

# Leica HER2 FISH System - 30 Test

## Instrucțiuni de utilizare

Pentru utilizare pe Leica Biosystems' BOND-MAX sistem i BOND-III sistem.

TA9217 este un produs pentru hibridizare fluorescentă *in situ* conceput pentru a colora 30 de teste (30 de lame colorate cu sonda 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

# Cuprins

<b>Utilizare prevăzută</b> .....	<b>3</b>
Pentru uz diagnostic <i>in vitro</i> .....	3
Instruire necesară.....	3
<b>Rezumat și explicații</b> .....	<b>3</b>
Context .....	3
Rezumat privind concordanța clinică BOND-MAX System .....	4
Rezumat privind concordanța clinică BOND-III System .....	4
Principiul metodei .....	5
Componente furnizate .....	5
Instrucțiuni de utilizare.....	5
Conservare și stabilitate .....	5
Prepararea probelor .....	5
Avertismente și precauții .....	6
<b>Metodă</b> .....	<b>6</b>
A. Reactivi necesari dar nefurnizați.....	6
B. Echipamente necesare dar nefurnizate .....	6
C. Metodologie .....	7
D. Pretratarea concentratului Bond Enzyme .....	7
E. Protocolul de colorare implicit .....	7
F. Etapele metodei.....	7
G. Conservarea lamelor .....	8
<b>Evaluarea și numărarea semnalelor</b> .....	<b>9</b>
Metoda recomandată pentru determinarea raportului LSI HER2 la CEP17 .....	10
<b>Leica HER2 FISH System - 30 Test Ghid de interpretare</b> .....	<b>11</b>
<b>Foile pentru scorul de intensitate a probei</b> .....	<b>12</b>
<b>Controlul calității</b> .....	<b>13</b>
Utilizarea lamelor de control.....	13
<b>Limitări</b> .....	<b>14</b>
A. Limitări generale .....	14
B. Limitări specifice produsului.....	14
<b>Concordanța clinică a Leica HER2 FISH System - 30 Test cu Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Mamar</b> .....	<b>14</b>
Rezultatele de concordanță în formatul 2x2 BOND-MAX System - Mamar .....	15
Rezultatele de concordanță în formatul 2x2 BOND-III System - Mamar.....	16
<b>Concordanța clinică între sistemul Leica HER2 FISH System - 30 Test și analiza Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Gastric</b> .....	<b>17</b>
Rezultate de concordanță în formatul 2x2 pentru sistemul BOND-MAX System - Gastric .....	17
<b>Testarea preciziei – BOND-MAX System</b> .....	<b>18</b>
A. Studiul preciziei în cadrul unui ciclu.....	18
B. Studiul preciziei în cadrul unui aparat .....	18
C. Studiul preciziei între cicluri .....	18
D. Studiul preciziei între laboratoare .....	18
E. Studiul preciziei între observatori.....	18
F. Studiul preciziei între loturi.....	19
<b>Testarea preciziei – BOND-III System</b> .....	<b>19</b>
G. Studiul preciziei în cadrul unui ciclu.....	19
H. Studiul preciziei în cadrul unui aparat.....	19
I. Studiul preciziei între cicluri .....	19
J. Studiul preciziei între laboratoare .....	19
K. Studiul preciziei între observatori.....	20
L. Studiul preciziei între loturi.....	20
<b>Robuștea analizei</b> .....	<b>20</b>
<b>Soluționarea problemelor</b> .....	<b>22</b>
<b>Bibliografie</b> .....	<b>24</b>
<b>Contract de licență</b> .....	<b>25</b>

## Utilizare prevăzută

### Pentru uz diagnostic *in vitro*

Sistemul Leica HER2 FISH System - 30 Test este conceput pentru a detecta amplificarea genei HER2/neu prin hibridizarea fluorescentă *in situ* (FISH) în probele de țesut de carcinom mamar uman și de adenocarcinom gastric (inclusiv de joncțiune esogastrică) fixate în formol și incluse în parafină. Sistemul Leica HER2 FISH System - 30 Test este indicat ca un ajutor în evaluarea pacienților pentru care este luat în considerare tratamentul cu Herceptin® (trastuzumab) (consultați prospectul pentru Herceptin). Sistemul Leica HER2 FISH System - 30 Test nu este destinat screeningului sau diagnosticării cancerului mamar. Trebuie luate de asemenea în considerare și toate celelalte informații clinice precum mărimea tumorii, numărul de noduli limfatici implicați și starea receptorului steroidian. Nicio decizie de tratament pentru pacienții cu cancer mamar nu trebuie să se bazeze numai pe starea de amplificare a genei HER2.

Notă: Toți pacienții din studiile clinice ale Herceptin au fost selectați utilizând o analiză de investigație Clinical Trial Assay (CTA). Niciunul dintre pacienții din aceste studii nu a fost selectat folosind sistemul Leica Leica HER2 FISH System - 30 Test. Sistemul Leica HER2 FISH System - 30 Test a fost comparat cu analiza Abbott Molecular PathVysion® HER-2 DNA Probe Kit pe un set independent de probe și s-a observat că se obțin rezultate concordante acceptabile, așa cum se indică în Rezumatul privind concordanța clinică. Nu a fost stabilită corelarea reală a sistemului Leica HER2 FISH System - 30 Test cu rezultatele clinice.

Toți pacienții din studiile clinice Herceptin pentru cancer gastric avansat (ToGA) au fost selectați utilizând Testul Dako Hercep. Niciunul dintre pacienții din aceste studii nu a fost selectat folosind sistemul Leica HER2 FISH System - 30 Test. Sistemul Leica HER2 FISH System - 30 Test a fost comparat cu analiza Abbott Molecular PathVysion® HER-2 DNA Probe Kit pe un set independent de probe și s-a observat că se obțin rezultate concordante acceptabile, așa cum se indică în Rezumatul privind concordanța clinică. Nu a fost stabilită corelarea reală a rezultatelor de la sistemul Leica HER2 FISH System - 30 Test cu rezultatele clinice.

*\* Herceptin® este o marcă comercială a Genentech, Inc. și F. Hoffmann-La Roche Ltd. PathVysion® este o marcă comercială a Abbott Molecular Inc. Toate drepturile rezervate. Utilizat sub licență.*

### Instruire necesară

Leica Biosystems va oferi instruire pentru toți utilizatorii în prepararea probelor, metoda de analiză și în interpretarea testării FISH a genei HER2.

## Rezumat și explicații

### Context

Gena HER2, cunoscută alternativ ca neu sau c-erbB2, este localizată pe brațul lung al cromozomului 17 la poziția 17q11-12 (1). S-a demonstrat că atât gena HER2 cât și proteina codificată de 185 kD joacă un rol foarte important în transformarea malignă și în evoluția tumorii în cancerul mamar (2).

HER2 funcționează ca un marker de prognostic, amplificarea genei și supraexpresia proteinei fiind legate de o creștere a ratei de recurență a bolii și de o mortalitate mai ridicată. HER2 funcționează de asemenea ca un marker predictiv pentru chemoterapia sistemică selectată și pentru tratamente țintite (3). În mod specific, s-a arătat că amplificarea genei HER2 este un indicator al prognosticului nefavorabil în cancerul mamar cu noduli pozitivi (4-8). Mai mult, un studiu a indicat că valoarea de prognostic a HER2 este mai mare la pacienții tratați prin chemoterapie (7). Cu toate acestea, în predicția supraviețuirii fără semne de boală și a supraviețuirii generale a fiecărui pacient, trebuie luați în considerare și alți factori de prognostic cum ar fi mărimea tumorii, numărul de noduli limfatici pozitivi și starea receptorului steroidian.

Supraexpresia oncoproteinei HER2, ca rezultat al amplificării genei ce se găsește în celulele canceroase mamare, sugerează oncoproteina HER2 ca țintă a terapiei bazate pe anticorpi (3) - în timp ce rezultatele din studiul ToGA arată clar că utilizarea Herceptin® în cancerul gastric împreună cu chemoterapia reprezintă un tratament eficient care îmbunătățește rata de supraviețuire generală în cancerele HER2 pozitive (9). Herceptin (trastuzumab), un anticorp

monoclonal umanizat (10) care se leagă cu o mare afinitate de oncoproteina HER2 s-a demonstrat că inhibă proliferarea celulelor tumorale umane care supraexprimă oncoproteina HER2 atât *in vitro* cât și *in vivo* (11-13). Începând cu dezvoltarea Herceptin, detectarea genei și a proteinei HER2 a devenit un instrument esențial în evaluarea tumorilor mamare, dirijând atât selectarea terapiei cât și managementul ulterior al pacienților (14,15).

Atât în celulele în interfază, cât și în metafază obținute din liniile celulare de carcinom mamar uman, FISH a fost utilizat pentru a indica amplificarea genei HER2 (16-19). Pentru cuantificarea amplificării genei HER2, prin tehnica FISH este evaluat nivelul de amplificare a genei HER2 direct în celulele tumorale. Morfologia caracteristică a țesutului și distribuția spațială a copiilor oncogene în carcinoamele mamare primare individuale necultivate sunt păstrate. Anomaliile în numărul de copii ale cromozomului 17 (aneusomie) sunt de asemenea des întâlnite în tumorile mamare. Acestea se pot prezenta ca lipsa sau excesul de cromozomi (polisomie). Această variație cromozomială are un impact critic asupra interpretării și raportării stării de amplificare a genei HER2. Din această cauză, măsurarea numărului de copii ale cromozomului 17 în legătură cu HER2 este foarte importantă (4).

