

Leica HER2 FISH System - 30 Test Bruksanvisning

För användning i Leica Biosystems BOND-MAX and BOND-III-system.

TA9217 är en produkt för fluorescerande *in situ*-hybridisering, utformad att färga in 30 tester (30 objektglas infärgade med LSI HER2/CEP17 Dual Probe).



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



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

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

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

Rx Only

Innehåll

| | |
|--|-----------|
| Avsedd användning | 3 |
| För användning inom <i>in vitro</i> -diagnostik | 3 |
| Utbildning som krävs | 3 |
| Summering och förklaring | 3 |
| Bakgrund | 3 |
| Sammanfattning för klinisk konkordans BOND-MAX System | 4 |
| Sammanfattning för klinisk konkordans BOND-III System | 4 |
| Procedurprinciper | 4 |
| Komponenter som ingår | 5 |
| Anvisningar om användning | 5 |
| Förvaring och stabilitet | 5 |
| Förberedelse av preparat | 5 |
| Varningar och försiktighetsåtgärder | 6 |
| Procedur | 6 |
| A. Reagenser som krävs men inte ingår | 6 |
| B. Utrustning som krävs men inte ingår | 6 |
| C. Metodik | 7 |
| D. Förbehandling med BOND-enzym | 7 |
| E. Standardprotokoll för infärgning | 7 |
| F. Steg i proceduren | 7 |
| G. Förvaring av objektglas | 8 |
| Bedömning och beräkning av signaler | 9 |
| Rekommenderad metod för bestämning av kvoten mellan LSI HER2 och CEP17 | 10 |
| Leica HER2 FISH System - 30 Test tolkningsguide | 11 |
| Leica HER2 FISH System - 30 Test uträkningsblad | 12 |
| Kvalitetskontroll | 13 |
| Användning av kontrollobjektglas | 13 |
| Begränsningar | 14 |
| A. Allmänna begränsningar | 14 |
| B. Produktspecifika begränsningar | 14 |
| Klinisk konkordans för Leica HER2 FISH System - 30 Test med Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Bröst | 14 |
| 2x2 Konkordansresultat BOND-MAX System - Bröst | 15 |
| 2x2 Konkordansresultat BOND-III System - Bröst | 16 |
| Klinisk konkordans mellan Leica HER2 FISH System - 30 Test och Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Gastrisk | 17 |
| 2x2 Konkordansresultat BOND-MAX System - Gastrisk | 17 |
| Precisionstestning – BOND-MAX System | 18 |
| A. Precisionstudie inom körning | 18 |
| B. Precisionstudie inom instrument | 18 |
| C. Precisionstudie mellan körningar | 18 |
| D. Precisionstudie mellan laboratorier | 18 |
| E. Precisionstudie mellan observatörer | 18 |
| F. Precisionstudie mellan partier | 19 |
| Precisionstestning – BOND-III System | 19 |
| G. Precisionstudie inom körning | 19 |
| H. Precisionstudie inom instrument | 19 |
| I. Precisionstudie mellan körningar | 19 |
| J. Precisionstudie mellan laboratorier | 19 |
| K. Precisionstudie mellan observatörer | 20 |
| L. Precisionstudie mellan partier | 20 |
| Testets robusthet | 20 |
| Felsökning | 22 |
| Referenser | 24 |
| Licensavtal | 25 |
| Ändringar jämfört med tidigare utgåva | 25 |
| Utgivningsdatum | 25 |
| Identifiering av symboler | 25 |

Avsedd användning

För användning inom *in vitro*-diagnostik

Leica HER2 FISH System - 30 Test är utformat för att upptäcka förstärkning av HER2/neu-genen genom fluorescerande *in situ*-hybridisering (FISH) i formalinfixerade, paraffinjuten bröstcancer hos människor och adenocarcinom i magen (inklusive den esofagogastriska förbindelsen) vävnadsprover. Leica HER2 FISH System - 30 Test anvisas som ett hjälpmedel vid klinisk bedömning av patienter för vilka behandling med Herceptin® (trastuzumab) övervägs (se bipacksedeln för Herceptin). Leica HER2 FISH System - 30 Test är inte avsett att användas vid screening eller diagnos av bröstcancer. All annan tillgänglig klinisk information bör också ta i beaktande, som t.ex. tumörstorlek, antal inblandade lymfnoder och steroidreceptorernas tillstånd. Beslut om behandling av bröstcancerpatienter bör aldrig baseras enbart på HER2-genförstärkningsstatus.

