

HER2 IQFISH pharmDx
(Dako Omnis)

Nr kat. GM333

Wydanie 4

Test *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) jest bezpośrednim testem hybrydyzacji fluorescencyjnej in-situ (ang. fluorescence in situ hybridization, FISH) służącym do ilościowego oznaczania amplifikacji genu *HER2* w utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie próbkach tkanek nowotworu piersi oraz wycinkach od pacjentów z przerzutowym gruczolakorakiem żołądka lub połączenia żołądkowo-przełykowego.

Test *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) stanowi uzupełnienie testu HercepTest™ podczas oceny pacjentów, u których rozważa się zastosowanie leczenia produktem Herceptin™.

Fiolka zawiera odczynniki wystarczające do wykonania 20 testów.

Odczynniki dodatkowe wykorzystywane w testach *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis):

Nr kat.	Nazwa produktu
GM300	ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis)
GM301	ISH Pre-Treatment Solution (20x) (Dako Omnis)
GM302	ISH Pepsin (Dako Omnis)
GM303	ISH Stringent Wash Buffer (20x) (Dako Omnis)
GM304	Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis)

Spis treści

	Strona
Przeznaczenie	3
Zasada testu — tkanka piersi.....	4
Odczynniki — tkanka piersi.....	5
Środki ostrożności — tkanka piersi	6
Przechowywanie — tkanka piersi.....	7
Przygotowanie wycinka — tkanka piersi.....	8
SPOSÓB UŻYTKOWANIA — tkanka piersi.....	8
A. Przygotowanie odczynników — tkanka piersi.....	8
B. Procedura barwienia — tkanka piersi.....	10
Kontrola jakości — tkanka piersi	12
Interpretacja wyniku barwienia — tkanka piersi.....	13
Ograniczenia — tkanka piersi	14
Charakterystyka pracy — tkanka piersi	15
Rozwiązywanie problemów — tkanka piersi.....	23
Załącznik 1 — tkanka piersi	25
Załącznik 2 — tkanka piersi	27
Podsumowanie i wyjaśnienia — tkanka żołądka	28
Zasada testu — tkanka żołądka	28
Odczynniki — tkanka żołądka	29
Środki ostrożności — tkanka żołądka.....	30
Przechowywanie — tkanka żołądka	31
Przygotowanie wycinka — tkanka żołądka.....	32
SPOSÓB UŻYTKOWANIA — tkanka żołądka.....	32
A. Przygotowanie odczynników — tkanka żołądka.....	32
B. Procedura barwienia — tkanka żołądka.....	35
Kontrola jakości — tkanka żołądka.....	36
Interpretacja wyniku barwienia — tkanka żołądka	37
Ograniczenia — tkanka żołądka.....	39
Charakterystyka pracy — tkanka żołądka	39
Rozwiązywanie problemów — tkanka żołądka	47
Załącznik 3 — tkanka żołądka.....	49
Załącznik 4 — tkanka żołądka.....	50
Załącznik 5 — tkanka żołądka.....	51
Piśmiennictwo	52
Objaśnienia symboli	54

Przeznaczenie

Do badań diagnostycznych in vitro.

Odczynnik *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) jest sondą do hybrydyzacji wykorzystywaną w automatycznym bezpośrednim teście hybrydyzacji fluorescencyjnej in situ (FISH) w urządzeniach Dako Omnis i służy, wraz z odczynnikami dodatkowymi, do ilościowego oznaczania amplifikacji genu *HER2* w utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie próbkach tkanek nowotworu piersi oraz wycinkach od pacjentów z gruczolakorakiem żołądka, w tym połączenia żołądkowo-przełykowego.

Test *HER2* IQFISH pharmDx stanowi uzupełnienie testu HercepTest™ podczas oceny pacjentów, u których rozważa się zastosowanie leczenia produktem Herceptin™ (trastuzumabem) (patrz ulotka dla pacjenta produktu Herceptin™).

Wyniki testu *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) stanowią uzupełnienie informacji kliniczno-patologicznych, na podstawie których dokonuje się obecnie oceny rokowania u pacjentów z nowotworem piersi w II stadium zaawansowania z przerzutami do węzłów chłonnych.

Gruczolakorak żołądka lub połączenia żołądkowo-przełykowego jest w tym dokumencie nazywany nowotworem żołądka.

Szczegółowe informacje o zastosowaniu w przypadku nowotworu piersi znajdują się na stronach 4–27.

Szczegółowe informacje o stosowaniu w przypadku nowotworu żołądka znajdują się na stronach 28-51.

Ważne: Należy zwrócić uwagę na różnice pomiędzy tkanką nowotworu piersi i żołądka, zwłaszcza w rozdziałach „Interpretacji wyniku barwienia”

Podsumowanie i wyjaśnienia — tkanka piersi

Ludzki gen *HER2* (znany również jako *ERBB2* lub *NEU*) jest zlokalizowany na chromosomie 17 i koduje białko HER2 lub p185^{HER2}. Białko HER2 jest receptorem błonowym kinazy tyrozynowej wykazującym podobieństwo do receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR lub HER1) (1-2). Gen *HER2* występuje w dwóch kopiach we wszystkich prawidłowych komórkach diploidalnych.

U pewnego odsetka chorych na nowotwór piersi gen *HER2* ulega amplifikacji w procesie złośliwej transformacji i rozrostu guza (3-8). Amplifikacja genu *HER2* z reguły prowadzi do nadekspresji białka HER2 na powierzchni komórek nowotworu piersi (9).

W 20–25% przypadków nowotworów piersi wykazano amplifikację genu *HER2* i/lub nadekspresję kodowanego przez ten gen białka (10). Ta regulacja w górę wiąże się ze złym rokowaniem, zwiększonym ryzykiem nawrotu i krótszym przeżyciem. Wyniki kilku badań wskazują, iż poziom HER2 koreluje z wrażliwością lub opornością nowotworu na określone rodzaje chemioterapii (11).

Wykazanie wysokiego poziomu nadekspresji białka HER2 lub amplifikacji genu *HER2* ma zasadnicze znaczenie dla rozpoczęcia leczenia produktem Herceptin™, będącym monoklonalnym przeciwciałem przeciwko białku HER2. Wyniki badań klinicznych wykazują, iż pacjenci chorzy na nowotwór z wysokim poziomem nadekspresji białka HER2 i/lub amplifikacji genu *HER2* odnoszą najwięcej korzyści z leczenia produktem Herceptin™ (12).

Niniejszy produkt (*HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis)) to mieszanka sond IQISH wykorzystywanych w automatycznym bezpośrednim teście FISH służącym do wykrywania amplifikacji genu *HER2*. Produkt ten powinien być stosowany wraz z określonymi odczynnikami dodatkowymi w urządzeniu Dako Omnis i wywodzi się z ręcznie wykonywanego testu amplifikacji genu *HER2* — *HER2* IQFISH pharmDx, nr kat. K5731.

Zasada testu — tkanka piersi

Odczynnik *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) to mieszanka sond IQISH składająca się z mieszaniny znakowanych czerwienią tekstańską sond DNA, obejmujących region długości 218 kb zawierający gen *HER2* na chromosomie 17, oraz mieszaniny znakowanych fluoresceiną sond PNA (peptide nucleic acid) (13), skierowanych przeciwko regionowi centromeru chromosomu 17 (CEN-17). W wyniku swoistej hybrydyzacji z obszarami docelowymi uzyskuje się wyraźny czerwony sygnał fluorescencyjny dla każdego locus genu *HER2* oraz wyraźny zielony sygnał fluorescencyjny dla każdego centromeru chromosomu 17.

Ocena amplifikacji genu *HER2* za pomocą testu *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) jest w pełni zautomatyzowaną metodą wykonywaną w urządzeniu Dako Omnis. Oprogramowanie stacji roboczej Dako Link Omnis umożliwia wybór trzech różnych, poddanych walidacji protokołów barwienia *HER2* FISH. Protokoły te różnią się jedynie czasem trawienia pepsyną — można wybrać trawienie pepsyną przez 10 minut (krótki protokół), 15 minut (średni protokół) lub 20 minut (długi protokół). Szczegóły znajdują się poniżej. Do wstępnej analizy zalecany jest średni protokół.

Po barwieniu w urządzeniu Dako Omnis wycinki zamyka się na szkiełku przy użyciu odczynnika Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) zawierającego 4',6-diamidyno-2-fenylindol (DAPI), a następnie przykrywa szkiełkiem nakrywkowym. Przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego wyposażonego w odpowiednie filtry (patrz załącznik 2), ustala się położenie komórek nowotworowych oraz zlicza sygnały czerwone (*HER2*) i zielone (CEN-17). Następnie oblicza się wskaźnik *HER2*/CEN-17. Zdrowe komórki w analizowanym skrawku tkanki spełniają rolę wewnętrznej kontroli dodatniej barwienia.

Szczegółowe informacje przedstawiono w rozdziale "Interpretacja wyniku barwienia".

Aby uzyskać szczegółowe informacje na temat ładowania i rozładowywania preparatów, pokryw ISH Lid (Dako Omnis), odczynników, płynów i odpadów, należy zapoznać się z podręcznikami użytkownika Dako Omnis.

Odczynniki — tkanka piersi

Odczynnik *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) oraz odczynniki dodatkowe można zamawiać oddzielnie jako pojedyncze odczynniki.

Dostarczane materiały

HER2 IQFISH pharmDx (Dako Omnis): 1,6 mL, gotowa do użycia mieszanka znakowanych czerwienią teksańską sond DNA dla *HER2* oraz znakowanych fluoresceiną sond PNA dla CEN-17, dostarczana w buforze hybrydizacyjnym IQISH.

Odczynnik *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) jest dostarczany w suchym lodzie. **Obecność suchego lodu przy odbiorze stanowi gwarancję, iż odczynnik nie został narażony na działanie wysokich temperatur podczas transportu.** Fiolki z rozmrożonymi odczynnikami należy przez cały czas przechowywać i obsługiwać w pozycji pionowej.

Fiolki z odczynnikami zawierają metalową kulkę pokrytą złotem, która umożliwia mieszanie odczynnika za pomocą urządzenia do mieszania Dako Omnis Mixing Device (patrz Podręcznik użytkownika urządzenia do mieszania Dako Omnis). Odczynnik należy dokładnie wymieszać przed załadowaniem do urządzenia Dako Omnis.

Materiały wymagane, ale niedostarczane

Odczynniki dodatkowe

Następujące odczynniki muszą znajdować się w urządzeniu Dako Omnis w celu przeprowadzenia analizy amplifikacji genu *HER2* za pomocą testu *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis):

ISH Pre-Treatment Solution (20x) (Dako Omnis): 175 mL, 20-krotnie stężony; do rozcieńczenia w stosunku 1:20 w butelce 3,5 L Dako Omnis (nr kat. GC109). Produkt zawiera środek przeciwbakteryjny i ma przyjazny dla użytkownika, nietoksyczny zielony barwnik umożliwiający łatwą identyfikację.

ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis): 14 mL 96% etanolu (gotowego do użycia).

ISH Pepsin (Dako Omnis): 7 mL roztworu pepsyny A (gotowego do użycia) o pH 2,0; zawiera środek stabilizujący i przeciwbakteryjny. Pepsyna jest dostarczana w suchym lodzie. **Obecność suchego lodu przy odbiorze stanowi gwarancję, iż odczynnik nie został narażony na działanie wysokich temperatur podczas transportu.**

ISH Stringent Wash Buffer ISH (20x) (Dako Omnis): 175 mL 20-krotnie stężonej soli fizjologicznej buforowanej cytrynianem sodu; do rozcieńczenia w stosunku 1:20 w butelce 3,5 L Dako Omnis (nr kat. GC109). Produkt zawiera środek przeciwbakteryjny oraz detergent i ma przyjazny dla użytkownika, nietoksyczny żółty barwnik umożliwiający łatwą identyfikację.

Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis): 0,8 mL środka do zamykania preparatów na szkiełkach do badań fluorescencyjnych (gotowego do użycia) z DAPI.

Choć wymienione odczynniki nie są dostarczane razem z odczynnikiem *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis), omówiono je pokrótce poniżej. Aby uzyskać dalsze informacje, należy zapoznać się z instrukcją obsługi każdego urządzenia.

Dodatkowe odczynniki i urządzenia

Dako Omnis, nr kat. GI100

Wash Buffer (20x) (Dako Omnis), nr kat. GC807

Clearify™, nr kat. GC810

Dako Omnis Mixing Device, nr kat. GC116

ISH Lid, nr kat. GC102

ISH Cleaning Solution, nr kat. GC207

Szkiełka nakrywkowe do zamykania preparatów (24 mm x 50 mm)

Aby uzyskać informacje na temat stosowania dodatkowych odczynników i urządzeń, należy zapoznać się z podstawowym oraz zaawansowanym podręcznikiem użytkownika urządzenia Dako Omnis.

Mikroskop i akcesoria

Filtry do mikroskopu fluorescencyjnego: podwójny filtr dla DAPI i FITC/czerwieni teksańskiej lub pojedyncze filtry dla FITC i czerwieni teksańskiej — szczegółowe informacje w załączniku 2. Stosowanie filtra dla DAPI przy dużym powiększeniu negatywnie wpływa na intensywność sygnału. Należy unikać długich czasów ekspozycji.

Należy stosować mikroskop fluorescencyjny ze źródłem światła w postaci lampy rtęciowej 100 W. Do stosowania z wymienionymi filtrami nie są zalecane inne źródła światła.

Pojemnik na preparaty mikroskopowe (tekturowa podstawka na 20 preparatów z odchylaną pokrywą lub podobny).

Środki ostrożności — tkanka piersi

1. Do badań diagnostycznych in vitro.
2. Do stosowania przez wyszkolony personel.
3. Odczynnik *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) zawiera od ≥ 10 - $< 25\%$ węgla etylenu i ≥ 3 - $< 5\%$ sodium chloride. *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) jest oznaczony:



Uwaga

H319

Działa drażniąco na oczy.

P280

Nosić okulary ochronne lub ochronę twarzy.

P264

Dokładnie umyć ręce po użyciu.

P305 + P351 + P338

W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.

Zasadniczo zakazuje się pracy z produktem osobom poniżej 18. roku życia.

Użytkownicy muszą być szczegółowo przeszkoleni w zakresie prawidłowej procedury postępowania, niebezpiecznych właściwości produktu i niezbędnych środków ostrożności. Dodatkowe informacje zawiera Karta Charakterystyki Substancji.

4. Próbki tkanek przed i po utrwaleniu oraz wszystkie materiały mające z nimi kontakt należy traktować jako potencjalnie zakaźne i usuwać przy zachowaniu odpowiednich środków ostrożności (14). Nigdy nie należy pipetować odczynników postępując się ustami. Unikać kontaktu odczynników i wycinków ze skórą i błonami śluzowymi. W razie kontaktu odczynników z wrażliwymi okolicami skóry należy je spłukać obfitą ilością wody.
5. Do minimum ograniczyć skażenie odczynników bakteriami, aby uniknąć możliwości uzyskiwania błędnych wyników.
6. Użycie innych niż opisane metod utrwalania tkanki oraz skrawków o innej grubości może spowodować zmianę morfologii tkanki i/lub natężenia sygnału.

7. Odczynniki zostały odpowiednio rozcieńczone. Dalsze rozcieńczanie może wpłynąć negatywnie na ich działanie.
8. W celu uniknięcia kontaktu z oczami i skórą należy nosić odpowiednie osobiste wyposażenie ochronne. Dodatkowe informacje zawiera Karta Charakterystyki Substancji.
9. Niewykorzystany roztwór usuwać zgodnie z rozporządzeniami lokalnymi, wojewódzkimi i krajowymi.

Przechowywanie — tkanka piersi

Odczynnik *HER2 IQFISH pharmDx* (Dako Omnis) należy przechowywać w temperaturze < -18°C (zalecana jest temperatura od -18°C do -25°C) w ciemności. Fiolki z rozmrożonymi odczynnikami przez cały czas muszą się znajdować w pozycji pionowej. Zamrażanie i rozmrażanie odczynników do 10 razy nie wpływa na jakość ich działania. Nie należy pozostawiać tego odczynnika w temperaturze pokojowej.

Jakość działania odczynnika *HER2 IQFISH pharmDx* (Dako Omnis) i odczynników dodatkowych ISH pepsin (Dako Omnis) oraz Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) może ulec pogorszeniu pod wpływem ciepła. Odczynników tych nie należy pozostawiać w temperaturze pokojowej.

Jakość działania odczynnika *HER2 IQFISH pharmDx* (Dako Omnis) i odczynnika dodatkowego Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) może ulec pogorszeniu pod wpływem nadmiernej ekspozycji na światło. Nie należy przechowywać ani prowadzić oznaczeń za pomocą tych odczynników w miejscach silnie naświetlonych, np. w bezpośrednim świetle słonecznym.

Odczynniki dodatkowe ISH Pre-Treatment Solution (20x) (Dako Omnis), ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis), ISH Stringent Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) oraz Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) należy przechowywać w ciemności w temperaturze 2–8°C. Odczynnik ISH Pepsin (Dako Omnis) należy przechowywać w temperaturze od -18 do 8°C. Wszystkie przechowywane fiolki z odczynnikami powinny mieć zamknięty korek, w tym górną klapę korka.

Rozcieńczone roztwory (roztwory robocze ISH Stringent Wash Buffer i ISH Pre-Treatment Solution) można przechowywać w temperaturze od 2 do 8°C przez 30 dni.

Nie używać żadnych odczynników po upływie daty ważności podanej na opakowaniu. Podczas przechowywania odczynników korki, w tym górna klapa korka, powinny być zamknięte. Jeżeli odczynniki są przechowywane w warunkach innych niż podane w ulotce dołączonej do opakowania, użytkownik powinien zweryfikować ich działanie (15).

Nie ma jednoznacznych oznak świadczących o niestabilności tego produktu. Dlatego też bardzo ważna jest ocena zdrowych komórek w analizowanej próbce tkanki. W przypadku uzyskania nieoczekiwanego wyniku odczynu, którego nie można wyjaśnić, i gdy podejrzewa się problem z odczynnikiem *HER2 IQFISH pharmDx* (Dako Omnis) lub odczynnikami dodatkowymi, należy skontaktować się z działem wsparcia technicznego firmy Dako.

Stabilność w urządzeniu Dako Omnis

Stabilność w urządzeniu odczynnika *HER2 IQFISH pharmDx* (Dako Omnis) oraz odczynników dodatkowych ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis) i ISH Pepsin (Dako Omnis) wynosi 80 godzin. Stabilność w urządzeniu rozcieńczonego roztworu ISH Pre-Treatment Solution (Dako Omnis) i buforu ISH Stringent Wash Buffer (Dako Omnis) wynosi 7 dni. Pozostały okres stabilności w urządzeniu jest kontrolowany przez oprogramowanie Dako Omnis. W przypadku stosowania odczynników z przekroczonym terminem ważności w urządzeniu Dako Omnis pojawi się ostrzeżenie, wszystkie preparaty wybarwione przeterminowanym odczynnikiem zmieniają status na „podejrzany”, a dziennik preparatów na stacji roboczej wskaże użycie przeterminowanego odczynnika.

Przygotowanie wycinka — tkanka piersi

Z materiałami z biopsji, wycięć i resekcji należy postępować w sposób umożliwiający zachowanie tkanki do analizy FISH. W przypadku wszystkich wycinków należy zastosować standardowe metody obróbki tkanek do barwienia immunocytochemicznego (16).

Skrawki zatopione w parafinie

Do użycia z zestawem nadaje się tylko tkanka zakonserwowana w obojętnej buforowanej formalinie i zatopiona w parafinie. Wycinki należy np. przygotować w formie bloczków o grubości 3 mm lub 4 mm i utrwać przez 18–24 godziny w obojętnej buforowanej formalinie. Następnie tkanki poddaje się odwodnieniu, stosując serię kąpiei alkoholowych i ksylenowych o stopniowo zmieniających się stężeniach, po czym przepaja płynną parafiną w temperaturze nieprzekraczającej 60°C. Prawidłowo utrwalone i zatopione tkanki przed podzieleniem na skrawki i zamknięciem na szkiełku można przechowywać przez nieograniczony czas, o ile przechowuje się je w chłodnym miejscu (15–25°C)(16-17). Nie dopuszcza się stosowania innych środków utrwalających.

Próbki tkanek należy pociąć na skrawki grubości 4–6 µm.

Równocześnie należy przygotować preparaty niezbędne do oceny amplifikacji genu *HER2* i zweryfikowania obecności guza. Zaleca się użycie minimum dwóch kolejnych skrawków: jednego skrawka do zbadania obecności guza barwionego hematoksyliną i eozyną (barwienie HE) i jednego skrawka do oceny amplifikacji genu *HER2*. Zaleca się zamykanie skrawków na szkiełkach Dako FLEX IHC Microscope Slides, nr kat. K8020. Odpowiednie są także szkiełka Superfrost Plus (Thermo Fischer Scientific, J1800AMNZ). Należy upewnić się, że termin ważności szkiełek podstawowych nie upłynął. Preparaty przechowywane w temperaturze 2–25°C należy zbadać w ciągu < 6 miesięcy od podzielenia na skrawki.

UWAGA: Próbki tkanek należy umieścić na szkiełku w obrębie zdefiniowanego obszaru barwienia. Wymiary obszaru barwienia preparatu podano w Podstawowym podręczniku użytkownika urządzenia Dako Omnis.

SPOSÓB UŻYTKOWANIA — tkanka piersi

A. Przygotowanie odczynników — tkanka piersi

A.1 *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis)

Fiolka odczynnika *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) zawiera metalową kulkę pokrytą złotem przeznaczoną do mieszania. Przed załadowaniem fiolki do urządzenia Dako Omnis odczynnik należy rozmrozić i dokładnie wymieszać, ponieważ podczas zamrażania ulega rozdziałowi na fazy.