Sistemul Leica HER2 FISH System - 30 Test conține LSI HER2 DNA probe, o sondă ADN SpectrumOrange™ de 226 Kb, fluorescență, marcată direct, specifică pentru locusul genei HER2 (17q11.2-q12) și CEP17 DNA probe, o sondă ADN SpectrumGreen™ de 5,4 Kb, fluorescență, marcată direct, specifică pentru secvența ADN alfa satelit la regiunea centromerică a cromozomului 17 (17p11.1-q11.1). Soluția pentru sondă a fost preparată și validată special pentru utilizarea cu sistemul BOND și nu este permisă modificarea sau utilizarea acesteia în sisteme manuale.

### Rezumat privind concordanța clinică BOND-MAX System

Sistemul Leica HER2 FISH System - 30 Test a fost dezvoltat pentru a furniza o alternativă complet automatizată la metodologiile curente utilizate pentru a determina starea de amplificare a genei HER2. Performanța sistemului Leica HER2 FISH System - 30 Test pe sistemul BOND-MAX System a fost evaluată în cadrul unui studiu independent prin compararea rezultatelor sistemului Leica HER2 FISH System - 30 Test cu analiza Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit pe 300 de probe de carcinom mamar și pe 109 probe de adenocarcinom gastric (inclusiv de joncțiune esogastrică). Niciuna dintre probele tumorale nu a fost obținută de la pacienții din studiile clinice pentru Herceptin. Rezultatele pentru țesutul mamar au indicat o concordanță de 99,33% în cadrul unei analize în format 2x2 (pentru un interval de încredere de 95% la valori cuprinse între 97,61 și 99,92%). Rezultatele pentru adenocarcinoamele gastrice (inclusiv de joncțiune esogastrică) au indicat o concordanță de 98,17% pentru o analiză în format 2x2 (pentru un interval de încredere de 95% la valori cuprinse între 93,53 și 99,78%). Datele de concordanță indică de asemenea că un rezultat pozitiv cu sistemul Leica HER2 FISH System - 30 Test este foarte probabil să corespundă cu un rezultat pozitiv la analiza Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit. Sistemul Leica HER2 FISH System - 30 Test este interpretat ca negativ pentru amplificarea genei HER2 atunci când raportul genelor HER2:CEP17 este mai mic de 2,0 și pozitiv când raportul genelor HER2:CEP17 este mai mare sau egal cu 2,0. Rezultatele neconcludente (valorile de prag), unde raportul genelor HER2:CEP17 este între sau egal cu 1,8-2,2, trebuie interpretate cu prudență. Numărați încă 20 de nuclee suplimentare și recalculați raportul.

### Rezumat privind concordanța clinică BOND-III System

Sistemul Leica HER2 FISH System - 30 Test a fost dezvoltat pentru a furniza o alternativă complet automatizată la metodologiile curente utilizate pentru a determina starea de amplificare a genei HER2. Performanța sistemului Leica HER2 FISH System - 30 Test pe sistemul BOND-III System a fost evaluată într-un studiu independent prin compararea rezultatelor sistemului Leica HER2 FISH System - 30 Test cu analiza Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit pe 300 de probe tumorale mamare. Niciuna dintre probele tumorale nu a fost obținută de la pacienții din studiile clinice ale Herceptin. Rezultatele au indicat o concordanță de 99,67% pentru o analiză în format 2x2 (interval de încredere cu o probabilitate de 95% cuprins între 98,16 și 99,99%). Datele de concordanță indică de asemenea că un rezultat pozitiv cu sistemul Leica HER2 FISH System - 30 Test este foarte probabil să corespundă cu un rezultat pozitiv la analiza Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit. Sistemul Leica HER2 FISH System - 30 Test este interpretat ca negativ pentru amplificarea genei HER2 atunci când raportul genelor HER2:CEP17 este mai mic de 2,0 și pozitiv când raportul genelor HER2:CEP17 este mai mare sau egal cu 2,0. Rezultatele neconcludente (valorile de prag), unde raportul genelor

HER2:CEP17 este între sau egal cu 1,8-2,2, trebuie interpretate cu prudență. Numărați încă 20 de nuclee suplimentare și recalculați raportul.

### Principiul metodei

Sistemul Leica HER2 FISH System - 30 Test conține componentele necesare pentru a efectua o hibridizare fluorescentă *in situ* pe baza metodei de colorare pentru țesuturile fixate în formol și incluse în parafină. După o pretratare corespunzătoare, incubare cu sonda LSI HER2/CEP17 Dual Probe gata de utilizare și o spălare riguroasă corespunzătoare, secțiunile de țesut sunt apoi deshidratate și montate cu DAPI. Rezultatele sunt interpretate prin microscopia de fluorescență utilizând filtrele recomandate la lungimile de undă corespunzătoare.

Sistemul Leica HER2 FISH System - 30 Test este destinat utilizării numai cu sistemul BOND-MAX i BOND-III.

### Componente furnizate

Materialele enumerate mai jos (Tabelul 1) sunt suficiente pentru colorarea a 30 de teste (30 de lame colorate cu sonda LSI HER2/CEP17 Dual Probe).

<b>LSI HER2/CEP17 Probe</b> <b>6.6 mL</b>	Conține sonda LSI HER2/CEP17 Dual Probe gata de utilizare. Conține formamidă <60% (v/v).
<b>Post Hybridization Wash 2</b> <b>9 mL</b>	Conține soluție de spălare post hibridizare, gata de utilizare. Conține formamidă <50% (v/v).
<b>BOND Enzyme Concentrate 2</b> <b>1 mL</b>	Conține soluție de proteinază K de 1,7 mg/ml.
<b>BOND Enzyme Diluent</b> <b>65 mL</b>	Conține diluant pentru enzimă. Conține 0,035% 2-metilizotiazol-3(2H)-onă.
<b>BOND Open Container</b> <b>3 x 7 mL</b>	BOND Open Container folosit pentru Enzyme 5.

Tabelul 1: Leica HER2 FISH System - 30 Test Componente

Consultați fișa tehnică de securitate (MSDS) individuală pentru informații suplimentare privind siguranța produsului, disponibilă pe [www.LeicaBiosystems.com/TA9217-IFU](http://www.LeicaBiosystems.com/TA9217-IFU)

### Instrucțiuni de utilizare

Toți reactivii furnizați sunt preparați special pentru utilizarea cu această analiză și numerele de lot sunt specifice pentru fiecare sistem Leica HER2 FISH System - 30 Test. Pentru ca analiza să fie validă, nu este permisă nicio înlocuire.

### Conservare și stabilitate

A se conserva la 2–8 °C. A nu se congela. Imediat după utilizare se conservă din nou la 2–8 °C. Orice abatere de la aceste condiții va determina ca analiza să nu mai fie validă. Asigurați-vă că sistemul Leica HER2 FISH System - 30 Test este utilizat în interiorul termenului de valabilitate indicat. Semnele care indică contaminarea și/sau instabilitatea sistemului Leica HER2 FISH System - 30 Test sunt: turbiditatea soluțiilor (cu excepția soluției sondei) și mirosul. Condițiile de conservare, altele decât cele specificate mai sus trebuie verificate de către utilizator.

### Prepararea probelor

Pentru toate probele trebuie utilizate metodele standard de procesare a țesuturilor (20). Se recomandă ca țesuturile să fie preparate în fixatori pe bază de formol, să fie procesate sistematic și să fie incluse în parafină. De exemplu probele trebuie secționare la o grosime de 3-4 mm și fixate timp de 18–24 de ore într-o soluție neutră de formol tamponat de 10%. Țesuturile trebuie

apoi deshidratate într-o serie de soluții de alcool și clarificate cu xilen, urmată de impregnarea cu ceară de parafină topită, la o temperatură care să nu depășească 60 °C. Probele de țesut trebuie secționare la grosimi între 4-6 μm.

Secțiunile de țesuturi montate pe lamele încărcate (BOND Plus Slides – cod produs S21.2113 sau Apex BOND Slides cod produs 3800040) pot fi păstrate până la 12 luni la 2–8 °C înainte de colorare. După secționare se recomandă ca lamele să fie incubate la 60 °C pentru o oră. Secțiunile colorate trebuie păstrate la -20 °C pentru a conserva semnalele fluorescente și a evita atenuarea culorii. Lăsați lamele conservate să ajungă la temperatura camerei înainte de citire.

## Avertismente și precauții

*Numai pentru uz profesional.*

Una sau mai multe componente ale produsului sunt periculoase și pot dăuna copilului nenăscut.

În general, este interzisă utilizarea acestui produs de către persoanele cu vârsta sub 18 ani. Utilizatorii trebuie să fie atenți instruiți cu privire la procedurile de lucru corecte, proprietățile periculoase ale produsului și instrucțiunile de siguranță necesare.

Înainte și după fixare, probele și toate materialele în contact cu acestea, trebuie tratate ținând cont de posibilitatea acestora de a transmite infecții și trebuie eliminate luându-se măsurile corespunzătoare.

Nu pipetați niciodată reactivii cu gura și evitați contactul reactivilor sau probelor cu pielea sau mucoasele. Dacă reactivii sau probele ajung în contact cu zone sensibile, clătiți cu apă din abundență. Cereți sfatul medicului. Consultați reglementările naționale, regionale sau locale privind eliminarea oricăror componente potențial toxice.

Pentru a evita riscul de intensificare a unei colorații nespecifice reduceți la minimum contaminarea microbiană a reactivilor.

