

VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail

REF 800-6043
08314373001

IVD Σ 30

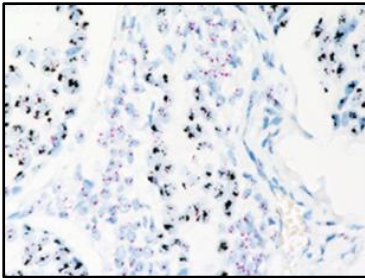


Fig. 1. Amplificeret HER2-status med VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail-analyse, brystkarcinom.

TILSIGTET ANVENDELSE

VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail er beregnet til at bestemme HER2-genstatus ved tælling af ratioen af HER2-genet i forhold til Chromosome 17 ved lysmikroskopi. HER2- og Chromosome 17-proberne detekteres ved hjælp af tofarvet kromogen in situ-hybridisering (ISH) i formalinfixerede og paraffinindstøbte humane vævspræparater fra bryst og gastrisk karcinom, inklusive den gastroesophageale junction, efterfulgt af farvning på BenchMark IHC/ISH-instrumenter.

VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail er indiceret som en hjælp til at vurdere patienter, hvor Herceptin (trastuzumab) overvejes. Dette produkt skal fortolkes af en kvalificeret patolog og sammenholdes med histologisk undersøgelse, relevante kliniske oplysninger og egnede kontroller.

Dette produkt er beregnet til in vitro diagnostisk (IVD) brug.

RESUMÉ OG FORKLARING

Human epidermal vækstfaktorreceptor 2 (HER2) er medlem af den epidermale vækstfaktor-underfamilie af transmembranreceptortyrosinkinaser, der medierer vækst, differentiering og overlevelse af celler.^{1,2} Cirka 15 til 30 procent af brystkarcinomer udviser overekspression af HER2-proteinet, amplifikation af HER2-genet (*ERBB2*) eller begge dele.^{3,4} Kendskab til HER2-gen- og/eller proteinstatus i invasivt brystkarcinom gør det muligt for lægerne at træffe mere informerede beslutninger med henblik på at forbedre den generelle behandling af disse patienter.⁵ HER2-status er en almindeligt anerkendt prædiktiv faktor for respons på HER2-målrettet behandling hos brystkræftpatienter.^{5,6,7} Trastuzumab (Herceptin) er et humaniseret monoklonalt antistof mod det ekstracellulære domæne af HER2 og har vist sig at være gavnligt hos patienter med HER2-positiv brystcancer.⁸⁻¹³ Påvisning af HER2-genamplifikation og/eller proteinoverekspression er afgørende ved udvælgelse af patienter til behandling med trastuzumab.^{5,14}

På samme måde forekommer HER2-genamplifikation og/eller proteinoverekspression i gastrisk adenokarcinom og adenokarcinom i gastroesophageal junction (kollektivt betegnet gastroesophagealt adenokarcinom eller GEA).^{15,16,17} HER2-overekspression er blevet rapporteret i flere publicerede undersøgelser. Et af de største screening-datasæt, der omfattede 3803 patienter med GEA, rapporterede imidlertid, at 22 procent af patienterne testede positiv for HER2-proteinexpression eller genamplifikation.¹⁸ Størstedelen af undersøgelserne peger på, at HER2-overekspression er en negativ prognostisk faktor ved fravær af HER2-rettet behandling.¹⁹

Den HER2-rettede behandling med trastuzumab er en grundpille i behandlingen af invasivt brystkarcinom, og at den har terapeutisk værdi ved behandlingen af patienter med gastrisk/GEA-cancer med overekspression af receptoren.^{15,17} Påvisning af HER2-genamplifikation og/eller proteinoverekspression er afgørende ved udvælgelsen af patienter til behandling med trastuzumab.^{15,19} Kliniske undersøgelser har vist, at patienter med brystcancer eller gastrisk/GEA-cancer og høj HER2-proteinoverekspression og/eller genamplifikation har størst udbytte af trastuzumab.^{3,15}

PROCEDURENS PRINCIP

VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail indeholder HER2-prober (mærket med haptent-dinitrophenyl eller DNP) og Chromosome 17-prober (mærket med haptent-digoxigenin eller DIG), som er formuleret i en formamidbaseret buffer. Proberne er designet til at detektere amplifikation af HER2-genet i invasivt brystkarcinom og GEA. HER2 DNA Probe er en blanding

af oligoprober, som er specifikt rettet mod HER2-genet (også kaldet ERBB2 og NEU), som findes på det humane Chromosome 17 (17q12). Chromosome 17-proben er en blanding af oligoprober, der er rettet mod sekvenser inden for centromerregionen og kan bruges som en reference for aneusomi. Antallet af kopier for begge prober optælles i tumorkerner, og resultaterne rapporteres som en ratio af HER2-/Chromosome 17 for at bestemme HER2-amplifikationsstatus (HER2-/Chromosome 17-ratio ≥ 2.0 er amplificeret, mens en ratio < 2.0 ikke er amplificeret). VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail er optimalt formuleret til brug med VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit, VENTANA Red ISH DIG Detection Kit og hjælpereagenser på et BenchMark IHC/ISH-instrument.

Detektionskittet indeholder et primært antistof og et enzymmærket sekundært antistof, der er konjugeret til peberrodsperoxidase (HRP) eller basisk fosfatase (AP), hvilket bruges som det kromogene enzym. Under farvningsprocessen med Dual in situ-hybridisering (Dual ISH) co-hybridiseres DNP- og DIG-mærkede prober til deres respektive specifikke DNA-målskvens inde i cellekernen. Detektion af den DNP-mærkede HER2-probe sker først, ved anvendelse af VENTANA Silver ISH (SISH) DNP Detection Kit, der indeholder følgende dispensere: muse-anti-DNP primært antistof mærket med hydroxyquinoxalin (HQ), muse-anti-HQ sekundært antistof konjugeret til peberrodsperoxidase (HRP), Chromogen A (Silver A), Chromogen B (Silver B) og Chromogen C (Silver C). Efter inkubation med det HQ-mærkede muse-anti-DNP primære antistof og derefter muse-anti-HQ HRP sekundært antistofkonjugat, opstår SISH-reaktionen. Kort fortalt drives denne reaktion af sekvens tilføjeles af Chromogen A (sølvacetat), B (hydroquinon) og C (H₂O₂). Her reduceres sølvionerne (Ag⁺) til metalliske sølvatomer (Ag⁰) af hydroquinon. Denne reaktion bliver drevet af substratet til HRP, brintoverilt (Chromogen C). Den sølvfarvede udfældning aflejres i kernen, og en enkelt kopi af HER2-genet visualiseres som en sort prik. Fig. 2 viser SISH-reaktionen.

Efter SISH-detektion for HER2 detekteres den DIG-mærkede Chromosome 17-probe med VENTANA Red ISH DIG Detection Kit. Dette kit indeholder følgende dispensere: muse-anti-DIG primært antistof mærket med nitroprazol (NP), muse-anti-NP sekundært antistof konjugeret til Alkaline Phosphatase (AP), pH Enhancer, Naphthol og Fast Red. Efter udvikling af SISH-signalet inkuberes objektglasset med det NP-mærkede muse-anti-DIG primære antistof, som binder til DIG-hapten på Chromosome 17-proben. Det primære antistof med anti-hapten detekteres med muse-anti-NP-konjugatet på AP-enzymet. Objektglasset inkuberes med pH Enhancer-opløsningen, der tilfører de korrekte saltkomponenter, koncentrationer og buffer-pH for at sikre, at AP-enzymet præsterer optimalt. Derefter tilføjes naphtholfosfat, der fungerer som substrat for AP-enzymet (AP defosforlyser naphthol). Fast Red tilføjes derefter objektglasset sammen med det defosforlyrede naphthol, hvilket danner en rød udfældning, der er tydelig ved lysmikroskopi. Fig. 3 illustrerer Red ISH-reaktionen. Derefter kontrastfarves præparatet med Hematoxylin II til fortolkning af lysmikroskopi.

Farvningsprotokollen består af adskillige trin, hvor reagenser inkuberes i forudbestemte tidsrum ved specifikke temperaturer. Ved afslutningen af hvert inkubationstrin vasker BenchMark IHC/ISH-instrumentet snittene for at fjerne ubundet materiale og anvender et flydende dækglas, der minimerer fordampningen af de vandige reagenser fra objektglasset. Resultaterne fortolkes ved hjælp lysmikroskopi med objektiver på hhv. 20x, 40x og/eller 60x forstørrelse.

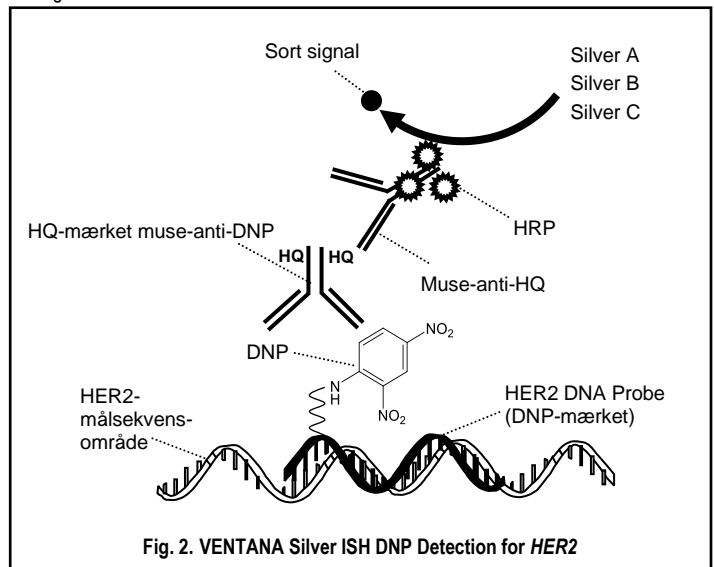


Fig. 2. VENTANA Silver ISH DNP Detection for HER2

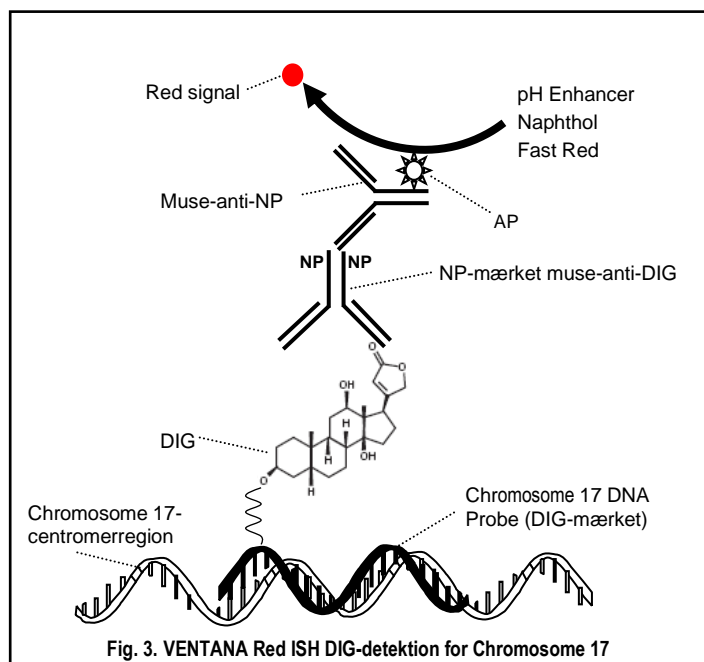


Fig. 3. VENTANA Red ISH DIG-detektion for Chromosome 17

LEVERET MATERIALE

VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail-dispenseren indeholder tilstrækkeligt med reagens til 30 tests.

En 6 mL-dispensere med VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail indeholder ca. 14 µg/mL af HER2-prober mærket med dinitrophenyl (DNP) og 0.24 µg/mL af Chromosome 17-prober mærket med digoxigenin (DIG) og formuleret i en formamidbaseret hybridiseringsbuffer. Begge prober anvendes til at bestemme HER2-genstatus (dvs. ratio af HER2/Chromosome 17).

Se metodearkene til det relevante VENTANA-detektionskit vedrørende detaljerede beskrivelser af: Procedurens princip, Materialer og metoder, Prøvetagning og forberedelse til analyse, metoder til kvalitetskontrol, Fejlfinding, Fortolkning af resultater og begrænsninger.

NØDVENDIGE MATERIALER, SOM IKKE MEDFØLGER

Farvareagenser, såsom VENTANA-detektionskits og -hjælpekompponenter, medfølger ikke.

Det er ikke alle produkter, der er nævnt i metodearket, som kan fås i alle geografiske områder. Indhent oplysninger hos den lokale supportrepræsentant.

Nedenstående reagenser og materialer, der er nødvendige ved farvning, medfølger ikke:

1. VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit (kat.nr. 760-516 / 08318883001)
2. VENTANA Red ISH DIG Detection Kit (kat.nr. 760-512 / 08318832001)
3. HybReady Solution (kat.nr. 780-4409 / 05917557001)
4. ISH Protease 3 (kat.nr. 780-4149 / 05273331001)
5. Hematoxylin II (kat.nr. 790-2208 / 05277965001)
6. Bluing Reagent (kat.nr. 760-2037 / 05266769001)
7. Reaction Buffer Concentrate (10X) (kat.nr. 950-300 / 05353955001)
8. SSC (10X) (kat.nr. 950-110 / 05353947001)
9. EZ Prep Concentrate (10X) (kat.nr. 950-102 / 05279771001)
10. *ultraView* Silver Wash II (Pre-dilute) (kat.nr. 780-003 / 05446724001)
11. Cell Conditioning Solution (CC1) (kat.nr. 950-124 / 05279801001)
12. Cell Conditioning Solution (CC2) (kat.nr. 950-123 / 05279798001)
13. LCS (Predilute) (kat.nr. 650-010 / 05264839001)
14. ULTRA LCS (Pre-dilute) (kat.nr. 650-210 / 05424534001)
15. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (kat.nr. 950-224 / 05424569001)
16. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC2) (kat.nr. 950-223 / 05424542001)
17. BenchMark IHC/ISH-instrument

18. Mikroskopobjektglas, positivt ladede (Superfrost Plus eller tilsvarende)
19. Permanent monteringsmateriale*
20. Dækglas, der er tilstrækkeligt til at dække vævet
21. Automatiseret dækglas instrument
22. HER2 Dual ISH 3-in-1 Xenograff Slides (kat.nr. 783-4422 / 05640300001) kan eventuelt anvendes til fejlfindingsaktiviteter.