Sondy należy mieszać za pomocą urządzenia Dako Omnis Mixing Device.

Należy postępować zgodnie z poniższą procedurą mieszania sond za pomocą urządzenia Dako Omnis Mixing Device. Szczegółowe informacje znajdują się w Podręczniku użytkownika urządzenia do mieszania Dako Omnis.

1. Wyjąć fiolkę odczynnika *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) z zamrażarki.
2. Załadować fiolkę do urządzenia Dako Omnis Mixing Device.
3. Podłączyć urządzenie Mixing Device i upewnić się, że zielona lampka stanu jest włączona. Wybrać program „Rozmrażanie i mieszanie”. **Ważne:** Fiolki przechowywane w temperaturze **poniżej** -25°C należy rozmrozić (krótko) przed ich umieszczeniem w urządzeniu Dako Omnis Mixing Device i użyć programu „Mieszanie”.
4. Wyjąć fiolkę z urządzenia Mixing Device.

5. Otworzyć górną klapę korka, odgiąć ją do tyłu, a następnie wsunąć w przeznaczone dla niej miejsce aż do usłyszenia kliknięcia (szczegóły znajdują się w Podstawowym podręczniku użytkownika Dako Omnis).
6. Niezwłocznie załadować fiolkę do modułu Reagent Storage Module urządzenia Dako Omnis. Jeśli podczas barwienia używana jest funkcja ciągłego ładowania odczynników, należy upewnić się, że czas upływający od mieszania do pobrania z fiolki w urządzeniu Dako Omnis wynosi co najmniej 10 minut.

Sondę *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) można ponownie zamrażać i używać maksymalnie 10 razy.

Mieszanekę sond *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) należy mieszać krótko przed jej załadowaniem do urządzenia. Nie należy wstrząsać fiolki. Całkowity okres stabilności sondy *HER2* IQFISH pharmDx ISH (Dako Omnis) wynosi **80 godzin**, jeśli jest ona przechowywana w module Reagent Storage Module urządzenia Dako Omnis. Pozostały okres stabilności w urządzeniu jest kontrolowany przez oprogramowanie Dako Omnis (patrz wyżej). Po upływie czasu, przez jaki sonda *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) musi znajdować się w urządzeniu, należy ją niezwłocznie umieścić w temperaturze $< -18^{\circ}\text{C}$ (zalecana jest temperatura od -18°C do -25°C).

A.2 ISH Pre-Treatment Solution (20x) (Dako Omnis)

Przygotować roztwór roboczy poprzez rozcieńczenie koncentratu roztworu ISH Pre-Treatment Solution (20x) (Dako Omnis) w stosunku 1:20 w następujący sposób:

1. Napełnić butelkę na płyny 3,5 L Dako Omnis oznaczoną jako PTB (niebieska etykieta) do linii napełnienia wodą dejonizowaną (3,325 L). Przed napełnieniem umieścić butelkę na płynie na płaskiej powierzchni.
2. Przełączyć zawartość jednej butelki ze 175 mL koncentratu roztworu ISH Pre-Treatment Solution (20x) (Dako Omnis) do butelki na płynie.
3. Przenieść odczepianą etykietę z butelki po koncentracie na butelkę na płynie. Dokręcić nakrętkę i delikatnie odwrócić butelkę na płynie do góry dnem 2–3 razy.
4. Użyć ręcznego skanera kodów paskowych do identyfikacji odczynnika (zeskanować odczepianą etykietę i butelkę na płynie).
5. Natychmiast załadować butelkę na płynie do urządzenia Dako Omnis.

Jeśli rozcieńczony roztwór jest przechowywany w urządzeniu Dako Omnis, należy go zużyć w ciągu 7 dni. Pozostały okres stabilności w urządzeniu jest kontrolowany przez oprogramowanie Dako Omnis (patrz wyżej). Niewykorzystany rozcieńczony roztwór można przechowywać w temperaturze $2-8^{\circ}\text{C}$ przez 30 dni. Po przechowywaniu w chłodnym miejscu należy upewnić się, że przed załadowaniem do urządzenia Dako Omnis rozcieńczony roztwór jest ogrzany do co najmniej 18°C .

UWAGA: W przypadku zmętnienia rozcieńczony roztwór nie nadaje się do użycia.

A.3 ISH Stringent Wash Buffer (20x) (Dako Omnis)

Przygotować roztwór roboczy poprzez rozcieńczenie koncentratu buforu ISH Stringent Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) w stosunku 1:20 w następujący sposób:

1. Napełnić butelkę na płyny 3,5 L Dako Omnis oznaczoną jako PTB (niebieska etykieta) do linii napełnienia wodą dejonizowaną (3,325 L). Przed napełnieniem umieścić butelkę na płynie na płaskiej powierzchni.
2. Przełączyć zawartość butelki ze 175 mL koncentratu buforu ISH Stringent Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) do butelki na płynie.
3. Przenieść odczepianą etykietę z butelki po koncentracie na butelkę na płynie. Dokręcić nakrętkę i delikatnie odwrócić butelkę na płynie do góry dnem 2–3 razy.

4. Użyć ręcznego skanera kodów paskowych Dako Omnis do identyfikacji odczynnika (zeskanować odczepianą etykietę i butelkę).
5. Natychmiast załadować butelkę do urządzenia Dako Omnis.

Jeśli rozcieńczony roztwór jest przechowywany w urządzeniu Dako Omnis, należy go zużyć w ciągu 7 dni. Pozostały okres stabilności w urządzeniu jest kontrolowany przez oprogramowanie Dako Omnis (patrz wyżej). Niewykorzystany rozcieńczony roztwór można przechowywać w temperaturze 2–8°C przez maksymalnie 30 dni. Po przechowywaniu w chłodnym miejscu należy upewnić się, że przed załadowaniem do urządzenia Dako Omnis rozcieńczony roztwór jest ogrzany do co najmniej 18°C.

UWAGA: W przypadku zmętnienia rozcieńczony roztwór nie nadaje się do użycia.

A.4 ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis)

Roztwór ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis) jest odczynnikiem gotowym do użycia. Przed jego załadowaniem do urządzenia Dako Omnis należy otworzyć górną klapę korka, odgiąć ją do tyłu a następnie wsunąć w przeznaczone dla niej miejsce aż do usłyszenia kliknięcia.

Całkowity okres stabilności roztworu ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis) wynosi **80 godzin**, jeśli jest on przechowywany w module Reagent Storage Module urządzenia Dako Omnis. Pozostały okres stabilności w urządzeniu jest kontrolowany przez oprogramowanie Dako Omnis (patrz wyżej). Po wykonaniu analizy roztwór ISH Ethanol Solution, 96% można umieścić w temperaturze przechowywania (2–8°C), aby zachować czas stabilności w urządzeniu.

A.5 ISH Pepsin (Dako Omnis)

Odczynnik ISH Pepsin (Dako Omnis) jest odczynnikiem gotowym do użycia. Przed jego załadowaniem do urządzenia Dako Omnis należy upewnić się, że odczynnik jest rozmrożony, otworzyć górną klapę korka, odgiąć ją do tyłu, a następnie wsunąć w przeznaczone dla niej miejsce aż do usłyszenia kliknięcia.

Całkowity okres stabilności odczynnika ISH Pepsin (Dako Omnis) wynosi **80 godzin**, jeśli jest on przechowywany w module Reagent Storage Module urządzenia Dako Omnis. Pozostały okres stabilności w urządzeniu jest kontrolowany przez oprogramowanie Dako Omnis (patrz wyżej). Po wykonaniu analizy odczynnik ISH Pepsin (Dako Omnis) należy umieścić w temperaturze przechowywania od -18 do 8°C, aby zachować czas stabilności w urządzeniu.

A.6 Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis)

Odczynnik Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) jest gotowym do użycia środkiem do zamykania preparatów stosowanym poza urządzeniem Dako Omnis. Po użyciu odczynnik Fluorescence Mounting Medium należy niezwłocznie umieścić w temperaturze przechowywania (2–8°C).

A.7 Dodatkowe akcesoria

Dodatkowo do urządzenia Dako Omnis należy załadować następujące akcesoria: wodę dejonizowaną; rozcieńczony bufor Wash Buffer 20x (Dako Omnis), nr kat. GC807; odczynnik Clearify™, nr kat. GC810, ISH Cleaning Solution, nr kat. GC207 oraz pokrywę ISH Lid (Dako Omnis), nr kat. GC102, opisane w podręcznikach użytkownika Dako Omnis.

B. Procedura barwienia — tkanka piersi

B.1. Uwagi proceduralne

Odczynnik *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) jest sondą do hybrydyzacji wykorzystywaną w automatycznym teście bezpośredniej hybrydyzacji fluorescencyjnej in situ (FISH) w urządzeniu Dako Omnis i wraz z odczynnikami dodatkowymi GM300, GM301, GM302, GM303 i GM304 (GM304 poza urządzeniem) jest przeznaczona do ilościowego oznaczania amplifikacji genu *HER2*. Przed jej użyciem użytkownik powinien przeczytać dokładnie wszystkie instrukcje i zapoznać się ze wszystkimi elementami oraz odnoszącymi się do nich środkami ostrożności.

Automatyczna procedura barwienia FISH w urządzeniu Dako Omnis obejmuje odparafinowanie skrawków tkankowych, odmaskowanie antygenu, trawienie pepsyną, hybrydyzację oraz głębokie

płukanie. Preparaty są wyładowywane z suchej stacji Unloading Station. Wszystkie etapy protokołu zostały wstępnie zaprogramowane w oprogramowaniu Dako Omnis.

Należy zapoznać się z podręcznikami użytkownika Dako Omnis w celu uzyskania informacji na temat ładowania preparatów, pokrywy ISH Lid, odczynników itd. W oprogramowaniu Dako Omnis wstępnie zaprogramowano trzy poddane walidacji protokoły *HER2 IQFISH*: *HER2 IQFISH Pepsin Short*, *HER2 IQFISH Pepsin Medium* i *HER2 IQFISH Pepsin Long*, które różnią się wyłącznie czasem trawienia pepsyną i które można wybrać dla każdego z pięciu preparatów w statywie na preparaty. Umożliwia to optymalizację trawienia tkanki, które może zależeć od warunków sprzed analizy. Za protokół standardowy uznaje się protokół *HER2 IQFISH Pepsin Medium*. Poszczególne protokoły barwienia można przeglądać w stacji roboczej Dako Link Omnis.

Dodatkowo użytkownik może wybrać szablon protokołu IQFISH. Optymalne warunki mogą się zmieniać w zależności od rodzaju materiału oraz sposobu jego przygotowania i powinny być określone w każdym laboratorium.

B.2. Procedura przed barwieniem

1. W części z protokołami IQFISH oprogramowania stacji roboczej Dako Link Omnis wybrać protokół *HER2 IQFISH*, który ma zostać zastosowany do każdego preparatu.
2. Wydrukować etykiety preparatów i przykleić je do szkiełek podstawowych.
3. Umieścić preparaty w statywie na preparaty. W celu uzyskania szczegółowych informacji zapoznać się z Podstawowym podręcznikiem użytkownika Dako Omnis. W statywie na preparaty może znajdować się od jednego do pięciu preparatów. Zaleca się, aby podczas barwienia odczynnikiem *HER2 IQFISH* wybarwić co najmniej dwa preparaty.
4. Załadować statyw na preparaty do urządzenia Dako Omnis.
5. Załadować pokrywę ISH Lid (jedna pokrywa ISH Lid na każdy statyw na preparaty) do urządzenia Dako Omnis.
6. Upewnić się, że w urządzeniu Dako Omnis znajdują się butelki i są w nim zarejestrowane. Butelki z płynami: Clearify™ (środek oczyszczający), rozcieńczony roztwór ISH Pre-Treatment Solution (Dako Omnis), rozcieńczony bufor ISH Stringent Wash Buffer (Dako Omnis) oraz rozcieńczony bufor Wash Buffer (Dako Omnis).
7. Załadować odczynniki ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis), ISH Pepsin (Dako Omnis) świeżo wymieszany odczynnik *HER2 IQFISH pharmDx* (Dako Omnis) oraz ISH Cleaning Solution do modułu Reagent Storage Module. Upewnić się, że górne kłapy korków wszystkich fiolek są otwarte.
8. Postępować zgodnie z instrukcjami wyświetlanymi na ekranie dotykowym i dotknąć opcji „Gotowe”, aby rozpocząć procedurę barwienia.

B.3. Procedura barwienia

Procedurę barwienia odczynnikami *HER2* IQFISH w urządzeniu Dako Omnis (podsumowaną w Tabeli 1) można monitorować w stacji roboczej Dako Link Omnis:

Tabela 1. Uproszczony przegląd etapów protokołu barwienia odczynnikami *HER2* IQFISH.

Etap	Odczynnik	Czas i temperatura
Odfarbowanie	Clearify™ (środek oczyszczający)	10 minut, 38°C
Odmaskowanie antygenu	ISH Pre-Treatment Solution (Dako Omnis)	15 minut, 97°C
Płukanie	ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis)	2 × 3 minuty, 32°C
Trawienie*	ISH Pepsin (Dako Omnis)	10 minut, 15 minut lub 20 minut
Suszenie		15 minut, 45°C
Denaturacja		10 minut, 66°C
Hybrydyzacja	<i>HER2</i> IQFISH pharmDx (Dako Omnis)	75 minut, 45°C
Głębokie płukanie	ISH Stringent Wash Buffer (Dako Omnis)	10 minut, 61°C

* W protokołach *HER2* IQFISH wymienionych powyżej można wybrać trzy poddane walidacji czasy trawienia pepsyną.

Jeśli nie są planowane kolejne barwienia ISH, wszystkie odczynniki należy umieścić w zalecanych temperaturach przechowywania.

B.4. Procedura po barwieniu

Wyładować preparaty i zastosować do 30 µL środka Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) zawierającego DAPI na obszar docelowy preparatu. Preparat tkankowy musi zostać całkowicie pokryty produktem Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis). Nałożyć szkiełko nakrywkowe.

UWAGA: Odczyt odczynu można przeprowadzić po 15 minutach od momentu zatopienia lub przed upływem 7 dni. Jednakże w przypadku kontaktu preparatów ze światłem lub wysokimi temperaturami może dochodzić do utraty zabarwienia. Aby zminimalizować płowienie barwy, preparaty należy przechowywać w ciemnym miejscu w temperaturze od -18 do 8°C.

Kontrola jakości — tkanka piersi

- Sygnaly muszą być jasne, wyraźne i łatwe do oceny.
- Komórki prawidłowe pozwalają na wewnętrzną kontrolę serii barwień.
 - Komórki zdrowe powinny dawać 1–2 wyraźnie widocznych sygnałów zielonych, sygnalizując prawidłową hybrydyzację sondy CEN-17 PNA z centromerowym regionem chromosomu 17.
 - Komórki zdrowe powinny również dawać 1–2 wyraźnie widocznych sygnałów czerwonych, sygnalizując prawidłową hybrydyzację sondy *HER2* DNA z genami *HER2*.
 - Ze względu na skrawanie tkanek niektóre zdrowe komórki będą dawać mniej niż oczekiwane dwa sygnały każdego koloru.
 - Brak sygnałów w komórkach zdrowych wskazuje na niepowodzenie testu, a uzyskane wyniki należy unieważnić.

3. Ocena morfologii jąder dokonywana przy użyciu filtra DAPI nie powinna wykazywać jakichkolwiek nieprawidłowości. Duża liczba komórek pustych i ogólnie zaburzona morfologia jąder wskazuje na nadmierne wytrawienie preparatu, prowadzące do utraty lub rozproszenia sygnałów. Wyników z takich preparatów nie należy brać pod uwagę .
4. Dostępnych musi być co najmniej 20 komórek guza.
5. Różnice w metodach utrwalania, przetwarzania i zatapiania tkanek stosowanych w laboratorium użytkownika mogą powodować istotne różnice wyników, wymagające regularnego dokonywania oceny kontroli wewnętrznych.

Interpretacja wyniku barwienia — tkanka piersi

Tkanka nadająca się do oceny

Badaniom należy poddawać jedynie próbki pobrane od pacjentów z rakiem inwazyjnym. Jeśli w próbce występują jednocześnie komórki raka in situ oraz inwazyjnego, należy oceniać wyłącznie składnik inwazyjny. Unikać obszarów martwicy i obszarów z niewyraźnie zaznaczonymi granicami jąder. Nie uwzględniać jąder wymagających oceny subiektywnej. Pomijać jądra z sygnałami o słabym natężeniu i z nieswoistym lub silnym odczynem tła.

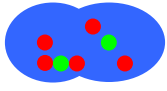

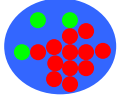
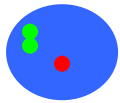
Zliczanie sygnału

Zlokalizować komórki nowotworowe w obrębie wybarwionego techniką HE preparatu i ocenić ten sam obszar preparatu barwionego metodą FISH. Obejrzeć kilka obszarów komórek guza, aby uwzględnić możliwą heterogeniczność. Wybrać obszar z równomiernym rozkładem jąder. Rozpocząć analizę w górnej lewej ćwiartce wybranego obszaru i przesuwając się od lewej do prawej, zliczać liczbę sygnałów w obrębie granic każdego analizowanego jądra według poniższych wskazówek (patrz również załącznik 2).

- Zmieniać ostrość, aby móc zauważyć wszystkie sygnały w poszczególnych jądrach
- Dwa sygnały o tej samej wielkości w odległości równej lub mniejszej od średnicy sygnału zliczać jako jeden
- W jądrach o wysokim poziomie amplifikacji genu *HER2* sygnały dla *HER2* mogą znajdować się bardzo blisko siebie, tworząc skupisko sygnałów. W takich przypadkach nie ma możliwości zliczenia sygnałów *HER2* i należy przeprowadzić oszacowanie. Szczególną uwagę należy zwrócić na sygnały zielone, ponieważ skupiska sygnałów *HER2* mogą pokrywać sygnały zielone, uniemożliwiając ich dostrzeżenie. W razie wątpliwości należy skontrolować sygnały zielone przy użyciu odpowiedniego filtra FITC.

Nie oceniać jąder bez zabarwienia lub z sygnałem o tylko jednej barwie. W ocenie uwzględniać tylko te jądra, które dają jeden lub więcej sygnałów FISH każdego koloru.

Wskazówki do zliczania sygnałów

1		Nie zliczać. Jądra komórkowe nakładają się na siebie, nie wszystkie obszary jąder są widoczne
2		Dwa sygnały zielone; nie uwzględniać jąder dających sygnały tylko jednej barwy
3		Zliczyć jako 3 sygnały zielone i 12 sygnałów czerwonych (oszacowanie skupiska)
4		Zliczyć jako 1 sygnał zielony i 1 sygnał czerwony. Dwa sygnały tej samej wielkości w odległości równej lub mniejszej od średnicy pojedynczego sygnału zlicza się jako jeden sygnał

5		<p>Nie zliczać (jądro wytrawione nadmiernie lub niedotrawione).</p> <p>Brak sygnałów w centrum jądra (jądra pierścieniowate).</p>
6		<p>Zliczyć jako 2 sygnały zielone i 3 sygnały czerwone. Dwa sygnały tej samej wielkości w odległości równej lub mniejszej od średnicy pojedynczego sygnału zlicza się jako jeden sygnał</p>
7		<p>Zliczyć jako 1 sygnał zielony i 5 sygnałów czerwonych</p>
8		<p>Zliczyć jako 3 sygnały zielone (1 zielony sygnał nieostry) i 3 sygnały czerwone</p>
9		<p>Skupisko sygnałów czerwonych, zakrywających sygnały zielone. Sprawdzić liczbę sygnałów zielonych przy użyciu odpowiedniego filtra FITC lub wcale nie zliczać</p>

W tabeli zapisać wyniki w sposób przedstawiony w załączniku 1.

Zliczyć sygnały 20 jąder na próbkę tkanki, o ile to możliwe — w różnych obszarach guza (18).

Obliczyć wskaźnik *HER2/CEN-17*, dzieląc całkowitą liczbę czerwonych sygnałów *HER2* przez całkowitą liczbę zielonych sygnałów *CEN-17*.

Wycinki o wskaźniku *HER2/CEN-17* większym lub równym 2 należy traktować jako wykazujące amplifikację genu *HER2* (3, 18-20).

Wyniki o wartości granicznej lub do niej zbliżonej (1,8–2,2) należy interpretować z dużą ostrożnością.

Jeśli współczynnik ma wartość graniczną (1,8–2,2), należy zliczyć sygnały kolejnych 20 jąder i przeliczyć współczynnik dla 40 jąder komórkowych.

W przypadku wątpliwości preparat należy poddać ponownej ocenie. W przypadkach granicznych niezbędne jest przeprowadzenie konsultacji patologa i lekarza prowadzącego leczenie pacjenta.

Ograniczenia — tkanka piersi

1. Do użytku zautomatyzowanego wyłącznie w urządzeniach Dako Omnis.
2. Dobór tkanek, utrwalanie, przygotowywanie preparatów oraz interpretacja wyników barwienia IQFISH wymagają specjalistycznego przeszkolenia. Interpretacja wyników barwienia odczytnikiem *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) nie powinna być przeprowadzana przez osoby z zaburzeniami widzenia barw.
3. W metodzie FISH wyniki zależą od przygotowania i obróbki tkanki przed barwieniem. Niewłaściwe utrwalanie, płukanie, suszenie, ogrzewanie, krojenie preparatów lub zanieczyszczenie innymi tkankami bądź płynami, może wpływać na hybrydyzację sondy. Przyczyną sprzecznych wyników może być stosowanie zmiennych metod utrwalania i zatapiania lub naturalne zmienne czynniki związane z tkankami.
4. Nie weryfikowano testu *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) pod kątem oceny próbek guzów piersi z mikrozwapnieniami.
5. Do odpowiedzialności użytkownika należy zatwierdzenie szablonu protokołu IQFISH.