## Metodă

### A. Reactivi necesari dar nefurnizați

- BOND Dewax Solution (AR9222)
- BOND Epitope Retrieval Solution 1 (AR9961)
- BOND Wash Solution x10 Concentrate (AR9590)
- Solvenți standard utilizați în analizele de hibridizare fluorescentă *in situ* (de ex. alcool etilic absolut și alcool etilic cu concentrații succesiv crescute)
- Apă distilată sau demineralizată
- DAPI Colorație de contrast
- Leica HER2 FISH Control Slides (TA9123)
- BOND Aspirating Probe Cleaning System (CS9100)

### B. Echipamente necesare dar nefurnizate

- Pipete (capabile să măsoare volume de 1-20 μl și respectiv 100 – 1000 μl)
- Lame încărcate (BOND Plus Slides – cod produs S21.2113 sau Apex BOND Slides cod produs 3800040)
- BOND-MAX (21.0051) sau BOND-III (21.2201)
- BOND Universal Covertiles™ (S21.2001, S21.4583 sau S21.4611)
- BOND Mixing Stations (S21.1971)
- BOND Slide Label & Print Ribbon (S21.4564)
- Lamele
- Etuvă pentru uscare (capabilă să mențină temperatura de 60 °C)
- Microscop de fluorescență (obiectiv de 60–100x) cu o sursă de lumină corespunzătoare. Înregistrați numărul de ore de utilizare a becului și înlocuiți-l înainte de a depăși durata de viață nominală. Asigurați-vă că lampa este aliniată corect.
- Set adecvat de filtre de fluorescență (SpectrumOrange™ – valoarea maximă de excitație la 559 nm, valoarea maximă de emisie la 588 nm, SpectrumGreen™ – valoarea maximă

de excitație la 497nm, valoarea maximă de emisie la 524 nm și DAPI – valoarea maximă de excitație la 367 nm, valoarea maximă de emisie la 452 nm). Seturi de filtre de trecere multi-bandă pentru microscop de fluorescență optimizate pentru utilizarea cu sistemul Leica HER2 FISH System - 30 Test sunt disponibile pentru majoritatea modelelor de microscopie. Seturile de filtre recomandate pentru sistemul Leica HER2 FISH System - 30 Test sunt filtrul de trecere cu bandă dublă DAPI/9-Orange, filtrul de trecere cu bandă dublă DAPI/Green, filtrul de trecere cu bandă dublă Green/Orange(V.2) și filtrul de trecere cu bandă triplă DAPI/Green/Orange (V.2).

## C. Metodologie

- Înainte de a aborda această metodologie, utilizatorii trebuie să fie instruiți corect în tehnica fluorescenței *in situ* automatizate.
- Fiecare secțiune de test colorată cu sonda LSI HER2/CEP17 Dual Probe permite analiza în aceeași celulă atât a semnalelor genei HER2, cât și ale regiunii centromerice a cromozomului 17. Un raport ulterior al semnalelor genei HER2 față de cele ale cromozomului 17 va permite o atribuire a unei valori cantitative pentru probă, care va indica un rezultat negativ (fără amplificare) sau pozitiv (cu amplificare). Rezultatele neconcludente (valorile de prag) (1,8-2,2) trebuie interpretate cu prudență. Numărați încă 20 de nuclee suplimentare și recalculați raportul.

## D. Pretratarea concentratului BOND Enzyme

Înainte de colorare, diluați concentratul BOND Enzyme Concentrate 2 într-un raport de diluție de 1:300 utilizând diluantul BOND Enzyme Diluent furnizat într-unul din recipientele în regim deschis BOND Open Containers furnizate. De exemplu, pentru a colora 10 lame preparați 3 mL de soluție de lucru prin diluarea a 10  $\mu$ l de BOND Enzyme Concentrate 2 în 2990  $\mu$ l de BOND Enzyme Diluent. Se recomandă ca enzima să fie proaspăt preparată înainte de fiecare ciclu de colorare și să se utilizeze un volum minim de 900  $\mu$ l pentru fiecare ciclu.

## E. Protocolul de colorare implicit

Se recomandă ca sistemul Leica HER2 FISH System - 30 Test să fie utilizat cu protocolul de colorare implicit recomandat, indicat în tabelul 2 de mai jos.

Tip protocol	Denumire protocol
Colorare	*FISH Protocol A
Preparare	*Dewax
HIER	*HIER 25 min with ER1 (97)
Enzimă	*Enzyme 5 for 25 min
Denaturare	*D10
Hibridizare	*ISH Hybridization (12Hr)

Tabelul 2: Protocolul de colorare implicit Leica HER2 FISH

## F. Etapele metodei

Aceste instrucțiuni trebuie citite împreună cu manualul de utilizare al sistemului BOND-MAX sau BOND-III System. Pentru fiecare lamă trebuie utilizată o lamelă nouă BOND Universal Covertile.

Utilizarea lamelei BOND Universal Covertiles, care a fost folosită în prealabil pentru colorarea imunohistochimică sau prin hibridizare *in situ* nu a fost validată pentru acest test.

- Asigurați-vă că pe sistemul BOND-MAX sau BOND-III System, recipientele pentru cantități mari și cele pentru reziduurile periculoase au capacități suficiente pentru a efectua ciclurile de colorare necesare.
- Verificați dacă există suficient alcool și apă distilată sau demineralizată, suficientă soluție BOND Dewax Solution, BOND Epitope Retrieval Solution 1 și BOND Wash Solution (diluată de 10x) în recipientele pentru reactivi, de mare capacitate, pentru a efectua ciclurile de colorare necesare.
- Asigurați-vă că este montat un sistem curat BOND Mixing Station.

4. Porniți sistemul BOND-MAX sau BOND-III System.
5. Porniți computerul atașat la sistemul BOND-MAX sau BOND-III System.
6. Deschideți programul software BOND.
7. Pentru o nouă trusă Leica HER2 FISH System - 30 Test scanați codul de bare al tăviței de reactivi cu cititorul de bare pentru a introduce sistemul în inventarul pentru reactivi BOND (Un singur cod de bare).
8. Preparați soluția BOND Enzyme 5 în recipientul în regim deschis BOND Open Container furnizat, la o diluție de 1:300. De exemplu, pentru 10 lame adăugați 10 µl de BOND Enzyme Concentrate 2 la 2990 µl de BOND Enzyme Diluent.
9. Scanați recipientul în regim deschis BOND furnizat și înregistrați-l ca **Bond Enzyme 5**.
10. Treceți la ecranul de configurare Slide (Lamă) și faceți clic pe **Add case (Adăugare caz)**.
11. Introduceți detaliile pentru primul caz. Verificați dacă volumul distribuit este setat la **150 µl** și dacă protocolul de preparare este **\*Dewax**. Faceți clic pe **OK**.
12. Având cazul evidențiat în ecranul de configurare Slide (Lamă), faceți clic pe **Add slide (Adăugare lamă)**.
13. Prima dată introduceți lamele de test pentru pacienți. Verificați dacă tipul de țesut este setat la **Test tissue (Țesut de test)**.
14. Selectați modul de colorare **Single (Unic)**.
15. Selectați procesul **ISH**.
16. Selectați **\*LSI HER2/CEP17 Dual Probe – 30 Test** din lista de sonde. Cu fila Protocols (Protocele) selectați implicit protocolul de colorare corect (**\*FISH Protocol A**), protocolul HIER (**\*HIER 25 min with ER1 (97)**), protocolul EIER (**\*Enzyme 5 for 25 min**), denaturarea (**\*D10**) și hibridizarea (**\*ISH Hybridization (12Hr)**).
17. Repetați etapele 10 - 16 până când au fost create lamele de test pentru pacient și controalele (lamele Leica HER2 FISH control slides și/sau controalele interne). Imprimați etichetele lamelor.
18. Etichetați lamele în mod corespunzător.
19. Deschideți capacele tuturor recipientelor Leica HER2 FISH System - 30 Test și încărcăți tăvița cu reactivi în sistemul BOND-MAX sau BOND-III System.
20. Așezați o nouă lamelă pe fiecare lamă.
21. Încărcați tăvița cu lame în sistemul BOND-MAX sau BOND-III System și apăsați butonul **Load/Unload (Încărcare/Descărcare)**.
22. Confirmați că lamele au fost scanate și faceți clic pe butonul **Run (Play) (Ciclu (Executare))** de pe ecranul de stare a Sistemului pentru a porni ciclul imediat (pentru sistemul Leica HER2 FISH System - 30 Test se recomandă ca această analiză să fie efectuată peste noapte utilizând funcția de pornire temporizată).
23. Verificați dacă câmpul indicator pentru tăviță afișează **Proc(OK)**, iar numărul de lot și timpul de finalizare sunt afișați.
24. Când ciclul este finalizat, apăsați pe butonul **Load/Unload (Încărcare/Descărcare)** și scoateți tăvițele cu lame din sistemul BOND-MAX sau BOND-III System.
25. Îndepărtați lamelele și clătiți lamele cu apă demineralizată.
26. Deshidratați rapid în două etape cu alcool, uscați la aer.
27. Distribuți 20 µl de DAPI direct pe probă.
28. Așezați lamelele și lăsați soluția să se răspândească cât mai mult posibil, având grijă să se îndeplinească toate bulele de aer.
29. Etanșați marginile lamelelor cu lac de unghii sau o altă substanță de etanșare asemănătoare.
30. Așezați lamele la întuneric pentru a facilita dezvoltarea semnalului înainte de a-l vizualiza la microscopul de fluorescență.
31. Pentru a conserva intensitatea semnalului, păstrați lamele colorate la -20 °C.