Obs: Alla patienter i kliniska försök med Herceptin valdes ut med ett undersökande immunocytochemiskt kliniskt försökstest (CTA). Ingen av patienterna i dessa försök valdes ut med Leica HER2 FISH System - 30 Test. Leica HER2 FISH System - 30 Test har jämförts med Abbott Molecular PathVysion® HER-2 DNA Probe Kit-test på en oberoende uppsättning prover och har visat sig ge acceptabelt samstämmiga resultat, vilket dokumenterats i den kliniska konkordanssammanfattningen. Den faktiska korrelationen av resultatet av Leica HER2 FISH System - 30 Test till det kliniska resultatet har inte fastställts.

Samtliga patienter i de kliniska försöken av Herceptin vid framskriden magcancer (ToGA) valdes ut med hjälp av Dako Hercep-testet. Ingen av patienterna i försöken i fråga valdes ut genom Leica HER2 FISH System - 30 Test. Leica HER2 FISH System - 30 Test har jämförts med Abbott Molecular PathVysion® HER-2 DNA Sondkittest på en oberoende uppsättning av prover och har visat sig ge acceptabelt samstämmiga resultat, vilket dokumenterats i den kliniska konkordanssammanfattningen. Den faktiska korrelationen av resultaten från Leica HER2 FISH System - 30 Testet med de kliniska resultaten har inte fastställts.

* Herceptin® är ett varumärke som tillhör Genentech, Inc. and F. Hoffmann-La Roche Ltd. PathVysion® är ett varumärke som tillhör Abbott Molecular Inc. Alla rättigheter förbehållna. Används under licens.

Utbildning som krävs

Leica Biosystems tillhandahåller träning i provförberedelse, testprocedur och tolkning av FISH-testning av HER2-genen åt alla användare.

Summering och förklaring

Bakgrund

HER2-genen, även känd som neu eller c-erbB2, sitter på den långa armen på kromosom 17 vid position 17q11-12 (1). Både HER2-genen och dess 185 kD kodade protein har visat sig spela en betydande roll i malign transformation och tumörutveckling vid bröstcancer (2).

HER2 fungerar som en prognosmarkör, då genförstärkning och överuttryck av protein sammankopplas med en ökad sannolikhet för sjukdomsåterfall och högre dödlighet. HER2 fungerar även som prognosmarkör för viss systemisk cellgiftsbehandling och riktade behandlingar (3). Mer specifikt så har förstärkning av HER2-genen har visat sig vara en indikator för dålig prognos i nodpositiv bröstcancer (4-8). Dessutom visar en studie att HER2:s prognosvärde är starkare hos patienter som behandlas med cellgifter (7). För att förutse chansen för sjukdomsfri och allmän överlevnad för individuella patienter måste dock andra etablerade prognosfaktorer, som t.ex. tumörstorlek, antal positiva lymfnoder och steroidreceptorstatus, också tas i beaktande.

Överuttryck av HER2-onkoprotein, orsakat av genförstärkning som identifierats i bröstcancerceller, ger idén till HER2 som mål för antikroppsbaseerad behandling (3) - medan resultaten från ToGA-försöken tydligt visar att användningen av Herceptin® vid magsäckscancer tillsammans med strålbehandling är en effektiv behandling som förbättrar den övergripande överlevnadsgraden vid HER2-positiv magsäckscancer (9). Herceptin (trastuzumab), en humaniserad monoklonal antikropp (10) som binder med hög affinitet till HER2-onkoprotein har

visat sig hämma spridningen av mänskliga tumörceller som överuttrycker HER2-onkoprotein både *in vitro* och *in vivo* (11-13). Sedan Herceptin togs fram, har detektion av både HER2-genen och -proteinet blivit värdefulla verktyg i utvärderingen av brösttumörer, till hjälp både vid behandlingsvalet och vid efterföljande patienthantering (14,15).