Charakterystyka pracy — tkanka piersi

Wydajność hybrydyzacji

Wydajność hybrydyzacji odczynnika *HER2* IQFISH pharmDx badano w trzech ośrodkach z użyciem 180 skrawków tkankowych utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie. We wszystkich 180 skrawkach tkankowych można było zastosować zliczanie zgodne z wytycznymi. Wydajność hybrydyzacji wyniosła 100%.

Wskaźniki *HER2/CEN-17* obliczone i użyte w badaniach charakterystyki wydajności są oparte na zliczaniu sygnałów 20 jąder komórkowych według wytycznych zliczania podanych w rozdziale „Interpretacja wyniku barwienia” niniejszej instrukcji obsługi.

Czułość analityczna

Czułość analityczną odczynnika *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) badano, używając 20 różnych próbek tkankowych nowotworów piersi (10 próbek z amplifikacją genu *HER2* oraz 10 próbek bez amplifikacji). Stosunek pomiędzy liczbą sygnałów *HER2* i sygnałów CEN-17 wyznaczono na podstawie zliczenia sygnałów w 20 jądrach komórek prawidłowych w próbce tkankowej. Wskaźnik *HER2/CEN-17* w komórkach prawidłowych zidentyfikowanych w 20 próbkach tkanek nowotworów piersi wyniósł od 0,97 do 1,11.

Swoistość analityczna

Sondy *HER2* DNA w odczynniku *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) są w końcowej fazie sekwencjonowane i mapowane, aby uzyskać potwierdzenie całkowitego pokrycia 218 kb zawierających gen *HER2*.

Sondy CEN-17 PNA w odczynniku *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) zostały przetestowane za pomocą metody FISH osobno i w połączeniu w celu potwierdzenia ich swoistej hybrydyzacji do regionu centromeru chromosomu 17.

Aby wykluczyć hybrydyzację krzyżową do chromosomów innych niż chromosom 17, badania przeprowadzono w fazie metafazy zgodnie ze standardowymi procedurami Dako QC. Swoistość hybrydyzacji mieszaniny sond *HER2* DNA oraz CEN-17 PNA została oceniona łącznie dla 275 preparatów metafazowych o różnych sygnałach. We wszystkich 275 przypadkach hybrydyzacja była swoista dla chromosomu 17. W żadnym z 275 przypadków nie zaobserwowano hybrydyzacji krzyżowej do loci na innych chromosomach. Swoistość sondy wyniosła więc 100% (275 na 275).

W celu pomiaru zdolności testu IQFISH do identyfikowania wyłącznie antygenów docelowych — genu *HER2* i regionu CEN-17 — bez zakłóceń ze strony innych substancji badania przeprowadzono na próbkach tkanek nowotworu piersi bez użycia sond *HER2* ani CEN-17 z mieszaniny hybrydyzacyjnej i z użyciem tylko buforu hybrydyzacyjnego. Łącznie oceniono 20 wycinków pod kątem obecności sygnałów niezwiązanych z mieszaniną sond. W żadnym z 20 wycinków nie wykryto innych obszarów docelowych na chromosomach ani zakłóceń ze strony bardzo podobnych substancji.

Badania wrażliwości wyników

Wrażliwość testu *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) oceniano, używając różnych stężeń sond PNA, czasów odmaskowania antygeny, czasów inkubacji z pepsyną, czasów denaturacji, czasów hybrydyzacji i czasów głębokiego płukania oraz temperatur. Różne parametry oceniano w pięciu utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie próbkach tkanek nowotworów piersi (zarówno z amplifikacją, jak i bez amplifikacji).

Stosowano zarówno mniejsze, jak i większe niż w standardowym protokole wartości wszystkich parametrów, za wyjątkiem stężenia sondy PNA oraz temperatury głębokiego płukania, dla których użyto wartości zgodnych ze standardowym protokołem.

Testowano następujące parametry:

Stężenie sondy PNA: testowano przy 100% i +/-17%.

Czas odmaskowania antygenu: testowano przy 13 min 45 s i 16 min 15 s.

Czas inkubacji z pepsyną: testowano przy 14 min 45 s i 16 min 15 s.

Czas denaturacji: testowano przy 9 min 45 s i 10 min 45 s.

Czas hybrydyzacji: testowano przy 70 min i 80 min.

Czas głębokiego płukania: testowano przy 8 min 45 s i 11 min 15 s.

Temperatura głębokiego płukania: testowano przy 59°C, 61°C i 63°C.

Oceniano trzy stężenia sond PNA, używając planów frakcyjnych doświadczeń (narzędzie JMP, SAS), w których zastosowano 12 różnych protokołów barwienia przedstawionych w Tabeli 2.

Tabela 2. Dwanaście różnych protokołów barwienia zastosowanych do badania wrażliwości wyników.

Protokół badania wrażliwości wyników nr	Badany parametr						
	Czas odmaskowania antygenu (min)	Czas trawienia pepsyną (min)	Czas denaturacji (min)	Czas hybrydyzacji (min)	Czas głębokiego płukania (min)	Temperatura głębokiego płukania (°C)	Stęż. PNA w miesz. sond
1	16,25	16,25	9,75	80	8,75	59	83%
2	13,75	14,75	10,75	70	8,75	59	100%
3	16,25	14,75	9,75	70	8,75	63	100%
4	13,75	14,75	10,75	80	8,75	61	83%
5	13,75	14,75	9,75	80	11,25	59	117%
6	13,75	16,25	10,75	70	11,25	63	83%
7	13,75	16,25	10,75	70	11,25	63	100%
8	16,25	14,75	9,75	70	11,25	61	83%
9	13,75	16,25	9,75	70	8,75	61	117%
10	16,25	16,25	10,75	70	11,25	59	117%
11	16,25	16,25	10,75	80	11,25	61	100%
12	16,25	14,75	10,75	80	8,75	63	117%

Każda z pięciu próbek tkanek była barwiona za pomocą wszystkich 12 protokołów.

W celu oceny wrażliwości odczytywana była intensywność sygnału oraz jakość morfologii. Używając wszystkich protokołów wybarwiono wszystkie próbki tkanek (łącznie 60 barwień) i otrzymano sygnały, które były jasne, wyraźnie odróżniające się i łatwe do oceny, przez co odpowiednie do zliczania.

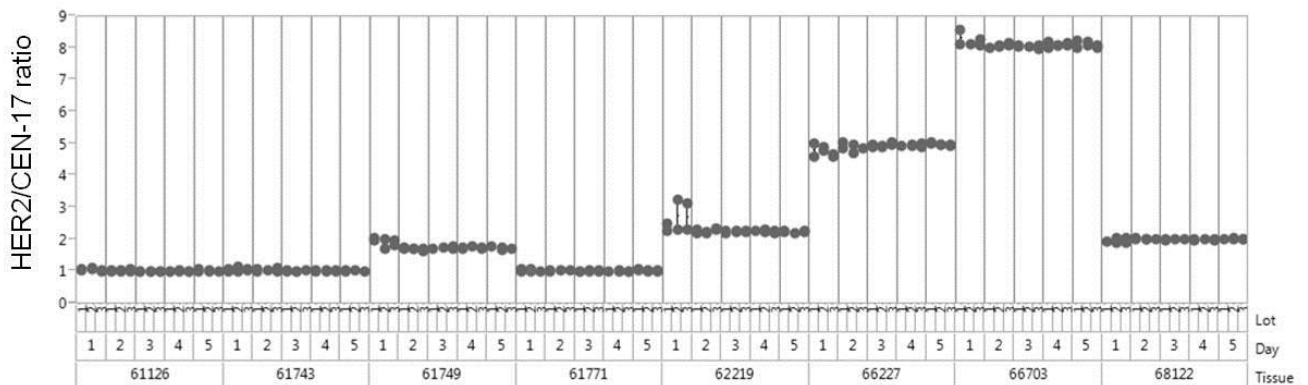
Ponadto oceniano wpływ grubości tkanki na wyniki testu *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis), używając różnej grubości skrawków tkanek nowotworów piersi utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie.

Łącznie zbadano pięć kolejnych skrawków ludzkich nowotworów piersi o różnych grubościach (3, 4, 5, 6 i 7 µm) za pomocą testu *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis). Średni współczynnik zmienności wskaźnika *HER2/CEN-17* wyniósł 5,8% (w zakresie od 4,3% do 7,1%).

Odtwarzalność

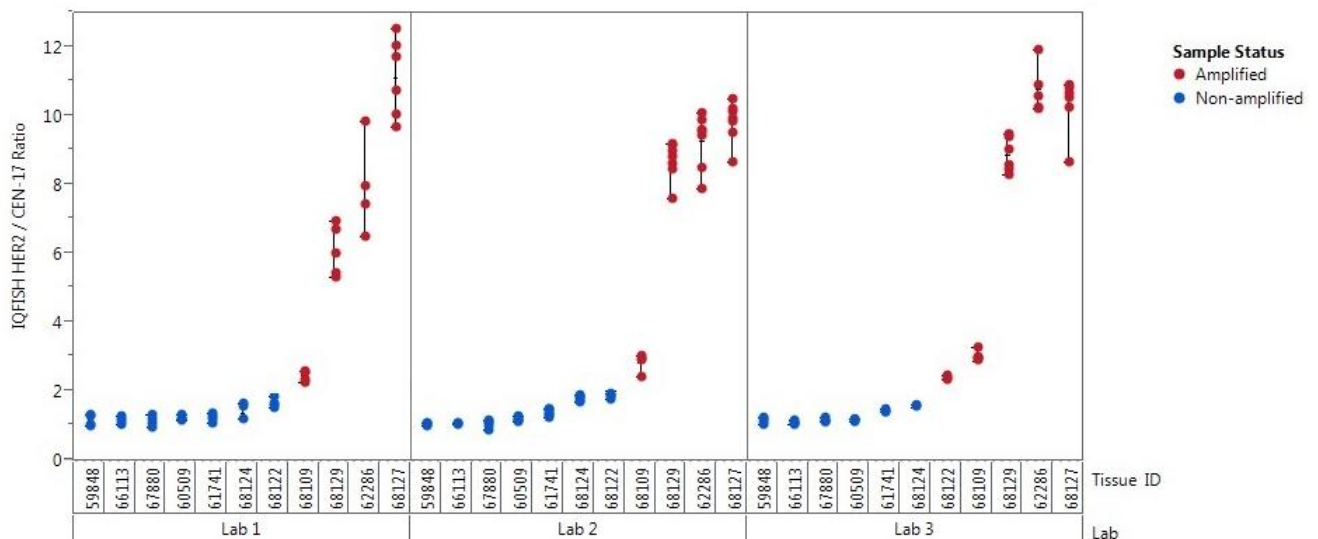
Odtwarzalność wyników w laboratorium między dniami i seriami badano za pomocą testu *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis). Metodą ślepej próby przeprowadzono wewnętrzne, randomizowane badanie wskaźników *HER2/CEN-17*, używając skrawków z ośmiu różnych wycinków nowotworów piersi utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie o różnych

poziomach amplifikacji genu *HER2*. Te osiem wycinków badano za pomocą testu HercepTest™. Wśród nich dwa charakteryzowały się nadekspresją białka HER2 na poziomie IHC 0/1+, dwa — HER2 IHC 2+, dwa — HER2 IHC 3+ i dwa wykazywały wcześniej określony wskaźnik *HER2/CEN-17* FISH wynoszący 1,5–2,5 stwierdzony na podstawie testu *HER2* IQFISH pharmDx (nr kat. K5731). Każdy wycinek barwiono w pięciu nienastępujących po sobie dniach za pomocą odczynników *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) pochodzących z trzech różnych serii. W całym badaniu przeprowadzono łącznie 240 barwień tkanek, ponieważ dwukrotnie wykonano barwienie w każdej kombinacji. Zmienność wskaźników pomiędzy dniami i seriami odczynnika przedstawiono na Rysunku 1. Dane analizowano za pomocą przekształcenia Boxa-Coxa z zastosowaniem modelu z efektem zmiennym w celu uzyskania jednorodności wariancji danych. Całkowity współczynnik zmienności wyniósł 4,3% i stwierdzono, że zmienność między dniami i seriami odczynnika odpowiada odpowiednio za 1,5% i 0% zmienności.



Rysunek 1. Wskaźniki *HER2/CEN-17* uzyskane na podstawie badania odtwarzalności wewnątrz laboratorium za pomocą testu *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis), w tym punkty końcowe odtwarzalności między seriami odczynnika i dniami.

Dodatkowo oceniano odtwarzalność testu *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) między dniami i ośrodkami w trzech zewnętrznych ośrodkach (jeden w Stanach Zjednoczonych i dwa w Europie) w badaniu ze stratyfikacją przeprowadzonym metodą ślepej próby na skrawkach tkanek z 12 różnych wycinków nowotworów piersi utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie. Trzy wycinki charakteryzowały się nadekspresją białka HER2 na poziomie IHC 0/1+, trzy — HER2 IHC 2+, trzy — HER2 IHC 3+ i trzy wykazywały wcześniej określony wskaźnik *HER2/CEN-17* FISH wynoszący 1,5–2,5 stwierdzony odpowiednio na podstawie testów HercepTest™ oraz *HER2* IQFISH pharmDx (nr kat. K5731). Wycinki barwiono i analizowano w ośrodkach badawczych. Każdy wycinek był barwiony co najmniej pięć razy w pięciu nienastępujących po sobie dniach i oceniany przez jednego obserwatora w każdym ośrodku. Wybarwiono i uwzględniono w analizie statystycznej 192 skrawki. Dane analizowano za pomocą przekształcenia Boxa-Coxa i obliczono składniki wariancji. Całkowity współczynnik zmienności oparty na górnej granicy 95% przedziału ufności wyniósł 15%. Zmienność wskaźnika *HER2/CEN-17* między dniami i ośrodkami przedstawiono na Rysunku 2.



Rysunek 2. Wykres zmienności wskaźników *HER2*/CEN-17 w nieprzekształconych jednostkach uzyskany w badaniu odtwarzalności testu *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) między dniami i ośrodkami przeprowadzonymi na wycinkach tkanek nowotworów piersi.

Test *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) oceniano pod kątem odtwarzalności między obserwatorami jako część wewnętrznego badania porównawczego metod przeprowadzonego z udziałem trzech obserwatorów niezależnie oceniających barwione wycinki. Odtwarzalność oceniano z użyciem 140 różnych ludzkich wycinków nowotworów piersi z amplifikacją lub bez amplifikacji genu *HER2*. Dane analizowano za pomocą przekształcenia Boca-Coxa. Średni współczynnik zmienności między obserwatorami wyniósł 9%.

Powtarzalność

Powtarzalność testu *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) w laboratorium oceniano w kolejnych skrawkach z ośmiu wycinków ludzkich tkanek nowotworów piersi z lub bez amplifikacji genu *HER2*. Tkanki badano podwójnie w pięciu nienastępujących po sobie dniach, używając trzech różnych serii odczynnika w łącznie 240 preparatach (120 skrawków poddanych podwójnej ocenie). Zastosowanie modelu z efektem zmiennym w analizie danych dało w wyniku zmienność przypisywaną dniom i seriom odczynnika (przedstawioną w badaniu wewnętrznej odtwarzalności). Wariancja reszt jest równa różnicy między powtórzeniami i stanowi powtarzalność. Górna granica 95% przedziału ufności współczynnika zmienności powtarzalności wynosi 4,4%.

Badania porównawcze metod

Porównanie wyników testów *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) i *HER2* IQFISH pharmDx Test *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) porównywano z testem *HER2* IQFISH pharmDx (nr kat. K5731) w badaniu porównawczym 140 wycinków ludzkich tkanek nowotworów piersi. Wśród wycinków 77 nie wykazywało amplifikacji genu *HER2*, 63 wykazywały amplifikację genu *HER2* i dla wszystkich znano wynik testu HercepTest™ (patrz Tabela 3).

Tabela 3. Rozkład wycinków na podstawie wyników HercepTest™ i *HER2* FISH (status genu *HER2*) uzyskanego za pomocą testu *HER2* IQFISH pharmDx (nr kat. K5731).

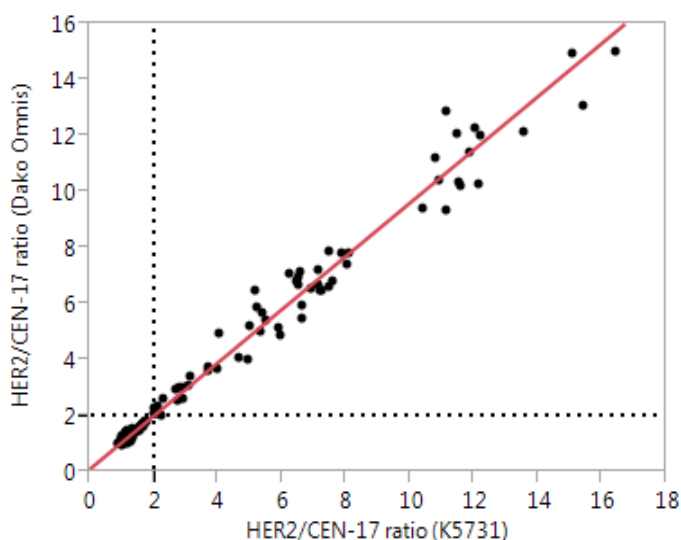
Wynik barwienia HercepTest™	0	1+	2+	3+	Razem
n	27	11	53	49	140
Status <i>HER2</i> w teście FISH					
Z amplifikacją	2	0	13	48	63
Brak amplifikacji	25	11	40	1	77
Łączna liczba wycinków badanych metodą FISH	27	11	53	49	140

W Tabeli 4 przedstawiono wyniki tabelaryzacji krzyżowej statusu genu *HER2* uzyskanego za pomocą tych dwóch testów oraz całkowity odsetek zgodności (ang. overall percent agreement,

OPA), odsetek zgodności wyników pozytywnych (ang. positive percent agreement, PPA) i odsetek zgodności wyników negatywnych (ang. negative percent agreement, NPA). Korelację wskaźników *HER2*/CEN-17 uzyskanych za pomocą tych dwóch testów przedstawiono na Rysunku 3.

Tabela 4. Tabela krzyżowa statusu genu *HER2* ocenionego za pomocą testów *HER2* IQFISH pharmDx (nr kat. K5731) i *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis).

		Status genu <i>HER2</i> (K5731)		Razem
		Brak amplifikacji	Z amplifikacją	
Status genu <i>HER2</i> (Dako Omnis)	Brak amplifikacji	77	0	77
	Z amplifikacją	0	63	63
Razem		77	63	140
OPA: 100%				
PPA: 100%				
NPA: 100%				



Rysunek 3. Korelacja wskaźników *HER2*/CEN-17 uzyskanych za pomocą testów *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) i *HER2* IQFISH pharmDx (nr kat. K5731) przeprowadzonych na 140 wycinkach nowotworów piersi (dopasowanie liniowe: $y = 0,11 + 0,95 \cdot x$; $R^2 = 0,97$. W dopasowaniu liniowym zastosowano wagę w postaci odwrotności wariancji).

Przed analizą wskaźniki *HER2*/CEN-17 poddano przekształceniu logarytmicznemu. 95% przedział ufności dla średniej różnicy między tymi dwiema metodami barwienia przy wskaźniku *HER2*/CEN-17 = 2 wyniósł [0,002; 0,031]. Oznacza to, że z 95% pewnością oczekiwana różnica nie przekracza 3%.

Pierwiastek z błędzi średniokwadratowego (ang. root mean square error, RMSE) wyniósł 9%, co jest miarą wielkości przeciętnego wahania wokół wartości średniej.

Porównanie wyników testów *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) i PathVysion *HER2* DNA Probe Kit

Test *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) porównywano z testem PathVysion *HER2* DNA Probe Kit w badaniu porównawczym 140 wycinków ludzkich tkanek nowotworów piersi. Wśród wycinków 80 nie wykazywało amplifikacji genu *HER2*, 80 wykazywało amplifikację genu *HER2* i dla wszystkich znano wynik testu HercepTest™ (patrz Tabela 5).

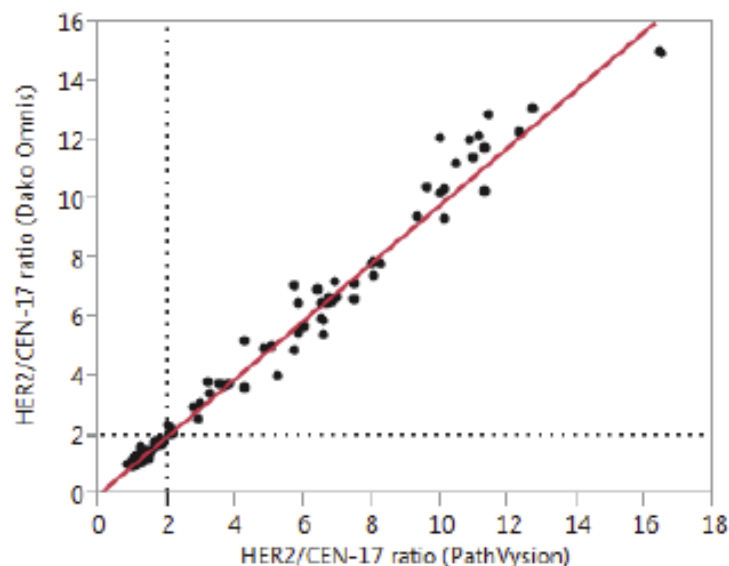
Tabela 5. Rozkład wycinków na podstawie wyników HercepTest™ i *HER2* FISH (status genu *HER2*) uzyskanego za pomocą testu *HER2* IQFISH pharmDx (nr kat. K5731).