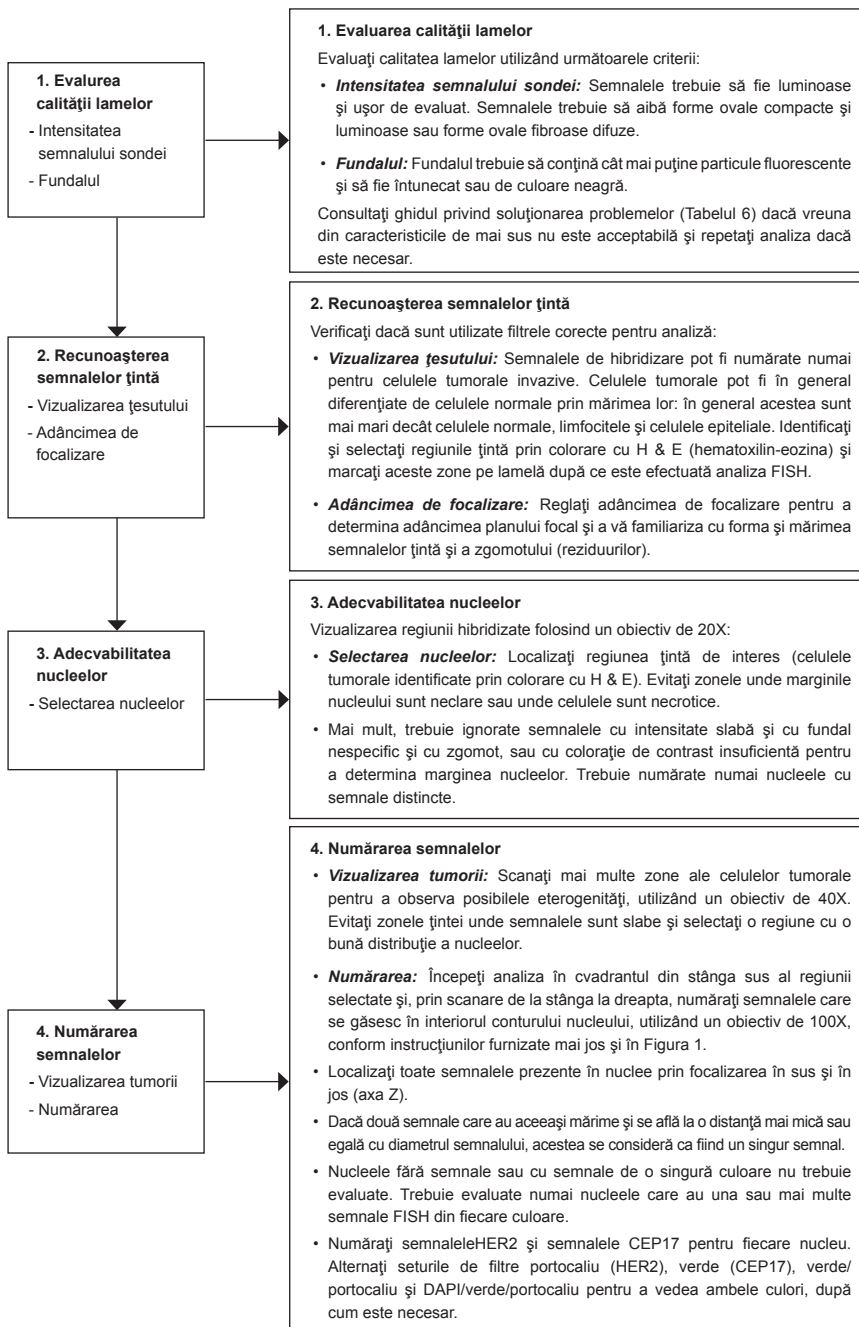
## G. Conservarea lamelor

Conservați lamele colorate la -20 °C în întuneric. Lăsați lamele să preia temperatura camerei înainte de vizualizarea acestora după ce au fost scoase de la temperatura de -20 °C.



## Evaluarea și numărarea semnalelor

Pentru a evalua calitatea semnalului și pentru numărarea semnalelor HER2 și CEP17 urmați procedura de mai jos:



## Metoda recomandată pentru determinarea raportului LSI HER2 la CEP17

Pentru a determina raportul LSI HER2 la CEP17, utilizați următoarea metodă:

1. Înregistrați și determinați numărul de semnale LSI HER2 și CEP17 în 20 de nuclee (a se vedea Figura 2 din foaia de evaluare Leica HER2 FISH System - 30 Test de mai jos).
2. Calculați numărul total de semnale LSI HER2. Aceasta reprezintă numărul total de semnale LSI HER2, de ex. 143.
3. Calculați numărul total de semnale CEP17. Aceasta reprezintă numărul total de semnale CEP17, de ex. 48.
4. Pentru calcularea rezultatului final, folosiți următorul mod de calcul: Numărul total de semnalele LSI HER2 împărțit la numărul total de semnale CEP17, de ex.  $143/48$  reprezintă un raport de 2,98, care este pozitiv pentru amplificarea HER2.

**Notă importantă: dacă raportul LSI HER2 la CEP17 este neconcludent (1,80 - 2,20), numărați încă 20 de nuclee și recalculați raportul.**

Rezultatele trebuie raportate în modul următor:

1. Dacă raportul este  $<2$ , amplificarea genei HER2 nu a fost observată
2. Dacă raportul este  $\geq 2$ , amplificarea genei HER2 a fost observată

**Notă importantă: un raport de sau aproape de valoarea de cut-off (1,80 - 2,20) trebuie interpretat cu precauție, așa cum este descris mai sus.**

## Leica HER2 FISH System - 30 Test Ghid de interpretare

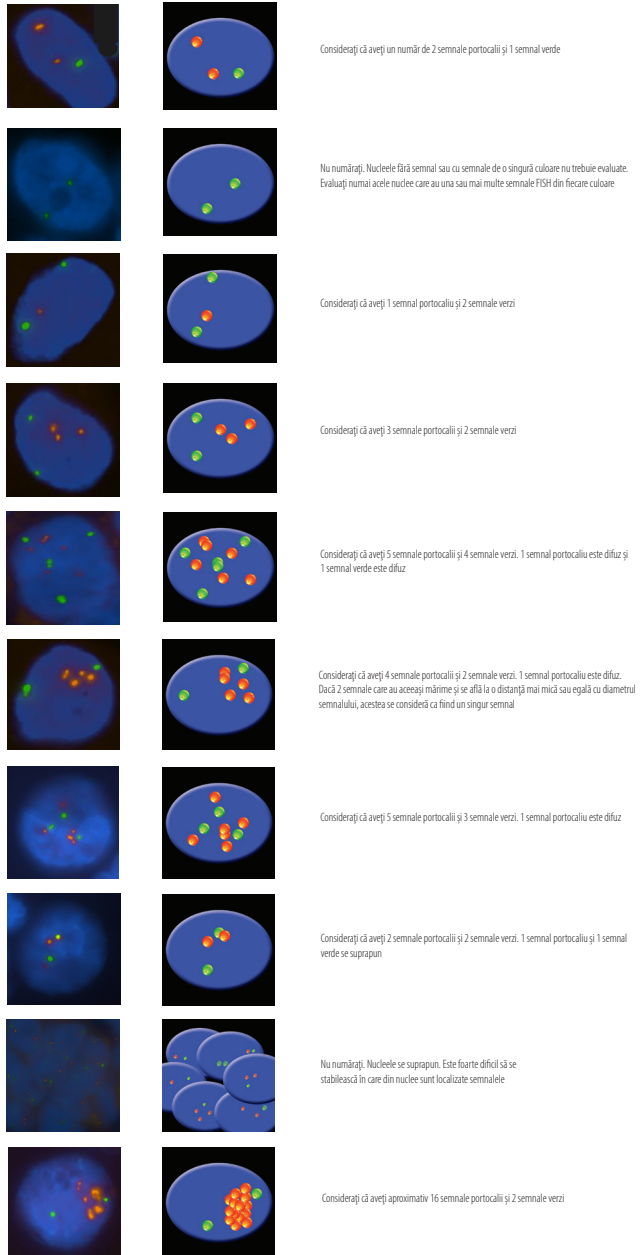


Figura 1: Ghid de interpretare

## Leica HER2 FISH System - 30 Test Foaie de evaluare

Numărarea semnelor din 20 de nuclee					
Nucleul nr.	HER2 - număr de copii	CEP17 - număr de copii	Nucleul nr.	HER2 - număr de copii	CEP17 - număr de copii
1			11		
2			12		
3			13		
4			14		
5			15		
6			16		
7			17		
8			18		
9			19		
10			20		
Total 1-10			Total 11-20		
		<b>HER2</b>	<b>CEP17</b>	<b>HER2:CEP17 Raport de amplificare</b>	
<b>Scor total 1-20</b>					
<b>Medie per celulă</b>					

Figura 2: Model de foaie de evaluare

## Metoda automată Ariol pentru determinarea HER2 FISH

Utilizarea aplicației de notare digitală Ariol PathVysion, ca și ajutor în interpretare a fost validată în mod independent pe un grup diferit de probe, pentru utilizare prin Leica HER2 FISH System. Aplicația de notare digitală Ariol PathVysion® utilizată în combinație cu Leica HER2 FISH System este destinată Diagnosticării In Vitro. Atunci când este utilizată împreună cu Leica HER2 FISH System, aplicația Ariol PathVysion ar trebui calibrată pentru utilizarea cu lamele de control pentru țesut, și nu cu Leica HER2 FISH Control Slides (TA9123).