* Se Tab. 30 for en oversigt over monteringsmateriale, der er kompatibelt med denne analyse.

OPBEVARING OG STABILITET

Opbevares ved 2–8 °C efter modtagelsen, og når de ikke anvendes. Må ikke nedfryses.

For at sikre korrekt reagenstillførsel og probens stabilitet skal kapslen sættes på dispenseren igen efter hver brug, og dispenseren skal omgående anbringes i køleskab i opret position.

Alle probedispensere er mærket med udløbsdato. Ved korrekt opbevaring er reagentet stabilt indtil den dato, der er angivet på etiketten. Brug ikke reagentet efter udløbsdatoen.

PRÆPARATFORBEREDELSE

Rutinemæssigt behandlede, formalinfikserede og paraffinindstøbte væv (FFPE) er egnede til brug med denne probe, når de anvendes med et BenchMark IHC/ISH-instrument. Det anbefalede vævsfixativ er 10 % neutral buffer-formalin (NBF) i 6 til 72 timer.²⁰ Foruden VENTANA-analyse har undersøgelser vist, at størstedelen af de ikke-entydige HER2-genresultater ved brug af FISH vedrører præanalytiske faktorer, herunder under- og overfiksering²¹ såvel som forsinket fiksering.²² Streng implementering af fikseringsprocedurer (såsom en dedikeret processor for at sikre et minimum af 6 timers fiksering) resulterede i en reduktion på 68.5 % i ikke-entydige tilfælde fra 10.8 % manglende identifikation til 3.4 %. Fiksering af præparater i formalin i < 6 timer kan føre til signaltab og kerneoverfordøjelse, som det ses ved bleg/svag hematoxylin-farvning. Kun fiksering i 10 % NBF anbefales, da nogle fiksativer producerer varierende farvning med ISH-baserede analyser (inklusive Bouin's og Alcohol Formalin-Acetic Acid (AFA)).²¹

Objektglassene skal farves øjeblikkeligt, da kvaliteten af nukleinsyremålene i udskårne vævssnit kan formindskes over tid. Interne undersøgelser har vist, at objektglas med snit af brystvæv eller gastrisk væv, der opbevares ved 2–8 °C, kan være stabile i 12 måneder. Positivt ladede objektglas kan være følsomme over for miljømæssige belastninger, hvilket kan medføre fejlbehæftet farvning af ISH-analyser (for eksempel manglende farvning eller kontrastfarve på vævet). Bed den lokale Roche-repræsentant om en kopi af »Impact of environmental stress on various histology slide types« med henblik på at få en bedre forståelse for, hvordan denne type objektglas skal anvendes.

Hvert snit skal skæres til den passende tykkelse (4 µm) til den probe, der anvendes, og placeres på et positivt ladet mikroskopobjektglas (Superfrost Plus eller lignende). Objektglas skal tømmes og tørre for at fjerne overskydende vand mellem objektglas og væv.

Vævssnit, der er tykkere end 4 µm kræver muligvis stærkere proteasebehandling end den anbefalede opløsning og kan udvise mere kernebobling end i tynde snit på grund af for meget paraffin i vævet. Kernebobling vises som store eller små bobler eller vakuoler i cellekernen. Når der opstår kernebobling, er der ofte et spektrum af effekter på SISH- og Red ISH-signalerne, der er karakteriseret ved 1) kerner med kernebobler, hvor SISH- og Red ISH-signaler generelt stadig er centralt placeret i kernen, og 2) kerner med kernebobler, der skubber SISH- og Red ISH-signalerne ud til periferien. Det er ofte muligt i begge tilfælde at opnå en score, forudsat at der kan foretages en tydelig skelnen mellem SISH- og Red ISH-signaler, at de ikke på anden vis er forvrængede, og at de stadig er tællelige. Imidlertid kan kraftig kernebobling lejlighedsvis forvrænge SISH- og Red ISH-signalerne eller gøre dem umulige at skelne, så nøjagtig tælling ikke er mulig. Dette sker ofte, når SISH- og Red ISH-signalerne skubbes ud til kerneperiferien. Når dette sker, kan man ofte finde kerner andre steder i prøven, der kan tælles, og tilfældet kan således scores. Hvis kernebobling er kraftig og i en sådan grad, at man ikke kan finde tilstrækkelige kerner, hvor SISH- og Red ISH-signaler med sikkerhed kan tælles, bør tilfældet ikke scores. Kernebobling kan også forekomme i forbindelse med underfiksering (1–3 timer med formalin), hvilket er en mindre diskret kernebobling. Dette kan afhjælpes ved 3 timers fiksering med ændret celleforbehandling/proteasebehandling, men efter 1 time kan det sandsynligvis ikke længere afhjælpes.

VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail-analysen er udviklet med yderligere forbehandlingsmuligheder, der kan hjælpe med at optimere analysen i forskellige laboratorier og til efterfølgende fejlfinding af bestemte væv/objektglas, der ikke udviser optimal farvning. Det anbefales, at hvert laboratorie foretager første korsler på repræsentative kontrolprøver, der er blevet forberedt under de samme forhold som de

kliniske prøver, der skal testes. Dette vil bidrage til at optimere de specifikke farvningsforhold for de enkelte laboratorier, der kan have forskellige fremgangsmåder ved prøveforberedelse. Der kan forekomme varierende resultater, hvis der anvendes andre præanalytiske faktorer end anbefalet. Præparater, der er præanalytisk fremstillet under betingelser, der ikke anbefales, farves muligvis aldrig passende med analysen.

ADVARSLER OG FORSIGTIGHEDSREGLER

1. Til in vitro diagnostisk (IVD) brug.
2. Kun til faglig anvendelse.
3. Brug ikke efter det angivne antal tests.
4. **Advarsel – produktet indeholder formamid.** Formamid er toksisk ved indånding og moderat toksisk ved indtagelse. Det er irriterende for hud, øjne og slimhinder og absorberes gennem huden. Det kan skade det ufødte barn. Der skal tages forholdsregler ved håndtering af reagenser. Brug engangshandsker og brug passende beskyttelsestøj, når du håndterer mistænkt kræftfremkaldende stoffer eller toksiske materialer.
5. Materialer af human eller animalsk oprindelse skal håndteres som potentielt biologisk farligt materiale og bortskaffes i henhold til gældende forholdsregler. I tilfælde af eksponering skal de ansvarlige myndigheders sundhedsdirektiver følges.^{23,24}
6. Undgå, at reagenser kommer i kontakt med øjne og slimhinder. Vask med rigelige mængder vand, hvis reagenserne kommer i kontakt med følsomme områder. Undgå indånding af reagenser.
7. Sørg for, at affaldsbeholderen er tom, før du starter en kørsel på instrumentet. Hvis denne forholdsregel ikke træffes, kan affaldsbeholderen blive overfyldt, så brugeren risikerer at glide og falde.
8. Undgå mikrobiel kontamination af reagenserne da dette kan fremkalde fejlbehæftede resultater.
9. For yderligere information om brugen af denne enhed henvises til BenchMark IHC/ISH-instrumentets brugervejledning og brugsanvisningerne til alle nødvendige komponenter, som findes på navifyportal.roche.com.
10. Indhent oplysninger hos lokale og/eller statslige myndigheder med henblik på den anbefalede metode til bortskaffelse.
11. Mærkning af produktsikkerhed følger primært EU's GHS-vejledning. Sikkerhedsdatablade er tilgængelige efter anmodning for faglige brugere.
12. For at rapportere mistanke om alvorlige hændelser i forbindelse med denne enhed, skal du kontakte den lokale Roche-repræsentant og den kompetente myndighed i den medlemsstat eller det land, hvor brugeren har etableret sig.

Dette produkt indeholder komponenter klassificeret som følger i henhold til Forordning (EU) nr. 1272/2008:

Tab. 1. Fareoplysninger.

Fare	Kode	Sætning
	H351	Mistænkes for at være kræftfremkaldende.
	H360D	Kan skade det ufødte barn.
	H373	Kan forårsage organskader ved længerevarende eller gentagen eksponering.
	P201	Indhent særlige anvisninger før brug.
	P202	Undgå at håndtere produktet, før alle sikkerhedsforanstaltninger er læst og forstået.
	P260	Undgå at indånde reagenståge eller -dampe.
	P280	Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjenskyttelse/ansigtsbeskyttelse/hørebeskyttelse.
	P308 + P313	Ved eksponering eller mistanke herom: Søg læge.
	P501	Indholdet/beholderen bortskaffes i et godkendt affaldsbehandlingsanlæg.

Dette produkt indeholder CAS-nr. 75-12-7: formamid

FARVNINGSPROCEDURE

VENTANA-prober er blevet udviklet til brug på et BenchMark IHC/ISH-instrument i kombination med VENTANA-detektionskits og -tilbehør. Farvningsprocedurerne for BenchMark IHC/ISH-instrumentet med VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit og VENTANA Red ISH DIG Detection Kit er anført i Tab. 2. De anbefalede farvningsprotokoller er anført i Tab. 3.

Parametrene for de automatiserede procedurer kan vises, udskrives og redigeres i henhold til den procedure, der er beskrevet i instrumentets brugervejledning. Se metodearket til det relevante VENTANA-detektionskit for at få yderligere oplysninger. Yderligere oplysninger om korrekt brug af denne enhed kan ses i inline-dispenserens metodeark, som hører til P/N 800-6043.

Tab. 2. Brug de følgende farvningsprocedurer til at udføre VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail-analyse på BenchMark IHC/ISH-instrumenter.

Instrumentplatform	Farvningsprocedure
BenchMark GX	GX VENTANA HER2 DISH DNA PRB CKT
BenchMark XT	XT VENTANA HER2 DISH DNA PRB CKT
BenchMark ULTRA eller BenchMark ULTRA PLUS	U VENTANA HER2 DISH DNA PRB CKT

Tab. 3. Anbefalede farvningsbetingelser for VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail-analyse på BenchMark IHC/ISH-instrumenter.

Farvningsbetingelse	Bryst	Gastrisk
Bagning	Ikke valgt	Ikke valgt
Cell Conditioning 1	16 min.	16 min.
Cell Conditioning 2	24 min.	16 min.
ISH Protease 3	20 min.	16 min.
Stringensvasketemperatur	76 °C for BenchMark GX/XT-instrumenter	76 °C for BenchMark GX/XT-instrumenter
	74 °C for BenchMark ULTRA- eller ULTRA PLUS-instrumenter	74 °C for BenchMark ULTRA- eller ULTRA PLUS-instrumenter

På grund af variationer i vævsfiksering og -behandling samt generelle forhold vedrørende laboratorieinstrumenter og -miljø kan det være nødvendigt at øge eller mindske celleforbehandling eller proteaseforbehandling baseret på individuelle læsninger af præparater.

Start af en kørsel på BenchMark IHC/ISH-instrumenter

1. Forsyn objektglasset med stregkodeetiket, der svarer til den probeprotokol, der skal udføres.
2. Sæt VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, reagenser fra VENTANA Red ISH DIG og VENTANA Silver ISH DNP Detection Kits og de nødvendige hjælpereagenser i reagensbakken/-bakkerne eller karrusellen. Anbring reagensbakken/-bakkerne eller karrusellen på instrumentet.
3. Kontrollér bulkvæsker affaldsbeholdere.
4. Bulkflaskerne med reaktionsbuffer skal være fyldte.
5. Affaldsbeholderen skal være tom, før kørslen startes.
6. Sæt objektglassene på instrumentet.
7. Start farvekørslen.
8. Når kørslen er fuldført, tages objektglassene ud af instrumentet. De farvede objektglas har rester af buffer og flydende dækglassopløsning på sig. Fortsæt med skylning og dehydrering (se nedenfor).

Dehydreringsprocedure

Bemærk: Fast Red-kromogen er opløseligt i alkohol og acetone. Farvede objektglas, der udsættes for alkohol og/eller acetone, kan resultere i et tab af specifikt signal.

- Den flydende dækglassopløsning fjernes ved at vaske objektglassene i 2 på hinanden følgende opløsninger af mildt opvaskemiddel (brug ikke rengøringsmiddel, der er beregnet til opvaskemaskiner).
- Skyl objektglassene grundigt med destilleret vand i cirka 1 minut. Ryst overskydende vand fra.
- Sæt objektglassene til tørre i en ovn (45–60 °C), eller lad dem lufttørre ved stuetemperatur. I ovn varierer tørretiden fra 10 minutter til en time (tørring af farvede objektglas over længere tid lader ikke til at forringe farveresultaterne). Sørg for, at objektglassene er helt tørre, før der monteres dækglasser, da overskydende vand på objektglassene kan besværliggøre monteringen og medføre bobledannelse.
- Læg objektglassene i et xylensbad i cirka 30 sekunder.
- Placer monteringsmateriale på objektglasset.
- Sæt dækglasser på objektglasset. Bemærk, at visse monteringsmaterialer ikke er kompatible med analysen og derfor ikke bør anvendes (se afsnittene Begrænsninger og Fejlfinding).

METODER TIL KVALITETSKONTROL

Positiv præparatkontrol

Normale *HER2*- og Chromosome 17-signalere (1 til 2 kopier pr. celle) fungerer som interne positive kontroller og skal være synlige i prøven ved hjælp af objektiver med hhv. 20x, 40x og/eller 60x forstørrelse. Imidlertid udviser ikke alle celler enkeltgenkopi grundet biologisk heterogenitet. Specifik kernefarvning kan være lokaliseret i forskellige celler, herunder: stromale fibroblaster, endotelceller, lymfocytter og ikke-neoplastiske epitelceller. Hvis de positive kontroller ikke viser positiv farvning, kan dette indikere et reagens- eller instrumentproblem. Da hvert præparat har en intern positiv kontrol (dvs. passende ISH-farvning i normale celler), fungerer denne som den ægte »positive kontrol«.

Der skal køres en laboratoriespecifik positiv præparatkontrol med hver udført farvningsprocedure. Kontrolpræparater kan være præparater, der er fremstillet på præcis samme måde som patientpræparaterne. Sådanne kontroller er nyttige for at kunne overvåge alle trin i proceduren, fra prøveforberedelse til farvning. Brug af et præparat, der er fremstillet på anden vis end testpræparaterne, vil give en kontrol for reagenserne, instrumentet og procedurerne, men ikke til fiksering og præparatbehandling. Resultater med testpræparaterne skal analyseres i samme kørsel. Sådanne kontroller bør ikke erstatte den korrekte evaluering af den interne kontrol i hvert patientpræparat.