Wynik barwienia HercepTest™	0	1+	2+	3+	Razem
n	28	10	54	48	140
Status <i>HER2</i> w teście FISH					
Z amplifikacją	1	0	12	47	60
Brak amplifikacji	27	10	42	1	80
Łączna liczba wycinków badanych metodą FISH	28	10	54	48	140

W Tabeli 6 przedstawiono wyniki tabelaryzacji krzyżowej statusu genu *HER2* uzyskanego za pomocą tych dwóch testów oraz całkowity odsetek zgodności (ang. overall percent agreement, OPA), odsetek zgodności wyników pozytywnych (ang. positive percent agreement, PPA) i odsetek zgodności wyników negatywnych (ang. negative percent agreement, NPA). Korelację wskaźników *HER2*/CEN-17 uzyskanych za pomocą tych dwóch testów przedstawiono na Rysunku 4.

Tabela 6. Tabela krzyżowa statusu genu *HER2* ocenionego za pomocą testów PathVysion *HER2* DNA Probe Kit i *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis).

		Status genu <i>HER2</i> (PathVysion)		Razem
		Brak amplifikacji	Z amplifikacją	
Status genu <i>HER2</i> (Dako Omnis)	Brak amplifikacji	80	0	80
	Z amplifikacją	0	60	60
Razem		80	60	140
OPA: 100%				
PPA: 100%				
NPA: 100%				



Rysunek 4. Korelacja wskaźników *HER2*/CEN-17 uzyskanych za pomocą testów *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) i PathVysion przeprowadzonych na 140 wycinkach nowotworów piersi (dopasowanie liniowe: $y = 0,01 + 0,98 \cdot x$; $R^2 = 0,96$. W dopasowaniu liniowym zastosowano wagę w postaci odwrotności wariancji).

Przed analizą wskaźniki *HER2*/CEN-17 poddano przekształceniu logarytmicznemu. 95% przedział ufności dla średniej różnicy między tymi dwiema metodami barwienia przy wskaźniku *HER2*/CEN-17 = 2 wyniósł [0,001; 0,031]. Oznacza to, że z 95% pewnością oczekiwana różnica nie przekracza 3%.

Pierwiastek z błędu średniokwadratowego (ang. root mean square error, RMSE) wyniósł 10%, co jest miarą wielkości przeciętnego wahania wokół wartości średniej.

Użyteczność kliniczna przy wyborze pacjentów do leczenia produktem Herceptin™ (trastuzumabem)

Test *HER2* FISH pharmDx Kit oceniano w badaniach porównawczych z testami PathVysion HER-2 DNA Probe Kit i Dako HercepTest™. Wyniki testów *HER2* FISH są dostępne dla łącznie 940 wycinków nowotworów piersi.

Porównanie wyników testów *HER2* FISH pharmDx Kit i PathVysion HER-2 DNA Probe Kit
Przeprowadzono trzy badania w celu porównania wyników testów *HER2* FISH pharmDx Kit i PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (patrz Tabela 7). Badania te wykonano w odrębnych geograficznie miejscach i nie wykorzystywano tych samych wycinków. Zbadano łącznie 328 wycinków.

Tabela 7. Podsumowanie danych z badań porównawczych metody FISH.

Oznaczenie badania	Badanie zgodności (wycinki z Danii, N=190)	Badanie zgodności (wycinki z Japonii, N=52)	Badanie zgodności (wycinki z Francji, N=86) (21)*
Zgodność (95% przedział ufności)	93,68% (90,22%–97,14%)	96,15%	Nie dotyczy
Odsetek zgodności wyników pozytywnych (95% przedział ufności)	86% (77,34%–95,08%)	97%	Nie dotyczy
Odsetek zgodności wyników negatywnych (95% przedział ufności)	97% (94,05%–99,89%)	96%	Nie dotyczy

* W artykule podano dane porównawcze, lecz nie określono testu *HER2* FISH.

Stwierdzono łącznie 12 niespójnych wyników między testami *HER2* FISH pharmDx Kit i PathVysion™ HER-2 DNA Probe w przypadku materiałów klinicznych z Danii (patrz Tabela 8).

Tabela 8. Podsumowanie 12 niespójnych wyników testów.

<i>HER2</i> FISH (pozytywny)/PathVysion (negatywny)				<i>HER2</i> FISH (negatywny)/PathVysion (pozytywny)			
Nr ident.	Wskaźnik <i>HER2</i> FISH	Wskaźnik PathVysion	Wynik testu HercepTest	Nr ident.	Wskaźnik <i>HER2</i> FISH	Wskaźnik PathVysion	Wynik testu HercepTest
160	2,10* (1,82-2,51)	1,51 (1,39-1,68)	2+	234	1,68 (1,38–1,83)	2,02* (1,84-2,29)	2+
208	3,61 (2,95-4,73)	1,62 (1,51-1,82)	2+	284	1,44 (1,07–1,83)	2,21* (1,94-2,64)	2+
306	2,20* (1,79-2,24)	1,33 (1,18-1,44)	1+	423	1,7 (1,52–1,95)	2,15 (2,02-2,45)	1+
846	2,58 (2,06-3,50)	1,51 (1,42-1,76)	2+	474	1,44 (1,16–1,83)	2,55 (2,38-3,26)	2+
				735	1,68 (1,40–1,99)	2,03* (1,89-2,19)	2+
				746	1,05 (0,96–1,18)	4,53 (4,27-5,17)	3+
				837	1,52 (1,48–1,79)	2,15 (2,10-2,67)	3+
				881	1,83* (1,15–2,69)	2,68 (2,39-3,14)	2+

* Przedział ufności średniej zlogarytmowanych wskaźników obejmuje liczbę 2,0. Liczby w nawiasach oznaczają 95% przedział ufności

W powyższej analizie rozbieżności zastosowano zlogarytmowane wskaźniki. 95% przedział ufności obliczono dla 60 zlogarytmowanych wskaźników jąder komórkowych, które analizowano w celu obliczenia wskaźnika dla PathVysion HER-2 DNA Probe. W 4 przypadkach, w których wynik testu *HER2* FISH pharmDx Kit był pozytywny, a testu PathVysion HER-2 DNA Probe — negatywny, żaden przedział nie obejmował krytycznej wartości 2. W 8 przypadków, w których wynik testu *HER2* FISH pharmDx Kit był negatywny, a testu PathVysion HER-2 DNA

Probe — pozytywny, 95% przedział ufności trzech (o numerach 234, 284 i 735) obejmował krytyczną wartość 2. Analogicznie obliczono 95% przedział ufności dla zlogarytmowanych wskaźników jąder komórkowych, które analizowano w celu obliczenia wskaźnika *HER2* FISH pharm Dx™ Kit. Z 4 przypadków, w których wynik testu *HER2* FISH pharmDx Kit był pozytywny, a testu PathVysion *HER-2* DNA Probe — negatywny, dwa (o numerach 160 i 306) obejmowały krytyczną wartość 2. Z ośmiu przypadków, w których wynik testu *HER2* FISH pharmDx Kit był negatywny, a testu PathVysion *HER-2* DNA Probe — pozytywny, 95% przedział ufności jednego (o numerze 881) obejmował krytyczną wartość 2.

Porównanie wyników testów *HER2* FISH pharmDx Kit i HercepTest™

Przeprowadzono cztery badania porównujące wyniki testów *HER2* FISH pharmDx Kit i HercepTest™. Łącznie porównano 940 wycinków, przy założeniu, że dodatni wynik testu HercepTest™ jest zdefiniowany jako IHC 3+ (patrz Tabela 9).

Tabela 9. Podsumowanie badań porównawczych testów *HER2* FISH pharmDx Kit i IHC (HercepTest™).

Oznaczenie badania	Próbki kliniczne z Danii (N=682)	Wycinki z Japonii (N=52)	Badanie przeprowadzone we Francji (N=86) (31)*	Badanie pilotażowe przeprowadzone w Danii (N=120) (22)
Zgodność (95% przedział ufności)	93,11% (91,21%–95,01%)	96,15%	87,21%	93,33%
Odsetek zgodności wyników pozytywnych (95% przedział ufności)	91% (87,39%–94,57%)	96%	87%	84%
Odsetek zgodności wyników negatywnych (95% przedział ufności)	94% (92,12%–96,46%)	96%	87%	97%

Rozkład wyników testów HercepTest™ i *HER2* FISH przeprowadzonych na próbkach klinicznych z Danii przedstawiono w Tabeli 10.

Tabela 10. Rozkład statusów *HER2* według testów HercepTest™ i *HER2* FISH pharmDx Kit.

Wynik barwienia HercepTest™	0	1+	2+	3+	Razem
n	221	267	84	248	820
%	27	33	10	30	100%
Status <i>HER2</i> w teście FISH					
Z amplifikacją	0	8	17	222	247
Brak amplifikacji	106	245	62	22	435
Łączna liczba wycinków badanych metodą FISH	106	253	79	244	682

Rozwiązywanie problemów — tkanka piersi

Problem	Prawdopodobna przyczyna	Zalecane postępowanie
1. Brak sygnałów lub słabe sygnały	<p>1a. Podczas transportu lub przechowywania odczynniki narażone były na działanie wysokich temperatur</p> <p>1b. Mikroskop nie działa prawidłowo</p> <ul style="list-style-type: none"> - Nieodpowiedni zestaw filtrów - Nieodpowiednia lampa - Zużyta lampa rtęciowa - Zabrudzone i/lub popękane soczewki zbierające - Nieodpowiedni olejek imersyjny <p>1c. Zanikanie sygnałów</p> <p>1d. Bufory błędnie zidentyfikowane</p>	<p>1a. Sprawdzić warunki przechowywania. Należy upewnić się, że w otrzymanych przesyłkach z mieszkanką sond IQISH i pepsyną obecny był suchy lód. Upewnić się, że odczynniki były przechowywane zgodnie z zaleceniami.</p> <p>1b. Należy sprawdzić mikroskop i upewnić się, że używane filtry są odpowiednie do stosowania z fluorochromami z mieszaniny sond, a lampa rtęciowa jest prawidłowa i nie został przekroczony czas jej spodziewanej żywotności (patrz załącznik 2). W razie wątpliwości skontaktować się z dostawcą mikroskopu.</p> <p>1c. Należy unikać długich badań mikroskopowych oraz zminimalizować czas narażenia na silne źródła światła.</p> <p>1d. Wymienić butelki na bufory oraz dopilnować ich prawidłowej rejestracji (w stacji roboczej) i identyfikacji (na ekranie dotykowym). W celu uzyskania dalszych szczegółów zapoznać się z Podstawowym podręcznikiem użytkownika Dako Omnis. Uwaga: roztwór ISH Pre-Treatment Solution jest zielony, a bufor ISH Stringent Wash Buffer — żółty.</p>

Problem	Prawdopodobna przyczyna	Zalecane postępowanie
2. Obszary bez sygnału	2. Nabranie pęcherzy powietrza podczas zamykania	2. Unikać powstawania pęcherzyków powietrza. W razie zaobserwowania pęcherzyków usunąć je, delikatnie pukając szczypczykami.
3. Nadmierne wybarwienie tła	3a. Niewłaściwe utrwalenie tkanek 3b. Przedłużona ekspozycja części hybrydyzowanej na silne źródło światła	3a. Używać wyłącznie skrawków tkankowych utrzalonych w formalinie i zatopionych w parafinie. 3b. Należy unikać długich badań mikroskopowych oraz zminimalizować czas narażenia na silne źródła światła.
4. Zła morfologia tkanek	4a. Nieprawidłowa obróbka pepsyną 4b. Zbyt długie trawienie pepsyną lub bardzo mała grubość skrawka może powodować pojawianie się komórek pustych lub komórek „pierścieniowych”	4a. Wybrać inny z trzech różnych protokołów barwienia. Upewnić się, że odczynnik ISH Pepsin (Dako Omnis) jest przechowywany w odpowiedniej temperaturze. 4b. Wypróbować protokół barwienia z krótszym czasem inkubacji z pepsyną. Upewnić się, że grubość skrawka wynosi 4–6 µm.
5. Zbyt wysoki poziom zielonej autofluorescencji w preparacie, w tym na obszarach bez tkanek utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie	5. Użycie przeterminowanych lub niezalecanych szkiełek podstawowych	5. Stosować szkiełka podstawowe zgodnie z zaleceniami. Należy upewnić się, że termin ważności szkiełek podstawowych nie upłynął.

UWAGA: Jeśli problemu nie daje się przypisać żadnej z powyższych przyczyn bądź jeśli zalecane działanie jest nieskuteczne, należy się skontaktować z działem wsparcia technicznego firmy Dako w celu uzyskania dalszej pomocy.

Załącznik 1 — tkanka piersi

HER2 IQFISH pharmDx (Dako Omnis), nr kat. GM333

Schemat zliczania

Data zadania: _____ Numer identyfikacyjny zadania barwienia: _____

Partia odczynnika *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis): _____ Numer identyfikacyjny preparatu: _____

Zliczanie sygnałów w 20 jądrach					
Jądro nr	Wynik <i>HER2</i> (czerwony)	Wynik CEN-17 (zielony)	Jądro nr	Wynik <i>HER2</i> (czerwony)	Wynik CEN-17 (zielony)
1			11		
2			12		
3			13		
4			14		
5			15		
6			16		
7			17		
8			18		
9			19		
10			20		
Ogółem (1–10)			Ogółem (11–20)		

W celu określenia wskaźnika *HER2/CEN-17* należy policzyć liczbę sygnałów *HER2* oraz liczbę sygnałów CEN-17 w tych samych 20 jądrach, a następnie podzielić całkowitą liczbę sygnałów *HER2* przez całkowitą liczbę sygnałów CEN-17. Jeśli wskaźnik *HER2/CEN-17* ma wartość graniczną (1,8–2,2), należy zliczyć sygnały kolejnych 20 jąder i przeliczyć wskaźnik dla 40 jąder komórkowych.

Wskaźnik o wartości granicznej lub do niej zbliżonej (1,8–2,2) należy interpretować ostrożnie (patrz: Wskazówki do zliczania sygnałów).

	Wynik <i>HER2</i>	Wynik CEN-17	Wskaźnik <i>HER2/CEN-17</i>
Wynik ogółem (1–20)			

Zliczanie sygnałów w dodatkowych 20 jądrach					
Jądro nr	Wynik <i>HER2</i> (czerwony)	Wynik CEN-17 (zielony)	Jądro nr	Wynik <i>HER2</i> (czerwony)	Wynik CEN-17 (zielony)
21			31		
22			32		
23			33		
24			34		
25			35		
26			36		
27			37		
28			38		
29			39		
30			40		
Ogółem (21–30)			Ogółem (31–40)		

Obliczyć wskaźnik *HER2*/CEN-17 w oparciu o 40 zliczonych jąder

	Wynik <i>HER2</i>	Wynik CEN-17	Wskaźnik <i>HER2</i> /CEN-17
Wynik ogółem (1–40)			

- Wskaźnik < 2: Nie zaobserwowano amplifikacji genu *HER2*
- Wskaźnik ≥ 2: Zaobserwowano amplifikację genu *HER2*

Data i podpis technika:

Data i podpis histopatologa:

Wytyczne do zliczania: patrz Interpretacja wyniku barwienia.

Załącznik 2 — tkanka piersi

HER2 IQFISH pharmDx (Dako Omnis), nr kat. GM333

Specyfikacja mikroskopu fluorescencyjnego

Firma Dako zaleca stosowanie następującej aparatury z odczynnikiem HER2 IQFISH pharmDx, (Dako Omnis), GM333:

1. Typ mikroskopu

- Mikroskop epifluorescencyjny

2. Lampa

- Lampa rtęciowa 100-watowa (odnotowywać czas świecenia)

3. Obiektywy

- Do badania przesiewowego tkanek nadają się obiektywy imersyjne o powiększeniu 16× lub 20×
- Do dużych powiększeń i zliczania sygnałów zaleca się stosowanie wyłącznie obiektywów imersyjnych, np. o powiększeniu 100×

4. Filtry

Filtry są projektowane indywidualnie pod kątem konkretnych fluorochromów i muszą być właściwie dobrane. Firma Dako zaleca stosowanie specyficznego filtra DAPI w połączeniu z wysokiej jakości podwójnym filtrem dla czerwieni teksańskiej/FITC.

- Filtr DAPI
- Filtr podwójny dla czerwieni teksańskiej/FITC
- Do weryfikacji i zliczania można używać filtrów pojedynczych dla czerwieni teksańskiej i FITC

Fluorochrom	Długość fali wzbudzenia	Długość fali emisji
FITC	495 nm	520 nm
Czerwień teksańska	596 nm	615 nm

Filtry są przeznaczone do konkretnych typów mikroskopów i użycie odpowiednich filtrów ma kluczowe znaczenie dla poprawności interpretacji. Aby uzyskać szczegółowe informacje, należy skontaktować się z dostawcą mikroskopu lub przedstawicielem firmy Dako.

5. Olejek

- Olejek niefluorescencyjny

Środki ostrożności

- Nie zaleca się stosowania lamp rtęciowych o mocy 50 watów
- Nie należy stosować filtrów rodaminowych
- Nie zaleca się używania filtrów potrójnych

Nieoptymalnie dobrany i skonfigurowany mikroskop może być przyczyną problemów z odczytem sygnałów fluorescencyjnych. Źródło światła nie może być nadmiernie zużyte, musi być prawidłowo ustawione i zogniskowane.

Klienci powinni zapoznać się z zaleceniami producenta dotyczącymi eksploatacji lampy rtęciowej i szczegółowo ich przestrzegać. Mikroskop należy konserwować, a lampę rtęciową regulować przed interpretacją wyników.

Należy w miarę możliwości unikać wystawiania preparatów na działanie światła wzbudzającego, aby zminimalizować zanik fluorescencji.

Przed rozpoczęciem hybrydyzacji fluorescencyjnej in situ zaleca się omówienie budowy mikroskopu z producentem lub zapoznanie się z literaturą.

Podsumowanie i wyjaśnienia — tkanka żołądka

Ludzki gen *HER2* (znany również jako *ERBB2* lub *NEU*) jest zlokalizowany na chromosomie 17 i koduje białko HER2 lub p185^{HER2}. Białko HER2 jest receptorem błonowym kinazy tyrozynowej wykazującym podobieństwo do receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR lub HER1) (1-2). Gen *HER2* występuje w dwóch kopiach we wszystkich prawidłowych komórkach diploidalnych.

Nadekspresję białka HER2 i amplifikację genu *HER2* nowotworu żołądka wykazano w licznych badaniach (omówionych w (23)). Wynik dodatni HER2 wykryto u ok. 20% pacjentów metodami IHC lub FISH (23). Badania przedkliniczne *in vitro* oraz *in vivo* wykazały skuteczność trastuzumabu (Herceptin™) na przykładzie różnych modeli nowotworu żołądka, co doprowadziło do rozpoczęcia kilku badań klinicznych (23-27).

Wszyscy pacjenci badania fazy III BO18255 (ToGA „Otwarte, randomizowane, wieloośrodkowe badanie fazy III porównujące trastuzumab w skojarzeniu z fluoropirymidyną i cisplatyną oraz samą chemioterapię jako leczenie pierwszego rzutu u pacjentów z HER2-dodatnim zaawansowanym nowotworem żołądka”) sponsorowanego przez Hoffmann-La Roche AG zostali wybrani z zastosowaniem testu Dako HercepTest™ (IHC) i odczynnika Dako *HER2* FISH pharmDx Kit (FISH) na podstawie dodatniego wyniku na obecność HER2 zdefiniowanego jako IHC 3+ lub FISH+ (wskaźnik *HER2*/CEN-17 $\geq 2,0$). Badanie wykazało użyteczność kliniczną obu testów — HercepTest™ (IHC) i *HER2* FISH pharmDx Kit (FISH) — w ocenie statusu HER2 pacjentów z zaawansowanym gruczolakorakiem żołądka lub połączenia żołądkowo-przelykowego, w leczeniu których rozważa się zastosowanie trastuzumabu (28).

Pacjenci z nowotworami bez amplifikacji genu, lecz nadekspresją białka HER2 na poziomie od niskiego do wysokiego [FISH(-)/IHC 2+] nie zostali włączeni do badania. Dlatego też nie jest jasne, czy pacjenci z nowotworami bez amplifikacji genu, lecz z nadekspresją białka HER2 [tzn. FISH(-), IHC 2+ lub 3+] odniosą korzyść z leczenia produktem Herceptin™. W badaniu wykazano także, iż amplifikacja genu (FISH) nie jest skorelowana z nadekspresją białka (IHC) w takim stopniu jak w przypadku nowotworów piersi i z tego powodu nie należy stosować żadnej z tych metod osobno w celu określenia statusu HER2.

Niniejszy produkt (*HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis)) to mieszanka sond IQISH wykorzystywanych w automatycznym bezpośrednim teście FISH służącym do wykrywania amplifikacji genu *HER2*. Produkt ten powinien być stosowany wraz z określonymi odczynnikami dodatkowymi w urządzeniu Dako Omnis i wywodzi się z ręcznie wykonywanego testu amplifikacji genu *HER2* — *HER2* IQFISH pharmDx, nr kat. K5731.