**Toate deciziile de diagnosticare sunt luate de către clinicianul calificat.**

Pentru mai multe informații, consultați manualul de utilizare Ariol.

## Controlul calității

### Utilizarea lamelor de control

Se recomandă ca lama Leica HER2 FISH Control Slide să fie inclusă în fiecare ciclu de teste pentru a monitoriza performanța analizei și pentru a evalua acuratețea numărării semnalelor. Lamele de control trebuie folosite pentru fiecare lot de colorare pe sistemul BOND-MAX sau BOND-III System și cu fiecare lot nou de reactivi. Mai mult, utilizatorii individuali pot să aleagă să-și utilizeze propriul material de control.

Evaluati calitatea lamei de control și efectuați numărarea semnalelor conform instrucțiunilor din capitolul **Evaluarea și numărarea semnalelor**. Trebuie îndeplinite criteriile pentru calitatea lamei și rezultatele raportului HER2:CEP17 trebuie să se încadreze între limitele stabilite pentru o performanță acceptabilă a testului. A se vede Tabelul 3 pentru criteriile de acceptare ale Leica HER2 FISH Control Slides.

Linie celulară	Bond Oracle HER2 IHC System Profil	HER2 Încărcarea cu receptori per celulă*	Leica HER2 FISH System - 30 Test Criterii de acceptare pentru HER2:CEP17
SKBr-3	3+	$4,3 \times 10^5$	HER2 - amplificarea este observată
MDA-MB-453	2+	$1,4 \times 10^5$	HER2/CEP17 - raportul acestor gene trebuie să fie între 1,5 – 2,5
MDA-MB-175	1+	$6,3 \times 10^4$	HER2 - amplificarea nu este observată
MDA-MB-231	0	$9,3 \times 10^3$	HER2 amplificarea nu este observată

\*analiza încărcării cu receptori HER2 evaluată prin citometria de flux

Tabelul 3: Interpretarea lamei Leica HER2 FISH Control Slide.

Dacă controalele pentru analiză au eșuat, rezultatele FISH pentru acest caz nu trebuie raportate. Dacă lamele de control nu îndeplinesc criteriile de acceptare pentru lame, se poate ca sistemul Leica HER2 FISH System - 30 Test să nu fi funcționat în mod adecvat. În această situație va fi necesară o repetare a testului cu lame de control și lame de probă de pacient proaspete. Dacă rezultatele sunt în afara intervalului specificat, dar lamele de control îndeplinesc cerințele de acceptare privind calitatea, poate fi adecvată repetarea screening-ului pentru aceeași lamă deoarece este posibil ca numărătoarea să se fi efectuat în mod greșit. Consultați ghidul privind soluționarea problemelor (Tabelul 6) dacă hibridizarea a eșuat, fie în cazul probei, fie la lamele de control.

Pentru probele clinice unde interpretarea semnalului de hibridizare este dificilă și nu există probă suficientă pentru reanaliză, testul nu aduce informații. Dacă nu există suficiente celule pentru analiză, testul nu aduce informații.

Probele de pacient trebuie controlate conform procedurilor de operare standard ale laboratorului. Calitatea semnalului și rezultatele numărătorii trebuie să fie documentate într-un formular de raportare corespunzător.

## Limitări

### A. Limitări generale

FISH este o metodă ce necesită o instruire specializată cu privire la toate aspectele metodei (inclusiv selecția reactivilor și țesutului corespunzător, a modului de fixare și procesare corespunzătoare, a preparării corespunzătoare a lamei), precum și a modului de interpretare. Colorarea țesuturilor depinde de modul de manipulare, fixare și procesare a țesutului înainte de colorare. O fixare, congelare, decongelare, spălare, uscare, încălzire, secționare necorespunzătoare sau contaminarea cu alte țesuturi sau fluide poate duce la artefacte, degradarea acizilor nucleici, fluorescență de fundal și rezultate fals negative. Rezultate discordante pot fi obținute din cauza variațiilor în metodele de fixare și includere sau neregularităților inerente din cadrul țesutului (21). Colorația de contrast excesivă sau incompletă poate de asemenea compromite corecta interpretare a rezultatelor.

Colorarea nespecifică ca rezultat al unei sonde nelegate are un aspect difuz, granular și poate fi vizualizată la sau departe de centrul de hibridizare presupus. Utilizați celule intacte pentru interpretarea rezultatelor privind colorația. Celulele necrotice sau degenerate pot să se coloreze nespecific (22). Colorații FISH neprevăzute sau variațiile în colorație, pot fi rezultatul unor modificări în nivelurile de expresie a genelor de codificare. Orice modificări în profilurile de colorație presupuse trebuie interpretate în asociere cu alte investigații de diagnosticare. Interpretarea colorației trebuie completată cu studii morfologice și cu utilizarea unui material de control corespunzător și trebuie evaluată de către un medic patolog calificat în contextul antecedentelor clinice ale pacientului și a oricăror alte teste de diagnosticare.

Performanța analizei (adică evaluarea adecvării materialului de control) și interpretarea oricărei colorații sau absența acesteia poate fi efectuată într-un laborator acreditat/autorizat în mod corespunzător, sub supravegherea unui medic patolog calificat corespunzător și experimentat, care este responsabil de evaluarea generală a probei hibridizate *in situ* și a interpretării acesteia. Rezultatele fals pozitive în cadrul FISH pot fi cauzate de reactivitatea încrucișată a sondei cu alte secvențe de acizi nucleici sau/și a legării nespecifice. Trebuie utilizate și documentate controalele corespunzătoare, iar în cadrul testelor trebuie să se ia în considerare toate datele de expirare relevante.

Variațiile tehnice și de interpretare trebuie luate de asemenea în considerare atunci când tehnica FISH este utilizată pe materialele provenite din linii celulare (23).

### B. Limitările specifice produsului

Acest produs nu este conceput pentru a fi utilizat în orice alte analize de diagnostic bazate pe ADN.

Nu înlocuiți reactivii sistemului Leica HER2 FISH System - 30 Test cu nicio altă componentă furnizată de Leica Biosystems sau de alți producători. Procedând astfel, analiza nu va fi validă. Utilizatorul trebuie să valideze orice abatere de la procedura recomandată.

Se recomandă să fie utilizate țesuturi fixate numai în fixatori pe bază de formol. Utilizarea oricăror alte tipuri de fixatori poate invalida analiza.

Țesuturile secționate la grosimi cu valori în afara domeniului recomandat nu au fost validate. Utilizarea oricăror alte grosimi ale secțiunilor poate invalida analiza.

## Concordanța clinică a Leica HER2 FISH System - 30 Test cu Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Mamar

Acest studiu examinează adecvabilitatea sistemului Leica HER2 FISH System - 30 Test pentru a fi utilizat ca ajutor în determinarea tratamentului pentru terapia cu Herceptin (trastuzumab). Studiul a fost conceput pentru a examina concordanța între sistemul Leica HER2 FISH System - 30 Test și un dispozitiv de diagnostic aprobat anterior, Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, considerat ca „standardul de aur” pentru această analiză pentru țesutul mamar. Criteriul de acceptare pentru testare a fost ca limita inferioară a intervalului de încredere unilateral cu o probabilitate de 95% să fie peste 90% între sistemul Leica HER2 FISH System - 30 Test și analiza manuală Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, între cazurile pozitive (cu amplificare) și negative (fără amplificare) de carcinom mamar invaziv fixat în formol și inclus în parafină (FFPE).

Studiul a fost desfășurat ca o evaluare mascată, în trei centre, ale probelor clinice de carcinom mamar invaziv. Fiecăreia dintre centrele de investigație i s-au pus la dispoziție blocuri de țesut arhivate de carcinom mamar invaziv fixat în formol și inclus în parafină cu niveluri cunoscute de expresie a oncoproteinei HER2. A fost selectată o cohortă de 300 de probe conștând din 75 de cazuri de IHC caracterizate în prealabil, de intensitate 0/1+; 150 de cazuri de IHC caracterizate în prealabil, de intensitate 2+; și 75 de cazuri de IHC caracterizate în prealabil, de intensitate 3+ și împărțite în mod egal la cele trei centre de studiu de investigație.

Toate cazurile au fost colorate prin analiza manuală Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit conform instrucțiunilor de utilizare ale producătorului, așa cum se specifică în prospect. Secțiunile succesive de la fiecare caz au fost colorate cu sistemul Leica HER2 FISH System - 30 Test pe un sistem BOND-MAX sau BOND-III System.

Toate lamele colorate au fost mascate și a fost evaluată intensitatea acestora în mod aleator de către un singur observator instruit la fiecare din cele trei centre de studiu de investigație. Scorurile au fost interpretate ca negative la un raport de gene HER2/CEP17 calculat de  $<2,0$  și pozitive la un raport de gene HER2/CEP17 calculat de  $\geq 2,0$ . Datele au fost apoi analizate pentru concordanță, potrivirea colorațiilor pozitive și a colorațiilor negative.

### Rezultatele de concordanță în formatul 2x2 BOND-MAX System - Mamar

Datele au fost grupate în negative ( $<2,0$ ) sau pozitive ( $\geq 2,0$ ) pentru o analiză 2x2. Potrivirile observate pentru cele 300 de probe între cele două teste în cadrul unei analize 2x2 arată o concordanță de 99,33% (298/300) cu un CI cu o probabilitate de 95% cuprins între 97,61 și 99,92% pentru BOND-MAX System

Concordanța pozitivă în procente (sensibilitatea) sau capacitatea sistemului Leica HER2 FISH System - 30 Test de a identifica corect cazurile pozitive ale analizei Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe (procentul de probe evaluate ca pozitive atât de sistemul Leica HER2 FISH System - 30 Test cât și de analiza manuală Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit din totalul de cazuri pozitive Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) a fost de 99,03% (102/103).

