδισμού είναι δυσχερής και το δείγμα δεν αρκεί για επανάληψη του προσδιορισμού, η εξέταση δεν είναι καταποτιστική. Εάν ο αριθμός των κυττάρων δεν επαρκεί για ανάλυση, η εξέταση δεν είναι καταποτιστική.

Τα δείγματα ασθενών θα πρέπει να ελέγχονται σύμφωνα με τις τυπικές διαδικασίες λειτουργίας του εργαστηρίου. Οι ποιότητα των σημάτων και τα αποτελέσματα της μέτρησης θα πρέπει να καταγράφονται σε κατάλληλο έντυπο αναφοράς.

## Περιορισμοί

### A. Γενικοί περιορισμοί

Η τεχνική FISH είναι μία τεχνική που προϋποθέτει ειδική εκπαίδευση σε όλες τις πτυχές της διαδικασίας (συμπεριλαμβανομένης της επιλογής κατάλληλων αντιδραστηρίων, ιστού, μονιμοποίησης, επεξεργασίας και προετοιμασίας της αντικειμενοφόρου πλάκας) και της ερμηνείας. Η χρώση του ιστού εξαρτάται από το χειρισμό, τη μονιμοποίηση και την επεξεργασία του ιστού πριν από τη χρώση. Η ακατάλληλη μονιμοποίηση, κατάψυξη, απόψυξη, πλύση, ξήρανση, θέρμανση, κοπή ή η επιμόλυνση με άλλους ιστούς ή υγρά ενδέχεται να επιφέρει σφάλματα μορφολογίας, μετουσίωση νουκλεϊκών οξέων, φθορισμό υποβάθρου ή ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Τα ασυνεπή αποτελέσματα μπορεί να οφείλονται σε διακυμάνσεις της μονιμοποίησης, των μεθόδων σκλήνωσης ή σε εγγενείς ανωμαλίες του ίδιου του ιστού (21). Η υπερβολική ή η ανεπαρκής αντίχρωση μπορεί επίσης να επιφέρει έκπτωση της ορθής ερμηνείας των αποτελεσμάτων.

Η μη ειδική χρώση που οφείλεται σε μη προσοδεδεμένο ανιχνευτή χαρακτηρίζεται από αραιή, κοκκώδη εμφάνιση και μπορεί να απεικονιστεί στην αναμενόμενη θέση υβριδισμού ή μακριά από αυτήν. Χρησιμοποιείτε ακέραια κύτταρα για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων χρώσης. Τα νεκρωτικά ή εκφυλισμένα κύτταρα μπορεί να παρουσιάσουν μη ειδική χρώση (22). Η μη αναμενόμενη χρώση FISH και οι διακυμάνσεις της χρώσης ενδέχεται να οφείλονται σε μεταβολές των επιπέδων έκφρασης του κωδικοποιητικών γονιδίων. Οποιαδήποτε μεταβολή των αναμενόμενων προτύπων χρώσης θα πρέπει να ερμηνεύεται σε συνδυασμό με όλες τις υπόλοιπες διαγνωστικές εξετάσεις. Η ερμηνεία της χρώσης θα πρέπει να συμπληρώνεται από μορφολογικές μελέτες και τη χρήση κατάλληλου υλικού μάρτυρα. Θα πρέπει δε να αξιολογείται στο πλαίσιο του αναμνηστικού της/τους ασθενούς και οποιωνδήποτε άλλων διαγνωστικών εξετάσεων, από έμπειρο ιατρό Παθολογοανατόμο.

Η απόδοση του προσδιορισμού (δηλ. η αξιολόγηση της καταλληλότητας των υλικών μαρτύρων) και η ερμηνεία οποιασδήποτε χρώσης ή της απουσίας της θα πρέπει να εκτελούνται σε συγκεκριμένο/αδειοδοτημένο εργαστήριο υπό την επίβλεψη ιατρού Παθολογοανατόμου με την κατάλληλη κατάρτιση και εμπειρία, ο οποίος φέρει και την γενική ευθύνη για τον προσδιορισμό υβριδισμού *in situ* και την ερμηνεία του. Τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα FISH μπορούν να οφείλονται σε διασταυρούμενη αντιδραστικότητα του ανιχνευτή με άλλες ακολουθίες νουκλεϊκών οξέων και/ή μη ειδική πρόσδεση. Θα πρέπει να εφαρμόζονται και να τεκμηριώνονται κατάλληλοι μάρτυρες. Θα πρέπει επίσης να λαμβάνονται υπόψη όλες οι σχετικές ημερομηνίες λήξης στο πλαίσιο των εξετάσεων.

Τεχνικές διακυμάνσεις και διακυμάνσεις της ερμηνείας μπορούν επίσης να παρουσιαστούν όταν η FISH εφαρμόζεται σε υλικά που προέρχονται από κυτταρικές γραμμές (23).

### B. Ειδικό για το προϊόν περιορισμοί

Αυτό το προϊόν δεν προορίζεται για χρήση σε κανέναν άλλο, βασιζόμενο σε DNA, διαγνωστικό προσδιορισμό.

Μην αντικαθιστάτε τα αντιδραστήρια Leica HER2 FISH System - 30 Test με οποιαδήποτε άλλα συστατικά τα οποία παρέχονται είτε από τη Leica Biosystems είτε από άλλους κατασκευαστές. Η ενέργεια αυτή θα καταστήσει άκυρο τον προσδιορισμό. Ο χρήστης θα πρέπει να επικυρώνει οποιαδήποτε απόκλιση από τις συνιστώμενες διαδικασίες.

Σε αυτόν τον προσδιορισμό συνιστάται η χρήση ιστών που έχουν μονιμοποιηθεί μόνο σε μονιμοποιητικά με βάση τη φορμαλδεΰδη. Η χρήση οποιουδήποτε άλλου τύπου μονιμοποιητικού μπορεί να καταστήσει τον προσδιορισμό άκυρο.

Δεν έχουν επικυρωθεί οι τομές ιστού που δεν έχουν κοπεί στο συνιστώμενο εύρος πάχους κοπής. Η χρήση οποιουδήποτε άλλου πάχους κοπής μπορεί να καταστήσει άκυρο τον προσδιορισμό.