Zasada testu — tkanka żołądka

Odczynnik *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) jest sondą IQISH składającą się z mieszaniny znakowanych czerwienią teksańską sond DNA, obejmujących region długości 218 kb zawierający gen *HER2* na chromosomie 17, oraz mieszaniny znakowanych fluoresceiną sond PNA (peptide nucleic acid) (13), skierowanych przeciwko regionowi centromeru chromosomu 17 (CEN-17). W wyniku swoistej hybrydyzacji z obszarami docelowymi uzyskuje się wyraźny czerwony sygnał fluorescencyjny dla każdego locus genu *HER2* oraz wyraźny zielony sygnał fluorescencyjny dla każdego centromeru chromosomu 17.

Ocena amplifikacji genu *HER2* za pomocą testu *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) jest w pełni zautomatyzowaną metodą wykonywaną w urządzeniu Dako Omnis. Oprogramowanie stacji roboczej Dako Link Omnis umożliwia wybór trzech różnych, poddanych walidacji protokołów barwienia *HER2* FISH. Protokoły te różnią się jedynie czasem trawienia pepsyną — można wybrać trawienie pepsyną przez 10 minut (krótki protokół), 15 minut (średni protokół) lub 20 minut (długi protokół). Szczegóły znajdują się poniżej. Do wstępnej analizy zalecany jest średni protokół.

Po barwieniu w urządzeniu Dako Omnis wycinki zamyka się na szkiełku przy użyciu odczynnika Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) zawierającego 4',6-diamidyno-2-fenylindol

(DAPI), a następnie przykrywa szkiełkiem nakrywkowym. Przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego wyposażonego w odpowiednie filtry (patrz załącznik 5), ustala się położenie komórek nowotworowych oraz zlicza sygnały czerwone (*HER2*) i zielone (CEN-17). Następnie oblicza się wskaźnik *HER2*/CEN-17. Zdrowe komórki w analizowanym skrawku tkanki spełniają rolę wewnętrznej kontroli dodatkowej skuteczności obróbki wstępnej i hybrydyzacji próbki.

Szczegółowe informacje przedstawiono w rozdziale "Interpretacja wyniku barwienia".

Aby uzyskać szczegółowe informacje na temat ładowania i rozładowywania preparatów; pokryw ISH Lid (Dako Omnis), nr kat. GC102; odczynników, płynów i odpadów, należy zapoznać się z podręcznikami użytkownika Dako Omnis.

Odczynniki — tkanka żołądka

Odczynnik *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) oraz odczynniki dodatkowe można zamawiać oddzielnie jako pojedyncze odczynniki.

Dostarczane materiały

HER2 IQFISH pharmDx (Dako Omnis): 1,6 mL, gotowa do użycia mieszanka znakowanych czerwienią teksańską sond DNA dla *HER2* oraz znakowanych fluoresceiną sond PNA dla CEN-17, dostarczana w buforze hybrydyzacyjnym IQISH. Odczynnik *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) jest dostarczany w suchym lodzie. **Obecność suchego lodu przy odbiorze stanowi gwarancję, iż odczynnik nie został narażony na działanie wysokich temperatur podczas transportu.** Fiolki z rozmrożonymi odczynnikami należy przez cały czas przechowywać i obsługiwać w pozycji pionowej.

Fiolki z odczynnikami zawierają metalową kulkę pokrytą złotem, która umożliwia mieszanie odczynnika za pomocą urządzenia do mieszania Dako Omnis Mixing Device (patrz Podręcznik użytkownika urządzenia do mieszania Dako Omnis). Odczynnik należy dokładnie wymieszać przed załadowaniem do urządzenia Dako Omnis.

Materiały wymagane, ale niedostarczane

Odczynniki dodatkowe

Następujące odczynniki muszą znajdować się w urządzeniu Dako Omnis w celu przeprowadzenia analizy amplifikacji genu *HER2* za pomocą testu *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis):

ISH Pre-Treatment Solution (20x) (Dako Omnis): 175 mL, 20-krotnie stężony; do rozcieńczenia w butelce 3,5 L Dako Omnis (nr kat. GC109). Produkt zawiera środek przeciwbakteryjny i ma przyjazny dla użytkownika, nietoksyczny zielony barwnik umożliwiający łatwą identyfikację.

ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis): 14 mL 96% etanolu (gotowego do użycia).

ISH Pepsin (Dako Omnis): 7 mL roztworu pepsyny A (gotowego do użycia) o pH 2,0; zawiera środek stabilizujący i przeciwbakteryjny. Pepsyna jest dostarczana w suchym lodzie. **Obecność suchego lodu przy odbiorze stanowi gwarancję, iż odczynnik nie został narażony na działanie wysokich temperatur podczas transportu.**

ISH Stringent Wash Buffer ISH (20x) (Dako Omnis): 175 mL 20-krotnie stężonej soli fizjologicznej buforowanej cytrynianem sodu; do rozcieńczenia w stosunku 1:20 w butelce 3,5 L Dako Omnis (nr kat. GC109). Produkt zawiera środek przeciwbakteryjny oraz detergent i ma przyjazny dla użytkownika, nietoksyczny żółty barwnik umożliwiający łatwą identyfikację.

Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis): 0,8 mL środka do zamykania preparatów na szkiełkach do badań fluorescencyjnych (gotowego do użycia) z DAPI.

Choć wymienione odczynniki nie są dostarczane razem z odczynnikiem *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis), omówiono je pokrótce poniżej. Aby uzyskać dalsze informacje, należy zapoznać się z instrukcją obsługi każdego urządzenia.

Dodatkowe odczynniki i urządzenia

Dako Omnis, nr kat. GI100

Wash Buffer (20x) (Dako Omnis), nr kat. GC807

Clearify™, nr kat. GC810

Dako Omnis Mixing Device, nr kat. GC116

ISH Lid, nr kat. GC102

ISH Cleaning Solution, nr kat. GC207

Szkiełka nakrywkowe do zamykania preparatów (24 mm x 50 mm)

Aby uzyskać informacje na temat stosowania dodatkowych odczynników i urządzeń, należy zapoznać się z podstawowym oraz zaawansowanym podręcznikiem użytkownika urządzenia Dako Omnis.

Mikroskop i akcesoria

Filtry do mikroskopu fluorescencyjnego: podwójny filtr dla DAPI i FITC/czerwieni tekstańskiej lub pojedyncze filtry dla FITC i czerwieni tekstańskiej — szczegółowe informacje w załączniku 5. Stosowanie filtra dla DAPI przy dużym powiększeniu negatywnie wpływa na intensywność sygnału. Należy unikać długich czasów ekspozycji.

Należy stosować mikroskop fluorescencyjny ze źródłem światła w postaci lampy rtęciowej 100 W. Do stosowania z wymienionymi filtrami nie są zalecane inne źródła światła.

Pojemnik na preparaty mikroskopowe (tekturowa podstawka na 20 preparatów z odchylaną pokrywą lub podobny)

Środki ostrożności — tkanka żołądka

1. Do badań diagnostycznych in vitro.
2. Do stosowania przez wyszkolony personel.
3. Odczynnik *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) zawiera od ≥ 10 - $< 25\%$ węgla etylenu i ≥ 3 - $< 5\%$ sodium chloride. *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) jest oznaczony:



Uwaga

H319

Działa drażniąco na oczy.

P280

Nosić okulary ochronne lub ochronę twarzy.

P264

Dokładnie umyć ręce po użyciu.

P305 + P351 + P338

W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.

Zasadniczo zakazuje się pracy z produktem osobom poniżej 18. roku życia.

Użytkownicy muszą być szczegółowo przeszkoleni w zakresie prawidłowej procedury postępowania, niebezpiecznych właściwości produktu i niezbędnych środków ostrożności. Dodatkowe informacje zawiera Karta Charakterystyki Substancji.

4. Próbkę tkanek przed i po utrwaleniu oraz wszystkie materiały mające z nimi kontakt należy traktować jako potencjalnie zakaźne i usuwać przy zachowaniu odpowiednich środków ostrożności (14). Nigdy nie należy pipetować odczynników posługując się ustami. Unikać kontaktu odczynników i wycinków ze skórą i błonami śluzowymi. W razie kontaktu odczynników z wrażliwymi okolicami skóry należy je spłukać obfitą ilością wody.
5. Do minimum ograniczyć skażenie odczynników bakteriami, aby uniknąć możliwości uzyskiwania błędnych wyników.
6. Użycie innych niż opisane metod utrwalania tkanki oraz skrawków o innej grubości może spowodować zmianę morfologii tkanki i/lub natężenia sygnału.

- Odczynniki zostały odpowiednio rozcieńczone. Dalsze rozcieńczanie może wpłynąć negatywnie na ich działanie.
- W celu uniknięcia kontaktu z oczami i skórą należy nosić odpowiednie osobiste wyposażenie ochronne. Dodatkowe informacje zawiera Karta Charakterystyki Substancji.
- Niewykorzystany roztwór usuwać zgodnie z rozporządzeniami lokalnymi, wojewódzkimi i krajowymi.
- Ze względu na heterogenną naturę preparatu raka żołądka ważne jest, aby zeskanować cały preparat w celu oceny rozłożenia sygnału przed wybraniem obszaru zliczania sygnałów.
- Nie zaleca się oceny bardzo małego preparatu (np. w celu zliczania preparat musi mieć zachowaną morfologię i dostateczną liczbę jąder).
- Przy analizie genu *HER2* metodą FISH w wycinkach biopsyjnych do uzyskania wiarygodnych danych na temat statusu *HER2* należy przeanalizować kilka (7–8) preparatów pobranych z różnych regionów guza.
- W celu identyfikacji wszystkich rdzeni tkanki w próbce biopsyjnej istotne znaczenie ma kontrola preparatu wybarwionego techniką HE.
- Amplifikacja genu *HER2* nie jest skorelowana z nadekspresją białka *HER2* w takim stopniu jak w przypadku nowotworów piersi i z tego powodu nie należy stosować żadnej z tych metod osobno w celu określenia statusu *HER2*.

Przechowywanie — tkanka żołądka

Odczynnik *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) należy przechowywać w temperaturze < -18°C (zalecana jest temperatura od -18°C do -25°C) w ciemności. Fiolki z rozmrożonymi odczynnikami przez cały czas muszą się znajdować w pozycji pionowej. Zamrażanie i rozmrażanie odczynników do 10 razy nie wpływa na jakość ich działania. Nie należy pozostawiać tego odczynnika w temperaturze pokojowej.

Jakość działania odczynnika *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) i odczynników dodatkowych ISH Pepsin (Dako Omnis) oraz Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) może ulec pogorszeniu pod wpływem ciepła. Odczynników tych nie należy pozostawiać w temperaturze pokojowej.

Jakość działania odczynnika *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) i odczynnika dodatkowego Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) może ulec pogorszeniu pod wpływem nadmiernej ekspozycji na światło. Nie należy przechowywać ani prowadzić oznaczeń za pomocą tych odczynników w miejscach silnie naświetlonych, np. w bezpośrednim świetle słonecznym.

Odczynniki dodatkowe ISH Pre-Treatment Solution (20x) (Dako Omnis), ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis), ISH Stringent Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) oraz Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) należy przechowywać w ciemności w temperaturze 2–8°C. Odczynnik ISH Pepsin (Dako Omnis) należy przechowywać w temperaturze od -18 do 8°C. Wszystkie przechowywane fiolki z odczynnikami powinny mieć zamknięty korek, w tym górną klapę korka.

Rozcieńczone roztwory (roztwory robocze ISH Stringent Wash Buffer i ISH Pre-Treatment Solution) można przechowywać w temperaturze od 2 do 8°C przez 30 dni.

Nie używać odczynników po upływie daty ważności podanej na opakowaniu. Podczas przechowywania korek, w tym górna klapa korka, powinny być zamknięte. Jeżeli odczynniki są przechowywane w warunkach innych niż podane w ulotce dołączonej do opakowania, użytkownik powinien zweryfikować ich działanie (15).

Nie ma jednoznacznych oznak świadczących o niestabilności tego produktu. Dlatego też bardzo ważna jest ocena zdrowych komórek w analizowanej próbce tkanki. W przypadku uzyskania nieoczekiwanego wyniku odczynu, którego nie można wyjaśnić, i gdy podejrzewa się problem z odczynnikiem *HER2* IQFISH pharmDx, należy skontaktować się z działem wsparcia technicznego firmy Dako.

Stabilność w urządzeniu Dako Omnis

Stabilność w urządzeniu odczynnika *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) oraz odczynników dodatkowych ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis) i ISH Pepsin (Dako Omnis) wynosi 80 godzin. Stabilność w urządzeniu rozcieńczonego roztworu ISH Pre-Treatment Solution (Dako Omnis) i buforu ISH Stringent Wash Buffer (Dako Omnis) wynosi 7 dni. Pozostały okres stabilności w urządzeniu jest kontrolowany przez oprogramowanie Dako Omnis. W przypadku stosowania odczynników z przekroczonym terminem ważności w urządzeniu Dako Omnis pojawi się ostrzeżenie, wszystkie preparaty wybarwione przeterminowanym odczynnikiem zmienią status na „podejrzany”, a dziennik preparatów na stacji roboczej wskaże użycie przeterminowanego odczynnika.

Przygotowanie wycinka — tkanka żołądka

Z wycinkami gruczolakoraka żołądka lub połączenia żołądkowo-przelykowego pochodzącymi z biopsji, wycięć i resekcji należy postępować w sposób umożliwiający zachowanie tkanki do analizy FISH. W przypadku wszystkich wycinków należy zastosować standardowe metody obróbki tkanek do barwienia immunocytochemicznego (16). W przypadku badania małych preparatów biopsyjnych należy upewnić się, czy do zliczania zachowano morfologię guza i obecność wystarczającej liczby jąder. Przy analizie genu *HER2* metodą FISH w wycinkach biopsyjnych do uzyskania wiarygodnych danych na temat statusu *HER2* należy przeanalizować kilka (7–8) preparatów pobranych z różnych regionów guza.

Skrawki zatopione w parafinie

Do użycia z zestawem nadaje się tylko tkanka zakonserwowana w obojętnej buforowanej formalinie i zatopiona w parafinie. Wycinki należy np. przygotować w formie bloczków o grubości 3 mm lub 4 mm i utrwać przez 18–24 godziny w obojętnej buforowanej formalinie. W badaniu ToGA wycinki biopsyjne utrwalano przez 6–8 godzin [opis badania — patrz pozycja (28) piśmiennictwa]. Następnie tkanki poddaje się odwodnieniu, stosując serię kąpieli alkoholowych i ksylenowych o stopniowo zmieniających się stężeniach, po czym przepaja płynną parafiną w temperaturze nieprzekraczającej 60°C. Prawdłowo utrwalone i zatopione tkanki przed podzieleniem na skrawki i zamknięciem na szkiełku można przechowywać przez nieograniczony czas, o ile przechowuje się je w chłodnym miejscu (15–25°C)(16-17). Nie dopuszcza się stosowania innych środków utrwalających.

Próbki tkanek należy pociąć na skrawki grubości 3–6 µm.

Równocześnie należy przygotować preparaty niezbędne do oceny amplifikacji genu *HER2* i zweryfikowania obecności guza. Zaleca się użycie minimum dwóch kolejnych skrawków: jednego skrawka do zbadania obecności guza barwionego hematoksyliną i eozyną (barwienie HE) i jednego skrawka do oceny amplifikacji genu *HER2*. Zaleca się zamykanie skrawków na szkiełkach Dako FLEX IHC Microscope Slides, nr kat. K8020. Odpowiednie są także szkiełka Superfrost Plus (Thermo Fischer Scientific, J1800AMNZ). Należy upewnić się, że termin ważności szkiełek podstawowych nie upłynął. Preparaty przechowywane w temperaturze 2–25°C należy zbadać w ciągu < 6 miesięcy od podzielenia na skrawki.

UWAGA: Próbki tkanek należy umieścić na szkiełku podstawowym w obrębie zdefiniowanego obszaru barwienia. Wymiary obszaru barwienia preparatu podano w Podstawowym podręczniku użytkownika urządzenia Dako Omnis.

SPOSÓB UŻYTKOWANIA — tkanka żołądka

A. Przygotowanie odczynników — tkanka żołądka

A.1 *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis)

Fiolka odczynnika *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) zawiera metalową kulkę pokrytą złotem przeznaczoną do mieszania. Przed załadowaniem fiolki do urządzenia Dako Omnis odczynnik

należy rozmrozić i dokładnie wymieszać, ponieważ podczas zamrażania ulega rozdzieleniu na fazy.

Sondy należy mieszać za pomocą urządzenia Dako Omnis Mixing Device.

Należy postępować zgodnie z poniższą procedurą mieszania sond za pomocą urządzenia Dako Omnis Mixing Device. Szczegółowe informacje znajdują się w Podręczniku użytkownika urządzenia do mieszania Dako Omnis.

1. Wyjąć fiolkę odczynnika *HER2 IQFISH pharmDx* (Dako Omnis) z zamrażarki
2. Załadować fiolkę do urządzenia Dako Omnis Mixing Device
3. Podłączyć urządzenie Mixing Device i upewnić się, że zielona lampka stanu jest włączona
4. Wybrać program „Rozmrażanie i mieszanie”. **Ważne:** Fiolki przechowywane w temperaturze **poniżej** -25°C należy rozmrozić (krótko) przed ich umieszczeniem w urządzeniu Dako Omnis Mixing Device i użyć programu „Mieszanie”.
5. Wyjąć fiolkę z urządzenia Mixing Device.
6. Otworzyć górną klapę korka, odgiąć ją do tyłu, a następnie wsunąć w przeznaczone dla niej miejsce aż do usłyszenia kliknięcia (szczegóły znajdują się w Podstawowym podręczniku użytkownika Dako Omnis).
7. Niezwłocznie załadować fiolkę do modułu Reagent Storage Module urządzenia Dako Omnis. Jeśli podczas barwienia używana jest funkcja ciągłego ładowania odczynników, należy upewnić się, że czas upływający od mieszania do pobrania z fiolki w urządzeniu Dako Omnis wynosi co najmniej 10 minut.

Sondę *HER2 IQFISH pharmDx* (Dako Omnis) można ponownie zamrażać i używać maksymalnie 10 razy.

Mieszankę sond *HER2 IQFISH pharmDx* (Dako Omnis) należy mieszać krótko przed jej załadowaniem do urządzenia. Nie należy wstrząsać fiolki. Całkowity okres stabilności sondy *HER2 IQFISH pharmDx ISH* (Dako Omnis) wynosi **80 godzin**, jeśli jest ona przechowywana w module Reagent Storage Module urządzenia Dako Omnis. Pozostały okres stabilności w urządzeniu jest kontrolowany przez oprogramowanie Dako Omnis (patrz wyżej). Po upływie czasu, przez jaki sonda *HER2 IQFISH pharmDx* (Dako Omnis) musi znajdować się w urządzeniu, należy ją niezwłocznie umieścić w temperaturze $< -18^{\circ}\text{C}$ (zalecana jest temperatura od -18°C do -25°C).

A.2 ISH Pre-Treatment Solution (20x) (Dako Omnis)

Przygotować roztwór roboczy poprzez rozcieńczenie koncentratu roztworu ISH Pre-Treatment Solution (20x) (Dako Omnis) w stosunku 1:20 w następujący sposób:

1. Napełnić butelkę na płyny 3,5 L Dako Omnis oznaczoną jako PTB (niebieska etykieta) do linii napełnienia wodą dejonizowaną (3,325 L). Przed napełnieniem umieścić butelkę na płyny na płaskiej powierzchni.
2. Przełączyć zawartość jednej butelki ze 175 mL koncentratu roztworu ISH Pre-Treatment Solution (20x) (Dako Omnis) do butelki na płyny.
3. Przenieść odczepianą etykietę z butelki po koncentracie na butelkę na płyny. Dokręcić nakrętkę i delikatnie odwrócić butelkę na płyny do góry dnem 2–3 razy.
4. Użyć ręcznego skanera kodów paskowych do identyfikacji odczynnika (zeskanować odczepianą etykietę i butelkę na płyny).
5. Natychmiast załadować butelkę na płyny do urządzenia Dako Omnis.

Jeśli rozcieńczony roztwór jest przechowywany w urządzeniu Dako Omnis, należy go zużyć w ciągu 7 dni. Pozostały okres stabilności w urządzeniu jest kontrolowany przez oprogramowanie Dako Omnis (patrz wyżej). Niewykorzystany rozcieńczony roztwór można przechowywać w temperaturze $2\text{--}8^{\circ}\text{C}$ przez 30 dni. Po przechowywaniu w chłodnym miejscu należy upewnić się, że przed załadowaniem do urządzenia Dako Omnis rozcieńczony roztwór jest ogrzany do co najmniej 18°C .

UWAGA: W przypadku zmętnienia rozcieńczony roztwór nie nadaje się do użycia.

A.3 ISH Stringent Wash Buffer (20x) (Dako Omnis)

Przygotować roztwór roboczy poprzez rozcieńczenie koncentratu buforu ISH Stringent Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) w stosunku 1:20 w następujący sposób:

1. Napełnić butelkę na płyny 3,5 L Dako Omnis oznaczoną jako PTB (niebieska etykieta) do linii napełnienia wodą dejonizowaną (3,325 L). Przed napełnieniem umieścić butelkę na płynie na płaskiej powierzchni.
2. Przełąć zawartość butelki ze 175 mL koncentratu buforu ISH Stringent Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) do butelki na płynie.
3. Przenieść odczepianą etykietę z butelki po koncentracie na butelkę na płynie. Dokręcić nakrętkę i delikatnie odwrócić butelkę na płynie do góry dnem 2–3 razy.
4. Użyć ręcznego skanera kodów paskowych Dako Omnis do identyfikacji odczynnika (zeskanować odczepianą etykietę i butelkę).
5. Natychmiast załadować butelkę do urządzenia Dako Omnis.