Xenograft-præparat

Xenograftobjektglas kan være nyttige til en foreløbig validering af den metode, der anvendes til farvning af objektglas med VENTANA *HER2* Dual ISH DNA Probe Cocktail-analysen. De anbefales også som hjælp til fejlfinding, når de bruges i kørsler, der indeholder kliniske prøver. Du kan få flere oplysninger i metodearket til det relevante xenograftobjektglas.

Uforklarede uoverensstemmelser

Uforklarede uoverensstemmelser i kontroller skal straks rapporteres til den lokale supportrepræsentant. Hvis resultaterne af kvalitetskontrol ikke overholder specifikationerne, er patientresultaterne ugyldige. Se afsnittet Fejlfinding på dette metodeark. Find og korriger problemet, og gentag derefter patientprøverne.

Analyseverifikation

Før den første anvendelse af en probe eller et farvningssystem i en diagnostisk procedure bør probens specificitet verificeres ved at teste den på en række væv med kendte ISH-præstationskarakteristika (se i metodearket til proben og kvalitetskontrolanbefalingerne fra College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist,²⁵ eller CLSI Approved Guideline²⁶ eller begge dokumenter). Disse kvalitetskontrolprocedurer skal gentages for hvert nyt reagenslot, eller hver gang analyseparametrene ændres.

FORTOLKNING AF FARVNINGEN/FORVENTEDE RESULTATER

Cellefarvningsmønsteret for VENTANA *HER2* Dual ISH DNA Probe Cocktail-analysen er kernefarvning.

En patolog med erfaring i mikroskopfortolkning af anatomiske patologipræparater, ISH-procedurer og genkendelse af enkelte og amplificerede *HER2*- og Chromosome 17 (Chr17)-kopier (som kræver mikroskopisk undersøgelse ved hjælp af objektiver med 20x, 40x og/eller 60x forstørrelse) skal evaluere kontrollerne, før resultaterne fortolkes.

Bemærk: Det anbefales ikke at bruge et objektiv med 100x forstørrelse. Alle vævobjektglas, der blev læst under designverifikation og valideringstest, blev læst ved hjælp af objektiver med 20x, 40x og/eller 60x forstørrelse.

VENTANA *HER2* Dual ISH DNA Probe Cocktail skal anvendes sammen med *Interpretation Guide VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail* [P/N 1018386] ved evaluering af objektglas.

Fortolkning og scoring af objektglas er beskrevet i de følgende afsnit. Tab. 4 illustrerer, hvordan svage signaler skal tælles.

Definitioner

- HER2*-genstatus. *HER2*-genstatus er en funktion af ratio af antal kopier af *HER2*-genet i forhold til antallet af kopier af Chr17, pr. celle, i et tilfælde med invasivt brystkarcinom eller GEA. *HER2*-genstatus er klassificeret ved hjælp af følgende retningslinjer:
 - HER2*/Chr17-ratio ≥ 2.0 er amplificeret
 - HER2*/Chr17-ratio < 2.0 er ikke-amplificeret
- Tilstrækkelighed af objektglas. Et VENTANA *HER2* Dual ISH DNA Probe Cocktail-objektglas skal opfylde tre kriterier for at kunne betragtes som tilstrækkeligt til optælling, og hvis objektglasset ikke opfylder disse kriterier, kan det ikke tælles, og resultatet er utilfredsstillende.
 - Intern positiv kontrol. Normale *HER2*- og Chr17-signalere (1 til 2 kopier pr. celle) fungerer som interne positive kontroller og skal være synlige i prøven. Denne kernefarvning kan være lokaliseret i forskellige ikke-neoplastiske celler, herunder: stromale fibroblaster, endotelceller, lymfocytter og ikke-neoplastiske epitelceller.
 - Neoplastiske celler. Ved brug af objektiver med 20x, 40x og/eller 60x forstørrelse skal det invasive aspekt af tumoren udvise et tælleligt felt af SISH- og Red ISH-signalere.
 - Baggrund. Enhver baggrundsfarvning, der skyldes enten SISH- eller Red ISH-detektionssystemer, skal evalueres for at afgøre, om det forstyrrer optællingen af de specifikke SISH- eller Red ISH-signalere. SISH-baggrund vises typisk som SISH-»støv«, der kan skelnes fra det specifikke signal. Red baggrund kan forekomme som rød tåge eller i sjældne tilfælde som uspecifikke signaler, der er svagere i intensitet sammenlignet med det specifikke signal.
- Målområder for signaloptylling. Et acceptabelt målområde inden for det invasive karcinom udviser et tælleligt felt af SISH- og Red ISH-signalere. Signaloptylling bør ikke udføres i områder, der indeholder svagt SISH- eller Red ISH-signal, komprimerede eller overlappende kerner eller nekrose. Hvis et målområde anses for utilstrækkeligt til at blive talt, er det ofte muligt at finde andre målområder på samme objektglas, som er passende. Dette kan bestemmes af tilstedeværelsen af normale celler, der udviser passende SISH- og Red ISH-farvning i eller ved siden af målområdet.

Yderligere observationer for *HER2* og Chromosome 17

Andre observationer kan bemærkes som kommentarer til patologens rapport.

- Heterogenitet: I nogle tilfælde kan vævet muligvis indeholde områder med karcinom, som er genetisk homogene for *HER2*-kopiantallet (dvs. der kan være en blanding af ikke-amplificerede og amplificerede kerner eller en blanding af kerner med forskellige kopier af *HER2*). Dette kan observeres i karcinomceller inden for selve målområdet eller mellem to forskellige målområder.
- Aneusomi er enhver tilstand, hvor en organisme har flere eller færre specifikke kromosomer end normalt, dvs. antallet af et bestemt kromosom (i dette tilfælde Chromosome 17) er ikke diploid. Ved polysomi kan der være tre eller flere kopier af kromosomet i stedet for de forventede to kopier. Ved monosomi vil tumorcellerne muligvis kun udvise én kopi af Chromosome 17 (med eller uden *HER2*-SISH-kllynger) har været rapporteret.²⁷ I tilfælde med klynger af *HER2* og Chromosome 17 skal man være omhyggelig med ikke at score dem med en ratio ~ 1.0 . I disse tilfælde skal læseren henholde sig til resultaterne af immunhistokemi (IHC) for *HER2*-proteinoverekspressionsanalyser, da flertallet har tendens til at være 3+.
- Monoallel deletion: Deletionen af *HER2*-genet fra Chromosome 17 i tumorceller resulterer i et *HER2*/Chr17-ratio < 1.0 .

Signalvisualisering

SISH- og Red ISH-signalere visualiseres som:

- Enkelt kopi. En svagt sort prik (SISH) tælles som en enkelt kopi af *HER2*. Svagt farvede enkelte prikker visualiseret i de interne kontrolkerne (ikke-neoplastisk) repræsenterer størrelsen på en enkelt kopi i invasive karcinomceller for SISH-signalet (sort). For Red ISH-signalere tælles hvert svage signal som én kopi. Det skal bemærkes, at Red ISH-signalet fra Chr17 kan virke større end SISH-signalerne og

- undertiden aflangt i form. Der kan muligvis forekomme lyserød tåge, som ikke bør forveksles med signaler. Red signaler, der er meget lyse i farven sammenlignet med signalet i interne positive kontrolkerner og det overordnede farvningsmønster, bør ikke tælles, da de kan være uspecifikke. Specifikke røde signaler har svagt aftegnede kanter, som vist i Tab. 4.
- Flere kopier. Svage enkelte SISH-signaler, der er visualiseret i kernen på den interne positive kontrol, repræsenterer størrelsen på en enkelt kopi af *HER2* i invasive karcinomceller. Størrelsen på de enkelte SISH-signaler bruges som reference til at bestemme det relative antal amplificerede kopier i cancerellekernerne. For Red ISH-signaler tælles hvert svage signal som én kopi.
 - Klynger. Tilstedeværelse af flere overlappende signaler i kernen, som ikke kan optælles. En klynge defineres som adskillige overlappende SISH-signaler i kernerne, der ikke kan skelnes enkeltvis. Klynger af *HER2* kan kun estimeres af læseren. For eksempel kan en stor klynge af flere SISH-signaler estimeres til 12 kopier, mens mindre klynger kan estimeres til 6 kopier. Estimeringen foretages ved anvendelse af de enkelte SISH-kopier, der er til stede i de interne positive kontrolceller, som reference. Tilstedeværelsen af *HER2*-klynger noteres på scorearket.
 - Overlappende kerner, kerner med forekomst af kun én en farve og prøver med uspecifik farvning bør ikke tælles. Alle kerner med overlappende Red ISH- og SISH-signaler, der ikke kan skelnes, skal visualiseres ved højere forstørrelser for at skelne de to signaler eller bør ikke tælles. Kerner, der fremstår opbløede, skal ikke tælles.

Optælling af SISH- og Red ISH-signaler for at bestemme *HER2*-genstatus

Undersøg det H&E-farvede objektglas for at lokalisere områder, der indeholder invasivt brystkarcinom eller gastroøsofagealt karcinom. Undersøg det *HER2* Dual ISH-farvede objektglas, der modsvarer H&E-objektglasset, og identificer et målområde med invasivt brystkarcinom eller gastroøsofagealt karcinom. Før optælling af *HER2*- og Chromosome 17-signaler for at bestemme *HER2*-genstatus er det meget afgørende at bestemme, om det invasive målområde (læsionens væv) er tilstrækkeligt farvet og opfylder de kriterier, der er beskrevet for tilstrækkeligheden af objektglas (se afsnittet Definitioner ovenfor, 2. Tilstrækkelighed af objektglas).

Scoringalgoritmen, der er udviklet til analysen, maksimerer præcision og effektivitet ved tælling. Tyve kerner, der hver indeholder røde (Red ISH) og sorte (SISH) signaler, bør blive optalt.

Kriterier for cellevalg

Tæl kun kerner med diametre, der er repræsentative for den gennemsnitlige population af invasive karcinomkerner i målområdet. Tæl ikke signaler i kerner, som er:

- Meget større i diameter end den gennemsnitlige størrelse af karcinomkerner
- Meget mindre i diameter end den gennemsnitlige størrelse af karcinomkerner

Tæl kun kerner, der er repræsentative for populationen af invasive karcinomkerner med det højeste gennemsnitlige antal signaler (både SISH og Red ISH).

I målområder, der er genetisk heterogene for *HER2*-kopi-tallet, skal du kun tælle kerner, der er repræsentative for populationen af invasive karcinomkerner med det højeste gennemsnitlige antal signaler (både SISH og Red ISH). Bemærk, at heterogenitet findes på scorearket.

Tab. 4. Signalvisualisering.

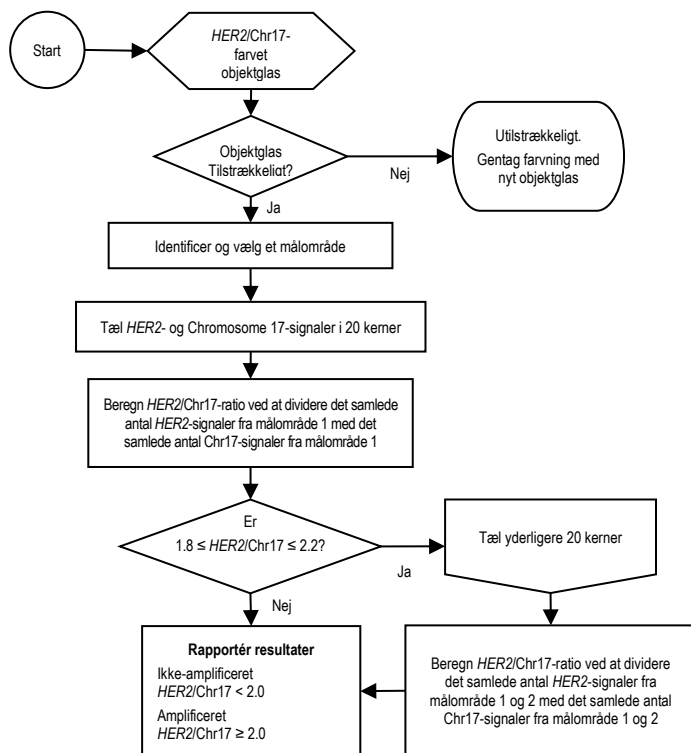
	Tæl ikke, hvis kernerne overlapper.
	Tæl ikke, hvis der ikke er noget signal til stede.
	Tæl ikke, hvis det kun er signalet for den ene farve, der er til stede.

	Tæl ikke, hvis signalerne er uden for kernerne.
	Tæl som 1 sort (<i>HER2</i>) og 1 rødt (Chr17) signal.
	Tæl som 2 sorte (<i>HER2</i>) og 2 røde (Chr17) signaler.
	Tæl som 1 sort (<i>HER2</i>) og 2 røde (Chr17) signaler. Det sorte signal er en »dublet«. Tæl kun to tilstedeværende signaler af samme farve, hvis afstanden mellem signalerne er lig med eller større end diameteren på et enkelt signal.
	Små SISH-klynger kan kun estimeres ved at bruge størrelsen på et enkelt signal som reference. Brug stromaceller til at estimere signalstørrelse (mindre celle). Denne klynge kunne eksempelvis estimeres til 6 SISH-signaler – tilføjelse af de øvrige 2 enkelte signaler giver et samlet antal på 8. Tæl som 2 røde signaler. Notér på scorearket, at der er klynger til stede for <i>HER2</i> .
	Estimer den store klynge. Her kan klyngen estimeres til 12 sorte signaler – tilføjelse af de øvrige 4 enkelte signaler giver et samlet antal på 16. Tæl røde signaler som 2 kopier af Chr17. Notér på scorearket, at der er klynger til stede for <i>HER2</i> .
	Et rødt signal tæt på et sort signal skal tælles som et rødt signal og ét sort signal. Dette kan kræve optælling med et 60x-objektiv for at kunne skelne dem. Derfor skal du tælle dem som 4 sorte (<i>HER2</i>) og 2 røde (Chr17) signaler. Hvis overlappende signaler ikke kan skelnes, skal du ikke tælle den pågældende kerne.
	Klynge af sorte prikker, der tilslører de(r) røde signal(er). Højere forstørrelse (60x) kan anvendes i forsøg på at bekræfte tilstedeværelse eller fravær af rødt signal – ellers skal de(t) ikke tælles med: Tæl altid kerner med tydelige røde signaler. Notér tilstedeværelsen af SISH-klynger på scorearket. Kerner med synligt og højere antal rødt signal skal scores i kerner med SISH-klynger.
	Hvis baggrunds-SISH-»støv« forekommer i kernerne, skal de kun tælles, hvis specifikke SISH-signaler tydeligt kan skelnes fra baggrunden.
	Der kan muligvis observeres lyserød tåge, som ikke bør forveksles med signaler. Der kan muligvis ses små, svage Red ISH-signaler, som kan repræsentere uspecifik binding af Chr17-proben til andre kromosomer. Billedet viser 2 svagt røde (Chr17) signaler og 2 sorte (<i>HER2</i>) signaler.