I celler i både interfase och metafase som kommer från cellinjer i mänskligt bröstcancer, har FISH använts för att påvisa HER2-genförstärkning (16-19). För kvantifiering av HER2-genförstärkning mäter FISH nivån av HER2-genförstärkning direkt i tumörcellerna. Vävnadens karakteristiska morfologi och distributionen av onkogene kopior i individuella ej odlade primära bröstcancer behålls. Avvikelse i antal kopior av kromosom 17 (aneusomi) hittas också ofta i brösttumörer. Dessa kan vara antingen minskningar eller ökningar (polysomi) i kromosomantalet. Denna kromosomvariation har en avgörande inverkan på tolkningen och rapporteringen av HER2-genförstärkningsstatusen. Mätning av antal kopior av kromosom 17 i samband med HER2 är därför av avgörande betydelse (4).

Leica HER2 FISH System - 30 Test innehåller LSI HER2 DNA-sond, en 226 Kb SpectrumOrange™ direktmärkt fluorescerande DNA-sond specifik för HER2-genlokus (17q11.2-q12) och CEP17 DNA-sond, en 5,4 Kb SpectrumGreen™ direktmärkt fluorescerande DNA-sond specifik för satellit-DNA-sekvens alpha vid den centromeriska delen av kromosom 17 (17p11.1-q11.1). Sondlösningen har formulerats och godkänts speciellt för användning med BOND-MAX and BOND-III System och bör inte modifieras eller användas i en manuell miljö.

Sammanfattning för klinisk konkordans BOND-MAX System

Leica HER2 FISH System - 30 Test är utvecklat för att utgöra ett helautomatiserat alternativ till aktuella metoder för att bestämma status för HER2-genförstärkning. Resultaten för Leica HER2 FISH System - 30 Test på BOND-MAX System utvärderades i en oberoende studie som jämförde resultaten för Leica HER2 FISH System - 30 Test med Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit test på 300 brösttumörprover och på 109 adenocarcinomer i magen (inklusive den esofagogastriska förbindelsen). Inga av dessa brösttumörprov har erhållits från patienter i kliniska försök med Herceptin. Resultaten på bröstvävnad indikerade en konkordans på 99,33 % i en 2x2-analys (95 % konfidensintervaller av 97,61–99,92 %). Resultaten på adenocarcinomer i magen (inklusive vävnad i den esofagogastriska förbindelsen) indikerade en konkordans på 98,17 % i en 2x2-analys (95 % konfidensintervaller av 93,53–99,78 %). Konkordansdata indikerar också att ett positivt resultat med Leica HER2 FISH System - 30 Test sannolikt motsvarar ett positivt resultat av test med Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit. Leica HER2 FISH System - 30 Test tolkas negativt för HER2-genförstärkning när HER2:CEP17-genkvoten är mindre än 2,0 och positivt när HER2:CEP17-genkvoten är större än eller lika med 2,0. Osäkra resultat, där genkvoten HER2:CEP17 är mellan eller lika med 1,8-2,2, bör tolkas med försiktighet. Räkna ytterligare 20 cellkärnor och beräkna kvoten på nytt.

Sammanfattning för klinisk konkordans BOND-III System

Leica HER2 FISH System är utvecklat för att utgöra ett helautomatiserat alternativ till aktuella metoder för att bestämma status för HER2-genförstärkning. Resultaten för Leica HER2 FISH System - 30 Test på BOND-III System utvärderades i en oberoende studie som jämförde resultaten för Leica HER2 FISH System - 30 Test med Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit Assay på 300 brösttumörprover. Inga av dessa brösttumörprov har erhållits från patienter i kliniska försök med Herceptin. Resultaten visade en 99,67% konkordans i en 2x2-analys (95% konfidensintervall på 98,16–99,99%). Konkordansdata indikerar också att ett positivt resultat med Leica HER2 FISH System - 30 Test sannolikt motsvarar ett positivt resultat av test med Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit. Leica HER2 FISH System - 30 Test tolkas negativt för HER2-genförstärkning när HER2:CEP17-genkvoten är mindre än 2,0 och positivt när HER2:CEP17-genkvoten är större än eller lika med 2,0. Osäkra resultat, där

genkvoten HER2:CEP17 är mellan eller lika med 1,8-2,2, bör tolkas med försiktighet. Räkna ytterligare 20 cellkärnor och beräkna kvoten på nytt.