## Κλινική συμφωνία του Leica HER2 FISH System - 30 Test με το Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Μαστός

Σε αυτήν τη μελέτη εξετάστηκε η καταλληλότητα του Leica HER2 FISH System - 30 Test για χρήση ως βοήθημα στον καθορισμό της θεραπείας με Herceptin (trastuzumab). Η μελέτη σχεδιάστηκε για να εξετάσει τη συμφωνία μεταξύ του Leica HER2 FISH System - 30 Test και μίας παλαιότερα εγκεκριμένης διαγνωστικής συσκευής, της Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, που θεωρείται και το «χρυσό πρότυπο» γι' αυτόν τον προσδιορισμό σε μαζικό ιστό. Το κριτήριο αποδοχής για την εξέταση ήταν ότι το κατώτερο όριο του μονόπλευρου διαστήματος αξιοπιστίας κατά 95% υπερβαίνει το 90% μεταξύ του Leica HER2 FISH System - 30 Test και του χειροκίνητου Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, μεταξύ θετικών (ενισχυμένων) και αρνητικών (μη ενισχυμένων), μονιμοποιημένων σε φορμαλδεύδη και εγκλεισμένων σε παραφίνη (FFPE), περιστατικών διηθητικού καρκίνου του μαστού.

Η μελέτη διενεργήθηκε ως μία καλυμμένη αξιολόγηση κλινικών δειγμάτων διηθητικού καρκίνου του μαστού, σε τρεις τοποθεσίες. Σε κάθε μία από τις ερευνητικές τοποθεσίες χορηγήθηκαν μονιμοποιημένα με φορμαλδεύδη και εγκλεισμένα σε παραφίνη, αρχειοθετημένα μπλοκ ιστού με διηθητικό καρκίνο του μαστού με γνωστά επίπεδα έκφρασης της ογκοπρωτεΐνης HER2. Επιλέχθηκε μία κοόρτη 300 δειγμάτων, που αποτελούνταν από 75 περιστατικά που παλαιότερα είχαν χαρακτηριστεί 0/1+ με ανοσοϊστοχημεία (IHC), 150 περιστατικά που παλαιότερα είχαν χαρακτηριστεί 2+ με ανοσοϊστοχημεία και 75 περιστατικά που παλαιότερα είχαν χαρακτηριστεί 3+ με ανοσοϊστοχημεία. Τα περιστατικά διανεμήθηκαν ομοίμορφα σε κάθε μία από τις ερευνητικές τοποθεσίες.

Όλα τα περιστατικά υποβλήθηκαν σε χρώση με το χειροκίνητο Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit Assay σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης του κατασκευαστή, όπως αυτές ορίζονται στο φύλλο οδηγιών χρήσης. Διαδοχικές τομές από κάθε περιστατικό υποβλήθηκαν κατόπιν σε χρώση με το Leica HER2 FISH System - 30 Test στο BOND-MAX and BOND-III System.

Όλες οι χρωσμένες αντικειμενοφόροι πλάκες καλύφθηκαν (masked) και βαθμολογήθηκαν με τυχαίοποιημένο τρόπο από έναν μόνο καταρτισμένο γνωματούοντα σε κάθε μία από τις τρεις ερευνητικές τοποθεσίες. Οι βαθμολογίες ερμηνεύτηκαν ως αρνητικές σε υπολογισμένο λόγο γονιδίων HER2/CEP17 <2,0 και θετικές σε υπολογισμένο λόγο γονιδίων HER2/CEP17 ≥ 2,0. Τα δεδομένα κατόπιν αναλύθηκαν ως προς τη συμφωνία, για τη συμφωνία θετικής χρώσης και τη συμφωνία αρνητικής χρώσης.



## Αποτελέσματα συμφωνίας 2x2 BOND-MAX System - Μαστός

Τα δεδομένα ομαδοποιήθηκαν ως αρνητικά (<2,0) ή θετικά (≥2,0) για ανάλυση 2x2. Η παρατηρηθείσα συμφωνία για 300 δείγματα μεταξύ των δύο εξετάσεων σε ανάλυση 2x2 ανέρχεται σε 99,33% (298/300) με ΔΑ 95% μεταξύ 97,61–99,92% για το BOND-MAX System

Το ποσοστό Θετικής συμφωνίας (ευαισθησία) ή η ικανότητα του Leica HER2 FISH System - 30 Test να αναγνωρίζει ορθά τα θετικά περιστατικά του προσδιορισμού Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (το ποσοστό δειγμάτων τόσο του Leica HER2 FISH System - 30 Test όσο και του χειροκίνητου Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit που βαθμολογήθηκαν ως θετικά, από όλα τα θετικά περιστατικά του Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) ήταν 99,03% (102/103).

Το ποσοστό Αρνητικής συμφωνίας (ειδικότητα) ή η ικανότητα της εξέτασης να αναγνωρίζει ορθά τα αρνητικά περιστατικά του Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (το ποσοστό δειγμάτων τόσο του Leica HER2 FISH System - 30 Test όσο και του Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit που βαθμολογήθηκαν ως αρνητικά, από όλα τα αρνητικά περιστατικά του Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) ήταν 99,49% (196/197). Βλ. Πίνακα 4.

		Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit		
		Αρνητικά (<2,0)	Θετικά (≥2,0)	Σύνολο
Leica HER2 FISH System - 30 Test BOND- MAX	Αρνητικά (<2,0)	196	1	197
	Θετικά (≥2,0)	1	102	103
	Σύνολο	197	103	300

Συνολική συμφωνία (ΔΑ 95%) = 99,33% (97,61 – 99,92%)

Πίνακας 4. Συμφωνία 2x2 του Leica HER2 FISH System - 30 Test για το BOND-MAX System με το Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit για μαζικό ιστό.

## Αποτελέσματα συμφωνίας 2x2 BOND-III System - Μαστός

Τα δεδομένα ομαδοποιήθηκαν ως αρνητικά (<2,00) ή θετικά (≥2,00) για ανάλυση 2x2. Η παρατηρηθείσα συμφωνία για 300 δείγματα μεταξύ των δύο εξετάσεων σε ανάλυση 2x2 ανέρχεται σε 99,67% (299/300) με ΔΑ 95% μεταξύ 98,16–99,99% για το BOND-III System.

Το ποσοστό Θετικής συμφωνίας (ευαισθησία) ή η ικανότητα του Leica HER2 FISH System - 30 Test να αναγνωρίζει ορθά τα θετικά περιστατικά του προσδιορισμού Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (το ποσοστό δειγμάτων τόσο του Leica HER2 FISH System - 30 Test όσο και του χειροκίνητου Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit που βαθμολογήθηκαν ως θετικά, από όλα τα θετικά περιστατικά του Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) ήταν 99,03% (102/103).

Το ποσοστό Αρνητικής συμφωνίας (ειδικότητα) ή η ικανότητα της δοκιμασίας να αναγνωρίζει ορθά τα αρνητικά περιστατικά του Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (το ποσοστό δειγμάτων τόσο του Leica HER2 FISH System - 30 Test όσο και του Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit που βαθμολογήθηκαν ως αρνητικά, από όλα τα αρνητικά περιστατικά του Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) ήταν 100% (197/197). Βλ. Πίνακα 5.