***HER2*-genstatus: Scoringalgoritme for VENTANA *HER2* Dual ISH DNA Probe Cocktail**

Tyve kerner (der hver indeholder røde (Chr17) og sorte (*HER2*) signaler) bør blive optalt. De endelige resultater for *HER2*-status rapporteres baseret på den ratio, der dannes ved at dividere summen af *HER2*-signaler for alle 20 kerner med summen af Chromosome 17-signaler for alle 20 kerner. Amplifikationsstatus defineres som Amplificeret, hvis *HER2*/Chr17-ratio ≥ 2.0 , og som Ikke-amplificeret, hvis *HER2*/Chr17-ratio < 2.0 . Hvis *HER2*/Chr17-ratio lander mellem 1.8 og 2.2, skal der optælles yderligere 20 kerner. Der

skal derefter dannes et nyt ration på basis af alle 40 kerner, og amplifikationsstatus rapporteres som allerede beskrevet.



Kontroller

Normale celler inden for eller ved siden af målområdet fungerer som interne kontroller af farvningen. Mindst 50 % af de normale cellekerner skal indeholde mindst ét SISH-signal, og mindst 50 % skal indeholde mindst et Red ISH-signal (SISH- og Red ISH-signalerne behøver ikke at være i de samme celler), for at målområdet kan anses for tilstrækkeligt. Manglende påvisning af et tilstrækkeligt signal i normale celler på et hvilket som helst objektglas i kørslen indikerer, at det pågældende objektglas er utilstrækkeligt til tælling. Brug af positive kontrolprøver eller xenograft-objektglas hjælper med fejlfinding af potentielle instrument- og/eller reagensproblemer.

BEGRÆNSNINGER

Generelle begrænsninger

- ISH er en metode i flere trin, der kræver specialuddannelse i udvælgelsen af de passende reagenser og væv, prøveforberedelse, behandling, klargøring af ISH-objektglasset og fortolkning af resultaterne.
- Vævsfarvning er afhængig af håndtering og behandling af vævet før farvning. Forkert fiksering, nedfrysning, optøning, vask, tørring, opvarmning, udsækning eller kontamination med andet væv eller væsker kan fremkalde artefakter, reagensbinding, falsk negative eller falsk positive resultater. Uoverensstemmende resultater kan være en konsekvens af forskelle i fikserings- og indstøbningsmetoder eller naturlige uregelmæssigheder i selve vævet.
- For kraftig eller ufuldstændig modfarvning kan bringe korrekt fortolkning af resultater i fare.
- Den kliniske fortolkning af farvning skal evalueres på baggrund af anamnese, morfologi og andre histopatologiske kriterier. Det er en kvalificeret patologs ansvar at være fortrolig med reagenserne og metoderne, der anvendes til fremstilling af det farvede præparat. Farvning skal udføres i et certificeret, licenseret laboratorie under tilsyn af en patolog, der er ansvarlig for gennemgang af de farvede objektglas og for at sikre tilstrækkeligheden kontroller.

- VENTANA-reagenser leveres ved optimal fortynding til brug, når de medfølgende instruktioner følges. Enhver afvigelse fra anbefalede testprocedurer kan ugyldiggøre forventede resultater. Brugere, der afviger fra anbefalede testprocedurer, vil være ansvarlige for fortolkningen af patientresultater.
- På grund af variationer i præparatbehandling kan det være nødvendigt enten at forøge eller formindske behandlingstiden for ISH-protease. Desuden vil en forøgelse eller reduktion af celleforbehandlingen påvirke farvningsresultaterne. Sådanne ændringer skal valideres af brugeren. Brugere, der afviger fra anbefalede testprocedurer, er ansvarlige for fortolkning af patientresultater under disse omstændigheder.
- Reagenserne kan fremvise uventede reaktioner i tidligere utestet væv. Muligheden for uventede reaktioner selv i testede vævsgrupper kan ikke helt udelukkes på grund af den biologiske variabilitet af væv. Kontakt din lokale supportrepræsentant med dokumenterede uventede reaktioner.

SPECIFIKKE BEGRÆNSNINGER

- Ikke alle fiksativer er kompatible med analysen. Det anbefalede fiksativ er 10 % NBF i 6 til 72 timer.
- VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail-analysen er udviklet til farvning af vævsnit, der er udskåret i en tykkelse på ~ 4 µm.²⁰ Med vævsnit, der er tykkere end 4 µm, kan der forekomme vævstab.
- Alle analyser er ikke nødvendigvis registreret på alle instrumenter. Kontakt den lokale supportrepræsentant for yderligere oplysninger.
- Oxidation, udtoning og/eller tab af SISH-signalet kan skyldes det anvendte mærke af monteringsmateriale. Se Tab. 30 for at få overblik over kompatible monteringsmaterialer.
- For at forhindre opløsning af Red ISH-signalet må farvede objektglas ikke dehydreres ved nedsækning i alkohol- eller acetonebad. Det anbefales at anvende luft- eller ovntørring. De farvede objektglas skal være fuldstændig tørre før monteringen af dækglasset.
- Som ved enhver test betyder et negativt resultat, at det specifikke mål ikke blev detekteret, og ikke, at målet var fraværende i de(t) analyserede celler eller væv.
- Denne probe er optimeret til brug med VENTANA-reagenser på BenchMark IHC/ISH-instrumenter. Brugere, der afviger fra anbefalede testprocedurer, er ansvarlige for fortolkning af patientresultater under disse omstændigheder.

YDEEVNEKARAKTERISTIKA

Præstationen af VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail blev evalueret ved hjælp af analyseundersøgelser og kliniske undersøgelser. Al farvning blev udført ved brug af VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail-protokollen som bemærket i Tab. 3 på BenchMark IHC/ISH-instrumenter, medmindre andet er anført.

I Tab. 5 og Tab. 6 opsummeres præstationsdataene for alle disse undersøgelser: Undersøgelser af overensstemmelse, gentagelighed og præcision, præcision indenfor samme læser og mellem læsere, lot til lot-præcision, instrumentpræcision mellem laboratorier, analytisk sensitivitet og specificitet, analysekarakterisering og stabilitet. Et undersæt af disse undersøgelser er beskrevet med flere detaljer i de følgende afsnit.

Tab. 5. Sammendrag af præstationsresultater for bryst fra de forskellige analytiske og kliniske studier.

Best- æt	Ikke- bestæt	I alt	Fejltilstande			
			Svag/ingen HER2/Chr17 (celler fra intern kontrol eller målceller)	Baggrunds- fejll	Intet væv	Andet
2893	127	3020	113 (3.74 %)	5 (0.17 %)	6 (0.20 %)	3 (0.10 %)

Tab. 6. Sammendrag af præstationsresultater for gastriske væv fra de forskellige analytiske og kliniske studier.

Best- æt	Ikke- bestæt	I alt	Fejltilstande			
			Svagtingen HER2/Chr17 (celler fra intern kontrol eller målceller)	Bag- grunds- fejll	Intet væv	Andet
1340	17	1357	17 (1.25 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)

KLINISK PRÆSTATION

Undersøgelse af overensstemmelse med PathVysion-analyse: VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail på BenchMark ULTRA-instrument sammenlignet med Abbott/Vysis PathVysion HER-2 DNA Probe Kit

For at evaluere overensstemmelsen mellem VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail-analysen med sammenligningsenheden Abbott/Vysis PathVysion HER-2 FISH Kit ved bestemmelse af HER2-genstatus i invasivt brystkarcinom blev der udført en metodesammenligningsundersøgelse. Tre centrale laboratorier deltog i VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail-analysetesten. Der blev tilvejebragt sekshundredesogtredive tilfælde af humant invasivt brystkarcinom fra tre kliniske optagelsescentre med henblik på potentiel inkludering i undersøgelsen baseret på tidligere opnået HER2-proteinekspression med IHC. Undersøgelsens sponsor leverede 133 tilfælde. De centrale laboratorier, der udførte VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail-analysen og PathVysion HER-2 FISH-analysen, var blindet for IHC-status og id'et for det oprindelige tilfælde for at forhindre bias i evaluering af præparaterne. Ét centralt laboratorie udførte IHC-farvning på alle prøver med PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistof) til de yderligere analyser. Farvningsresultaterne af FISH- og VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail-analysen blev optalt ved tælling af mindst 20 kerner i hvert præparat. Resultaterne blev rapporteret som: HER2/Chr 17-ratio ≥ 2.0 som amplificeret; HER2/Chr 17 < 2.0 som ikke-amplificeret. Af de 678 tilfælde, som blev farvet med både FISH- og VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail-analysen, var 605 præparater tællelige med begge analyser og blev derfor inkluderet i analysen af overensstemmelsesrater.

Primære resultater

Den primære analyse sammenlignede positive og negative procentoverensstemmelsesrater for at fastslå overensstemmelse mellem VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail- og PathVysion HER-2 FISH-analysen i brystkarcinom. Data for amplificerede og ikke-amplificerede kliniske vurderinger af hver analyse, der pooler data fra alle laboratorier, præsenteres i en 2x2-tabel herunder sammen med positive og negative procentvise overensstemmelsesrater, hvor PathVysion HER-2 FISH anvendes som referencanalyse. Godkendelseskriterierne på at påvise sammenlignelig analyse af de to analysemetoder ved brug af BenchMark ULTRA-instrumentet forudsatte, at det tosidede 95 %-scorekonfidensinterval var 85 % eller højere ved pooling af data fra alle tre steder. Godkendelseskriterierne blev opfyldt (Tab. 7). Derudover var de positive og negative overensstemmelsesrater pr. anlæg alle større end 85 % (Tab. 8).

Tab. 7. Overensstemmelse mellem VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail og Abbott/Vysis PathVysion HER-2 DNA Probe Kit i en kohorte af humane præparater af brystkarcinom.

Resultat med VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail	Resultat med PathVysion HER-2 FISH		
	Amplificeret	Ikke- amplificeret	I alt
Amplificeret	270	12	282
Ikke-amplificeret	32	291	323
I alt	302	303	605
	n/n	% (95 % CI for score)	
Positiv procentoverensstemmelse	270/302	89.4 (85.4, 92.4)	
Negativ procentoverensstemmelse	291/303	96.0 (93.2, 97.7)	

Tab. 8. Oversigten over negative, positive og samlede overensstemmelsesrater for VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail og Abbott/Vysis PathVysion HER-2 DNA Probe Kit på præparater af humant brystkarcinom vises efter center.

VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail sammenlignet med PathVysion HER-2 FISH	Positiv procentoverens- stemmelse	Negativ procentoverens- stemmelse	Samlet procentvis overensstem- melse
Laboratorie A: n/N (%) (95 % CI)	92/100 (92.0 %) (85.0, 95.9)	92/93 (98.9 %) (94.2, 99.8)	184/193 (95.3 %) (91.4, 97.5)
Laboratorie B: n/N (%) (95 % CI)	93/103 (90.3 %) (83.0, 94.6)	108/119 (90.8 %) (84.2, 94.8)	201/222 (90.5 %) (86.0, 93.7)
Laboratorie C: n/N (%) (95 % CI)	85/99 (85.9 %) (77.7, 91.4)	91/91 (100.0 %) (95.9, 100.0)	176/190 (92.6 %) (88.0, 95.6)

Disse data tyder på fremragende overensstemmelse mellem VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail-analysen og PathVysion HER-2 FISH Kit med hensyn til bestemmelse af HER2-genstatus i præparater af humant brystkarcinom.

Sekundære resultater

Samlet procentvis overensstemmelse mellem VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail og PathVysion HER-2 FISH Kit og dets tosidede 95 % CI for score, ved pooling af data fra alle kliniske anlæg, var 92.7 % (90.4, 94.5).

Sekundære resultater: IHC sammenlignet med ISH for HER2-status

Den overensstemmelsesundersøgelse, der blev brugt til sammenligning af VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail og PathVysion FISH, var designet til også at evaluere tilfælde baseret på deres IHC-scoring for HER2-proteinniveauer (se metodearkivet til PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistof [P/N 14427EN], for IHC-scoring). Dette muliggjorde en sekundær analyse med henblik på at sammenligne overensstemmelsesrater mellem PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistof og VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail-analysen og mellem PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistof og PathVysion FISH-analysen. I denne undersøgelse blev IHC-scoring på 2+/3+ vurderet som værende positive for HER2-overekspression. Overensstemmelsesdata for PathVysion HER-2 FISH-analysen og PATHWAY HER2/neu (4B5)-antistoffet er vist i Tab. 9. Overensstemmelsesdata for VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail-analysen og PATHWAY HER2/neu (4B5)-antistoffet er vist i Tab. 10.

Tab. 9. IHC på BenchMark ULTRA-instrumentet sammenlignet med FISH: Pooled data fra alle centre.

		Resultat med PathVysion HER-2 FISH		
		Amplificeret	Ikke- amplificeret	I alt
PATHWAY HER2 (4B5)- antistofresultater	Positive (2+/3+ tilfælde)	277	63	340
	Negative (0/1+)	27	238	265
	I alt	304	301	605
		n/n	% (95 % CI for score)	
Positiv procentoverensstemmelse		277/304	91.1 (87.4, 93.8)	

Tab. 10. IHC på BenchMark ULTRA-instrumentet sammenlignet med VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail-analysen: Poolede fra alle centre.