Procedurprinciper

Leica HER2 FISH System - 30 Test innehåller komponenter som krävs för att utföra en fluorescerande *in situ*-hybridiseringsbaserad infärgningsprocedur för formalinfixerade, paraffininbäddade vävnader. Efter lämplig förbehandling, inkubering med den förberedda LSI HER2/CEP17 Dual Probe och lämplig stringenstvätt, torkas och monteras sedan vävnadssnitten med DAPI. Resultaten tolkas med flouescensmikroskopi med hjälp av rekommenderade filter på lämpliga våglängder.

Leica HER2 FISH System - 30 Test bör endast användas på BOND-MAX and BOND-III System.

Komponenter som ingår

Materielen i listan nedan (Tabell 1) räcker till att färga in 30 tester (30 objektglas infärgade med LSI HER2/CEP17 Dual Probe).

| | |
|---|--|
| LSI HER2/CEP17 Probe 6,6 ml | Innehåller förberedd LSI HER2/CEP17 Dual Probe. Innehåller <60% (v/v) formamid. |
| Post Hybridization Wash 2 9 ml | Innehåller förberedd post-hybridiseringstvättlösning. Innehåller <50% (v/v) formamid. |
| BOND Enzyme Concentrate 2 1 ml | Innehåller Proteinase K-lösning 1,7 mg/ml. |
| BOND Enzyme Diluent 65 ml | Innehåller enzymutspädningsmedel. Innehåller 0,035% 2-metylisotiazol 3(2H)-on. |
| BOND Open Container 3 x 7 ml | BOND Open Container som används för Enzyme 5. |

Tabell 1: Leica HER2 FISH System - 30 Test komponenter

Se individuell MSDS för ytterligare produktsäkerhetsinformation, finns på www.LeicaBiosystems.com/TA9217-IFU

Anvisningar om användning

Alla reagenser som tillhandahålls är särskilt utformade för användning med detta test och partinumren är specifika för varje Leica HER2 FISH System - 30 Test. Testet kan inte giltigförklaras om några komponenter byts ut.

Förvaring och stabilitet

Förvara vid 2–8 °C. Frys inte ned. Återför till 2–8 °C direkt efter användning. Avvikelse från dessa villkor gör att testet ogiltigförklaras. Kontrollera att Leica HER2 FISH System - 30 Test används före sitt utgångsdatum. Tecken som visar att Leica HER2 FISH System - 30 Test har blivit kontaminerat eller instabilt är grumlighet hos lösningarna (förutom sondlösningen) och luktutveckling. Användaren måste kontrollera lagringsförhållandena om de avviker från det som specificerats ovan.

Förberedelse av preparat

Standardmetoder för vävnadsbearbetning ska användas för alla preparat (20). Vi rekommenderar att vävnader prepareras i formalinbaserat fixeringsmedel och normalt bearbetas och paraffininbäddas. Provprenparat ska till exempel tas i en tjocklek på 3–4 mm och fixeras

under 18–24 timmar i 10% neutralbuffrat formalin. Vävnaderna ska sedan dehydreras i en serie alkoholer och renas med xylen, följt av impregnering med smält paraffinvax, under högst 60 °C. Vävnadsprover skall tas i snitt på mellan 4-6 µm.

Vävnadssnitt monterade på laddade objektglas (BOND Plus Slides – produktkod S21.2113 eller Apex BOND Slides - produktkod 3800040) kan hållas i upp till 12 månader vid 2–8 °C före infärgning. Efter snittning rekommenderas att objektglasen inkuberas i 60 °C i en timme. Infärgade snitt bör lagras vid -20 °C för att bevara fluorescenssignalen och förebygga försvagning. Låt lagrade objektglas nå rumstemperatur före avläsning.