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

Συνολική συμφωνία (ΔΑ 95%) = 99,67% (98,16 – 99,99%).

Πίνακας 5. Συμφωνία 2x2 του Leica HER2 FISH System - 30 Test για το BOND-III System με το Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit για μαζικό ιστό.

Συνοψίζοντας, τα δεδομένα που παρήχθησαν σε αυτήν τη μελέτη δείχνουν πως το Leica HER2 FISH System - 30 Test μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βοήθημα στην αξιολόγηση ασθενών για τις οποίες/τους οποίους εξετάζεται το ενδεχόμενο θεραπείας με Herceptin (trastuzumab), με βάση το υψηλό ποσοστό συμφωνίας του με το Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, μία παλαιότερα εγκεκριμένη διαγνωστική εξέταση για αυτήν την ένδειξη.

## Κλινική συμφωνία της εξέτασης του Leica HER2 FISH System - 30 Test με το Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Γαστρικός

Σε αυτήν τη μελέτη εξετάστηκε η καταλληλότητα του Leica HER2 FISH System - 30 Test για χρήση ως βοήθημα στον καθορισμό της θεραπείας με Herceptin (trastuzumab). Η μελέτη σχεδιάστηκε για να εξετασθεί τη συμφωνία μεταξύ του Leica HER2 FISH System - 30 Test και μίας παλαιότερα εγκεκριμένης διαγνωστικής συσκευής, της Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, που θεωρείται και το «χρυσό πρότυπο» γι' αυτόν τον προσδιορισμό σε γαστρικό ιστό. Το κριτήριο αποδοχής για την εξέταση ήταν ότι το κατώτερο όριο του μονόπλευρου διαστήματος αξιοπιστίας κατά 95% υπερβαίνει το 90% μεταξύ του Leica HER2 FISH System - 30 Test και του χειροκίνητου Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, μεταξύ θετικών (ενισχυμένων) και αρνητικών (μη ενισχυμένων), μονιμοποιημένων σε φορμαλδεϋδη και εγκλεισμένων σε παραφίνη (FFPE) περιστατικών αδενοκαρκινωμάτων του στομάχου (συμπεριλαμβανομένης της γαστροοισοφαγικής συμβολής).

Η μελέτη διενεργήθηκε ως μία αξιολόγηση κλινικών δειγμάτων διηθητικού γαστρικού αδενοκαρκινώματος. Η εξέταση διεξήχθη μονιμοποιημένα με φορμαλδεϋδη και εγκλεισμένα σε παραφίνη, αρχαιοθετημένα μπλοκ ιστού γαστρικού αδενοκαρκινώματος με γνωστά επίπεδα έκφρασης γονιδίου HER2. Επιλέχθηκε μια κοόρτη 109 δειγμάτων που περιλάμβανε 50 ενισχυμένα περιστατικά και 59 μη ενισχυμένα περιστατικά.

Όλα τα περιστατικά υποβλήθηκαν σε χρώση με το χειροκίνητο Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit Assay σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης του κατασκευαστή, όπως αυτές ορίζονται στο φύλλο οδηγιών χρήσης. Διαδοχικές τομές από κάθε περιστατικό υποβλήθηκαν κατόπιν σε χρώση με το Leica HER2 FISH System - 30 Test στο BOND-MAX System.

Όλες οι χρωσμένες αντικειμενοφόροι πλάκες βαθμολογήθηκαν με τυχαίοποιημένο τρόπο από έναν μόνο καταρτισμένο γνωματούοντα. Οι βαθμολογίες ερμηνεύτηκαν ως αρνητικές σε υπολογισμένο λόγο γονιδίων HER2/CEP17 <2,0 και θετικές σε υπολογισμένο λόγο γονιδίων HER2/CEP17 ≥ 2,0. Τα δεδομένα κατόπιν αναλύθηκαν ως προς τη συμφωνία, για τη συμφωνία θετικής χρώσης και τη συμφωνία αρνητικής χρώσης.

### 2x2 Αποτελέσματα συμφωνίας BOND-MAX System - Γαστρικός

Τα δεδομένα ομαδοποιήθηκαν ως αρνητικά (<2,0) ή θετικά (≥2,0) για ανάλυση 2x2. Η παρατηρηθείσα συμφωνία για 109 δείγματα μεταξύ των δύο εξετάσεων σε ανάλυση 2x2 ανέρχεται σε 98,17% (107/109) με ΔΑ 95% μεταξύ 93,53 και 99,78% για το BOND-MAX System.

Το ποσοστό Θετικής συμφωνίας (ευαισθησία) ή η ικανότητα του Leica HER2 FISH System - 30 Test να αναγνωρίζει ορθά τα θετικά περιστατικά του προσδιορισμού Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (το ποσοστό δειγμάτων τόσο του Leica HER2 FISH System - 30 Test όσο και του χειροκίνητου Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit που βαθμολογήθηκαν ως θετικά, από όλα τα θετικά περιστατικά του Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) ήταν 96,00% (48/50).

Το ποσοστό Αρνητικής συμφωνίας (ειδικότητα) ή η ικανότητα της δοκιμασίας να αναγνωρίζει ορθά τα αρνητικά περιστατικά του Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (το ποσοστό δειγμάτων τόσο του Leica HER2 FISH System - 30 Test όσο και του Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit που βαθμολογήθηκαν ως αρνητικά, από όλα τα αρνητικά περιστατικά του Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) ήταν 100% (59/59). Βλ. Πίνακα 6.

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

Συνολική Συμφωνία (ΔΑ 95%) = 98,17% (93,53–99,78%)

Πίνακας 6. Συμφωνία 2x2 του Leica HER2 FISH System - 30 Test στο BOND-MAX System με το Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit σε γαστρικό ιστό.

# Έλεγχος ακρίβειας – BOND-MAX System

## A. Μελέτη ακρίβειας εντός της εκτέλεσης

Η μελέτη ακρίβειας εντός της εκτέλεσης διενεργήθηκε με τυχαίοποιημένο και τυφλοποιημένο τρόπο. Η εξέταση της ακρίβειας εντός της εκτέλεσης του Leica HER2 FISH System - 30 Test αξιολογήθηκε σε μία μόνο ερευνητική τοποθεσία, σε 540 προηγούμενως HER2 χαρακτηρισμένα δείγματα TMA (μικροδιάταξη πολλαπλών ιστών) που περιείχαν μονιμοποιημένα με φορμαλδεύδη και εγκλεισμένα σε παραφίνη περιστατικά καρκίνου του μαστού. Με τη χρήση διατάξεων TMA για τον καθορισμό της ακρίβειας εντός της εκτέλεσης, κατέστη δυνατή η εφαρμογή περισσότερων περιστατικών, καλύπτοντας μεγαλύτερο εύρος έκφρασης του HER2 στο πλαίσιο μίας μόνο εκτέλεσης σε ένα μόνο όργανο.