		Resultat med VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail		
		Amplificeret	Ikke-amplificeret	I alt
PATHWAY HER2 (4B5)-antistofresultater	Positive (2+/3+ tilfælde)	248	78	326
	Negative (0/1+)	18	253	271
	I alt	266	331	597
		n/n	% (95 % CI for score)	
Positiv procentoverensstemmelse		248/266	93.2 (89.6, 95.7)	

Overensstemmelsesundersøgelse: VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail-analyse på BenchMark ULTRA-instrument sammenlignet med Dako HER2 IQFISH pharmDx™ Kit-analyse

Der blev udført en overensstemmelsesundersøgelse for at evaluere VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail-analysen sammenlignet med Dako HER2 IQFISH pharmDx™ Kit for fluorescerende in situ-hybridisering (FISH) ved bestemmelse af HER2-genstatus i GEA. Komparabiliteten af analysen på GEA-præparater blev bestemt ved at sammenligne farvningsresultater fra de to analyser (Tab. 11). Ethundredefireogtredive (134) humane GEA-præparater (en blanding af amplificerede og ikke-amplificerede tilfælde) blev farvet ved brug af VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail. Samme kohorte blev farvet ved hjælp af Dako HER2 IQFISH pharmDx™-analysen. Resultaterne, der viser detaljerede oplysninger om negative, positive og samlede overensstemmelsesrater for de 146 kliniske prøver i denne kohorte, og som var tællelige med både Dako HER2 IQFISH pharmDx™-analysen og VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail-analysen, er vist i Tab. 11 og Tab. 12.

Tab. 11. Overensstemmelse mellem VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail og Dako HER2 IQFISH pharmDx™-analysen i en kohorte af humane GEA-præparater

Amplifikationsstatus med VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail	Dako HER2 IQFISH pharmDx™-analyse Amplifikationsstatus	
	Amp	Ikke-amp
Amp	49	8
Ikke-amp	5	84

Tab. 12. Oversigt over negative, positive og samlede overensstemmelsesrater for VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail og Dako HER2 IQFISH pharmDx™ på humane GEA-præparater.

	Negativ Overensstemmelsesrate		Positive Overensstemmelsesrate		Samlet Overensstemmelsesrate	
	Rådata/antal tilfælde	Procent (95 % CI for score)	Rådata/antal tilfælde	Procent (95 % CI for score)	Rådata/antal tilfælde	Procent (95 % CI for score)
VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail	84/92	91.3 (83.8–95.5)	49/54	90.7 (80.1–96.0)	133/146	91.1 (85.4–94.7)

ANALYTISK YDEEVNE

BenchMark IHC/ISH-instrumentets gentagelighed og præcision ved brystkarcinom

Gentageligheden og præcisionen af VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail blev evalueret på BenchMark IHC/ISH-instrumenter i kombination med VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit og VENTANA Red ISH DIG Detection Kit.

Reproducerbarhed indenfor samme kørsel blev evalueret med 28 præparater af brystkarcinom. To ens objektglas fra hvert præparat blev farvet med VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail på et enkelt BenchMark ULTRA-, BenchMark XT- eller BenchMark GX-instrument. Til analysen af BenchMark XT- og GX-instrumentdataene blev tilfælde med ratioer mellem 1.5 til 2.5 vægtet til deres prævalens.

Dag til dag-præcision blev også evalueret ved brug af præparater af brystkarcinom. Ens objektglas fra hvert af de 28 præparater blev farvet med VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail på BenchMark IHC/ISH-instrumenter på 5 ikke-sammenhængende dage. Til analysen af BenchMark XT- og BenchMark GX-instrumentdataene blev tilfælde med ratioer mellem 1.5 til 2.5 vægtet til deres prævalens.

Reproducerbarhed inden for samme kørsel blev bestemt med gennemsnitlig positiv overensstemmelse (APA), gennemsnitlig negativ overensstemmelse (ANA) og samlet procentvis overensstemmelse (OPA). Dag til dag-præcisionen blev bestemt med positiv procentvis overensstemmelse (PPA), negativ procentvis overensstemmelse (NPA) og samlet procentvis overensstemmelse (OPA) for alle observationer i den evaluerbare population. Der findes et sammendrag af resultaterne af begge undersøgelser i Tab. 13.

Tab. 13. BenchMark IHC/ISH-instrumentets reproducerbarhed indenfor samme kørsel og dag til dag-præcision.

Platform	Gentagelighed/præcision	Klinisk Status	Overensstemmelse			
			Type	n/N	%	95 % CI
ULTRA	Reproducerbarhed indenfor samme kørsel	Amplificeret	APA	194/194	100	(98.1, 100)
		Ikke-amplificeret	ANA	186/186	100	(98.0, 100)
		I alt	OPA	190/190	100	(98.0, 100)
ULTRA	Dag til dag præcision	Amplificeret	PPA	139/139	100	(97.3, 100)
		Ikke-amplificeret	NPA	135/135	100	(97.2, 100)
		I alt	OPA	274/274	100	(98.6, 100)
XT	Reproducerbarhed indenfor samme kørsel	Amplificeret	APA	128.8/128.8	100	(97.1, 100)
		Ikke-amplificeret	ANA	151.2/151.2	100	(97.5, 100)
		I alt	OPA	140.0/140.0	100	(97.3, 100)
XT	Dag til dag præcision	Amplificeret	PPA	128.8/128.8	100	(97.1, 100)
		Ikke-amplificeret	NPA	151.2/151.2	100	(97.5, 100)
		I alt	OPA	280.0/280.0	100	(98.6, 100)
GX	Reproducerbarhed indenfor samme kørsel	Amplificeret	APA	128.8/128.8	100	(97.1, 100)
		Ikke-amplificeret	ANA	151.2/151.2	100	(97.5, 100)
		I alt	OPA	140.0/140.0	100	(97.3, 100)
GX	Dag til dag præcision	Amplificeret	PPA	128.8/128.8	100	(97.1, 100)

Platform	Gentagelighed/præcision	Klinisk Status	Overensstemmelse			
			Type	n/N	%	95 % CI
		Ikke-amplificeret	NPA	151.2/151.2	100	(97.5, 100)
		I alt	OPA	280.0/280.0	100	(98.6, 100)

Bemærk: 95 % CI'er blev beregnet under anvendelse af percentil-bootstrap-metoden. I tilfælde, hvor pointestimatet var 100 %, blev Wilson Score-metoden anvendt. Fire tilfælde med ISH-forhold mellem 1.5 og 2.5, begge inklusive, blev inkluderet i undersøgelsen.

Præcision imellem instrumenter ved brystkarcinom

Mellempræcisionen mellem BenchMark IHC/ISH-instrumenter for VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail blev bestemt ved farvning af ens objektglas med 28 præparater af brystkarcinom på 3 BenchMark IHC/ISH-instrumenter med VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail ved brug af VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit og VENTANA Red ISH DIG Detection Kit. Mellempræcisionen mellem instrumenter blev bestemt med PPA, NPA og OPA for alle observationer i den evaluerbare population. Tilfældene med ratioer mellem 1.5 til 2.5 blev vægтет til deres prævalens (BenchMark XT-/BenchMark GX-instrumenter). Der findes et sammendrag af resultaterne af denne undersøgelse i Tab. 14.

Tab. 14. Mellempræcision mellem BenchMark IHC/ISH-instrumenter.

Platform	Præcision	Klinisk status	Overensstemmelse			
			Type	n/N	%	95 % CI
ULTRA	Mellempræcision mellem instrumenter	Amplificeret	PPA	84/84	100	(95.6, 100)
		Ikke-amplificeret	NPA	84/84	100	(95.6, 100)
		I alt	OPA	168/168	100	(97.8, 100)
XT	Mellempræcision mellem instrumenter	Amplificeret	PPA	77.3/77.3	100	(95.3, 100)
		Ikke-amplificeret	NPA	90.7/90.7	100	(95.9, 100)
		I alt	OPA	168.0 / 168.0	100	(97.8, 100)
GX	Mellempræcision mellem instrumenter	Amplificeret	PPA	76.2/76.2	100	(95.2, 100)
		Ikke-amplificeret	NPA	90.7/90.7	100	(95.9, 100)
		I alt	OPA	166.9 / 166.9	100	(97.8, 100)

Bemærk: 95 % CI'er blev beregnet under anvendelse af percentil-bootstrap-metoden. I tilfælde, hvor pointestimatet var 100 %, blev Wilson Score-metoden anvendt. Fire tilfælde med ISH-forhold mellem 1.5 og 2.5, begge inklusive, blev inkluderet i undersøgelsen.

Præcision indenfor samme læser og mellem læsere ved brystkarcinom

BenchMark IHC/ISH-instrumentets præcision indenfor samme læser og mellem læsere for VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail blev bestemt ved at få tre læsere til at evaluere 60 præparater af brystkarcinom farvet med VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail ved brug af VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit og VENTANA Red ISH DIG Detection Kit på BenchMark ULTRA-instrument. Ved præcision indenfor samme læser blev det samme sæt objektglas læst to gange efter mindst to ugers pause mellem hver læsning. Præcisionen indenfor samme læser og mellem læsere blev bestemt med

APA, ANA og OPA for alle observationer i den evaluerbare population. Der findes et sammendrag af resultaterne af denne undersøgelse i Tab. 15.

Tab. 15. Præcision indenfor samme læser og mellem læsere med BenchMark ULTRA-instrumentet.

Præcision	Klinisk status	Overensstemmelse			
		Type	n/N	%	95 % CI
For samme læser	Amplificeret	APA	178/181	98.3	(96.3, 100)
	Ikke-amplificeret	ANA	174/177	98.3	(96.1, 100)
	I alt	OPA	176/179	98.3	(96.1, 100)
Fra læser til læser	Amplificeret	APA	350/362	96.7	(93.2, 99.4)
	Ikke-amplificeret	ANA	342/354	96.6	(92.8, 99.4)
	I alt	OPA	346/358	96.6	(92.8, 99.4)

Bemærk: 95 %-CI'er blev beregnet under anvendelse af percentil-bootstrap-metoden. Seks tilfælde med ISH-forhold mellem 1.5 og 2.5, begge inklusive, blev inkluderet i undersøgelsen.

Præcision mellem platforme ved brystkarcinom

BenchMark IHC/ISH-instrumentets præcision mellem platforme for VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail blev bestemt ved at evaluere 28 præparater af brystkarcinom farvet med VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail ved brug af VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit og VENTANA Red ISH DIG Detection Kit på BenchMark IHC/ISH-instrumenter. Præcisionen mellem platforme blev bestemt med PPA, NPA og OPA for alle observationer i den evaluerbare population. Tilfældene med ratios mellem 1.5 til 2.5 blev vægтет til deres prævalens. Der findes et sammendrag af resultaterne af denne undersøgelse i Tab. 16.

Tab. 16. Præcision af BenchMark IHC/ISH-instrument mellem platforme.

Præcision	Klinisk status	Overensstemmelse			
		Type	n/N	%	95 % CI
Præcision mellem platforme	Amplificeret	PPA	230.8/230.8	100	(98.4, 100)
	Ikke-amplificeret	NPA	271.0/272.2	99.6	(98.3, 100)
	I alt	OPA	501.8/502.9	99.8	(99.2, 100)

Bemærk: 95 % CI'er blev beregnet under anvendelse af percentil-bootstrap-metoden. I tilfælde, hvor pointestimatet var 100 %, blev Wilson Score-metoden anvendt. Fire tilfælde med ISH-forhold mellem 1.5 og 2.5, begge inklusive, blev inkluderet i undersøgelsen.

BenchMark IHC/ISH-instrument: Gentagelighed og præcision ved gastrisk adenokarcinom

Gentageligheden og præcisionen af VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail blev evalueret på BenchMark IHC/ISH-instrumenterne i kombination med VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit og VENTANA Red ISH DIG Detection Kit.

Reproducerbarhed indenfor samme kørsel blev evalueret med fjorten præparater af gastrisk adenokarcinom. To ens objektglas fra hvert af præparat af gastrisk adenokarcinom blev farvet med VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail på et enkelt BenchMark IHC/ISH-instrument. Tilfældene med ratios mellem 1.5 til 2.5 blev vægтет til deres prævalens.

Dag til dag præcision blev også evalueret ved brug af præparater af gastrisk adenokarcinom. Ens objektglas fra hvert af de fjorten præparater blev farvet med

VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail på BenchMark IHC/ISH-instrumenter på 5 ikke-sammenhængende dage. Tilfældene med ratios mellem 1.5 til 2.5 blev vægget til deres prævalens.

Reproducerbarhed inden for samme kørsel blev bestemt med gennemsnitlig positiv overensstemmelse (APA), gennemsnitlig negativ overensstemmelse (ANA) og samlet procentvis overensstemmelse (OPA). Dag til dag-præcisionen blev bestemt med positiv procentvis overensstemmelse (PPA), negativ procentvis overensstemmelse (NPA) og samlet procentvis overensstemmelse (OPA) for alle observationer i den evaluerbare population. Der findes et sammendrag af resultaterne af begge undersøgelser i Tab. 17.

Tab. 17. BenchMark IHC/ISH-instrument: Reproducerbarhed indenfor samme kørsel og dag til dag-præcision.

Platform	Gentagelighed/præcision	Klinisk Status	Overensstemmelse			
			Type	n/N	%	95 % CI
ULTRA	Reproducerbarhed indenfor samme kørsel	Amplificeret	APA	70.0/70.0	100	(94.8, 100)
		Ikke-amplificeret	ANA	70.0/70.0	100	(94.8, 100)
		I alt	OPA	70.0/70.0	100	(94.8, 100)
ULTRA	Dag til dag præcision	Amplificeret	PPA	70.0/70.0	100	(94.8, 100)
		Ikke-amplificeret	NPA	70.0/70.0	100	(94.8, 100)
		I alt	OPA	140.0/140.0	100	(97.3, 100)
XT	Reproducerbarhed indenfor samme kørsel	Amplificeret	APA	70.0/70.0	100	(94.8, 100)
		Ikke-amplificeret	ANA	70.0/70.0	100	(94.8, 100)
		I alt	OPA	70.0/70.0	100	(94.8, 100)
XT	Dag til dag præcision	Amplificeret	PPA	70.0/70.0	100	(94.8, 100)
		Ikke-amplificeret	NPA	70.0/70.0	100	(94.8, 100)
		I alt	OPA	140.0/140.0	100	(97.3, 100)
GX	Reproducerbarhed indenfor samme kørsel	Amplificeret	APA	64.6/65.1	99.1	(95.9, 100)
		Ikke-amplificeret	ANA	70.0/70.6	99.2	(95.2, 100)
		I alt	OPA	67.3/67.9	99.2	(96.9, 100)
GX	Dag til dag præcision	Amplificeret	PPA	67.3/67.9	99.2	(96.5, 100)
		Ikke-amplificeret	NPA	70.0/70.0	100	(94.8, 100)
		I alt	OPA	137.3/137.9	99.6	(98.5, 100)

Bemærk: 95 % CI'er blev beregnet under anvendelse af percentil-bootstrap-metoden. I tilfælde, hvor pointestimatet var 100 %, blev Wilson Score-metoden anvendt. To tilfælde med ISH-forhold mellem 1.5 og 2.5, begge inklusive, blev inkluderet i undersøgelsen.