Jeśli rozcieńczony roztwór jest przechowywany w urządzeniu Dako Omnis, należy go zużyć w ciągu 7 dni. Pozostały okres stabilności w urządzeniu jest kontrolowany przez oprogramowanie Dako Omnis (patrz wyżej). Niewykorzystany rozcieńczony roztwór można przechowywać w temperaturze 2–8°C przez 30 dni. Po przechowywaniu w chłodnym miejscu należy upewnić się, że przed załadowaniem do urządzenia Dako Omnis rozcieńczony roztwór jest ogrzany do co najmniej 18°C.

UWAGA: W przypadku zmętnienia rozcieńczony roztwór nie nadaje się do użycia.

A.4 ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis)

Roztwór ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis) jest odczynnikiem gotowym do użycia. Przed jego załadowaniem do urządzenia Dako Omnis należy otworzyć górną klapę korka, odgiąć ją do tyłu a następnie wsunąć w przeznaczone dla niej miejsce aż do usłyszenia kliknięcia.

Całkowity okres stabilności roztworu ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis) wynosi **80 godzin**, jeśli jest on przechowywany w module Reagent Storage Module urządzenia Dako Omnis.

Pozostały okres stabilności w urządzeniu jest kontrolowany przez oprogramowanie Dako Omnis (patrz wyżej). Po wykonaniu analizy roztwór ISH Ethanol Solution, 96% można umieścić w temperaturze przechowywania (2–8°C), aby zachować czas stabilności w urządzeniu.

A.5 ISH Pepsin (Dako Omnis)

Odczynnik ISH Pepsin (Dako Omnis) jest odczynnikiem gotowym do użycia. Przed jego załadowaniem do urządzenia Dako Omnis należy upewnić się, że odczynnik jest rozmrożony, otworzyć górną klapę korka, odgiąć ją do tyłu, a następnie wsunąć w przeznaczone dla niej miejsce aż do usłyszenia kliknięcia.

Całkowity okres stabilności odczynnika ISH Pepsin (Dako Omnis) wynosi **80 godzin**, jeśli jest on przechowywany w module Reagent Storage Module urządzenia Dako Omnis. Pozostały okres stabilności w urządzeniu jest kontrolowany przez oprogramowanie Dako Omnis (patrz wyżej).

Po wykonaniu analizy odczynnik ISH Pepsin (Dako Omnis) należy umieścić w temperaturze przechowywania od -18 do 8°C, aby zachować czas stabilności w urządzeniu.

A.6 Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis)

Odczynnik Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) jest gotowym do użycia środkiem do zamykania preparatów stosowanym poza urządzeniem Dako Omnis. Po użyciu odczynnik Fluorescence Mounting Medium należy niezwłocznie umieścić w temperaturze przechowywania (2–8°C).

A.7 Dodatkowe akcesoria

Dodatkowo w urządzeniu Dako Omnis powinny znajdować się następujące akcesoria: wodę dejonizowaną; rozcieńczony bufor Wash Buffer 20x (Dako Omnis), nr kat. GC807; odczynnik

Clearify™ (Dako Omnis), nr kat. GC810, ISH Cleaning Solution, nr kat. GC207 oraz pokrywa ISH Lid (Dako Omnis), nr kat. GC102, opisane w podręcznikach użytkownika Dako Omnis.

B. Procedura barwienia — tkanka żołądka

B.1. Uwagi proceduralne

Odczynnik *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) jest sondą do hybrydyzacji wykorzystywaną w automatycznym teście bezpośredniej hybrydyzacji fluorescencyjnej in situ (FISH) w urządzeniu Dako Omnis i wraz z odczynnikami dodatkowymi GM300, GM301, GM302, GM303 i GM304 (GM304 poza urządzeniem) jest przeznaczona do ilościowego oznaczania amplifikacji genu *HER2*. Przed jej użyciem użytkownik powinien przeczytać dokładnie wszystkie instrukcje i zapoznać się ze wszystkimi elementami oraz odnoszącymi się do nich środkami ostrożności.

Automatyczna procedura w urządzeniu Dako Omnis obejmuje odparafinowanie skrawków tkankowych, odmaskowanie antygenu, trawienie pepsyną, hybrydyzację oraz głębokie płukanie. Preparaty są wyładowywane z suchej stacji Unloading Station. Wszystkie etapy protokołu zostały wstępnie zaprogramowane w oprogramowaniu Dako Omnis.

Aby uzyskać informacje na temat ładowania preparatów, pokrywy ISH Lid, odczynników itd., należy zapoznać się z podręcznikami użytkownika Dako Omnis. W oprogramowaniu Dako Omnis wstępnie zaprogramowano trzy poddane walidacji protokoły: *HER2* IQFISH: *HER2* IQFISH Pepsin Short, *HER2* IQFISH Pepsin Medium i *HER2* IQFISH Pepsin Long, które różnią się wyłącznie czasem trawienia pepsyną i które można wybrać dla każdego z pięciu preparatów w statywie na preparaty. Umożliwia to optymalizację trawienia tkanki, które może zależeć od warunków sprzed analizy. Za protokół standardowy uznaje się protokół *HER2* IQFISH Pepsin Medium. Poszczególne protokoły barwienia można przeglądać w stacji roboczej Dako Link Omnis.

Dodatkowo użytkownik może wybrać szablon protokołu IQFISH. Optymalne warunki mogą się zmieniać w zależności od rodzaju materiału oraz sposobu jego przygotowania i powinny być określone w każdym laboratorium.

B.2. Procedura przed barwieniem

1. W części z protokołami IQFISH oprogramowania stacji roboczej Dako Link Omnis wybrać protokół *HER2* IQFISH, który ma zostać zastosowany do każdego preparatu.
2. Wydrukować etykiety preparatów i przykleić je do szkiełek podstawowych.
3. Umieścić preparaty w statywie na preparaty. W celu uzyskania szczegółowych informacji zapoznać się z Podstawowym podręcznikiem użytkownika Dako Omnis. W statywie na preparaty może znajdować się od jednego do pięciu preparatów. Zaleca się, aby podczas barwienia odczynnikiem *HER2* IQFISH wybarwić co najmniej dwa preparaty.
4. Załadować statyw na preparaty do urządzenia Dako Omnis.
5. Załadować pokrywę ISH Lid (jedna pokrywa ISH Lid na każdy statyw na preparaty) do urządzenia Dako Omnis.
6. Upewnić się, że w urządzeniu Dako Omnis znajdują się butelki i są w nim zarejestrowane. Butelki z płynami: Clearify™ (środek oczyszczający), rozcieńczony roztwór ISH Pre-Treatment Solution (Dako Omnis), rozcieńczony bufor ISH Stringent Wash Buffer (Dako Omnis) oraz rozcieńczony bufor Wash Buffer (Dako Omnis).
7. Załadować odczynniki ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis), ISH Pepsin (Dako Omnis) świeżo wymieszany odczynnik *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) oraz ISH Cleaning Solution do modułu Reagent Storage Module. Upewnić się, że górne kłapy korków wszystkich fiolek są otwarte.
8. Postępować zgodnie z instrukcjami wyświetlanymi na ekranie dotykowym i dotknąć opcji „Gotowe”, aby rozpocząć procedurę barwienia.

B.3. Procedura barwienia

Procedurę barwienia odczynnikiem *HER2* IQFISH w urządzeniu Dako Omnis (podsumowaną w Tabeli 11) można monitorować w stacji roboczej Dako Link Omnis:

Tabela 11. Uproszczony przegląd etapów protokołu barwienia odczynnikami *HER2* IQFISH.

Etap	Odczynnik	Czas i temperatura
Odparafinowanie	Clearify™ (środek oczyszczający)	10 minut, 38°C
Odmaskowanie antygenu	ISH Pre-Treatment Solution (Dako Omnis)	15 minut, 97°C
Płukanie	ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis)	2 × 3 minuty, 32°C
Trawienie*	ISH Pepsin (Dako Omnis)	10 minut, 15 minut lub 20 minut
Suszenie		15 minut, 45°C
Denaturacja		10 minut, 66°C
Hybrydyzacja	<i>HER2</i> IQFISH pharmDx (Dako Omnis)	75 minut, 45°C
Głębokie płukanie	ISH Stringent Wash Buffer (Dako Omnis)	10 minut, 61°C

* W protokołach *HER2* IQFISH wymienionych powyżej można wybrać trzy poddane walidacji czasy trawienia pepsyną.

Jeśli nie są planowane kolejne barwienia ISH, wszystkie odczynniki należy umieścić w zalecanych temperaturach przechowywania.

B.4. Procedura po barwieniu

Wyładować preparaty i zastosować do 30 µL środka Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) zawierającego DAPI na obszar docelowy preparatu. Preparat tkankowy musi zostać całkowicie pokryty produktem Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis). Nałożyć szkiełko nakrywkowe.

UWAGA: Odczyt odczynu można przeprowadzić po 15 minutach od momentu zatopienia lub przed upływem 7 dni. Jednakże w przypadku kontaktu preparatów ze światłem lub wysokimi temperaturami może dochodzić do utraty zabarwienia. Aby zminimalizować płowienie barwy, preparaty należy przechowywać w ciemnym miejscu w temperaturze od -18 do 8°C.

Kontrola jakości — tkanka żołądka

- Sygnaly muszą być jasne, wyraźne i łatwe do oceny.
- Komórki prawidłowe pozwalają na wewnętrzną kontrolę serii barwień.
 - Komórki zdrowe powinny dawać 1–2 wyraźnie widocznych sygnałów zielonych, sygnalizując prawidłową hybrydyzację sondy CEN-17 PNA z centromerowym regionem chromosomu 17.
 - Komórki zdrowe powinny również dawać 1–2 wyraźnie widocznych sygnałów czerwonych, sygnalizując prawidłową hybrydyzację sondy *HER2* DNA z genami *HER2*.
 - Ze względu na skrawanie tkanek niektóre zdrowe komórki będą dawać mniej niż oczekiwane dwa sygnały każdego koloru.
 - Brak sygnałów w komórkach zdrowych wskazuje na niepowodzenie testu, a uzyskane wyniki należy unieważnić.
- Ocena morfologii jąder dokonywana przy użyciu filtra DAPI nie powinna wykazywać jakichkolwiek nieprawidłowości. Duża liczba komórek pustych i ogólnie zaburzona morfologia jąder wskazuje na nadmierne wytrawienie preparatu, prowadzące do utraty lub rozproszenia sygnałów. Wyników z takich preparatów nie należy brać pod uwagę.
- Dostępnych musi być co najmniej 20 komórek guza.

5. Różnice w metodach utrwalania, przetwarzania i zatapiania tkanek stosowanych w laboratorium użytkownika mogą powodować istotne różnice wyników, wymagające regularnego dokonywania oceny kontroli wewnętrznych.

Interpretacja wyniku barwienia — tkanka żołądka

Tkanka nadająca się do oceny

Zlokalizować komórki nowotworowe w obrębie wybarwionego techniką HE preparatu i ocenić ten sam obszar preparatu barwionego metodą FISH (przy użyciu filtra DAPI). Analizować należy wyłącznie próbki pochodzące od chorych, u których występuje gruczolakorak żołądka lub gruczolakorak żołądka i przełyku. W przypadku występowania metaplastyki nabłonka żołądka w nabłonek jelitowy i gruczolakoraka w tym samym preparacie, należy oceniać tylko składnik nowotworu. Unikać obszarów ciężkiego zapalenia, martwicy i o niejednoznacznych granicach jądra komórkowego. Nie uwzględniać jąder wymagających oceny subiektywnej. Nie uwzględniać jąder dających sygnał o słabym nasileniu oraz o nieswoistym lub wysokim tle.

W pierwszej kolejności ocenić przy użyciu mikroskopu odpowiednio cały obszar preparatu barwionego metodą FISH oraz w obrębie obszaru wybarwionego techniką HE. Przed zliczaniem preparatu barwionego metodą FISH należy sprawdzić rozłożenie sygnału (jednorodny czy heterogeny) na karcie zliczania sygnałów. W przypadku rozłożenia heterogennego należy sprawdzić, czy amplifikacja występuje w ogniskach, czy w pojedynczych komórkach (wzór mozaikowy).

1) Jednorodne rozłożenie sygnału

W przypadku jednorodnego rozłożenia sygnału należy odpowiednio zliczyć centromery chromosomu (sygnały zielone) oraz geny *HER2* (sygnały czerwone) z 20 komórek w 1–2 reprezentatywnych obszarach guza.

2) Heterogenne rozłożenie sygnału

W przypadku, gdy rozkład sygnału jest niejednorodny, należy zliczyć łącznie 20 komórek z wybranych obszarów, postępując w sposób opisany poniżej:

- A) jeśli występuje amplifikacja ogniskowa, należy wybierać obszary komórek z amplifikacją;
- B) jeśli występuje rozłożenie mozaikowe lub obecne są komórki z amplifikacją, polisomalne i disomalne, do zliczania należy wybierać obszary komórek z amplifikacją. W obszarach tych zliczać należy nie tylko komórki z amplifikacją, lecz również sąsiadujące komórki bez amplifikacji aż do sumarycznej liczby 20 komórek.

Jeśli to możliwe, nie wybierać obszarów nakładających się.

Pomijanie wybarwionego DNA bakteryjnego

Liczne komórki wyspecjalizowane (komórki tuczne i makrofagi), rozproszone w tkance żołądka wykazują wysoki poziom wybarwienia sondą *HER2* ze względu na obecność DNA bakteryjnego. Ma to wpływ na występowanie silnie fluoryzujących na czerwono komórek, które wyraźnie odróżniają się od komórek guza z wysoką amplifikacją genu *HER2*.

Zliczanie sygnału

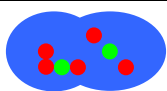

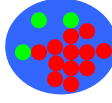

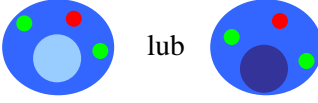

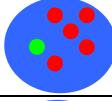
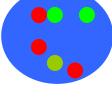

Po wybraniu obszaru do oceny sygnału należy rozpocząć analizę jednego z 20 sąsiadujących jąder, a następnie zliczać metodą komórka po komórce z pominięciem jąder, które nie spełniają kryteriów jakościowych. Zlokalizować komórki nowotworowe w obrębie wybarwionego techniką HE preparatu i ocenić ten sam obszar preparatu barwionego metodą FISH. Zbadać cały wybarwiony preparat w celu uwzględnienia możliwej heterogeniczności. Wybrać obszar z równomiernym rozkładem jąder. Rozpocząć analizę w górnej lewej ćwiartce wybranego obszaru i przesuwać się od lewej do prawej, zliczać liczbę sygnałów w obrębie granic każdego analizowanego jądra według poniższych wskazówek (patrz również załącznik 5).

- Zmieniać ostrość, aby móc zauważyć wszystkie sygnały w poszczególnych jądrach
- Dwa sygnały o tej samej wielkości w odległości równej lub mniejszej od średnicy sygnału zliczać jako jeden. Aby zliczyć dwa oddzielne sygnały, ta odległość musi być co najmniej równa średnicy sygnału normalnej wielkości. Jeśli odległość pomiędzy dwoma sygnałami jest mniejsza niż średnica sygnału, są one zliczane jako jeden.

- W jądrach o wysokim poziomie amplifikacji genu *HER2* sygnały dla *HER2* mogą znajdować się bardzo blisko siebie, tworząc skupisko sygnałów. W takich przypadkach nie ma możliwości zliczenia sygnałów *HER2* i należy przeprowadzić oszacowanie. Szczególną uwagę należy zwrócić na sygnały zielone, ponieważ skupiska sygnałów czerwonych *HER2* mogą pokrywać sygnały zielone, uniemożliwiając ich dostrzeżenie. W razie wątpliwości należy skontrolować sygnały zielone przy użyciu odpowiedniego filtra FITC.

Nie oceniać jąder bez zabarwienia lub z sygnałem o tylko jednej barwie. W ocenie uwzględniać tylko te jądra, które dają jeden lub więcej sygnałów FISH każdego koloru.

Wskazówki do zliczania sygnałów

1		Nie zliczać. Jądra komórkowe nakładają się na siebie, nie wszystkie obszary jąder są widoczne
2		Dwa sygnały zielone; nie uwzględniać jąder dających sygnały tylko jednej barwy
3		Zliczyć jako 3 sygnały zielone i 12 sygnałów czerwonych (oszacowanie skupiska)
4		Zliczyć jako 1 sygnał zielony i 1 sygnał czerwony. Dwa sygnały tej samej wielkości w odległości równej lub mniejszej od średnicy pojedynczego sygnału zlicza się jako jeden sygnał
5		Nie zliczać (jądro wytrawione nadmiernie lub niedotrąwione). Brak sygnałów w centrum jądra (jądra pierścieniowate).
6		Zliczyć jako 2 sygnały zielone i 3 sygnały czerwone. Dwa sygnały tej samej wielkości w odległości równej lub mniejszej od średnicy pojedynczego sygnału zlicza się jako jeden sygnał
7		Zliczyć jako 1 sygnał zielony i 5 sygnałów czerwonych
8		Zliczyć jako 3 sygnały zielone (1 zielony sygnał nieostry) i 3 sygnały czerwone
9		Skupisko sygnałów czerwonych, zakrywających sygnały zielone. Sprawdzić liczbę sygnałów zielonych przy użyciu odpowiedniego filtra FITC lub wcale nie zliczać

W tabeli zapisać wyniki w sposób przedstawiony w załącznikach 3 i 4.

Zliczyć sygnały 20 jąder na próbkę tkanki, o ile to możliwe — w różnych obszarach guza.

Obliczyć wskaźnik *HER2/CEN-17*, dzieląc całkowitą liczbę czerwonych sygnałów *HER2* przez całkowitą liczbę zielonych sygnałów *CEN-17*.

Wycinki o wskaźniku *HER2/CEN-17* większym lub równym 2 należy traktować jako wykazujące amplifikację genu *HER2* (29).

Wyniki o wartości granicznej lub do niej zbliżonej (1,8–2,2) należy interpretować z dużą ostrożnością.

Jeśli wskaźnik ma wartość graniczną (1,8–2,2), należy zliczyć sygnały 40 różnych jąder i obliczyć wskaźnik dla 40 jąder komórkowych. Jeśli zliczanie dąży do wartości granicznej, obowiązuje

wynik z drugiej oceny. Podczas drugiego zliczania, w celu lepszej orientacji należy uwzględnić znakowanie immunohistochemiczne sondą HER2, jeśli dostępne.

W przypadku wątpliwości preparat należy poddać ponownej ocenie. W przypadkach granicznych niezbędne jest przeprowadzenie konsultacji patologa i lekarza prowadzącego leczenie pacjenta.

Ograniczenia — tkanka żołądka

1. Do użytku zautomatyzowanego wyłącznie w urządzeniach Dako Omnis.
2. Przygotowywanie tkanek i preparatów oraz interpretacja wyników barwienia IQFISH wymagają specjalistycznego przeszkolenia. Interpretacja wyników barwienia odczynnikiem *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) nie powinna być przeprowadzana przez osoby z zaburzeniami widzenia barw.
3. W metodzie FISH wyniki zależą od przygotowania i obróbki tkanki przed barwieniem. Niewłaściwe utrwalanie, płukanie, suszenie, ogrzewanie, krojenie preparatów lub zanieczyszczenie innymi tkankami bądź płynami, może wpływać na hybrydyzację sondy. Przyczyną sprzecznych wyników może być stosowanie zmiennych metod utrwalania i zatapiania lub naturalne zmienne czynniki związane z tkankami.
4. Do odpowiedzialności użytkownika należy zatwierdzenie szablonu protokołu IQFISH

Charakterystyka pracy — tkanka żołądka

Wydajność hybrydyzacji

Wydajność hybrydyzacji odczynnika *HER2* IQFISH pharmDx badano w trzech ośrodkach z użyciem 180 skrawków tkankowych utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie. We wszystkich 180 skrawkach tkankowych można było zastosować zliczanie zgodne z wytycznymi. Wydajność hybrydyzacji wyniosła 100%.

Wskaźniki *HER2*/CEN-17 obliczone i użyte w badaniach charakterystyki wydajności są oparte na zliczaniu sygnałów 20 jąder komórkowych według wytycznych zliczania podanych w rozdziale „Interpretacja wyniku barwienia” niniejszej instrukcji obsługi.

Czułość analityczna

Czułość analityczną odczynnika *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) badano, używając 20 różnych wycinków gruczolaka żołądka (10 próbek z amplifikacją genu *HER2* oraz 10 próbek bez amplifikacji). Stosunek między liczbą sygnałów *HER2* i sygnałów CEN-17 wyznaczono na podstawie zliczenia sygnałów w 20 jądrach komórek prawidłowych w próbce tkankowej. Wskaźnik *HER2*/CEN-17 w 20 próbkach tkanek gruczolaka żołądka wyniósł od 0,94 do 1,19.

Swoistość analityczna

Sondy *HER2* DNA w odczynniku *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) są w końcowej fazie sekwencjonowane i mapowane, aby uzyskać potwierdzenie całkowitego pokrycia 218 kb zawierających gen *HER2*.

Sondy CEN-17 PNA w odczynniku *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) zostały przetestowane osobno i w połączeniu w celu potwierdzenia ich swoistej hybrydyzacji do regionu centromeru chromosomu 17.