Κατά την καταμέτρηση των αντικειμενοφόρων πλακών που υποβλήθηκαν σε χρώση κατά τη Μελέτη ακρίβειας εντός της εκτέλεσης, τα 532/540 αξιολογημένα περιστατικά επέδειξαν σύμφωνα αποτελέσματα, οδηγώντας σε συνολική συμφωνία 98,52% με χαμηλό ΔΑ95% 97,10%.

## B. Μελέτη ακρίβειας εντός του οργάνου

Η μελέτη ακρίβειας εντός του οργάνου διενεργήθηκε με τυχαίοποιημένο και τυφλοποιημένο τρόπο. Η εξέταση της ακρίβειας εντός του οργάνου του Leica HER2 FISH System - 30 Test αξιολογήθηκε σε μία μόνο ερευνητική τοποθεσία, σε 1620 προηγούμενως HER2 χαρακτηρισμένα δείγματα TMA (μικροδιάταξη πολλαπλών ιστών) που περιείχαν μονιμοποιημένα με φορμαλδεύδη και εγκλεισμένα σε παραφίνη περιστατικά καρκίνου του μαστού. Με τη χρήση διατάξεων TMA για τον καθορισμό της ακρίβειας εντός του οργάνου, κατέστη δυνατή η εφαρμογή περισσότερων περιστατικών, καλύπτοντας μεγαλύτερο εύρος έκφρασης του HER2 στο πλαίσιο πολλαπλών εκτελέσεων σε ένα μόνο όργανο.

Κατά την καταμέτρηση των αντικειμενοφόρων πλακών που υποβλήθηκαν σε χρώση κατά τη Μελέτη ακρίβειας εντός του οργάνου, τα 1620/1620 αξιολογημένα περιστατικά επέδειξαν σύμφωνα αποτελέσματα, οδηγώντας σε συνολική συμφωνία 100% με χαμηλό ΔΑ95% 99,82%.

## Γ. Μελέτη ακρίβειας μεταξύ εκτελέσεων

Η μελέτη ακρίβειας μεταξύ εκτελέσεων διενεργήθηκε με τυχαίοποιημένο και τυφλοποιημένο τρόπο. Η εξέταση της ακρίβειας μεταξύ εκτελέσεων του Leica HER2 FISH System - 30 Test αξιολογήθηκε σε μία μόνο ερευνητική τοποθεσία, σε 900 προηγούμενως HER2 χαρακτηρισμένα δείγματα TMA (μικροδιάταξη πολλαπλών ιστών) που περιείχαν μονιμοποιημένα με φορμαλδεύδη και εγκλεισμένα σε παραφίνη περιστατικά καρκίνου του μαστού. Με τη χρήση διατάξεων TMA για τον καθορισμό της ακρίβειας μεταξύ εκτελέσεων από ημέρα σε ημέρα, κατέστη δυνατή η εφαρμογή περισσότερων περιστατικών, καλύπτοντας μεγαλύτερο εύρος έκφρασης HER2 προς εξέταση, μεταξύ εκτελέσεων σε διαφορετικές ημέρες.

Κατά την καταμέτρηση των αντικειμενοφόρων πλακών που υποβλήθηκαν σε χρώση κατά τη Μελέτη ακρίβειας μεταξύ εκτελέσεων, τα 894/900 αξιολογημένα περιστατικά επέδειξαν σύμφωνα αποτελέσματα, οδηγώντας σε συνολική συμφωνία 99,33% με χαμηλό ΔΑ95% 98,55%.

## Δ. Μελέτη ακρίβειας μεταξύ εργαστηρίων

Η μελέτη ακρίβειας μεταξύ εργαστηρίων διενεργήθηκε με τυχαίοποιημένο και τυφλοποιημένο τρόπο. Η εξέταση της ακρίβειας μεταξύ εργαστηρίων του Leica HER2 FISH System - 30 Test αξιολογήθηκε μεταξύ τριών ερευνητικών τοποθεσιών, σε 513 προηγούμενως HER2 χαρακτηρισμένα δείγματα TMA (μικροδιάταξη πολλαπλών ιστών) που περιείχαν μονιμοποιημένα με φορμαλδεύδη και εγκλεισμένα σε παραφίνη περιστατικά καρκίνου του μαστού. Με τη χρήση διατάξεων TMA για τον καθορισμό της ακρίβειας μεταξύ εργαστηρίων, κατέστη δυνατή η εφαρμογή περισσότερων περιστατικών, καλύπτοντας μεγαλύτερο εύρος έκφρασης HER2 προς εξέταση, μεταξύ εκτελέσεων σε περισσότερα όργανα.

Κατά την καταμέτρηση των αντικειμενοφόρων πλακών που υποβλήθηκαν σε χρώση κατά τη Μελέτη ακρίβειας μεταξύ εργαστηρίων, τα 510/513 αξιολογημένα περιστατικά επέδειξαν σύμφωνα αποτελέσματα, οδηγώντας σε συνολική συμφωνία 99,42% με χαμηλό ΔΑ95% 98,30%.

## **E. Μελέτη ακρίβειας μεταξύ γνωματευόντων**

Η μελέτη ακρίβειας μεταξύ γνωματευόντων διενεργήθηκε με τυχαίοποιημένο και τυφλοποιημένο τρόπο. Η αναπαραγωγιμότητα μεταξύ γνωματευόντων στο Leica HER2 FISH System - 30 Test αξιολογήθηκε μεταξύ τριών ερευνητικών τοποθεσιών. Χρησιμοποιήθηκε ένας μόνο, έμπειρος γνωματεύων ανά ερευνητική τοποθεσία. Δεκαοκτώ περιστατικά καρκίνου του μαστού, ολικής εκτομής, χρησιμοποιήθηκαν για την ακρίβεια μεταξύ γνωματευόντων, αντικατοπτρίζοντας τους τύπους δειγμάτων που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη.

Κατά την καταμέτρηση των αντικειμενοφόρων πλακών που υποβλήθηκαν σε χρώση κατά τη Μελέτη ακρίβειας μεταξύ γνωματευόντων, τα 53/54 αξιολογημένα περιστατικά επέδειξαν σύμφωνα αποτελέσματα, οδηγώντας σε συνολική συμφωνία 98,15% με χαμηλό ΔΑ95% 90,11%.