Mellempræcision mellem instrumenter ved gastrisk adenokarcinom

Mellempræcisionen mellem BenchMark IHC/ISH-instrumenter for VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail blev bestemt ved farvning af ens objektglas med fjorten præparater af gastrisk adenokarcinom på 3 BenchMark IHC/ISH-instrumenter med VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail ved brug af VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit og VENTANA Red ISH DIG Detection Kit. Mellempræcisionen mellem instrumenter blev bestemt med PPA, NPA og OPA for alle observationer i den evaluerbare population. Tilfældene med ratios mellem 1.5 til 2.5 blev vægget til deres prævalens. Der findes et sammendrag af resultaterne af denne undersøgelse i Tab. 18.

Tab. 18. Mellempræcision mellem BenchMark IHC/ISH-instrumenter.

Platform	Præcision	Klinisk status	Overensstemmelse			
			Type	n/N	%	95 % CI
ULTRA	Mellempræcision mellem instrumenter	Amplificeret	PPA	42.0/42.0	100	(91.6, 100)
		Ikke-amplificeret	NPA	42.0/42.0	100	(91.6, 100)
		I alt	OPA	84.0/84.0	100	(95.6, 100)
XT	Mellempræcision mellem instrumenter	Amplificeret	PPA	40.4/40.9	98.6	(94.1, 100)
		Ikke-amplificeret	NPA	40.9/40.9	100	(91.4, 100)
		I alt	OPA	81.3/81.9	99.3	(97.5, 100)
GX	Mellempræcision mellem instrumenter	Amplificeret	PPA	40.9/40.9	100	(91.4, 100)
		Ikke-amplificeret	NPA	42.0/42.0	100	(91.6, 100)
		I alt	OPA	82.9/82.9	100	(95.6, 100)

Bemærk: 95 % CI'er blev beregnet under anvendelse af percentil-bootstrap-metoden. I tilfælde, hvor pointestimatet var 100 %, blev Wilson Score-metoden anvendt. To tilfælde med ISH-forhold mellem 1.5 og 2.5, begge inklusive, blev inkluderet i undersøgelsen.

Præcision indenfor samme læser og mellem læsere ved gastrisk adenokarcinom

BenchMark IHC/ISH-instrumentets præcision indenfor samme læser og mellem læsere for VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail blev bestemt ved at få tre læsere til at evaluere 28 præparater af gastrisk adenokarcinom farvet med VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail ved brug af VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit og VENTANA Red ISH DIG Detection Kit på BenchMark ULTRA-instrument. Alle objektglas blev randomiseret og maskeret for så vidt angår tilfældets diagnose. Ved præcision inden for samme læser blev det samme sæt objektglas læst to gange efter mindst to ugers pause mellem hver læsning. Præcisionen indenfor samme læser og mellem læsere blev bestemt med APA, ANA og OPA for alle observationer i den evaluerbare population. Der findes et sammendrag af resultaterne af denne undersøgelse i Tab. 19.

Tab. 19. Præcision indenfor samme læser og mellem læsere med BenchMark ULTRA-instrumentet.

Præcision	Klinisk status	Overensstemmelse			
		Type	n/N	%	95 % CI
Fra læser til læser	Amplificeret	APA	80/84	95.2	(90.5, 100)

Præcision	Klinisk status	Overensstemmelse			
		Type	n/N	%	95 % CI
	Ikke-amplificeret	ANA	80/84	95.2	(90.5, 100)
	I alt	OPA	80/84	95.2	(90.5, 100)
	Amplificeret	APA	82/84	97.6	(95.2, 100)
For samme læser	Ikke-amplificeret	ANA	82/84	97.6	(95.2, 100)
	I alt	OPA	82/84	97.6	(95.2, 100)

Bemærk: 95 % CI'er blev beregnet under anvendelse af percentil-bootstrap-metoden. To tilfælde med ISH-forhold mellem 1.5 og 2.5, begge inklusive, blev inkluderet i undersøgelsen.

Præcision mellem platforme ved gastrisk adenokarcinom

BenchMark IHC/ISH-instrumentets præcision mellem platforme for VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail blev bestemt ved at evaluere fjorten præparater af gastrisk adenokarcinom farvet med VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail ved brug af VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit og VENTANA Red ISH DIG Detection Kit på BenchMark IHC/ISH-instrumenter. Præcisionen mellem platforme blev bestemt med PPA, NPA og OPA for alle observationer i den evaluerbare population. Tilfældene med ratios mellem 1.5 til 2.5 blev vægtet til deres prævalens. Der findes et sammendrag af resultaterne af denne undersøgelse i Tab. 20.

Tab. 20. BenchMark IHC/ISH-instrument: Præcision mellem platforme.

Præcision	Klinisk status	Overensstemmelse			
		Type	n/N	%	95 % CI
Præcision mellem platforme	Amplificeret	PPA	123.3/123.9	99.5	(98.1, 100)
	Ikke-amplificeret	NPA	124.9/124.9	100	(97.0, 100)
	I alt	OPA	248.2/248.8	99.8	(99.2, 100)

Bemærk: 95 % CI'er blev beregnet under anvendelse af percentil-bootstrap-metoden. I tilfælde, hvor pointestimatet var 100 %, blev Wilson Score-metoden anvendt. To tilfælde med ISH-forhold mellem 1.5 og 2.5, begge inklusive, blev inkluderet i undersøgelsen.

Lot til lot-præcision ved brystkarcinom

Lot til lot-præcisionen blev bestemt ved at teste 3 produktionslots af VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit og VENTANA Red ISH DIG Detection Kit på BenchMark ULTRA-instrumenter. Otteogtyve tilfælde af brystkarcinom blev farvet med hver probe og hvert detektionskit. I Tab. 21 vises en oversigt over resultaterne for lot til lot-præcisionen for analysen.

Tab. 21. Lot til lot-præcision.

Præcision	Klinisk status	Overensstemmelse			
		Type	n/N	%	95 % CI
Lot til lot	Amplificeret	PPA	121/121	100	(96.9, 100)

Præcision	Klinisk status	Overensstemmelse			
		Type	n/N	%	95 % CI
	Ikke-amplificeret	NPA	123/123	100	(97.0, 100)
	I alt	OPA	244/244	100	(98.5, 100)

Bemærk: 95 % CI'er blev beregnet under anvendelse af percentil-bootstrap-metoden. I tilfælde, hvor pointestimatet var 100 %, blev Wilson Score-metoden anvendt. Fire tilfælde med ISH-forhold mellem 1.5 og 2.5, begge inklusive, blev inkluderet i undersøgelsen.

Undersøgelse af reproducerbarhed på BenchMark ULTRA-instrument mellem laboratorier ved brystkarcinom og gastrisk adenokarcinom

Der blev foretaget en undersøgelse af reproducerbarhed mellem laboratorier (ILR) for at evaluere reproducerbarheden af VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail med hensyn til at bestemme HER2-genstatus i væv fra brystkarcinom og gastrisk adenokarcinom farvet på BenchMark ULTRA-instrumentet i kombination med VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit og VENTANA Red ISH DIG Detection Kit.

Otteogtyve FFPE-præparater med væv fra bryst- og gastrisk adenokarcinom blev anvendt, og cirka halvdelen af disse tilfælde blev amplificeret for HER2-ekspressions, mens en halvdel blev ikke-amplificeret for HER2-status.

Der blev skåret flere vævssnit fra hvert præparat, som blev sendt til 3 eksterne laboratorier. På hvert center farvedes 28 brysttilfælde og 28 gastriske tilfælde på 5 ikke-sammenhængende dage i løbet af minimum 20 dage. Efter farvning på BenchMark ULTRA-instrumentet evaluerede en læser hvert objektglas for at tildele HER2-genstatus. Resultaterne af undersøgelsen er sammenfattet i Tab. 22 og Tab. 23. Dataene blev analyseret for PPA og NPA for alle observationer. For hvert tilfælde blev alle evaluerbare observationer (amplificerede ift. ikke-amplificerede) sammenlignet med det modale resultat for hvert tilfælde. Tilfældene med ratios mellem 1.5 til 2.5 blev vægtet til deres prævalens. Disse sammenligninger blev poollet fra forskellige centre og dage, og derefter blev resultaterne samlet for forskellige vævssnit.

Tab. 22. ILR: Overensstemmelsesrater på BenchMark ULTRA-instrumentet for brystkarcinom.

Reproducerbarhed mellem laboratorier		Overensstemmelse			
		Type	n/N	%	95 % CI
Mellem forskellige centre (3 laboratorier)		PPA	208.9/208.9	100	(98.2, 100.0)
		NPA	198.1/200.3	98.9	(96.8, 100.0)
		OPA	407.0/409.3	99.5	(98.4, 100.0)
Mellem dage (5 ikke-fortløbende dage)	Anlæg A	PPA	72/74	97.3	(92.3, 100.0)
		NPA	63/63	100	(94.3, 100.0)
		OPA	135/137	98.5	(95.6, 100.0)
	Anlæg B	PPA	70/70	100	(94.8, 100.0)
		NPA	63/64	98.4	(95.8, 100.0)
		OPA	133/134	99.3	(97.8, 100.0)
	Anlæg C	PPA	70/70	100	(94.8, 100.0)
		NPA	69/69	100	(94.7, 100.0)
		OPA	139/139	100	(97.3, 100.0)

Bemærk: 95 % CI'er blev beregnet under anvendelse af percentil-bootstrap-metoden. I tilfælde, hvor pointestimatet var 100 %, blev Wilson Score-metoden anvendt. Fire tilfælde med ISH-forhold mellem 1.5 og 2.5, begge inklusive, blev inkluderet i undersøgelsen.

Tab. 23. ILR: Overensstemmelsesrater på BenchMark ULTRA-instrumentet for gastrisk adenokarcinom.

Reproducerbarhed mellem laboratorier		Overensstemmelse			
		Type	n/N	%	95 % CI
Mellem forskellige centre (3 laboratorier)		PPA	206.8/206.8	100	(98.2, 100.0)
		NPA	208.4/208.9	99.7	(99.2, 100.0)
		OPA	415.1/415.7	99.9	(99.6, 100.0)
Mellem dage (5 ikke-fortløbende dage)	Anlæg A	PPA	70/70	100	(94.8, 100.0)
		NPA	69/70	98.6	(96.0, 100.0)
		OPA	139/140	99.3	(97.9, 100.0)
	Anlæg B	PPA	67/67	100	(94.6, 100.0)
		NPA	69/69	100	(94.7, 100.0)
		OPA	136/136	100	(97.3, 100.0)
	Anlæg C	PPA	70/70	100	(94.8, 100.0)
		NPA	70/70	100	(94.8, 100.0)
		OPA	140/140	100	(97.3, 100.0)

Bemærk: 95 % CI'er blev beregnet under anvendelse af percentil-bootstrap-metoden. I tilfælde, hvor pointestimatet var 100 %, blev Wilson Score-metoden anvendt. Fire tilfælde med ISH-forhold mellem 1.5 og 2.5, begge inklusive, blev inkluderet i undersøgelsen.

Ydeevne af VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail på BenchMark ULTRA PLUS-instrumentet

Konkordans mellem BenchMark ULTRA PLUS- og BenchMark ULTRA-instrumenterne for brystkarcinom

Tre laboratorier i forskellige institutioner i USA deltog i undersøgelsen af konkordans mellem BenchMark ULTRA PLUS-instrumentet versus BenchMark ULTRA-instrumentet. Der var 193 unikke FFPE-tilfælde med tilfælde af invasivt brystkarcinom, som repræsenterede farvningsområdet for VENTANA HER2 Dual ISH Cocktail-analysen, med nogenlunde ligelig fordeling mellem HER2-amplificerede og ikke-HER2-amplificerede tilfælde. Objektglas fra alle tilfælde blev farvet med H&E samt VENTANA HER2 Dual ISH Cocktail af Roche på et BenchMark ULTRA-instrument ved hjælp af den anbefalede farvningsprotokol. Ufarvede objektglas med væv fra alle tilfælde blev randomiseret og ligeligt fordelt (64/65 tilfælde/pr. anlæg) på deltagende anlæg med henblik på farvning på et BenchMark ULTRA PLUS-instrument ved brug af den anbefalede VENTANA HER2 Dual ISH Cocktail-farvningsprotokol. Patologer, der ikke kendte tilfældets status, evaluerede og scorede objektglassene på et BenchMark IHC/ISH-instrument og bestemte HER2-genstatusen. Efter en periode på 2 uger evaluerede patologerne de objektglas, der var blevet farvet på det andet BenchMark IHC/ISH-instrument. HER2-genstatusen blev bestemt ved brug af ratioen mellem HER2-gensignaler og Chromosome 17 (Chr17)-signaler (dvs. HER2:Chr17-ratio) i tumorcellekernerne. Ved ratio 2.0 eller større blev tilfældet vurderet som HER2-amplificeret. Hvis det var mindre end 2.0, blev det vurderet som ikke-HER2-amplificeret. Resultaterne blev analyseret af Roche. OPA-, PPA- og NPA-raterne var henholdsvis 97.1 % (535/551), 97.3 % (248/255) og 97.0 % (287/296). Resultaterne er sammenfattet i Tab. 24.