Procentul de concordanță negativă (specificitatea) sau capacitatea testului de a identifica corect cazurile negative de Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (procentul de probe evaluate ca negative de către sistemul Leica HER2 FISH System - 30 Test și analiza Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit din totalul de cazuri negative Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) a fost de 99,49% (196/197). A se vedea Tabelul 4.

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

Concordanța totală (CI cu o probabilitate de 95%) = 99,33% (între 97,61 și 99,92%)

Tabelul 4. Concordanța în format 2x2 a sistemului Leica HER2 FISH System - 30 Test pe sistemul BOND-MAX System cu Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit pe țesut mamar.

## Rezultatele de concordanță în formatul 2x2 BOND-III System - Mamar

Datele au fost grupate în negative ( $<2,0$ ) sau pozitive ( $\geq 2,0$ ) pentru o analiză 2x2. Potrivirile observate pentru cele 300 de probe între cele două teste în cadrul unei analize 2x2 arată o concordanță de 99,67% (299/300) cu un CI cu o probabilitate de 95% cuprins între 98,16 și 99,99% pentru BOND-III System.

Concordanța pozitivă în procente (sensibilitatea) sau capacitatea sistemului Leica HER2 FISH System - 30 Test de a identifica corect cazurile pozitive ale analizei Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (procentul de probe evaluate ca pozitive atât de sistemul Leica HER2 FISH System - 30 Test cât și de analiza manuală Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit din totalul de cazuri pozitive ale analizei Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) a fost de 99,03% (102/103).

Concordanța negativă în procente (specificitatea) sau capacitatea testului de a identifica corect cazurile negative ale analizei Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (procentul de probe evaluate ca negative atât de sistemul Leica HER2 FISH System - 30 Test cât și de analiza manuală Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit din totalul de cazuri pozitive ale analizei Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) a fost de 100% (197/197). A se vedea Tabelul 5.

		Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit		
		Negativ ( $<2,0$ )	Pozitiv ( $\geq 2,0$ )	Total
Leica HER2 FISH System - 30 Test BOND-III	Negativ ( $<2,0$ )	197	1	198
	Pozitiv ( $\geq 2,0$ )	0	102	102
	Total	197	103	300

Concordanța totală (CI cu o probabilitate de 95%) = 99,67% (între 98,16 și 99,99%).

Tabelul 5. Concordanța în format 2x2 a sistemului Leica HER2 FISH System - 30 Test pe sistemul BOND-III System și analiza Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit pentru țesut mamar.

În concluzie, datele obținute în acest studiu demonstrează că sistemul Leica HER2 FISH System - 30 Test poate fi utilizat ca un ajutor în evaluarea pacienților pentru care este luat în considerare tratamentul cu Herceptin (trastuzumab), pe baza concordanței sale ridicate cu Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, un test de diagnosticare aprobat anterior pentru această indicație.



## Concordanța clinică între sistemul Leica HER2 FISH System - 30 Test și analiza Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Gastric

Acest studiu examinează adecvabilitatea sistemului Leica HER2 FISH System - 30 Test pentru a fi utilizat ca ajutor în determinarea tratamentului pentru terapia cu Herceptin (trastuzumab). Studiul a fost conceput pentru a examina concordanța între sistemul Leica HER2 FISH System - 30 Test și un dispozitiv de diagnostic aprobat anterior, Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, considerat ca "standardul de aur" pentru această analiză în cazul țesutului gastric. Criteriul de acceptare pentru testare a fost ca limita inferioară a intervalului de încredere unilateral cu o probabilitate de 95% să fie peste 90% între sistemul Leica HER2 FISH System - 30 Test și analiza manuală Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, între cazurile pozitive (cu amplificare) și negative (fără amplificare) de adenocarcinoame gastrice (inclusiv de joncțiune esogastrică) fixate în formol și incluse în parafină (FFPE).

Studiul a fost desfășurat ca o evaluare a probelor clinice de adenocarcinom gastric invaziv. Testarea a fost efectuată pe blocuri de țesut arhivate de adenocarcinom gastric fixat în formol și inclus în parafină, cu niveluri cunoscute de expresie a genei HER2. A fost selectată o cohortă de 109 de probe, constând din 50 de cazuri cu amplificare și 59 de cazuri fără amplificare.

Toate cazurile au fost colorate prin analiza manuală Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit conform instrucțiunilor de utilizare ale producătorului, așa cum se specifică în prospect. Secțiunile succesive de la fiecare caz au fost colorate cu sistemul Leica HER2 FISH System - 30 Test pe sistemul BOND-MAX System.

Toate lamele colorate au fost evaluate în mod aleator de către un singur observator instruit. Scorurile au fost interpretate ca negative la un raport de gene HER2/CEP17 calculat de  $<2,0$  și pozitive la un raport de gene HER2/CEP17 calculat de  $\geq 2,0$ . Datele au fost apoi analizate pentru concordanță, potrivirea colorațiilor pozitive și a colorațiilor negative.

### Rezultate de concordanță în formatul 2x2 pentru sistemul BOND-MAX System - Gastric

Datele au fost grupate în negative ( $<2,00$ ) sau pozitive ( $\geq 2,00$ ) pentru o analiză 2x2. Potrivirile observate pentru cele 109 de probe între cele două teste în cadrul unei analize 2x2 arată o concordanță de 98,17% (107/109), pentru un CI de 95% la valori cuprinse între 93,53 și 99,78% pentru sistemul BOND-MAX System.

Concordanța pozitivă în procente (sensibilitatea) sau capacitatea sistemului Leica HER2 FISH System - 30 Test de a identifica corect cazurile pozitive ale analizei Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (procentul de probe evaluate ca pozitive atât de sistemul Leica HER2 FISH System - 30 Test, cât și de analiza manuală Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit din totalul de cazuri pozitive ale analizei Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) a fost de 96,00% (48/50).

Procentul de concordanță negativă (specificitatea) sau capacitatea testului de a identifica corect cazurile negative de Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (procentul de probe evaluate ca negative de către sistemul Leica HER2 FISH System - 30 Test și analiza Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit din totalul de cazuri negative ale analizei Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) a fost de 100% (59/59). Consultați Tabelul 6.

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

Concordanța totală (CI de 95%) = 98,17% (între 93,53 și 99,78%)

Tabelul 6. Rezultate de concordanță în formatul 2x2 între sistemul Leica HER2 FISH System - 30 Test pe sistemul BOND-MAX System și analiza Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit pentru țesutul gastric.

## Testarea preciziei – BOND-MAX System

### A. Studiul preciziei în cadrul unui ciclu

Studiul preciziei în cadrul unui ciclu a fost efectuat în regim aleator și orb. Testarea preciziei în cadrul unui ciclu a sistemului Leica HER2 FISH System - 30 Test a fost evaluată într-un singur centru de investigație pe 540 de probe TMA (micromatrice de țesuturi) caracterizate în prealabil pentru HER2 care au inclus cazuri de carcinom mamar fixat în formol și inclus în parafină. Utilizarea probelor TMA pentru determinarea preciziei în cadrul unui ciclu, a permis analiza unui volum mai mare de cazuri ce acoperă un interval mai larg al expresiei HER2 în cadrul unui singur ciclu pe un singur aparat.

La numărarea lamelor colorate din studiului preciziei în cadrul unui ciclu, 532/540 de cazuri evaluate au demonstrat un rezultat concordant ceea ce a dus la o concordanță generală de 98,52% cu un CI cu o probabilitate de 95% mai scăzut, de 97,10%.

### B. Studiul preciziei în cadrul unui aparat

Studiul preciziei în cadrul unui aparat a fost efectuat în regim aleator și orb. Testarea preciziei în cadrul unui aparat a sistemului Leica HER2 FISH System - 30 Test a fost evaluată într-un singur centru de investigație pe 1620 de probe TMA caracterizate în prealabil pentru HER2 care au inclus cazuri de carcinom mamar fixat în formol și inclus în parafină. Utilizarea probelor TMA pentru determinarea preciziei în cadrul unui aparat, a permis analiza unui volum mai mare de cazuri ce acoperă un interval mai larg al expresiei HER2 în cadrul mai multor cicluri pe un singur aparat.

La numărarea lamelor colorate din studiului preciziei în cadrul unui aparat, 1620/1620 de cazuri evaluate au demonstrat un rezultat concordant ce a dus la o concordanță generală de 100% cu un CI cu o probabilitate de 95% mai scăzut, de 99,82%.

### C. Studiul preciziei între cicluri

Studiul preciziei între cicluri a fost efectuat în regim aleator și orb. Testarea preciziei între cicluri a sistemului Leica HER2 FISH System - 30 Test a fost evaluată într-un singur centru de investigație pe 900 de probe TMA caracterizate în prealabil pentru HER2 care au inclus cazuri de carcinom mamar fixat în formol și inclus în parafină. Utilizarea probelor TMA pentru determinarea preciziei între cicluri, de zi cu zi, a permis testarea unui volum mai mare de cazuri acoperind un interval mai larg al expresiei HER2 pentru a fi testat între cicluri, în zile diferite.