## **ΣΤ. Μελέτη ακρίβειας από παρτίδα σε παρτίδα**

Η μελέτη ακρίβειας από παρτίδα σε παρτίδα διενεργήθηκε με τυχαίοποιημένο και τυφλοποιημένο τρόπο. Η ακρίβεια από παρτίδα σε παρτίδα καθορίστηκε σε τρεις ανεξάρτητα κατασκευασμένες παρτίδες του Leica HER2 FISH System - 30 Test, που κατασκευάστηκαν σύμφωνα με την Ορθή Βιομηχανική Πρακτική (GMP). Κάθε παρτίδα εξετάστηκε σε μία μόνο ερευνητική τοποθεσία, σε 540 προηγούμενως HER2 χαρακτηρισμένα δείγματα TMA (μικροδιάταξη πολλαπλών ιστών) που περιείχαν μονιμοποιημένα με φορμαλδεΰδη και εγκλεισμένα σε παραφίνη περιστατικά καρκίνου του μαστού. Με τη χρήση διατάξεων TMA για τον καθορισμό της αναπαραγωγιμότητας από παρτίδα σε παρτίδα, κατέστη δυνατή η εφαρμογή περισσότερων περιστατικών, καλύπτοντας μεγαλύτερο εύρος έκφρασης HER2 προς εξέταση, μεταξύ παρτίδων.

Κατά την καταμέτρηση των αντικειμενοφόρων πλακών που υποβλήθηκαν σε χρώση κατά τη Μελέτη ακρίβειας από παρτίδα σε παρτίδα, τα 534/540 αξιολογημένα περιστατικά επέδειξαν σύμφωνα αποτελέσματα, οδηγώντας σε συνολική συμφωνία 98,89% με χαμηλό ΔΑ95% 97,60%.

## **Έλεγχος ακρίβειας – BOND-III System**

### **Z. Μελέτη ακρίβειας εντός της εκτέλεσης**

Η μελέτη ακρίβειας εντός της εκτέλεσης διενεργήθηκε με τυχαίοποιημένο και τυφλοποιημένο τρόπο. Η εξέταση της ακρίβειας εντός της εκτέλεσης του Leica HER2 FISH System - 30 Test αξιολογήθηκε σε μία μόνο ερευνητική τοποθεσία, σε 540 προηγούμενως HER2 χαρακτηρισμένα δείγματα TMA (μικροδιάταξη πολλαπλών ιστών) που περιείχαν μονιμοποιημένα με φορμαλδεΰδη και εγκλεισμένα σε παραφίνη περιστατικά καρκίνου του μαστού. Με τη χρήση διατάξεων TMA για τον καθορισμό της ακρίβειας εντός της εκτέλεσης, κατέστη δυνατή η εφαρμογή περισσότερων περιστατικών, καλύπτοντας μεγαλύτερο εύρος έκφρασης του HER2 στο πλαίσιο μίας μόνο εκτέλεσης σε ένα μόνο όργανο.

Κατά την καταμέτρηση των αντικειμενοφόρων πλακών που υποβλήθηκαν σε χρώση κατά τη Μελέτη ακρίβειας εντός της εκτέλεσης, τα 540/540 αξιολογημένα περιστατικά επέδειξαν σύμφωνα αποτελέσματα, οδηγώντας σε συνολική συμφωνία 100% με χαμηλό ΔΑ95% 99,45%.

### **H. Μελέτη ακρίβειας εντός του οργάνου**

Η μελέτη ακρίβειας εντός του οργάνου διενεργήθηκε με τυχαίοποιημένο και τυφλοποιημένο τρόπο. Η εξέταση της ακρίβειας εντός του οργάνου του Leica HER2 FISH System - 30 Test αξιολογήθηκε σε μία μόνο ερευνητική τοποθεσία, σε 1620 προηγούμενως HER2 χαρακτηρισμένα δείγματα TMA (μικροδιάταξη πολλαπλών ιστών) που περιείχαν μονιμοποιημένα με φορμαλδεΰδη και εγκλεισμένα σε παραφίνη περιστατικά καρκίνου του μαστού. Με τη χρήση διατάξεων TMA για τον καθορισμό της ακρίβειας εντός του οργάνου, κατέστη δυνατή η εφαρμογή περισσότερων περιστατικών, καλύπτοντας μεγαλύτερο εύρος έκφρασης του HER2 στο πλαίσιο περισσότερων εκτελέσεων σε ένα μόνο όργανο.

Κατά την καταμέτρηση των αντικειμενοφόρων πλακών που υποβλήθηκαν σε χρώση κατά τη Μελέτη ακρίβειας εντός του οργάνου, τα 1620/1620 αξιολογημένα περιστατικά επέδειξαν σύμφωνα αποτελέσματα, οδηγώντας σε συνολική συμφωνία 100% με χαμηλό ΔΑ95% 99,82%.

## Θ. Μελέτη ακρίβειας μεταξύ εκτελέσεων

Η μελέτη ακρίβειας μεταξύ εκτελέσεων διενεργήθηκε με τυχαίοποιημένο και τυφλοποιημένο τρόπο. Η εξέταση της ακρίβειας μεταξύ εκτελέσεων του Leica HER2 FISH System - 30 Test αξιολογήθηκε σε μία μόνο ερευνητική τοποθεσία, σε 900 προηγούμενως HER2 χαρακτηρισμένα δείγματα TMA (μικροδιάταξη πολλαπλών ιστών) που περιείχαν μονιμοποιημένα με φορμαλδεΐδη και εγκλεισμένα σε παραφίνη περιστατικά καρκίνου του μαστού. Με τη χρήση διατάξεων TMA για τον καθορισμό της ακρίβειας μεταξύ εκτελέσεων από ημέρα σε ημέρα, κατέστη δυνατή η εφαρμογή περισσότερων περιστατικών, καλύπτοντας μεγαλύτερο εύρος έκφρασης HER2 προς εξέταση, μεταξύ εκτελέσεων σε διαφορετικές ημέρες.

Κατά την καταμέτρηση των αντικειμενοφόρων πλακών που υποβλήθηκαν σε χρώση κατά τη Μελέτη ακρίβειας μεταξύ εκτελέσεων, τα 891/900 αξιολογημένα περιστατικά επέδειξαν σύμφωνα αποτελέσματα, οδηγώντας σε συνολική συμφωνία 99,00% με χαμηλό ΔΑ95% 98,11%.