Tab. 24. Poollet overensstemmelse af HER2-genstatus for brystkarcinomtlfælde farvet med VENTANA HER2 Dual ISH Cocktail på BenchMark ULTRA PLUS-instrumentet sammenlignet med BenchMark ULTRA-instrumentet

BenchMark ULTRA PLUS HER2-genstatus	BenchMark ULTRA HER2-genstatus		I alt
	Amplificeret	Ikke-amplificeret	
Amplificeret	248	9	257

BenchMark ULTRA PLUS HER2-genstatus	BenchMark ULTRA HER2-genstatus		I alt
	Amplificeret	Ikke-amplificeret	
Ikke-amplificeret	7	287	294
I alt	255	296	551
	n/N	% (95 % CI)	
PPA	248/255	97.3 (95.0, 99.2)	
NPA	287/296	97.0 (94.8, 99.0)	
OPA	535/551	97.1 (95.5, 98.6)	

Bemærk: Tosidede 95 %-CI'er blev beregnet med percentil-bootstrap-metoden ud fra 2000 ens objektglas valgt med stratifikation på de 4 diagnostiske scorepuljer, der blev brugt under valget af tilfældet [amplificeret (ikke grænsetilfælde), ikke-amplificeret (ikke grænsetilfælde), grænsetilfælde amplificeret, grænsetilfælde ikke-amplificeret]

Undersøgelse af reproducerbarhed mellem laboratorier af BenchMark ULTRA PLUS-instrumentet med brystkarcinom

Der blev foretaget en undersøgelse af reproducerbarhed mellem laboratorier (ILR) for at evaluere reproducerbarheden af VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail med hensyn til at bestemme HER2-genstatus i væv fra brystkarcinom farvet på BenchMark ULTRA PLUS-instrumentet i kombination med VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit og VENTANA Red ISH DIG Detection Kit.

Otteogtyve unikke FFPE-vævssnit med tilfælde af invasivt brystkarcinom, som repræsenterede farvningsområdet for VENTANA HER2 Dual ISH Cocktail-analysen, med nogenlunde ligelig fordeling mellem HER2-amplificerede og ikke-HER2-amplificerede tilfælde.

Der blev skåret flere vævssnit fra hvert præparat, som blev sendt til 3 eksterne laboratorier. Alle 28 vævssnit blev farvet på et BenchMark ULTRA PLUS-instrument på hver af de 5 ikke-fortløbende dage i løbet af minimum 20 dage på hvert laboratorium. Læsere evaluerede objektglassene og bestemte HER2-genstatusen.

Resultaterne er sammenfattet i Tab. 25 og Tab. 26. Dataene blev analyseret for PPA, NPA og OPA Tab. 25 og APA, ANA og OPA i Tab. 26 på tværs af alle observationer. For hvert tilfælde blev alle evaluerbare observationer (amplificerede ift. ikke-amplificerede) sammenlignet med det modale resultat for hvert tilfælde. Disse sammenligninger blev poollet fra forskellige centre og dage, og derefter blev resultaterne samlet for forskellige vævssnit.

Tab. 25. ILR: Overensstemmelsesrater med modalstatus på BenchMark ULTRA PLUS-instrumentet for brystkarcinom.

Reproducerbarhed mellem laboratorier	Overensstemmelse			
	Type	n/N	%	95 % CI
Samlet	PPA	372/381	97.6	(95.3, 100.0)
	NPA	421/440	95.7	(91.1, 99.3)
	OPA	793/821	96.6	(94.3, 98.5)
Mellem forskellige centre (3 laboratorier)	PPA	380/389	97.7	(95.3, 100.0)
	NPA	421/432	97.5	(95.3, 99.3)
	OPA	801/821	97.6	(96.3, 98.7)
Fra læser til læser	PPA	383/389	98.5	(97.1, 99.5)
	NPA	424/432	98.1	(97.1, 99.0)
	OPA	807/821	98.3	(97.5, 99.0)

Bemærk: De tosidede 95 %-CI'er blev beregnet under anvendelse af percentil-bootstrap-metoden.

Tab. 26. ILR: Parvise overensstemmelsesrater på BenchMark ULTRA PLUS-instrumentet for brystkarcinom

Reproducerbarhed mellem laboratorier	Overensstemmelse			
	Type	n/N	%	95 % CI
Mellem forskellige centre (3 centre)	APA	7204/7652	94.1	(91.1, 96.9)
	ANA	7968/8416	94.7	(91.5, 97.4)
	OPA	7586/8034	94.4	(91.5, 97.1)
Fra læser til læser	APA	370/390	94.9	(92.5, 97.1)
	ANA	408/428	95.3	(92.7, 97.5)
	OPA	389/409	95.1	(92.7, 97.3)
Mellem dage (5 ikke-fortløbende dage)	APA	1472/1519	96.9	(95.5, 98.2)
	ANA	1642/1689	97.2	(95.8, 98.5)
	OPA	1557/1604	97.1	(95.7, 98.3)

Bemærk: De tosidede 95 % CI'er blev beregnet under anvendelse af percentil-bootstrap-metoden.

Konkordans mellem BenchMark ULTRA PLUS- og BenchMark ULTRA-instrumenterne for gastrisk karcinom

Der var 109 unikke FFPE-vævssnit med tilfælde af invasivt gastrisk karcinom, som repræsenterede farvningsområdet for VENTANA HER2 Dual ISH Cocktail-analysen, med nogenlunde ligelig fordeling mellem HER2-amplificerede og ikke-HER2-amplificerede vævssnit. Objektglas med væv blev farvet på et BenchMark ULTRA PLUS-instrument og et BenchMark ULTRA-instrument ved brug af den anbefalede farvningsprotokol. Farvede objektglas blev bedømt af en patolog. Den samlede procentvise overensstemmelse for VENTANA HER2 Dual ISH Cocktail-farvning baseret på HER2-genstatussen (HER2-amplificeret, ikke-HER2-amplificeret) var 92.4 %. Tosidede 95 %-konfidensintervaller, som er 84.4 % til 96.5 %, blev beregnet ved anvendelse af Wilson-scoring-metoden. Raterne for baggrundsacceptabilitet og morfologisk acceptabilitet for alle vævssnit var 100 % for BenchMark ULTRA PLUS-instrumentet.

Præcisionsundersøgelser for gastrisk karcinom på BenchMark ULTRA PLUS-instrumentet

Tolv vævssnit med gastrisk karcinom, som repræsenterede farvningsområdet for VENTANA HER2 Dual ISH Cocktail-analysen, blev testet på BenchMark ULTRA PLUS-instrumentet. Vævssnittene havde en nogenlunde ligelig fordeling mellem HER2-amplificeret og ikke-HER2-amplificeret HER2-genstatus. Farvede objektglas blev bedømt af en patolog. Alle overensstemmelsesrater blev beregnet ved brug af tosidede 95 %-konfidensintervaller ved brug af percentil-bootstrap-metoden.

I forbindelse med reproducerbarhed indenfor samme kørsel blev fem objektglas pr. vævssnit farvet på BenchMark ULTRA PLUS-instrumentet. Den samlede procentvise overensstemmelse for VENTANA HER2 Dual ISH Cocktail-farvning baseret på HER2-genstatussen (HER2-amplificeret, ikke-HER2-amplificeret) var 91.7 % (95 % CI: 81.7, 100.0).

Dag til dag-præcision blev bestemt ved at farve to objektglas pr. tilfælde på BenchMark ULTRA PLUS-instrumentet i fem farvekørsler over en periode på fem ikke-sammenhængende dage. Den samlede procentvise overensstemmelse for VENTANA HER2 Dual ISH Cocktail-farvning baseret på HER2-genstatussen (HER2-amplificeret, ikke-HER2-amplificeret) var 90.8 % (95 % CI: 80.8, 100.0)

Mellemprecision mellem instrumenter blev bestemt ved at farve to objektglas pr. tilfælde på hvert af i alt tre BenchMark ULTRA PLUS-instrumenter. Den samlede procentvise overensstemmelse for VENTANA HER2 Dual ISH Cocktail-farvning baseret på HER2-genstatussen (HER2-amplificeret, ikke-HER2-amplificeret) var 92.6 % (95 % CI: 84.5, 100.0).

Sensitivitet og specificitet

Den analytiske specificitet (hybridiseringseffektivitet) for VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail-analysen blev bestemt ved farvning af normale humane metafaseudstrygninger på et BenchMark ULTRA-instrument. Af 100 analyserede

metafaseudstrygninger viste 100 % specifik samlokalisering af både HER2- og Chromosome 17-prober.

Analytisk sensitivitet måler probens evne til at detektere dens specifikke mål, mens specificitet er dens evne til at skelne målet fra andre sekvenser i præparatet. Analysen har en kontrol for analytisk sensitivitet og specificitet indbygget i hvert enkelt humant væv. Normale humane celler (inklusive: stromale fibroblaster, endotelceller, lymfocytter og ikke-neoplastiske brystepitelceller) skal indeholde 1–2 kopier af HER2 og Chr17. Derfor er 1–2 kopier for HER2 og Chr17 i normale humane celler en indikation af, at prøberne detekterer deres specifikke mål (en målestok for sensitivitet). En til to kopier for HER2 og Chr17 i normale celler er også en indikation af, at prøben detekterer dens specifikke mål (en målestok for specificitet). Den første beståelsesfrekvens for VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail-analysen på 40 brystprøver, der var fikseret inden for ASCO CAP-retningslinjerne (10 % NBF i 6 til 72 timer) var 97.5 % (87.1–99.6) på BenchMark ULTRA-instrumenter, 100 % (91.2–100) på BenchMark XT-instrumenter og 97.5 % (87.1–99.6) på BenchMark GX-instrumenter. Specificiteten på de samme 40 brystprøver uden probekontrol var 100 % (91.2–100) på BenchMark ULTRA-instrumenter.

Den første beståelsesfrekvens for VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail-analysen på 39 gastriske prøver, der var fikseret inden for ASCO CAP-retningslinjerne (10 % NBF i 6 til 72 timer) var 97.4 % (86.8–99.5) på BenchMark ULTRA-instrumenter, 97.4 % (86.8–99.5) på BenchMark XT-instrumenter og 100 % (91–100) på BenchMark GX-instrumenter.

Analytisk sensitivitet og specificitet blev også vurderet ved at farve flere tilfælde af normale og neoplastiske humane væv med VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail-analyse, VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit og VENTANA Red ISH DIG Detection Kit. Resultaterne er anført i Tab. 27 og Tab. 28. Der blev ikke observeres nogen uventet farvning med VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail-analysen på normale og neoplastiske væv.

Tab. 27. Sensitivitet/specificitet for VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail-analysen blev bestemt ved testning af normale FFPE-væv.

Væv	Antal acceptable tilfælde/ tilfælde i alt	Væv	Antal acceptable tilfælde/ tilfælde i alt
Binyre	3/3	Lunge	3/3
Blære	3/3	Lymfeknude	3/3
Knoglemarv	3/3	Mesothelium	3/3
Ovarie	3/3	Pancreas	3/3
Bryst	3/3	Glandula parathyroidea	3/3
Cerebellum	3/3	Perifer nerve	3/3
Cerebrum	3/3	Prostata	3/3
Cervix	3/3	Skeletmuskulatur	3/3
Colon	3/3	Hud	3/3
Endometrium	3/3	Milt	3/3
Øsofagus	3/3	Mavesæk	3/3
Hjerte	3/3	Testis	3/3
Hypofyse (glandula pituitaria)	3/3	Thymus	3/3
Tarm	3/3	Thyroidea	3/3
Nyre	3/3	Tunge/spytktitel	3/3
Lever	3/3	Tonsil	3/3

Tab. 28. Sensitivitet/specificitet for VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail-analysen blev fastlagt ved undersøgelse af forskellige neoplastiske FFPE-væv.

Patologi	Antal acceptable tilfælde/tilfælde i alt
Glioblastom (cerebrum)	3/3
Meningiom (cerebrum)	1/1
Oligodendrogliom (cerebrum)	1/1
Endometrioidt karcinom (ovarie)	1/1
Adenokarcinom (ovarie)	1/1
Pankreatisk neuroendokrint neoplasme (pancreas)	1/1
Adenokarcinom (pancreas)	1/1
Seminom (testis)	1/1
Embryonalt karcinom (testis)	1/1
Medullært karcinom (thyroidea)	1/1
Papillært karcinom (thyroidea)	1/1
Duktalt karcinom in situ (bryst)	1/1
Invasivt duktalt karcinom (bryst)	2/2
B-cellelymfom, ikke specificeret yderligere (milt)	1/1
Småcellet karcinom (lunge)	1/1
Pladecellekarcinom (lunge)	1/1
Adenokarcinom (øsofagus)	1/1
Pladecellekarcinom (øsofagus)	1/1
Adenokarcinom (mavesæk)	1/1
Adenokarcinom (gastroesophageal junction)	1/1
Adenokarcinom (tyndtarm)	1/1
Gastrointestinal stromal tumor (GIST) (tyndtarm)	1/1
Gastrointestinal stromal tumor (GIST) (colon)	1/1
Adenokarcinom (colon)	1/1
Adenokarcinom (rektum)	1/1
Gastrointestinal stromal tumor (GIST) (rektum)	1/1
Hepatoblastom (lever)	1/1
Hepatocellulært karcinom (lever)	1/1
Clear cell-karcinom (nyre)	1/1
Adenokarcinom (prostata)	2/2
Leiomyom (uterus)	1/1
Endometrioidt adenokarcinom (uterus)	1/1
Clear cell-karcinom (uterus)	1/1
Pladecellekarcinom (cervix)	2/2
Embryonalt rhabdomyosarkom (tværstribet muskulatur)	1/1
Pladecellekarcinom (hud)	1/1

Patologi	Antal acceptable tilfælde/tilfælde i alt
Basalcellekarcinom (hud)	1/1
Neurofibrom (lumbalt)	1/1
Neuroblastom (retroperitoneum)	1/1
Mesotheliom (peritoneum)	1/1
B-cellelymfom, ikke specificeret yderligere (lymfeknude)	2/2
Hodgkin lymfom (lymfeknude)	3/3
Anaplastisk storcellet lymfom (lymfeknude)	1/1
Leiomyosarkom (blære)	1/1
Urotelkarcinom (blære)	1/1
Osteosarkom (knogle)	1/1
Mesotheliom (peritoneum)	1/1
Leiomyosarkom (glat muskulatur)	1/1

FEJLFINDING

Tab. 29. Løsninger ved fejlfinding.