Aby wykluczyć hybrydyzację krzyżową do chromosomów innych niż chromosom 17, badania przeprowadzono w fazie metafazy zgodnie ze standardowymi procedurami Dako QC. Swoistość hybrydyzacji mieszaniny sond *HER2* DNA oraz CEN-17 PNA została oceniona łącznie dla 275 preparatów metafazowych o różnych sygnałach. We wszystkich 275 przypadkach hybrydyzacja była swoista dla chromosomu 17. W żadnym z 275 przypadków nie zaobserwowano hybrydyzacji krzyżowej do loci na innych chromosomach. Swoistość sondy wyniosła więc 100% (275 na 275).

W celu pomiaru zdolności testu IQFISH do identyfikowania wyłącznie antygenów docelowych — genu *HER2* i regionu CEN-17 — bez zakłóceń ze strony innych substancji badania przeprowadzono na wycinkach gruczołakoraka żołądka bez użycia sond *HER2* ani CEN-17 z mieszaniny hybrydyzacyjnej i z użyciem tylko buforu hybrydyzacyjnego. Łącznie oceniono 20 wycinków pod kątem obecności sygnałów niezwiązanych z mieszaniną sond. W żadnym z 20 wycinków nie wykryto innych obszarów docelowych na chromosomach ani zakłóceń ze strony bardzo podobnych substancji.

Badania wrażliwości wyników

Wrażliwość testu *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) oceniano, używając różnych stężeń sond PNA, czasów odmaskowania antygeny, czasów inkubacji z pepsyną, czasów denaturacji, czasów hybrydyzacji i czasów głębokiego płukania oraz temperatur. Różne parametry oceniano w trzech wycinkach tkanek gruczołakoraka żołądka oraz w dwóch wycinkach gruczołakoraka połączenia żołądkowo-przełykowego utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie (w każdej grupie znajdowały się wycinki tkanek zarówno z amplifikacją, jak i bez amplifikacji).

Stosowano zarówno mniejsze, jak i większe niż w standardowym protokole wartości wszystkich parametrów, za wyjątkiem stężenia sondy PNA oraz temperatury głębokiego płukania, dla których użyto wartości zgodnych ze standardowym protokołem.

Testowano następujące parametry:

Stężenie sondy PNA: testowano przy 100% i +/-17%.

Czas odmaskowania antygeny: testowano przy 13 min 45 s i 16 min 15 s.

Czas inkubacji z pepsyną: testowano przy 14 min 45 s i 16 min 15 s.

Czas denaturacji: testowano przy 9 min 45 s i 10 min 45 s.

Czas hybrydyzacji: testowano przy 70 min i 80 min.

Czas głębokiego płukania: testowano przy 8 min 45 s i 11 min 15 s.

Temperatura głębokiego płukania: testowano przy 59°C, 61°C i 63°C.

Oceniano trzy stężenia sond PNA, używając planów frakcyjnych doświadczeń (narzędzie JMP, SAS), w których zastosowano 12 różnych protokołów barwienia przedstawionych w Tabeli 12.

Tabela 12. Dwanaście różnych protokołów barwienia zastosowanych do badania wrażliwości wyników.

Protokół badania wrażliwości wyników nr	Badany parametr						
	Czas odmaskowania antygeny (min)	Czas trawienia pepsyną (min)	Czas denaturacji (min)	Czas hybrydyzacji (min)	Czas głębokiego płukania (min)	Temperatura głębokiego płukania (°C)	Stęż. PNA w miesz. sond
1	16,25	16,25	9,75	80	8,75	59	83%
2	13,75	14,75	10,75	70	8,75	59	100%
3	16,25	14,75	9,75	70	8,75	63	100%
4	13,75	14,75	10,75	80	8,75	61	83%
5	13,75	14,75	9,75	80	11,25	59	117%
6	13,75	16,25	10,75	70	11,25	63	83%
7	13,75	16,25	10,75	70	11,25	63	100%
8	16,25	14,75	9,75	70	11,25	61	83%
9	13,75	16,25	9,75	70	8,75	61	117%
10	16,25	16,25	10,75	70	11,25	59	117%
11	16,25	16,25	10,75	80	11,25	61	100%
12	16,25	14,75	10,75	80	8,75	63	117%

Każda z pięciu próbek tkanek była barwiona za pomocą wszystkich 12 protokołów.

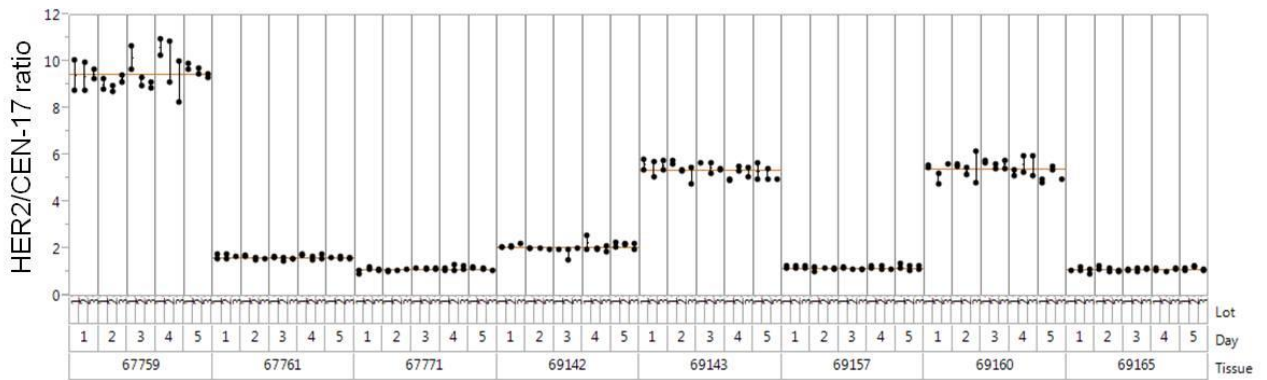
W celu oceny wrażliwości odczytywana była intensywność sygnału oraz jakość morfologii. Używając wszystkich protokołów wybarwiono wszystkie próbki tkanek (łącznie 60 barwień) i otrzymano sygnały, które były jasne, wyraźnie odróżniające się i łatwe do oceny, przez co odpowiednie do zliczania.

Ponadto oceniano wpływ grubości tkanki na wyniki testu *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis), używając różnej grubości skrawków tkanek nowotworu żołądka utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie.

Łącznie badano pięć kolejnych skrawków gruczolakoraka żołądka o różnych grubościach (2, 3, 4, 5, 6 i 7 µm) za pomocą testu *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis). Średni współczynnik zmienności wskaźnika *HER2/CEN-17* wyniósł 3,9% (w zakresie od 3,2% do 5,0%).

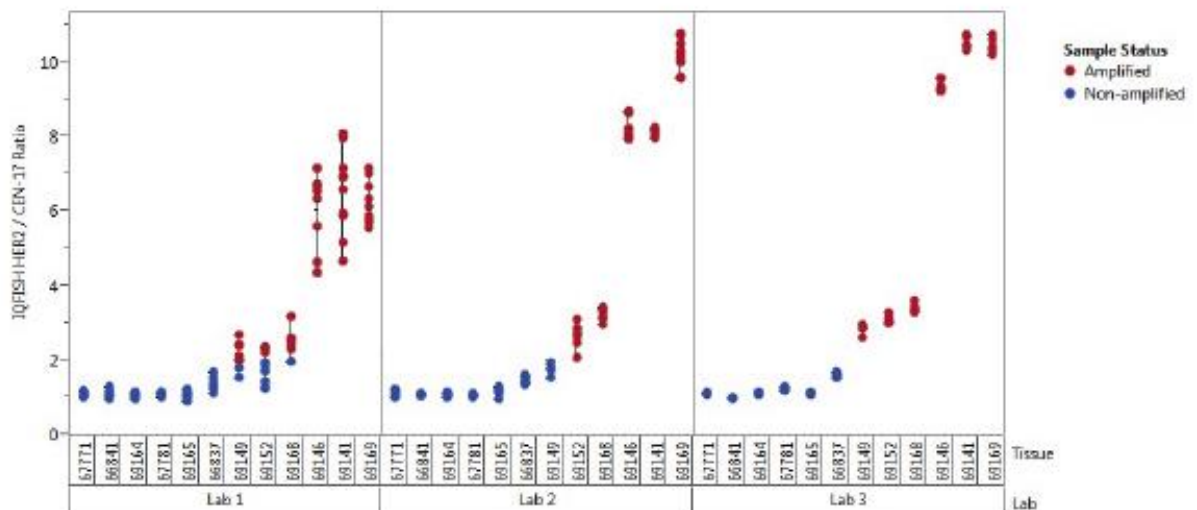
Odtwarzalność

Odtwarzalność wyników w laboratorium między dniami i seriami badano za pomocą testu *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis). Metodą ślepej próby przeprowadzono wewnętrzne, randomizowane badanie wskaźników *HER2/CEN-17*, używając skrawków z ośmiu różnych wycinków nowotworu żołądka, w tym połączenia żołądkowo-przłykowego, utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie o różnych poziomach amplifikacji genu *HER2*. Te osiem wycinków badano za pomocą testu HercepTest™. Wśród nich dwa charakteryzowały się nadekspresją białka *HER2* na poziomie IHC 0/1+, dwa — *HER2* IHC 2+, dwa — *HER2* IHC 3+ i dwa wykazywały wcześniej określony wskaźnik *HER2/CEN-17* FISH wynoszący 1,5–2,5 stwierdzony na podstawie testu *HER2* IQFISH pharmDx (nr kat. K5731). Każdy wycinek barwiono w pięciu nienastępujących po sobie dniach za pomocą odczynników *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) pochodzących z trzech różnych serii. W całym badaniu przeprowadzono łącznie 240 barwień tkanek, ponieważ dwukrotnie wykonano barwienie w każdej kombinacji. Zmienność wskaźników pomiędzy dniami i seriami odczynnika przedstawiono na Rysunku 8. Dane analizowano za pomocą przekształcenia Boxa-Coxa z zastosowaniem modelu z efektem zmiennym w celu uzyskania jednorodności wariancji danych. Całkowity współczynnik zmienności wyniósł 6,5% i stwierdzono, że zmienność między dniami i seriami odczynnika odpowiada odpowiednio za 0,7% i 0,8% zmienności.



Rysunek 8. Wskaźniki *HER2/CEN-17* uzyskane na podstawie badania odtwarzalności wewnątrz laboratorium za pomocą testu *HER2 IQFISH pharmDx* (Dako Omnis), w tym punkty końcowe odtwarzalności między seriami odczynnika i dniami. Średnią wartość dla każdej próbki tkanki przedstawiono za pomocą linii poziomej.

Dodatkowo oceniano odtwarzalność testu *HER2 IQFISH pharmDx* (Dako Omnis) między dniami i ośrodkami w trzech zewnętrznych ośrodkach (dwa w Stanach Zjednoczonych i jeden w Europie) w badaniu ze stratyfikacją przeprowadzonym metodą ślepej próby na skrawkach tkanek z 12 różnych wycinków nowotworu żołądka, w tym połączenia żołądkowo-przełykowego, utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie. Trzy wycinki charakteryzowały się nadekspresją białka *HER2* na poziomie IHC 0/1+, trzy — *HER2* IHC 2+, trzy — *HER2* IHC 3+ i trzy wykazywały wcześniej określony wskaźnik *HER2/CEN-17* FISH wynoszący 1,5–2,5, stwierdzony odpowiednio na podstawie testów HercepTest™ oraz *HER2 IQFISH pharmDx* (nr kat. K5731). Wycinki barwiono i analizowano w ośrodkach badawczych. Każdy wycinek był barwiony co najmniej siedem razy w siedmiu nienastępujących po sobie dniach i oceniany przez jednego obserwatora w każdym ośrodku. Wybarwiono i uwzględniono w analizie statystycznej 314 skrawków. Dane analizowano za pomocą przekształcenia Boxa-Coxa i obliczono składniki wariancji. Całkowity współczynnik zmienności oparty na górnej granicy 95% przedziału ufności wyniósł 24%. Zmienność wskaźnika *HER2/CEN-17* między dniami i ośrodkami przedstawiono na Rysunku 9.



Rysunek 9. Wykres zmienności wskaźników *HER2/CEN-17* w nieprzekształconych jednostkach uzyskany w badaniu odtwarzalności testu *HER2 IQFISH pharmDx* (Dako Omnis) między dniami i ośrodkami przeprowadzonymi na próbkach tkanek nowotworu żołądka.

Test *HER2 IQFISH pharmDx* (Dako Omnis) oceniano pod kątem odtwarzalności między obserwatorami jako część wewnętrznego badania porównawczego metod przeprowadzonego z udziałem trzech obserwatorów niezależnie oceniających barwione wycinki. Odtwarzalność oceniano z użyciem 139 różnych wycinków gruczolakoraka żołądka z amplifikacją lub bez

amplifikacji genu *HER2*. Dane analizowano za pomocą przekształcenia Boca-Coxa. Średni współczynnik zmienności między obserwatorami wyniósł 18%. Wśród wycinków gruczolakoraka 96,4% pochodziło z resekcji, a 5,6% — z biopsji. 81,3% wycinków uzyskano z żołądka, natomiast 18,7% — z połączenia żołądkowo-przełykowego.

Powtarzalność

Powtarzalność testu *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) w laboratorium oceniano w kolejnych skrawkach z ośmiu wycinków gruczolakoraka żołądka z lub bez amplifikacji genu *HER2*. Tkanki badano podwójnie w pięciu nienastępujących po sobie dniach, używając trzech różnych serii odczynnika w łącznie 240 preparatach (120 skrawków poddanych podwójnej ocenie). Zastosowanie modelu z efektem zmiennym w analizie danych dało w wyniku zmienność przypisywaną dniom i seriom odczynnika (patrz badanie odtwarzalności wewnętrznej powyżej). Wariancja reszt stanowi różnicę między powtórzeniami i tym samym powtarzalność. Górna granica 95% przedziału ufności współczynnika zmienności powtarzalności wynosi 7,1%.

Badanie porównawcze metod

Porównanie testów *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis) i *HER2* IQFISH pharmDx (K5731)

W badaniu uwzględniono 140 wycinków nowotworów żołądka, w skład których weszły różne typy tkankowe gruczolakoraka żołądka, tj. samego żołądka lub połączenia żołądkowo-przełykowego, pochodzące z resekcji lub biopsji oraz z homogennym lub heterogennym (ogniskowym lub mozaikowym) rozłożeniem sygnału (patrz Tabela 13).

Tabela 13. Rozkład wycinków według typu nowotworu żołądka (żołądek lub połączenie żołądkowo-przełykowe), rodzaju rozłożenia sygnału (homogenny lub heterogenny) i typu tkanki (z resekcji lub biopsji).

Typ nowotworu żołądka	Liczba wycinków	Rozłożenie sygnału	Liczba wycinków	Rodzaj tkanki	Liczba wycinków
Żołądek	113	Homogenne	58	Z resekcji	134
Połączenie żołądkowo-przełykowe	27	Heterogenne — ogniskowe	61	Z biopsji	6
		Heterogenne — mozaikowe	21		
Razem	140	Razem	140	Razem	140

Wśród wycinków 76 nie wykazywało amplifikacji genu *HER2*, 64 wykazywały amplifikację genu *HER2* i dla wszystkich znano wynik testu HercepTest™ (patrz Tabela 14).

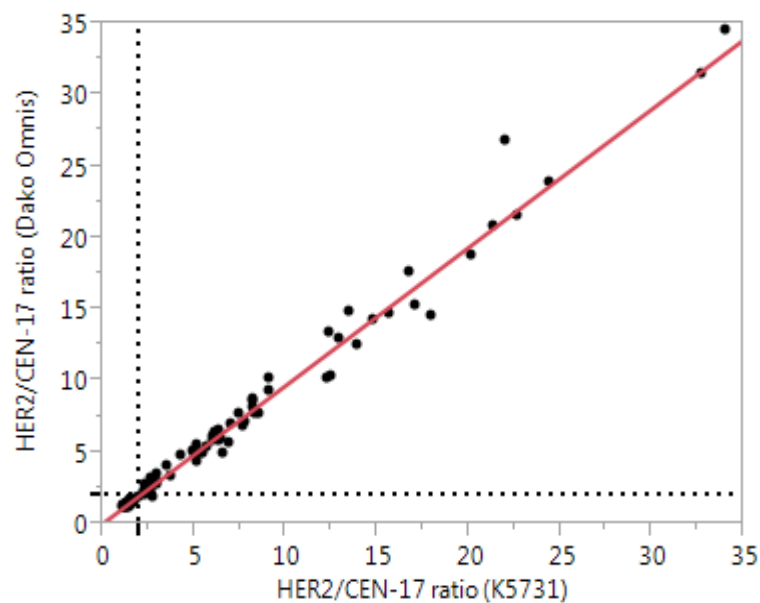
Tabela 14. Rozkład wycinków na podstawie wyników HercepTest™ i *HER2* FISH uzyskanego za pomocą testu *HER2* FISH pharmDx Kit (nr kat. K5731).

Wynik barwienia HercepTest™	0	1+	2+	3+	Razem
n	39	14	45	42	140
Status <i>HER2</i> w teście FISH					
Z amplifikacją	4	1	19	40	64
Brak amplifikacji	35	13	26	2	76
Łączna liczba wycinków badanych metodą FISH	39	14	45	42	140

W 15 przedstawiono wyniki tabelaryzacji krzyżowej statusu *HER2* uzyskanego za pomocą tych dwóch testów oraz całkowity odsetek zgodności (ang. overall percent agreement, OPA), odsetek zgodności wyników pozytywnych (ang. positive percent agreement, PPA) i odsetek zgodności wyników negatywnych (ang. negative percent agreement, NPA). Tabela 15 Korelację wskaźników *HER2*/CEN-17 uzyskanych za pomocą tych dwóch testów przedstawiono na Rysunku 10.

Tabela 15. Tabela krzyżowa statusu genu *HER2* ocenionego za pomocą testów *HER2* IQFISH pharmDx (K5731) i *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis).

		Status genu <i>HER2</i> (K5731)		Razem
		Brak amplifikacji	Z amplifikacją	
Status genu <i>HER2</i> (Dako Omnis)	Brak amplifikacji	76	1	77
	Z amplifikacją	0	63	63
Razem		76	64	140
OPA: 99,3%				
PPA: 98,4%				
NPA: 100%				



Rysunek 10. Korelacja wskaźników *HER2*/CEN-17 uzyskanych za pomocą testów *HER2* FISH pharmDx (Dako Omnis) i *HER2* IQFISH pharmDx (nr kat. K5731) przeprowadzonych na 140 wycinkach nowotworów żołądka (dopasowanie liniowe: $y = 0,06 + 0,97 \cdot x$; $R^2 = 0,97$. W dopasowaniu liniowym zastosowano wagę w postaci odwrotności wariancji).

95% przedział ufności dla średniej różnicy między tymi dwiema metodami barwienia przy wskaźniku *HER2*/CEN-17 = 2 wyniósł [0,007; 0,022]. Oznacza to, że oczekiwana różnica nie przekracza 2%.

Dane kliniczne

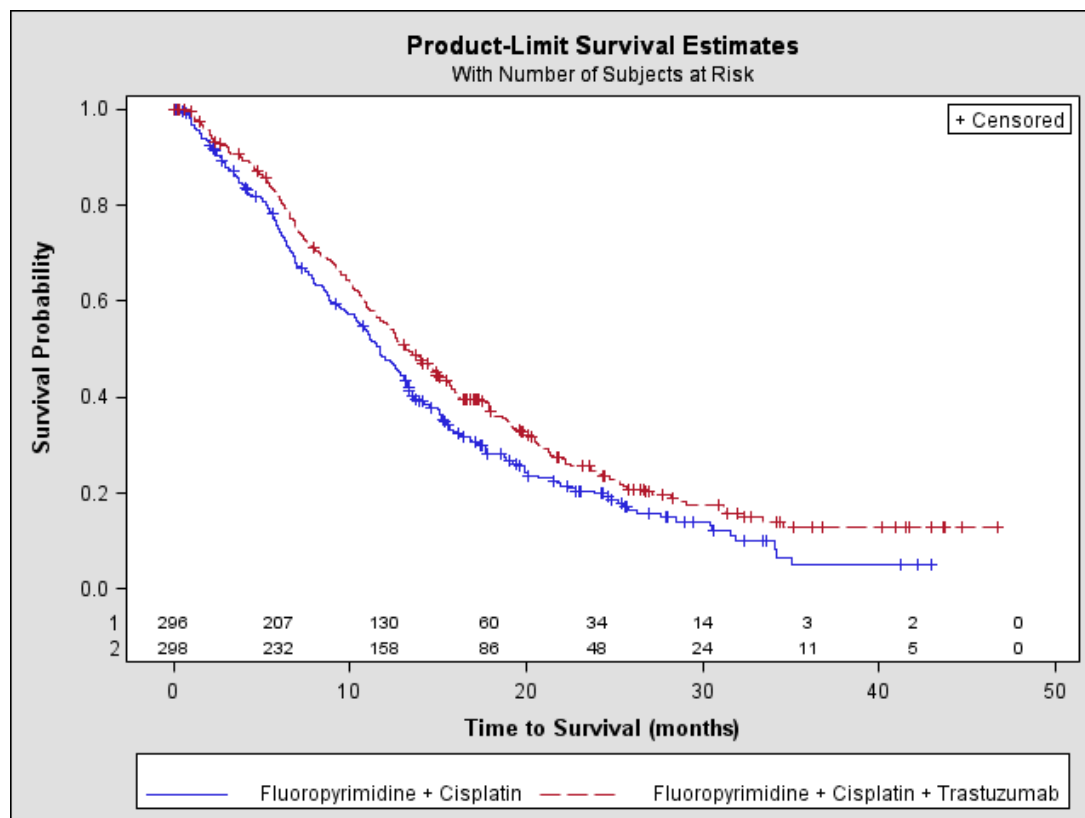
Bezpieczeństwo kliniczne i skuteczność trastuzumabu (Herceptin™) wykazano w badaniu BO18255 (badanie ToGA — „Otwarte, randomizowane, wieloośrodkowe badanie fazy III porównujące trastuzumab w skojarzeniu z cisplatyną i fluoropirymidyną (kapecytabiną lub 5-fluorouracylem) (FC+H) oraz samą chemioterapię (FC) jako leczenie pierwszego rzutu u pacjentów z *HER2*-dodatnim zaawansowanym nowotworem żołądka”) (28). Przeprowadzono otwarte, randomizowane, wieloośrodkowe badanie fazy III u pacjentów z *HER2*-dodatnim zaawansowanym gruczolakorakiem żołądka lub połączenia żołądkowo-przełykowego. W badaniu BO18255 pozytywność *HER2* zdefiniowano jako pozytywny wynik IHC (3+) w teście HercepTest™ (Dako) i/lub pozytywny wynik FISH (*HER2*/CEN-17 $\geq 2,0$) w teście *HER2* FISH pharmDx Kit (Dako). Wybrani losowo pacjenci byli poddawani chemioterapii (preparatem 5-FU lub capecytabine oraz cisplatin) lub chemioterapii razem z przyjmowaniem preparatu trastuzumab.