## I. Μελέτη ακρίβειας μεταξύ εργαστηρίων

Η μελέτη ακρίβειας μεταξύ εργαστηρίων διενεργήθηκε με τυχαίοποιημένο και τυφλοποιημένο τρόπο. Η εξέταση της ακρίβειας μεταξύ εργαστηρίων του Leica HER2 FISH System - 30 Test αξιολογήθηκε μεταξύ τριών ερευνητικών τοποθεσιών, σε 513 προηγούμενως HER2 χαρακτηρισμένα δείγματα TMA (μικροδιάταξη πολλαπλών ιστών) που περιείχαν μονιμοποιημένα με φορμαλδεΐδη και εγκλεισμένα σε παραφίνη περιστατικά καρκίνου του μαστού. Με τη χρήση διατάξεων TMA για τον καθορισμό της ακρίβειας μεταξύ εργαστηρίων, κατέστη δυνατή η εφαρμογή περισσότερων περιστατικών, καλύπτοντας μεγαλύτερο εύρος έκφρασης HER2 προς εξέταση, μεταξύ εκτελέσεων σε περισσότερα όργανα.

Κατά την καταμέτρηση των αντικειμενοφόρων πλακών που υποβλήθηκαν σε χρώση κατά τη Μελέτη ακρίβειας μεταξύ εργαστηρίων, τα 511/513 αξιολογημένα περιστατικά επέδειξαν σύμφωνα αποτελέσματα, οδηγώντας σε συνολική συμφωνία 99,61% με χαμηλό ΔΑ95% 98,60%.

## ΙΑ. Μελέτη ακρίβειας μεταξύ γνωματευόντων

Η μελέτη ακρίβειας μεταξύ γνωματευόντων διενεργήθηκε με τυχαίοποιημένο και τυφλοποιημένο τρόπο. Η εξέταση αναπαραγωγιμότητας μεταξύ γνωματευόντων του Leica HER2 FISH System - 30 Test αξιολογήθηκε μεταξύ τριών ερευνητικών τοποθεσιών. Χρησιμοποιήθηκε ένας μόνο, έμπειρος γνωματευών ανά ερευνητική τοποθεσία. Δεκαοκτώ περιστατικά καρκίνου του μαστού, ολικής εκτομής, χρησιμοποιήθηκαν για την ακρίβεια μεταξύ γνωματευόντων, αντικατοπτρίζοντας τους τύπους δειγμάτων που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη.

Κατά την καταμέτρηση των αντικειμενοφόρων πλακών που υποβλήθηκαν σε χρώση κατά τη Μελέτη ακρίβειας μεταξύ γνωματευόντων, τα 53/54 αξιολογημένα περιστατικά επέδειξαν σύμφωνα αποτελέσματα, οδηγώντας σε συνολική συμφωνία 98,15% με χαμηλό ΔΑ95% 90,11%.

## ΙΒ. Μελέτη ακρίβειας από παρτίδα σε παρτίδα

Η μελέτη ακρίβειας από παρτίδα σε παρτίδα διενεργήθηκε με τυχαίοποιημένο και τυφλοποιημένο τρόπο. Η ακρίβεια από παρτίδα σε παρτίδα καθορίστηκε σε τρεις ανεξάρτητα κατασκευασμένες παρτίδες του Leica HER2 FISH System - 30 Test, που κατασκευάστηκαν σύμφωνα με την Ορθή Βιομηχανική Πρακτική (GMP). Κάθε παρτίδα εξετάστηκε σε μία μόνο ερευνητική τοποθεσία, σε 540 προηγούμενως HER2 χαρακτηρισμένα δείγματα TMA (μικροδιάταξη πολλαπλών ιστών) που περιείχαν μονιμοποιημένα με φορμαλδεΐδη και εγκλεισμένα σε παραφίνη περιστατικά καρκίνου του μαστού. Με τη χρήση διατάξεων TMA για τον καθορισμό της αναπαραγωγιμότητας από παρτίδα σε παρτίδα, κατέστη δυνατή η εφαρμογή περισσότερων περιστατικών, καλύπτοντας μεγαλύτερο εύρος έκφρασης HER2 προς εξέταση, μεταξύ παρτίδων.

Κατά την καταμέτρηση των αντικειμενοφόρων πλακών που υποβλήθηκαν σε χρώση κατά τη Μελέτη ακρίβειας από παρτίδα σε παρτίδα, τα 540/540 αξιολογημένα περιστατικά επέδειξαν σύμφωνα αποτελέσματα, οδηγώντας σε συνολική συμφωνία 100% με χαμηλό ΔΑ95% 99,45%.

## Αντοχή του προσδιορισμού

Στο BOND-MAX and BOND-III System εκτελέστηκαν μελέτες αντοχής για τον καθορισμό του εύρους ανοχής του προσδιορισμού για το χρόνο και τη θερμοκρασία ανάκτησης θερμότητας / το χρόνο, τη θερμοκρασία και τη συγκέντρωση για την ανάκτηση ενζύμου / το χρόνο και τη θερμοκρασία μετουσίωσης / το χρόνο και τη θερμοκρασία υβριδισμού και το χρόνο και θερμοκρασία σχολαστικής πλύσης. Εκτελέστηκαν επίσης μελέτες αντοχής με χρήση του τυπικού πρωτοκόλλου BOND-MAX and BOND-III System εκτός των συνιστώμενων ορίων, όπως αυτά καθορίζονται στο έγγραφο οδηγιών FDA/ORA ORA LAB5.3 Rev1.7 για τη θερμοκρασία και την υγρασία.

- Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές της κατάστασης ενίσχυσης όταν η τυπική θερμοκρασία για κάθε εξαρτώμενο από θερμότητα βήμα αυξήθηκε κατά 4 °C ή μειώθηκε κατά 4 °C, σε σύγκριση με το τυπικό πρωτόκολλο Leica HER2 FISH System - 30 Test. Οι τιμές βέλτιστης ποιότητας παρατηρήθηκαν στις τυπικές θερμοκρασίες, οι οποίες αποτελούν και τις συνιστώμενες θερμοκρασίες.
- Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές της κατάστασης ενίσχυσης όταν ο χρόνος θερμικά επαγόμενης ανάκτησης επιτόπου (HIER) εκτελέστηκε για 20 λεπτά και 30 λεπτά στους 97 °C με διάλυμα BOND ER1, σε σύγκριση με το τυπικό πρωτόκολλο Leica HER2 FISH System - 30 Test. Οι τιμές βέλτιστης ποιότητας παρατηρήθηκαν στον τυπικό χρόνο των 25 λεπτών, που αποτελεί και τον συνιστώμενο χρόνο επώασης.
- Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές της κατάστασης ενίσχυσης όταν ο χρόνος ενζυμικά επαγόμενης ανάκτησης επιτόπου (EIER) εκτελέστηκε για 15 λεπτά και 35 λεπτά στους 37 °C, σε σύγκριση με το τυπικό πρωτόκολλο Leica HER2 FISH System - 30 Test. Οι τιμές βέλτιστης ποιότητας παρατηρήθηκαν στον τυπικό χρόνο των 25 λεπτών, που αποτελεί και τον συνιστώμενο χρόνο επώασης.
- Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές της κατάστασης ενίσχυσης όταν η συγκέντρωση του ενζύμου της ενζυμικά επαγόμενης ανάκτησης επιτόπου (EIER) εκτελέστηκε με λόγους συμπυκνωμένου διαλύματος ενζύμου/ αραιωτικού ενζύμου 1:200 και 1:500 με χρήση του τυπικού πρωτοκόλλου Leica HER2 FISH System - 30 Test protocol. Οι τιμές βέλτιστης ποιότητας παρατηρήθηκαν στην τυπική συγκέντρωση 1:300, που αποτελεί και τη συνιστώμενη αραίωση.
- Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές της κατάστασης ενίσχυσης όταν ο χρόνος μετουσίωσης εκτελέστηκε για 5 λεπτά και για 15 λεπτά, σε σύγκριση με το τυπικό πρωτόκολλο Leica HER2 FISH System - 30 Test. Οι τιμές βέλτιστης ποιότητας παρατηρήθηκαν στον τυπικό χρόνο των 10 λεπτών, που αποτελεί και τον συνιστώμενο χρόνο μετουσίωσης.
- Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές της κατάστασης ενίσχυσης όταν ο χρόνος υβριδισμού εκτελέστηκε για 9 ώρες και για 15 ώρες, σε σύγκριση με το τυπικό πρωτόκολλο Leica HER2 FISH System - 30 Test. Οι τιμές βέλτιστης ποιότητας παρατηρήθηκαν στον τυπικό χρόνο των 12 ωρών, που αποτελεί και τον συνιστώμενο χρόνο υβριδισμού.
- Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές της κατάστασης ενίσχυσης όταν ο χρόνος πλύσης μετά τον υβριδισμό εκτελέστηκε για 2 λεπτά, 5 λεπτά και 7 λεπτά, σε σύγκριση με το τυπικό πρωτόκολλο Leica HER2 FISH System - 30 Test. Οι τιμές βέλτιστης ποιότητας παρατηρήθηκαν στον τυπικό χρόνο των 4 λεπτών, που αποτελεί και τον συνιστώμενο χρόνο πλύσης μετά τον υβριδισμό.
- Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές της κατάστασης ενίσχυσης όταν το Leica HER2 FISH System - 30 Test εκτελέστηκε στους 28 °C και 30% σχετική υγρασία καθώς και στους 16 °C και 80% σχετική υγρασία, σε σύγκριση με το τυπικό πρωτόκολλο Leica HER2 FISH System - 30 Test, εκτελεσμένο σε συνθήκες περιβάλλοντος.

Οι διαδικασίες που εκτελούνται εκτός των ελεγμένων, συνιστώμενων παραμέτρων αντοχής του προσδιορισμού δεν έχουν επικυρωθεί. Η χρήση οποιασδήποτε άλλης παραμέτρου εξέτασης μπορεί να καταστήσει άκυρο τον προσδιορισμό.

Στο παραπάνω κείμενο περιγράφονται οι συνθήκες που ελέγχθηκαν και τα αποτελέσματα της μελέτης. Λάβετε υπόψη πως η Leica δεν έχει ελέγξει όλους τους δυνητικούς συνδυασμούς συνθηκών και δεν συνιστά τη χρήση μη-τυπικών ευρών, για όλες τις συνθήκες. Το τυπικό πρωτόκολλο Leica HER2 FISH Staining Protocol περιγράφεται στον Πίνακα 2.

## Αντιμετώπιση προβλημάτων

Πρόβλημα	Πιθανή αιτία	Ενέργεια επίλυσης
Απουσία ή ασθενές σήμα φθορισμού/χρώση	Ακατάλληλη μονιμοποίηση ή επεξεργασία του δείγματος εξέτασης	Βεβαιωθείτε πως έχει χρησιμοποιηθεί μονιμοποιητικό με βάση τη φορμαλδεΰδη και πως τα χρονοδιαγράμματα επεξεργασίας ενδεικνύονται για το δείγμα που υποβάλλεται σε εξέταση.
	Το Leica HER2 FISH System - 30 Test χρησιμοποιείται μετά την παρέλευση της ημερομηνίας λήξης του	Βεβαιωθείτε πως δεν έχει παρέλθει η ημερομηνία λήξης του Leica HER2 FISH System - 30 Test.
	Λανθασμένη επιλογή πρωτοκόλλου	Βεβαιωθείτε για την ενδειγμένη προεπιλογή του *FISH Protocol A στο πεδίο πρωτοκόλλου χρώσης του πλαισίου διαλόγου Προσθ.
	Διανομή ακατάλληλων ασυσκεύαστων αντιδραστηρίων	Βεβαιωθείτε πως όλα τα αντιδραστήρια BOND έχουν τοποθετηθεί στους κατάλληλους περιέκτες ασυσκεύαστων αντιδραστηρίων και πως έχουν τοποθετηθεί στις ενδειγμένες θέσεις του οργάνου.
	Ανεπαρκής αποπαραίνωση των τομών	Βεβαιωθείτε πως έχει επιλεγεί η λειτουργία *Dewax από το πεδίο Προετοιμασίας του πλαισίου διαλόγου Προσθ. πλακ. .
	Λανθασμένη προπαρασκευαστική επεξεργασία	Βεβαιωθείτε πως έχουν επιλεγεί τα τυπικά πρωτόκολλα προπαρασκευαστικής επεξεργασίας (HIER και Enzymatic Digestion). Προσαρμόστε το πρωτόκολλο προκαταρκτικής επεξεργασίας (HIER ή Ενζυματική Πέψη) εάν χρειάζεται.
	Λανθασμένη μετουσίωση	Βεβαιωθείτε πως έχει επιλεγεί η κατάλληλη, τυπική μετουσίωση *D10.
	Λανθασμένος υβριδισμός	Βεβαιωθείτε πως έχει επιλεγεί ο κατάλληλος, τυπικός υβριδισμός *H12. Παρατείνετε το χρόνο υβριδισμού, εάν χρειάζεται.
	Υπερβολική πλύση μετά τον υβριδισμό	Μειώστε το χρόνο επώασης πλύσης μετά τον υβριδισμό.
	Η εκτέλεση ακυρώθηκε πριν από την ολοκλήρωσή της	Με χρήση του λογισμικού BOND, επιβεβαιώστε την παρουσία οποιωνδήποτε σφαλμάτων που χρήζουν αναφοράς κατά την εκτέλεση χρώσης και αντιμετωπίστε τα σύμφωνα με τις προτροπές του λογισμικού BOND.
	Λανθασμένος εξοπλισμός μικροσκοπίας φθορισμού <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ακατάλληλο σετ φίλτρων</li> <li>• Λανθασμένος λαμπτήρας</li> <li>• Λαμπτήρας έχει λήξει</li> <li>• Λανθασμένος τύπος λαδιού</li> </ul>	Βεβαιωθείτε πως το σύνολο του χρησιμοποιούμενου εξοπλισμού μικροσκοπίας φθορισμού είναι κατάλληλο για τον προσδιορισμό που εκτελείται και επιβεβαιώστε: <ul style="list-style-type: none"> <li>• το κατάλληλο σετ φίλτρων</li> <li>• τον κατάλληλο λαμπτήρα</li> <li>• την καλή ισχύ του λαμπτήρα</li> <li>• το κατάλληλο λάδι για τη μικροσκοπία εμπάπτισης σε λάδι</li> </ul>
	Υπερέκθεση σε υπεριώδες φως (φωτολεύκανση)	Φυλάσσετε τις αντικειμενοφόρους πλάκες πριν και μετά την αξιολόγηση στο σκοτάδι, για τη διατήρηση των σημμάτων φθορισμού. Για τη μακροπρόθεσμη διατήρηση των σημμάτων, φυλάσσετε τις αντικειμενοφόρους πλάκες στους -20 °C.