Problem	Løsning
Fraværende eller svag SISH-farvning	<ol style="list-style-type: none"> Sørg for, at reagensdispenserne fungerer korrekt (dvs. ikke er tilstoppede eller tomme), og at bulkopløsninger er fyldt op. Kontrollér reagensdispenserens spædningskammer eller menisken for fremmedlegemer eller partikler som fibre eller udfældninger. Hvis dispenserens er blokeret, må du ikke anvende dispenserens, og du skal kontakte den lokale supportrepræsentant. Ellers skal du prime dispenserens igen ved at rette dispenserens hen over en affaldsbeholder, fjerne dysehætten og trykke ned på toppen af dispenserens. Hvis farvning stadig er svag eller fraværende, skal du fortsætte til punkt 2 nedenfor. Sørg for, at fikseringstype, tid og snittykkelse er korrekt til ISH-baserede analyser. Sørg for, at bruge SISH-kompatible monteringsmaterialer (se Tab. 30), så SISH-signalet bevares. Hvis farvning stadig er svag eller fraværende, skal du fortsætte til punkt 4 nedenfor. Øg CC1-tid til > 16 min. Øg CC2-tid til > 16 min. for gastrisk karcinom/GEA eller > 24 min. for brystkarcinom. Øg ISH Protease 3-tid til > 16 min. for gastrisk karcinom eller > 20 min. for brystkarcinom, hvis kernens morfologi er intakt.
Ingen eller svag Red ISH-farvning	<ol style="list-style-type: none"> Sørg for, at reagensdispenserne fungerer korrekt (dvs. ikke er tilstoppede eller tomme), og at bulkopløsninger er fyldt op. Hvis farvning stadig er svag eller fraværende, skal du fortsætte til punkt 2 nedenfor. Sørg for, at alkoholbade og længerevarende xylenskyllinger til at dehydrere ikke bruges til at dehydrere farvede objektglas, da dette vil nedbryde Red ISH-signalerne. Hvis farvning stadig er svag eller fraværende, skal du fortsætte til punkt 3 nedenfor. Sørg for, at fikseringstype, tid og snittykkelse er korrekt til ISH-baserede analyser. Øg CC1-tid til > 16 min. Øg CC2-tid til > 16 min. for gastrisk karcinom eller > 24 min. for brystkarcinom.

Problem	Løsning
	6. Øg ISH Protease 3-tid til > 16 min. for gastrisk karcinom eller > 20 min. for brystkarcinom, hvis kemens morfologi er intakt.
Uspecifik Red ISH-baggrund	1. Sørg for, at der anvendes positivt ladede objektglas, og at præparatet er fikseret og udsåret korrekt til ISH-baserede analyser. 2. Hvis Red ISH-baggrund kan skelnes fra specifikt Red ISH-signal, skal objektglasset tælles med, men uspecifikke Red ISH-signaler skal ikke. 3. Hvis Red ISH-baggrund i kernen interfererer med optælling, gentages farvningen med 76 °C eller 78 °C varm stringensvask. Reduktion af protease- eller celleforbehandlingstid mindsker også rød baggrund.
Uspecifik SISH-baggrund	1. Sørg for, at der anvendes positivt ladede objektglas, og at præparatet er fikseret og udsåret korrekt til ISH-baserede analyser. 2. Hvis SISH-baggrund kan skelnes fra specifikt SISH-signal, skal objektglasset tælles med, men uspecifikke signaler skal ikke. 3. Hvis SISH-baggrund i kernen interfererer med optælling, gentages farvningen med kortere proteasebehandlings- eller celleforbehandlingstid.
Udfældning	1. Hvis artefakter fra udfældning interfererer med optælling, skal farvningen gentages. Hvis SISH-baggrund kan skelnes fra specifikt SISH-signal, skal objektglasset tælles med, men uspecifikke signaler skal ikke. 2. Sørg for, at objektglasstregkodeetiketterne er centreret og påført objektglasset, uden at etiketten stikker ud. Undlad sætte to etiketter på eller forsøge at sætte stregkodeetiketter på igen.
Dannelse af bobler	1. Hvis bobledannelse interfererer med optællingen, skal du sikre, at præanalytiske procedurer og prøvetykkelse er som anbefalet.
Vævet vaskes af objektglassene.	1. Sørg for, at der anvendes positivt ladede objektglas.

Tab. 30. Kompatibilitet mellem monteringsmateriale og SISH-baserede analyser.

Monteringsmateriale	Producent	Type (xylen, alkohol, vandigt)	Kompatibilitet med SISH
Entellan	Merck	Xylen	Nej
Entellan New	Merck	Xylen	Nej
Eukitt	EMS	Xylen	Nej
HSR	Systemex	Xylen	Nej
Malinol	Muto Chemical	Xylen	Nej
Acrytol	SurgiPath	Xylen	Ja
Alcolmount	Diapath	Alkohol	Ja
BioMount 2	BBInternational	Xylen	Ja
Cytoseal 60	Richard Allan Scientific	Xylen	Ja
Cytoseal XYL	Richard Allan Scientific	Xylen	Ja
Diamount	Diapath	Xylen	Ja
DPX	BDH: Raymond Lamb	Xylen	Ja

Monteringsmateriale	Producent	Type (xylen, alkohol, vandigt)	Kompatibilitet med SISH
FloTexx	Lerner Labs	Xylen	Ja
Gel Mount	Biomeda	Vandig	Ja
Histomount	Raymond Lamb	Xylen	Ja
MicroMount	SurgiPath	Xylen	Ja
MM24	SurgiPath	Xylen	Ja
Mountex	Histolab	Xylen	Ja
MountQuick	Daido Sangyo Co.	Vandig	Ja
Paramount	Protaqs Quartett: Dako	Xylen	Ja
Permound	Fisher	Xylen	Ja
Pertex	Cell Path	Xylen	Ja
Shandon Consul mount	Thermo Scientific	Xylen	Ja
Softmount	WAKO	Lemasol A	Ja
SureMount	Triangle Biomedical Sciences	Xylen	Ja
Thermo EZ Mount	Thermo Scientific	Xylen	Ja
Ultramount	Dako	Xylen	Ja

REFERENCER

- Moasser MM. The Oncogene Her2: Its Signaling and Transforming Functions and Its Role in Human Cancer Pathogenesis. *Oncogene*. 2007;26(45):6469-6487.
- Hsu JL, Hung MC. The Role of Her2, Egrf, and Other Receptor Tyrosine Kinases in Breast Cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2016;35(4):575-588.
- Hudis CA. Trastuzumab—Mechanism of Action and Use in Clinical Practice. *N Engl J Med*. 2007;357(1):39-51.
- Comejo KM, Kandil D, Khan A, et al. Theranostic and Molecular Classification of Breast Cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2014;138(1):44-56.
- Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, et al. Early Breast Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up. *Ann Oncol*. 2019.
- Ferretti G, Felici A, Papaldo P, et al. Her2/Neu Role in Breast Cancer: From a Prognostic Foe to a Predictive Friend. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2007;19(1):56-62.
- Moasser MM, Krop IE. The Evolving Landscape of Her2 Targeting in Breast Cancer. *JAMA Oncol*. 2015;1(8):1154-1161.
- Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2002;20:719-726.
- Baselga J, Carbonell X, Castaneda-Soto NJ, et al. Phase II study of efficacy, safety, and pharmacokinetics of trastuzumab monotherapy administered on a 3-weekly schedule. *J Clin Oncol*. 2005;23:2162-2171.
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Concurrent administration of anti-HER2 monoclonal antibody and first-line chemotherapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer. A phase III, multinational, randomized controlled trial. *N Engl J Med*. 2001;344:783-792.
- Marty M, Cognetti F, Maraninchi D, et al. Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: The M77001 Study Group. *J Clin Oncol*. 2005;23:4265-4274.
- Piccari-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005;353:1659-1672.
- Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005;353:1673-1684.

14. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. Arch Pathol Lab Med. 2018;142(11):1364-1382
15. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, et al: ToGA Trial Investigators: 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;376:687-697.
16. Subasinghe D, Acott N, Kumarasinghe MP. A Survival Guide to Her2 Testing in Gastric/Gastroesophageal Junction Carcinoma. Gastrointest Endosc. 2019;90(1):44-54.
17. Smyth EC, Verheij M, Allum W, et al. Gastric Cancer: Esmo Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up. Ann Oncol. 2016;27(suppl 5):v38-v49
18. Van Cutsem E, Bang YJ, Feng-Yi F, et al. Her2 Screening Data from Toga: Targeting Her2 in Gastric and Gastroesophageal Junction Cancer. Gastric Cancer. 2015;18(3):476-484.
19. Abrahao-Machado LF, Scapulatempo-Neto C. Her2 Testing in Gastric Cancer: An Update. World J Gastroenterol. 2016;22(19):4619-4625.
20. Carson FL, Cappellano C. Histotechnology; A Self-Instructional Text, 5th edition. American Society for Clinical Pathology Press; 2020, 2022.
21. Middleton LP, et al. Implementation of American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists HER2 Guideline Recommendations in a tertiary care facility increases HER2 immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization concordance and decreases the number of inconclusive cases. Arch Pathol Lab Med. 2009;133:775-780.
22. Khoury T, Sait S, Hwang H, Chandrasekhar R, Wilding G, Tan D, Kulkarni S. Delay to formalin fixation effect on breast biomarkers. Mod Pathol. 2009;22:1457-1467.
23. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
24. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 24 June 2020 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
25. College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2007.
26. CLSI (formerly NCCLS). Quality Assurance for Design Control and Implementation of Immunocytochemistry Assays: Approved Guideline-Second Edition. CLSI document I/LA28-A2 (ISBN 1-56238-745-6). CLSI, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087-1898 USA, 2011.
27. Reinholz MM, et al. Breast cancer and aneusomy 17: Implications for carcinogenesis and therapeutic response. Lancet Oncol. 2009 Mar;10:267-277.

For USA: Rx only

KONTAKTOPLYSNINGER



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim
Germany
+800 5505 6606

www.roche.com



BEMÆRK: Der anvendes altid et punktum i dette dokument som decimaltegn til markering af grænsen mellem det hele tal og de efterfølgende decimaler. Der anvendes ikke tusindtalsseparatorer.

Sammenfatningen af sikkerhed og ydeevne kan findes her:

<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>

Symboler

Ventana bruger følgende symboler og tegn ud over dem, der er anført i ISO 15223-1-standarden (for USA: Se elabdoc.roche.com/symbols for yderligere oplysninger).



Globalt vareidentifikationsnummer

Rx only

For USA: Forsigtig: Ifølge amerikansk føderal lovgivning må dette udstyr kun sælges af eller efter ordination fra en læge.

REVISIONSHISTORIK

Rev	Opdateringer
C	Opdateringer af afsnit om advarsler og forsigtighedsregler samt referencer. Opdatering af den aktuelle skabelon.

OPHAVSRET

VENTANA, BENCHMARK, HYBREADY, PATHWAY og ULTRAVIEW er varemærker tilhørende Roche. Alle andre produktnavne og varemærker tilhører deres respektive ejere.

© 2025 Ventana Medical Systems, Inc.

1. Tilfælde-id/patient-id:	2. Er dette tilfælde tælleligt? 2a. <input type="checkbox"/> Ja, fortsæt til nr. 3 2b. <input type="checkbox"/> Nej, spring nr. 3 over. Fortsæt til nr. 4	3. Er der tumorheterogenitet til stede? 3a. <input type="checkbox"/> Ja, spring nr. 4 over. Fortsæt til nr. 5. 3b. <input type="checkbox"/> Nej, spring nr. 4 over. Fortsæt til nr. 5.
4. Dette tilfælde er ikke tælleligt, fordi (markér ALLE relevante):	4a. <input type="checkbox"/> Der var intet væv tilbage på det ISH-farvede objektglas	4b. <input type="checkbox"/> Der var intet invasivt karcinom i vævet på det ISH-farvede objektglas
4e. <input type="checkbox"/> Signalet i den interne positive kontrol kan ikke detekteres <input type="checkbox"/> HER2 <input type="checkbox"/> Chr 17	4f. <input type="checkbox"/> Svag/fraværende ISH-farvning i målceller, kan ikke scores <input type="checkbox"/> HER2 <input type="checkbox"/> Chr 17	4g. <input type="checkbox"/> Andet (angiv):
4c. <input type="checkbox"/> Kernemorfologien er uacceptabel. Vævsstrukturelle bestanddele i normale celler kan ikke skelnes fra dem fra målkarzinomceller. <input type="checkbox"/> HER2 <input type="checkbox"/> Chr 17		

5. Optæl målområde 1: Tæl HER2-signal og Chr17-signal i hver af 20 kerner. Tilføj det talte antal HER2-signaler. Tilføj det talte antal Chr 17. Find genstatusratio ved at dividere det SAMLEDE HER2-signalantal med det SAMLEDE Chr 17-signalantal. Afrund til første decimal. Dokumentér, om der blev talt klynger af signaler.

MÅLOMRÅDE FOR SIGNALTÆLLING 1–20 kerner																							5x Kommentarer
5a	5b	5c	5d	5e	5f	5g	5h	5i	5j	5k	5l	5m	5n	5o	5p	5q	5r	5s	5t	5u	5v	5w	
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	I ALT	RATIO	Er der klynger til stede?
HER2																							<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nej
Chr17																							<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nej

6. Resultat fra 20 kerner: 6a. Ikke-amplificeret: HER2/Chr17 < 2.0 eller 6b. Amplificeret: HER2/Chr17 ≥ 2.0

Hvis HER2/Chr17-ratio lander mellem 1.8 og 2.2, skal der optælles yderligere 20 kerner.

7. Optæl målområde 2: Tæl HER2-signal og Chr17-signal i hver af 20 kerner. Tilføj det talte antal HER2-signaler. Tilføj det talte antal Chr 17. Dokumentér, om der blev talt klynger af signaler.

MÅLOMRÅDE FOR SIGNALTÆLLING 2–2. 20 kerner (hvis ratio for målområde 1 er 1.8–2.2)																							8x Kommentarer
7a	7b	7c	7d	7e	7f	7g	7h	7i	7j	7k	7l	7m	7n	7o	7p	7q	7r	7s	7t	7u	8w		
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	I ALT	Er der klynger til stede?	
HER2																						<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nej	
Chr17																						<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nej	

8. Resultat fra alle 40 kerner:

8a. Målområde 1 HER2 i alt _____ + Målområde 2 HER2 i alt _____ = I alt HER2-antal _____
(fra boks 5u) (fra boks 7u)

8c. **Ratio:** I alt HER2/I alt Chr17

8b. Målområde 1 Chr17 i alt _____ + Målområde 2 Chr17 i alt _____ = I alt Chr17-antal _____
(fra boks 5u) (fra boks 7u)

8d. Endeligt resultat fra 40 kerner: Ikke-amplificeret: HER2/Chr17 < 2.0 eller Amplificeret: HER2/Chr ≥ 2.0

Scoret af: _____

Dato: _____