La numărarea lamelor colorate din studiului preciziei între cicluri, 894/900 de cazuri evaluate au demonstrat un rezultat concordant ceea ce a dus la o concordanță generală de 99,33% cu un CI cu o probabilitate de 95% mai scăzut, de 98,55%.

### D. Studiul preciziei între laboratoare

Studiul preciziei între laboratoare a fost efectuat în regim aleator și orb. Testarea preciziei între laboratoare a sistemului Leica HER2 FISH System - 30 Test a fost evaluată între trei centre de investigație pe 513 probe TMA caracterizate în prealabil pentru HER2 care au inclus cazuri de carcinom mamar fixat în formol și inclus în parafină. Utilizarea probelor TMA pentru determinarea preciziei între laboratoare a permis testarea unui volum mai mare de cazuri acoperind un interval mai larg al expresiei HER2 pentru a fi testat între cicluri pe mai multe aparate.

La numărarea lamelor colorate din studiului preciziei între laboratoare, 510/513 de cazuri evaluate au demonstrat un rezultat concordant ceea ce a dus la o concordanță generală de 99,42% cu un CI cu o probabilitate de 95% mai scăzut, de 98,30%.

### E. Studiul preciziei între observatori

Studiul preciziei între observatori a fost efectuat în regim aleator și orb. Testarea reproductibilității între observatori a sistemului Leica HER2 FISH System - 30 Test a fost evaluată între trei centre de investigație. A fost folosit un singur observator experimentat la fiecare centru de investigație. Au fost folosite optzeci de cazuri de secțiuni întregi de carcinom mamar pentru precizia între observatori, ce reflectă tipurile de probe utilizate în mediile clinice.

La numărarea lamelor colorate din studiului preciziei între observatori, 53/54 de cazuri evaluate au demonstrat un rezultat concordant ce a dus la o concordanță generală de 98,15% cu un CI cu o probabilitate de 95% mai scăzut, de 90,11%

## F. Studiul preciziei între loturi

Studiul preciziei între loturi a fost efectuat în regim aleator și orb. Precizia între loturi a fost determinată în trei loturi de fabricație independente ale sistemului Leica HER2 FISH System - 30 Test, produse în conformitate cu buna practică de fabricație (GMP). Fiecare lot a fost testat într-un singur centru de investigație pe 540 de probe TMA caracterizate în prealabil pentru HER2 care au inclus cazuri de carcinom mamar fixat în formol și inclus în parafină. Utilizarea probelor TMA pentru determinarea preciziei între loturi a permis testarea unui volum mai mare de cazuri acoperind un interval mai larg al expresiei HER2 pentru a fi testat între loturi.

La numărarea lamelor colorate din studiului preciziei între loturi, 534/540 de cazuri evaluate au demonstrat un rezultat concordant ceea ce a dus la o concordanță generală de 98,89% cu un CI cu o probabilitate de 95% mai scăzut, de 97,60%.

## Testarea preciziei – BOND-III System

### G. Studiul preciziei în cadrul unui ciclu

Studiul preciziei în cadrul unui ciclu a fost efectuat în regim aleator și orb. Testarea preciziei în cadrul unui ciclu a sistemului Leica HER2 FISH System - 30 Test a fost evaluată într-un singur centru de investigație pe 540 de probe TMA caracterizate în prealabil pentru HER2 care au inclus cazuri de carcinom de mamar fixat în formol și inclus în parafină. Utilizarea probelor TMA pentru determinarea preciziei în cadrul unui ciclu a permis testarea unui volum mai mare de cazuri acoperind un interval mai larg al expresiei HER2 în cadrul unui singur ciclu pe un singur aparat.

La numărarea lamelor colorate din studiului preciziei în cadrul unui ciclu, 540/540 de cazuri evaluate au demonstrat un rezultat concordant ce a dus la o concordanță generală de 100% cu un CI cu o probabilitate de 95% mai scăzut, de 99,45%.

### H. Studiul preciziei în cadrul unui aparat

Studiul preciziei în cadrul unui aparat a fost efectuat în regim aleator și orb. Testarea preciziei în cadrul unui aparat a sistemului Leica HER2 FISH System - 30 Test a fost evaluată într-un singur centru de investigație pe 1620 de probe TMA caracterizate în prealabil pentru HER2 care au inclus cazuri de carcinom mamar fixat în formol și inclus în parafină. Utilizarea probelor TMA pentru determinarea preciziei în cadrul unui aparat a permis testarea unui volum mai mare de cazuri acoperind un interval mai larg al expresiei HER2 în cadrul mai multor cicluri pe un singur aparat.

La numărarea lamelor colorate din studiului preciziei în cadrul unui ciclu, 1620/1620 de cazuri evaluate au demonstrat un rezultat concordant ceea ce a dus la o concordanță generală de 100% cu un CI cu o probabilitate de 95% mai scăzut, de 99,82%.

### I. Studiul preciziei între cicluri

Studiul preciziei între cicluri a fost efectuat în regim aleator și orb. Testarea preciziei între cicluri a sistemului Leica HER2 FISH System - 30 Test a fost evaluată într-un singur centru de investigație pe 900 de probe TMA caracterizate în prealabil pentru HER2 care au inclus cazuri de carcinom mamar fixat în formol și inclus în parafină. Utilizarea probelor TMA pentru determinarea preciziei între cicluri, de zi cu zi, a permis testarea unui volum mai mare de cazuri acoperind un interval mai larg al expresiei HER2 între cicluri în zile diferite.

La numărarea lamelor colorate din studiului preciziei între cicluri, 891/900 de cazuri evaluate au demonstrat un rezultat concordant ce a dus la o concordanță generală de 99,00% cu un CI cu o probabilitate de 95% mai scăzut, de 98,11%.

### J. Studiul preciziei între laboratoare

Studiul preciziei între laboratoare a fost efectuat în regim aleator și orb. Testarea preciziei între laboratoare a sistemului Leica HER2 FISH System - 30 Test a fost evaluată între trei centre de investigație pe 513 probe TMA caracterizate în prealabil pentru HER2 care au inclus cazuri de carcinom mamar fixat în formol și inclus în parafină. Utilizarea probelor TMA pentru determinarea preciziei între laboratoare a permis testarea unui volum mai mare de cazuri acoperind un interval mai larg al expresiei HER2 pentru a fi testat între cicluri pe mai multe aparate.

La numărarea lamelor colorate din studiul preciziei între laboratoare, 511/513 de cazuri evaluate au demonstrat un rezultat concordant ceea ce a dus la o concordanță generală de 99,61% cu un CI cu o probabilitate de 95% mai scăzut, de 98,60%.

## K. Studiul preciziei între observatori

Studiul preciziei între observatori a fost efectuat în regim aleator și orb. Testarea reproductibilității între observatori a sistemului Leica HER2 FISH System - 30 Test a fost evaluată între trei centre de investigație. A fost folosit un singur observator experimentat la fiecare centru de investigație. Au fost folosite optzeci de cazuri de secțiuni întregi de carcinom mamar pentru precizia între observatori, ce reflectă tipurile de probe utilizate în mediile clinice.

La numărarea lamelor colorate din studiului preciziei între observatori, 53/54 de cazuri evaluate au demonstrat un rezultat concordant ce a dus la o concordanță generală de 98,15% cu un CI cu o probabilitate de 95% mai scăzut, de 90,11%.

## L. F. Studiul preciziei între loturi

Studiul preciziei între loturi a fost efectuat în regim aleator și orb. Precizia între loturi a fost determinată în trei loturi de fabricație independente ale sistemului Leica HER2 FISH System - 30 Test, produse în conformitate cu buna practică de fabricație (GMP). Fiecare lot a fost testat într-un singur centru de investigație pe 540 de probe TMA caracterizate în prealabil pentru HER2 care au inclus cazuri de carcinom mamar fixat în formol și inclus în parafină. Utilizarea probelor TMA pentru determinarea preciziei între loturi a permis testarea unui volum mai mare de cazuri acoperind un interval mai larg al expresiei HER2 pentru a fi testat între loturi.

La numărarea lamelor colorate din studiului preciziei între loturi, 540/540 de cazuri evaluate au demonstrat un rezultat concordant ceea ce a dus la o concordanță generală de 100% cu un CI cu o probabilitate de 95% mai scăzut, de 99,45%.

## Robuștețea analizei

Studiile de robustețe au fost efectuate pe BOND-MAX sistem și BOND-III sistem pentru a determina intervalul de toleranță pentru durata și temperatura de recuperare prin încălzire; durata, temperatura și concentrația de recuperare a enzimei durata și temperatura de denaturare; durata și temperatura de hibridizare; și durata și temperatura spălării riguroase. Studiile de robustețe prin utilizarea protocolului implicit al sistemului BOND-MAX sau BOND-III System au fost efectuate în afara limitelor recomandate așa cum sunt acestea definite în documentul de orientare privind temperatura și umiditatea al FDA/ORA, ORA LAB5.3 Rev1.7.