Πρόβλημα	Πιθανή αιτία	Ενέργεια επίλυσης
Μη ειδικά σήματα φθορισμού υποβάθρου/ χρώση υποβάθρου	Ανεπαρκής πλύση μετά τον υβριδισμό	Αυξήστε το χρόνο επώασης πλύσης μετά τον υβριδισμό.
	Διανομή ακατάλληλων ασυσκεύαστων αντιδραστηρίων	Βεβαιωθείτε πως όλα τα αντιδραστήρια BOND έχουν τοποθετηθεί στους κατάλληλους περιέκτες ασυσκεύαστων αντιδραστηρίων και πως αυτοί έχουν τοποθετηθεί στις ενδεδειγμένες θέσεις του οργάνου.
	Ανεπαρκής αποπαραφίνωση των τομών	Βεβαιωθείτε πως έχει επιλεγεί Dewax στο πεδίο Προετοιμασίας του πλαισίου διαλόγου Προσθ.
	Μη ειδική διασταυρούμενη αντίδραση με περιοχές νεκρωτικού ιστού	Βεβαιωθείτε πως έχει χρησιμοποιηθεί μονιμοποιητικό με βάση τη φορμαλδεύδη και πως τα χρονοδιαγράμματα επεξεργασίας ενδείκνυνται για το δείγμα που υποβάλλεται σε εξέταση. Εάν είναι εφικτό, επαναλάβετε την εξέταση του περιστατικού με χρήση διαφορετικού μπλοκ. Εάν αυτό δεν είναι εφικτό, αξιολογήστε σε συνδυασμό με αντίστοιχη τομή χρώσης αιματοξυλίνης-ηωσίνης και επιλέξτε περιοχές που εμφανίζουν τα καλύτερα χαρακτηριστικά μονιμοποίησης.
	Οι τομές προσκολλήθηκαν στις αντικειμενοφόρους πλάκες με χρήση εναλλακτικών υλικών προσκόλλησης.	Χρησιμοποιήστε BOND Plus Slides κωδικός προϊόντος S21.2113 'H Apex BOND Slides κωδικός προϊόντος 3800040).
Πτωχή διατήρηση της μορφολογίας του ιστού	Λανθασμένη μονιμοποίηση και επεξεργασία ιστού	Βεβαιωθείτε πως έχει χρησιμοποιηθεί μονιμοποιητικό με βάση τη φορμαλδεύδη και πως τα χρονοδιαγράμματα επεξεργασίας ενδείκνυνται για το δείγμα που υποβάλλεται σε εξέταση. Εάν είναι εφικτό, επαναλάβετε την εξέταση του περιστατικού με χρήση διαφορετικού μπλοκ. Εάν αυτό δεν είναι εφικτό, αξιολογήστε σε συνδυασμό με αντίστοιχη τομή χρώσης αιματοξυλίνης-ηωσίνης και επιλέξτε περιοχές που εμφανίζουν τα καλύτερα χαρακτηριστικά μονιμοποίησης.
	Λανθασμένη προκαταρκτική επεξεργασία	Προσαρμόστε το πρωτόκολλο προκαταρκτικής επεξεργασίας (HIER ή Ενζυματική Πέψη).
Αποκολλημένος ιστός από αντικειμενοφόρους πλάκα/-ες ασθενούς/μάρτυρα	Χρήση λανθασμένου τύπου αντικειμενοφόρων πλακών ή ακατάλληλη αποστράγγιση της τομής	Βεβαιωθείτε πως χρησιμοποιούνται κατάλληλες αντικειμενοφόροι πλάκες για τις τομές ασθενούς/ μάρτυρα (π.χ. BOND Plus Slides κωδικός προϊόντος S21.2113 'H Apex BOND Slides κωδικός προϊόντος 3800040). Βεβαιωθείτε πως εφαρμόζεται ενδεδειγμένη αποστράγγιση των αντικειμενοφόρων πλακών και πως επωάζονται για 1 ώρα στους 60 °C.

Πίνακας 7. Leica HER2 FISH System - 30 Test Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων.

Εάν συναντήσετε οποιοδήποτε πρόβλημα με το Leica HER2 FISH System - 30 Test το οποίο δεν αναφέρεται στον οδηγό αντιμετώπισης προβλημάτων, επικοινωνήστε με το τοπικό Τμήμα τεχνικής εξυπηρέτησης της Leica Biosystems ή με το διανομέα.

## Βιβλιογραφία

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, Kuriu S, 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.

## Άδεια χρήσης

Αυτό το προϊόν περιέχει ανιχνευτές FISH PathVysion από την Abbott Molecular Inc.

Τα PathVysion, LSI και CEP αποτελούν εμπορικά σήματα της Abbott Molecular Inc. Με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος. Χρησιμοποιείται κατόπιν αδείας.

## Προσθήκες στην προηγούμενη έκδοση

Η γαστρική δεδομένων πρόσθεσε.

## Ημερομηνία έκδοσης

26 Φεβρουάριος 2020

## Ερμηνεία των συμβόλων

	Κωδικός παρτίδας		Φύλαξη		Αριθμός καταλόγου
	<i>In vitro</i> διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν		Κατασκευαστής		Αριθμός σειράς
	Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης		Επαρκές περιεχόμενο για <n> εξετάσης		Ημερομηνία λήξης EEEE-MM-HH

Το Herceptin είναι εμπορικό σήμα της Genentech, Inc. και F. Hoffmann-La Roche Ltd.