Głównym punktem końcowym skuteczności był całkowity czas przeżycia (overall survival, OS) analizowany za pomocą stratyfikowanego testu logarytmicznego rang. Końcowa analiza całkowitego czasu przeżycia uwzględniająca 351 zgonów była istotna statystycznie (nominalny poziom istotności 0,0193). Jeden rok po analizie końcowej dodatkowo przeprowadzono zaktualizowaną analizę całkowitego czasu przeżycia. Średni całkowity czas przeżycia wynoszący 13,5 miesiąca w przypadku pacjentów leczonych produktem Herceptin™ oraz chemioterapią był istotnie dłuższy niż średni całkowity czas przeżycia wynoszący 11,0 miesięcy w przypadku pacjentów leczonych wyłącznie chemioterapią. Wyniki skuteczności zarówno w końcowej, jak i w zaktualizowanej analizie przedstawiono w Tabeli 16 oraz na Rysunku 11.

Tabela 16. Całkowity czas przeżycia w populacji z zaplanowanym leczeniem.

	Grupa FC N=296	Grupa FC + H N=298
Końcowy całkowity czas przeżycia		
Liczba zgonów (%)	184 (62,2%)	167 (56,0%)
Mediana	11,0	13,5
95% CI (miesiące)	(9,4; 12,5)	(11,7; 15,7)
Hazard względny	0,73	
95% CI	(0,60; 0,91)	
wartość p*, dwustronna	0,0038*	
Zaktualizowany całkowity czas przeżycia		
Liczba zgonów (%)	227 (76,7%)	221 (74,2%)
Mediana	11,7	13,1
95% CI (miesiące)	(10,3; 13,0)	(11,9; 15,1)
Hazard względny	0,80	
95% CI	(0,67; 0,97)	

*W porównaniu z nominalnym poziomem istotności 0,0193



Rysunek 11. Zaktualizowany całkowity czas przeżycia pacjentów z przerzutowym nowotworem żołądka

Eksploracyjną analizę całkowitego czasu przeżycia opartą na badaniu amplifikacji genu (FISH) i nadekspresji białka (IHC) przedstawiono w Tabeli 17.

Tabela 17. Analiza eksploracyjna według statusu HER2 z wynikami zaktualizowanego całkowitego czasu przeżycia.

	FC N=296^a	FC+H N=298^b
Podgrupa FISH+ / IHC 0, 1+ (N=133)		
Liczba zgonów / n (%)	57/71 (80,3%)	56/62 (90,3%)
Średni całkowity czas przeżycia (miesiące)	8,8	8,3
95% CI (miesiące)	(6,4; 11,7)	(6,2; 10,7)
Hazard względny (95% CI)	1,33 (0,92; 1,92)	
Podgrupa FISH+ / IHC2+ (N=160)		
Liczba zgonów / n (%)	65/80 (81%)	64/80 (80%)
Średni całkowity czas przeżycia (miesiące)	10,8	12,3
95% CI (miesiące)	(6,8; 12,8)	(9,5; 15,7)
Hazard względny (95% CI)	0,78 (0,55; 1,10)	
Podgrupa FISH+ lub FISH-/IHC3+^c (N=294)		
Liczba zgonów / n (%)	104/143 (73%)	96/151 (64%)
Średni całkowity czas przeżycia (miesiące)	13,2	18,0
95% CI (miesiące)	(11,5; 15,2)	(15,5; 21,2)
Hazard względny (95% CI)	0,66 (0,5; 0,87)	

Średni czas przeżycia określono na podstawie krzywych Kaplana-Meiera.

- ^a Z analiz wykluczono dwóch pacjentów z grupy FC ze statusem FISH+ i nieznanym statusem IHC.
- ^b Z analiz wykluczono pięciu pacjentów leczonych produktem Herceptin™ ze statusem FISH+ i nieznanym statusem IHC.
- ^c Obejmuje 6 pacjentów leczonych wyłącznie chemioterapią i 10 pacjentów leczonych produktem Herceptin™ ze statusem FISH-, IHC3+ oraz 8 pacjentów leczonych wyłącznie chemioterapią i 8 pacjentów leczonych produktem Herceptin™ z nieznanym statusem FISH i statusem IHC3+.

Rozwiązywanie problemów — tkanka żołądka

Problem	Prawdopodobna przyczyna	Zalecane postępowanie
1. Brak sygnałów lub słabe sygnały	<p>1a. Podczas transportu lub przechowywania odczynniki narażone były na działanie wysokich temperatur</p> <p>1b. Mikroskop nie działa prawidłowo</p> <ul style="list-style-type: none"> - Nieodpowiedni zestaw filtrów - Nieodpowiednia lampa - Zużyta lampa rtęciowa - Zabrudzone i/lub popękane soczewki zbierające - Nieodpowiedni olejek imersyjny <p>1c. Zanikanie sygnałów</p> <p>1d. Bufory błędnie zidentyfikowane</p>	<p>1a. Sprawdzić warunki przechowywania. Należy upewnić się, że w otrzymanych przesyłkach z mieszanką sond IQISH i pepsyną obecny był suchy lód. Upewnić się, że odczynniki były przechowywane zgodnie z zaleceniami.</p> <p>1b. Należy sprawdzić mikroskop i upewnić się, że używane filtry są odpowiednie do stosowania z fluorochromami z mieszaniny sond, a lampa rtęciowa jest prawidłowa i nie został przekroczony czas jej spodziewanej żywotności (patrz załącznik 5). W razie wątpliwości skontaktować się z dostawcą mikroskopu.</p> <p>1c. Należy unikać długich badań mikroskopowych oraz zminimalizować czas narażenia na silne źródła światła.</p> <p>1d. Wymienić butelki na bufory oraz dopilnować ich prawidłowej rejestracji (w stacji roboczej) i identyfikacji (na ekranie dotykowym). W celu uzyskania dalszych szczegółów zapoznać się z Podstawowym podręcznikiem użytkownika Dako Omnis. Uwaga: roztwór ISH Pre-Treatment Solution jest zielony, a bufor ISH Stringent Wash Buffer — żółty.</p>
2. Obszary bez sygnału	2. Nabranie pęcherzy powietrza podczas zamykania	2. Unikać powstawania pęcherzyków powietrza. W razie zaobserwowania pęcherzyków usunąć je, delikatnie pukając szczypcami.

Nowotwór żołądka

Problem	Prawdopodobna przyczyna	Zalecane postępowanie
3. Nadmierne wybarwienie tła	3a. Niewłaściwe utrwalenie tkanek 3b. Przedłużona ekspozycja części hybrydyzowanej na silne źródło światła	3a. Używać wyłącznie skrawków tkankowych utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie. 3b. Należy unikać długich badań mikroskopowych oraz zminimalizować czas narażenia na silne źródła światła.
4. Zła morfologia tkanek	4a. Nieprawidłowa obróbka pepsyną 4b. Zbyt długie trawienie pepsyną lub bardzo mała grubość skrawka może powodować pojawianie się komórek pustych lub komórek „pierścieniowych”.	4a. Wybrać inny z trzech różnych protokołów barwienia. Upewnić się, że odczynnik ISH Pepsin jest przechowywany w odpowiedniej temperaturze. 4b. Wypróbować protokół barwienia z krótszym czasem inkubacji z pepsyną. Upewnić się, że grubość skrawka wynosi 3–6 µm.
5. Zbyt wysoki poziom zielonej autofluorescencji w preparacie, w tym na obszarach bez tkanek utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie	5. Użycie przeterminowanych lub niezalecanych szkiełek podstawowych.	5. Stosować szkiełka podstawowe zgodnie z zaleceniami. Należy upewnić się, że termin ważności szkiełek podstawowych nie upłynął.

UWAGA: Jeśli problemu nie daje się przypisać żadnej z powyższych przyczyn bądź jeśli zalecane działanie jest nieskuteczne, należy się skontaktować z działem wsparcia technicznego firmy Dako w celu uzyskania dalszej pomocy.

Załącznik 3 — tkanka żołądka

HER2 IQFISH pharmDx (Dako Omnis), nr kat. GM333

Schemat zliczania

Data zadania: _____ Numer identyfikacyjny zadania barwienia: _____

Partia odczynnika *HER2* IQFISH pharmDx (Dako Omnis): _____ Numer identyfikacyjny preparatu: _____

Charakterystyka rozłożenia sygnału w tkance:

Homogenny:

Heterogenny — ogniskowy: lub Heterogenny — mozaikowy:

Zliczanie sygnałów w 20 jądrach					
Jądro nr	Wynik <i>HER2</i> (czerwony)	Wynik CEN-17 (zielony)	Jądro nr	Wynik <i>HER2</i> (czerwony)	Wynik CEN-17 (zielony)
1			11		
2			12		
3			13		
4			14		
5			15		
6			16		
7			17		
8			18		
9			19		
10			20		
Ogółem (1–10)			Ogółem (11–20)		

W celu określenia wskaźnika *HER2*/CEN-17 należy policzyć liczbę sygnałów *HER2* oraz liczbę sygnałów CEN-17 w tych samych 20 jądrach, a następnie podzielić całkowitą liczbę sygnałów *HER2* przez całkowitą liczbę sygnałów CEN-17. Jeśli wskaźnik *HER2*/CEN-17 ma wartość graniczną (1,8–2,2), należy zliczyć sygnały 40 różnych jąder i przeliczyć wskaźnik dla 40 jąder komórkowych (patrz Schemat oceny ponownego zliczania, załącznik 4).

Wskaźnik o wartości granicznej lub do niej zbliżonej (1,8–2,2) należy interpretować ostrożnie (patrz: Wskazówki do zliczania sygnałów).

	Wynik <i>HER2</i>	Wynik CEN-17	Wskaźnik <i>HER2</i> /CEN-17
Wynik ogółem (1–20)			

- Wskaźnik < 2: Nie zaobserwowano amplifikacji genu *HER2*
- Wskaźnik ≥ 2: Zaobserwowano amplifikację genu *HER2*

Data i podpis technika:

Data i podpis histopatologa:

Wytyczne do zliczania: patrz Interpretacja wyniku barwienia.

Załącznik 4 — tkanka żołądka

HER2 IQFISH pharmDx, nr kat. GM333

Schemat oceny ponownego zliczania

Data zadania: _____

Numer identyfikacyjny zadania barwienia: _____

Partia odczynnika *HER2* IQFISH

pharmDx (Dako Omnis): _____

Numer identyfikacyjny preparatu: _____

Sygnały z dodatkowych 40 jąder (1–40)											
Jądro nr	<i>HER2</i> (czerwony)	CEN17 (zielony)	Jądro nr	<i>HER2</i> (czerwony)	CEN-17 (zielony)	Jądro nr	<i>HER2</i> (czerwony)	CEN-17 (zielony)	Jądro nr	<i>HER2</i> (czerwony)	CEN-17 (zielony)
1			11			21			31		
2			12			22			32		
3			13			23			33		
4			14			24			34		
5			15			25			35		
6			16			26			36		
7			17			27			37		
8			18			28			38		
9			19			29			39		
10			20			30			40		
Razem (1–10)			Razem (11–20)			Razem (21–30)			Razem (31–40)		

W celu określenia wskaźnika *HER2*/CEN-17 należy policzyć liczbę sygnałów *HER2* oraz liczbę sygnałów CEN-17 w tych samych 40 jądrach, a następnie podzielić całkowitą liczbę sygnałów *HER2* przez całkowitą liczbę sygnałów CEN-17. **Zapisać ogólny wynik dla jąder 1–40 w tabeli poniżej.**

	Wynik <i>HER2</i>	Wynik CEN-17	Wskaźnik <i>HER2</i> /CEN-17
Wynik ogółem (1–40)			

- Wskaźnik < 2: Nie zaobserwowano amplifikacji genu *HER2*
- Wskaźnik ≥ 2: Zaobserwowano amplifikację genu *HER2*

Data i podpis technika:

Data i podpis histopatologa:

Wytyczne do zliczania: patrz Interpretacja wyniku barwienia.

Załącznik 5 — tkanka żołądka

HER2 IQFISH pharmDx, nr kat. GM333

Specyfikacja mikroskopu fluorescencyjnego

Firma Dako zaleca stosowanie następującej aparatury z odczynnikiem HER2 IQFISH pharmDx, (Dako Omnis), GM333:

1. Typ mikroskopu

- Mikroskop epifluorescencyjny

2. Lampa

- Lampa rtęciowa 100-watowa (odnotowywać czas świecenia)

3. Obiektywy

- Do badania przesiewowego tkanek nadają się obiektywy imersyjne o powiększeniu 16x lub 20x
- Do dużych powiększeń i zliczania sygnałów zaleca się stosowanie wyłącznie obiektywów imersyjnych, np. o powiększeniu 100x

4. Filtry

Filtry są projektowane indywidualnie pod kątem konkretnych fluorochromów i muszą być właściwie dobrane. Firma Dako zaleca stosowanie specyficznego filtra DAPI w połączeniu z wysokiej jakości podwójnym filtrem dla czerwieni teksańskiej/FITC.

- Filtr DAPI
- Filtr podwójny dla czerwieni teksańskiej/FITC
- Do weryfikacji i zliczania można używać filtrów pojedynczych dla czerwieni teksańskiej i FITC

Fluorochrom	Długość fali wzbudzenia	Długość fali emisji
FITC	495 nm	520 nm
Czerwień teksańska	596 nm	615 nm

Filtry są przeznaczone do konkretnych typów mikroskopów i użycie odpowiednich filtrów ma kluczowe znaczenie dla poprawności interpretacji. Aby uzyskać szczegółowe informacje, należy skontaktować się z dostawcą mikroskopu lub przedstawicielem firmy Dako.

5. Olejek

- Olejek niefluorescencyjny

Środki ostrożności

- Nie zaleca się stosowania lamp rtęciowych o mocy 50 watów
- Nie należy stosować filtrów rodaminowych
- Nie zaleca się używania filtrów potrójnych

Nieoptymalnie dobrany i skonfigurowany mikroskop może być przyczyną problemów z odczytem sygnałów fluorescencyjnych. Źródło światła nie może być nadmiernie zużyte, musi być prawidłowo ustawione i zogniskowane.

Klienci powinni zapoznać się z zaleceniami producenta dotyczącymi eksploatacji lampy rtęciowej i szczegółowo ich przestrzegać. Mikroskop należy konserwować, a lampę rtęciową regulować przed interpretacją wyników.

Należy w miarę możliwości unikać wystawiania preparatów na działanie światła wzbudzającego, aby zminimalizować zanik fluorescencji.










Przed rozpoczęciem hybrydyzacji fluorescencyjnej in situ zaleca się omówienie budowy mikroskopu z producentem lub zapoznanie się z literaturą.

Piśmiennictwo

1. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science*. 1985;230:1132-9.
2. Muleris M, Almeida A, Malfroy B, Dutrillaux B. Assignment of v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2 (ERBB2) to human chromosome band 17q21.1 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*. 1997;76:34-5.
3. Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Kurisu W, Thor A, Chen LC, Smith HS, et al. ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:5321-5.
4. King CR, Kraus MH, Aaronson SA. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science*. 1985;229:974-6.
5. Persons DL, Bui MM, Lowery MC, Mark HF, Yung JF, Birkmeier JM, et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for detection of HER-2/neu amplification in breast cancer: a multicenter portability study. *Ann Clin Lab Sci*. 2000;30:41-8.
6. Rennstam K, Baldetorp B, Kytola S, Tanner M, Isola J. Chromosomal rearrangements and oncogene amplification precede aneuploidization in the genetic evolution of breast cancer. *Cancer Res*. 2001;61:1214-9.
7. Schwab M. Oncogene amplification in solid tumors. *Semin Cancer Biol*. 1999;9:319-25.
8. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987;235:177-82.
9. Borg A, Tandon AK, Sigurdsson H, Clark GM, Ferno M, Fuqua SA, et al. HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. *Cancer Res*. 1990;50:4332-7.
10. Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF et al. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist* 2009;14: 320-368.
11. Nichols DW, Wolff DJ, Self S, Metcalf JS, Jacobs D, Kneuper-Hall R, et al. A testing algorithm for determination of HER2 status in patients with breast cancer. *Ann Clin Lab Sci*. 2002;32:3-11.
12. Bilous M, Dowsett M, Hanna W, Isola J, Lebeau A, Moreno A, et al. Current perspectives on HER2 testing: a review of national testing guidelines. *Mod Pathol*. 2003;16:173-82.
13. Nielsen PE, Egholm M, editors. *Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications*. Norfolk NR18 0EH, England: Horizon Scientific Press. 1999.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Third Edition*. CLSI document M29-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2005.
15. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, FR 7163, February 28. 1992.
16. Sheehan DC, Hrapchak BB. *Theory and practice of histotechnology*. St. Louis: CV Mosby Company. 1980.
17. Kiernan JA. *Histological and histochemical methods: theory and practice*. New York: Pergamon Press. 1981.
18. Tsuda H, Akiyama F, Terasaki H, Hasegawa T, Kurosumi M, Shimadzu M, et al. Detection of HER-2/neu (c-erb B-2) DNA amplification in primary breast carcinoma. Interobserver reproducibility and correlation with immunohistochemical HER-2 overexpression. *Cancer*. 2001;92:2965-74.

19. Ellis IO, Dowsett M, Bartlett J, Walker R, Cooke T, Gullick W, et al. Recommendations for HER2 testing in the UK. *J Clin Pathol*. 2000;53:890-2.
20. Hanna W. Testing for HER2 status. *Oncology*. 2001;61 Suppl 2:22-30.
21. Ginestier C, Charafe-Jauffret E, Penault-Llorca F, Geneix J, Adelaide J, Chaffanet M, et al. Comparative multi-methodological measurement of ERBB2 status in breast cancer. *J Pathol*. 2004;202(3):286-98.
22. Olsen KE, Knudsen H, Rasmussen BB, Baslev E, Knoop A, Ejlersen B, et al. Amplification of HER2 and TOP2A and deletion of TOP2A genes in breast cancer investigated by new FISH probes. *Acta Oncol*. 2004;59:795-805.
23. Jorgensen JT. Targeted HER2 Treatment in Advanced Gastric Cancer. *Oncology*. 2010;78:26-33.
24. Fujimoto-Ouchi K, Sekiguchi F, Yasuno H, Moriya Y, Mori K, Tanaka Y. Antitumor activity of trastuzumab in combination with chemotherapy in human gastric cancer xenograft models. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2007;59:795-805.
25. Kim SY, Kim HP, Kim YJ, Oh do Y, Im SA, Lee D, et al. Trastuzumab inhibits the growth of human gastric cancer cell lines with HER2 amplification synergistically with cisplatin. *Int J Oncol*. 2008;32:89-95.
26. Matsui Y, Inomata M, Tojigamori M, Sonoda K, Shiraishi N, Kitano S. Suppression of tumor growth in human gastric cancer with HER2 overexpression by an anti-HER2 antibody in a murine model. *Int J Oncol*. 2005;27:681-5.
27. Tanner M, Hollmen M, Junttila TT, Kapanen AI, Tammola S, Soini Y, et al. Amplification of HER-2 in gastric carcinoma: association with Topoisomerase IIalpha gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab. *Ann Oncol*. 2005;16:273-8.
28. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet*. 2010; 376(9742):687-97.
29. Hofmann M, Stoss O, Shi D, Buttner R, van de Vijver M, Kim W, et al. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology*. 2008;52:797-805.

Objaśnienia symboli

 Numer katalogowy	 Ograniczenie temperatury	 Zużyć przed
 Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro	 Chronić przed słońcem (patrz część nt. przechowywania)	 Producent
 Sprawdzić w instrukcji obsługi	 Numer partii	 Piktogram GHS (patrz część nt. środków ostrożności)

Wersja 2017.07

Producent:
Dako Denmark A/S
Produktionsvej 42
DK-2600 Glostrup
Dania
Tel.: +45 44 85 95 00
Faks +45 44 85 95 95
www.agilent.com

Dystrybutor w USA:
Dako North America, Inc.
6392 Via Real
Carpinteria, CA 93013 USA
Tel.: 805/566-6655,
Bezpłatna infolinia: 800/235-5743
Informacje nt. zamawiania:
Tel.: 800/235-5763
Faks 805/566-6688
Dział wsparcia technicznego: Tel.: 800/424-0021