- Nu s-au observat diferențe în starea de amplificare când temperatura implicită pentru fiecare etapă dependentă de temperatură a fost mărită cu 4 °C sau a fost scăzută cu 4 °C, comparativ cu valoarea implicită Leica HER2 FISH System - 30 Test protocol. Rapoartele de cea mai bună calitate au fost observate la temperaturile implicite și aceste temperaturi sunt cele recomandate.
- Nu s-au observat diferențe în starea de amplificare când durata de recuperare a epitopului prin încălzire (HIER) a fost de 20 de minute și respectiv 30 de minute la 97 °C cu soluția BOND ER1, comparativ cu protocolul implicit pentru sistemul Leica HER2 FISH System - 30 Test. Rapoartele de cea mai bună calitate au fost observate la durata de timp implicită de 25 de minute și acesta este durata de incubare recomandată.
- Nu s-au observat diferențe în starea de amplificare când durata de recuperare enzimatică a epitopului (EIER) a fost de 15 de minute și respectiv 35 de minute la 37 °C, comparativ cu protocolul implicit pentru sistemul Leica HER2 FISH System - 30 Test. Rapoartele de cea mai bună calitate au fost observate la durata de timp implicită de 25 de minute și aceasta este durata de incubare recomandată.
- Nu s-au observat diferențe în starea de amplificare când pentru concentrația enzimei din recuperarea enzimatică a epitopului (EIER) au fost utilizate rapoarte concentrat de enzimă/diluant enzimă de 1:200 și respectiv 1:500 comparativ cu protocolul implicit pentru sistemul Leica HER2 FISH System - 30 Test. Rapoartele de cea mai bună calitate au fost observate la concentrația implicită de 1:300 și această diluție este cea recomandată.
- Nu s-au observat diferențe în starea de amplificare când durata denaturării a fost de 5 minute și respectiv 15 minute, comparativ cu protocolul implicit pentru sistemul Leica HER2 FISH System - 30 Test. Rapoartele de cea mai bună calitate au fost observate la durata de timp implicită de 10 de minute și această durată de denaturare este cea recomandată.

- Nu s-au observat diferențe în starea de amplificare când durata hibridizării a fost de 9 ore și respectiv 15 ore, comparativ cu protocolul implicit pentru sistemul Leica HER2 FISH System - 30 Test. Rapoartele de cea mai bună calitate au fost observate la durata de timp implicită de 12 ore și această durată de hibridizare este cea recomandată.
- Nu s-au observat diferențe în starea de amplificare când durata de spălare post-hibridizare a fost de 2 minute, 5 minute și respectiv 7 minute, comparativ cu protocolul implicit pentru sistemul Leica HER2 FISH System - 30 Test. Rapoartele de cea mai bună calitate au fost observate la durata de timp implicită de 4 de minute și această durată de spălare post-hibridizare este cea recomandată.
- Nu s-au observat diferențe în starea de amplificare când analiza cu sistemul Leica HER2 FISH System - 30 Test a fost efectuată la 28 °C și o umiditate relativă de 30% și respectiv 16 °C și o umiditate relativă de 80%, comparativ cu protocolul implicit pentru Leica HER2 FISH System - 30 Test privind condițiile de mediu.

Operațiile efectuate în afara parametrilor recomandați și testați privind robustețea de analiză nu au fost validate. Utilizarea oricăror alți parametri de testare poate invalida analiza.

Testul de mai sus descrie condițiile testate și rezultatele din acest studiu. De reținut este că Leica nu a testat toate combinațiile posibile de condiții și nu recomandă utilizarea unor valori în afara celor implicite, pentru toate condițiile. Protocolul de colorare implicit Leica HER2 FISH este prezentat în Tabelul 2.

## Soluționarea problemelor

Problemă	Cauză probabilă	Acțiune de remediere
Fără sau semnal/colorație fluorescent(ă) slab(ă)	Fixarea sau procesarea necorespunzătoare a probelor de analizat	Verificați dacă se utilizează un fixativ pe bază de formol și că programările pentru procesare sunt adecvate pentru proba supusă analizei.
	Leica HER2 FISH System - 30 Test este utilizat în afara termenului său de valabilitate	Verificați dacă Leica HER2 FISH System - 30 Test este utilizat în interiorul termenului de valabilitate specificat.
	Selectarea incorectă a protocolului	Asigurați-vă că protocolul implicit corect este *FISH Protocol A în câmpul de protocol al colorării din caseta de dialog Add slide (Adăugare lamă).
	Dozarea neadecvată a reactivului stoc	Verificați dacă toți reactivii BOND au fost introduși în recipientele de mare capacitate corespunzătoare și au fost așezați în pozițiile corecte în aparat.
	Deparafinizare necorespunzătoare a lamelor	Verificați dacă este selectat modul *Dewax în câmpul Preparation (Preparare) al casetei de dialog Add slide (Adăugare lamă).
	Pretratare necorespunzătoare	Verificați dacă sunt selectate protocoalele implicate de pretratare (HER și Enzymatic Digestion (Digestie enzimatică)). Ajustați protocolul de pretratare (HER sau Enzymatic Digestion) dacă este necesar.
	Denaturare necorespunzătoare	Verificați dacă este selectat modul de denaturare implicit *D10.
	Hibridizare necorespunzătoare	Verificați dacă este selectat modul de hibridizare implicit *H12. Prolungiți durata hibridizării dacă este necesar.
	Spălare post-hibridizare în exces	Reduceți durata de incubare a etapei de spălare post hibridizare.
	Ciclul oprit înainte de a fi finalizat	Cu ajutorul programului BOND, confirmați prezența oricăror erori raportabile pe parcursul ciclului de colorare și abordați-le așa cum vă îndrumă programul BOND.
	Echipament necorespunzător de microscopie prin fluorescență <ul style="list-style-type: none"> <li>• Set de filtre necorespunzător</li> <li>• Lampă necorespunzătoare</li> <li>• Lampă învechită</li> <li>• Tip de ulei necorespunzător</li> </ul>	Verificați dacă toate echipamentele de microscopie de fluorescență utilizate sunt corespunzătoare pentru proba efectuată și anume: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Set corespunzător de filtre</li> <li>• Lampă corespunzătoare</li> <li>• Putere adecvată a lămpii</li> <li>• Ulei adecvat pentru utilizarea în microscopia cu imersie în ulei</li> </ul>
	Supraexpunere la lumina UV (fotoactivare)	Păstrați lamele la întuneric, înainte și după analiză, pentru a conserva semnalele fluorescente. Pentru a conserva semnalele pentru depozitare timp îndelungat, păstrați lamele la –20 °C.

Problemă	Cauză probabilă	A acțiune de remediere
Semnal/colorație fluorescență de fundal nespecifică	Spălare post hibridizare necorespunzătoare	Măriți durata de incubare a etapei de spălare posthibridizare.
	Dozarea neadekvată a reactivului stoc	Verificați dacă toți reactivii BOND au fost introduși în recipientele de mare capacitate corespunzătoare și așezați în pozițiile corecte în aparat.
	Deparafinizare necorespunzătoare a lamelor	Verificați dacă este selectat modul "Dewax în câmpul Preparation (Preparare) al casetei de dialog Add slide (Adăugare lamă).
	Reacție încrucișată nespecifică cu zone de necroză de țesut	Verificați dacă se utilizează un fixativ pe bază de formol și că programările pentru procesare sunt adecvate pentru proba supusă analizei. Dacă este posibil, retestați cazul folosind un alt bloc. Dacă acest lucru nu este posibil, evaluați comparativ cu o secțiune corespunzătoare colorată cu H&E și selectați zonele care prezintă profilurile de fixare cele mai bune.
	Secțiunile au aderat la lame folosind adevizi alternativi	Utilizați BOND Plus Slides – cod produs S21.2113 sau Apex BOND Slides cod produs 3800040).
Conservare slabă a morfologiei țesutului	Fixare și procesare necorespunzătoare a țesutului	Verificați dacă se utilizează un fixativ pe bază de formol și că programările pentru procesare sunt adecvate pentru proba supusă analizei. Dacă este posibil, retestați cazul folosind un alt bloc. Dacă acest lucru nu este posibil, evaluați comparativ cu o secțiune corespunzătoare colorată cu H&E și selectați zonele care prezintă profilurile de fixare cele mai bune.
	Pretratare necorespunzătoare	Ajustați protocolul de pretratare (HIER sau Enzymatic Digestion (Digestie enzimatică)).
Țesut desprins de pe lamele de control sau de pacient	Utilizarea unui tip necorespunzător de lame sau uscarea incorectă a secțiunii	Verificați dacă se utilizează lame corespunzătoare pentru secțiunile de pacient/control (de exemplu BOND Plus Slides – cod produs S21.2113 sau Apex BOND Slides cod produs 3800040) Verificați dacă lamele sunt scurse în mod corespunzător și sunt incubate timp de 1 oră la 60 °C.

Tabloul 7. Leica HER2 FISH System - 30 Test Ghid de soluționare a problemelor.

Dacă vreă problemă asociată cu sistemul Leica HER2 FISH System - 30 Test nu intră în sfera de aplicare a acestui ghid de soluționare a problemelor vă rugăm să contactați departamentul tehnic de service sau distribuitorul local al Leica Biosystems pentru asistență.

## Bibliografie

- 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.

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



## Contract de licență

Acest produs conține sonde FISH PathVysion furnizate de Abbott Molecular Inc.

PathVysion, LSI și CEP sunt mărci comerciale ale Abbott Molecular Inc. Toate drepturile rezervate. Utilizat sub licență.









## Modificări ale ediției anterioare

Componente furnizate, identificarea simbolului.

## Data publicării

28 septembrie 2020

## Identificare simboluri

	Cod lot		Conservare		Număr de catalog
	Dispozitiv medical pentru diagnostic <i>in vitro</i>		Producător	<b>SN</b>	Serie
	eIFU - consultați instrucțiunile de utilizare		Conținut suficient pentru <n> teste		A se utiliza până la data de AAAA-LL-ZZ
<b>Rx Only</b>	Numai pe bază de prescripție medicală				

Herceptin este o marcă comercială a Genentech, Inc. și F. Hoffmann-La Roche Ltd.