Varningar och försiktighetsåtgärder

Endast för professionella användare.

En eller flera av komponenterna i produkten är farliga och kan orsaka fosterskador.

Personer under 18 år är som regel inte tillåtna att arbeta med produkten. Användare måste utbildas noggrant i korrekta arbetsprocedurer, produktens riskegenskaper och nödvändiga säkerhetsanvisningar.

Preparat, före och efter fixeringen, samt allt material som exponeras för dem, ska hanteras som om de kan överföra infektioner och avfallshanteras med korrekta försiktighetsåtgärder.

Håll aldrig pipetter med reagens i munnen och undvik att reagenser och preparat får kontakt med hud och slemhinnor. Om reagenser eller preparat kommer i kontakt med känsliga områden, tvättas dessa med en stor mängd vatten. Rådfråga medicinsk expertis. Rådfråga lokala kommunala myndigheter om hur potentiella toxiska komponenter ska avfallshanteras.

Minimera mikrobiell kontaminering av reagenser så att en ökning av icke-specifik infärgning inte uppstår.

Procedur

A. Reagenser som krävs men inte ingår

- BOND Dewax Solution (AR9222)
- BOND Epitope Retrieval Solution 1 (AR9961)
- BOND Wash Solution x10 Concentrate (AR9590)
- Standardlösningsmedel som används i tester baserade på fluorescerande *in situ*-hybridisering (t.ex. etanol, ren och utspädd)
- Destillerat eller avjoniserat vatten
- DAPI motfärg
- Leica HER2 FISH Control Slides (TA9123)
- BOND Aspirating Probe Cleaning System (CS9100)

B. Utrustning som krävs men inte ingår

- Pipetter (ska kunna mäta volymer på 1–20 µl och 100 – 1000 µl)
- Laddade objektglas (BOND Plus Slides – produktkod S21.2113 eller Apex BOND Slides - produktkod 3800040)
- BOND-MAX (21.0051) or BOND-III (21.2201)
- BOND Universal Covertiles™ (S21.2001, S21.4583 eller S21.4611)
- BOND Mixing Stations (S21.1971)
- BOND Slide Label & Print Ribbon (S21.4564)
- Täckglas
- Torkugn (ska kunna hålla 60 °C)
- Fluorescensmikroskop (objektiv på 60–100x) med lämplig ljuskälla. Håll räkning på hur många timmar lampan har använts och ersätt lampan innan den överskrider sin maximala användningstid. Se till att lampan är korrekt inriktad.
- Lämplig uppsättning fluorescensfilter (SpectrumOrange™ – excitationstopp vid 559 nm, utstrålningstopp vid 588 nm, SpectrumGreen™ – excitationstopp vid 497 nm, utstrålningstopp vid 524 nm och DAPI – excitationstopp vid 367 nm, utstrålningstopp vid 452 nm). Uppsättningar av multi-bandpassfilter för fluorescensmikroskop som

är optimerade för användning med Leica HER2 FISH System finns till de flesta mikroskopmodeller. De rekommenderade filteruppsättningarna för Leica HER2 FISH System är DAPI/9-Orange dubbel bandpass, DAPI/Grön dubbel bandpass, Grön/Orange(V.2) dubbel bandpass och DAPI/Grön/Orange (V.2) trippel bandpass.

C. Metodik

- Innan de börjar tillämpa denna metodik, bör användare vara tillräckligt utbildade i den automatiserade *in situ*-fluorescensstekniken.
- Varje testsnitt som infärgats med LSI HER2/CEP17 Dual Probe möjliggör enkelcellsanalys av både HER2 och centromeriska kromosom 17-signalerna. En därpå följande kvot av HER2 mot kromosom 17-signalerna gör att man kan tilldela provet ett kvantitativt värde, som visar ett negativt (icke-förstärkt) eller positivt (förstärkt) resultat. Osäkra resultat (gränsfall, 1,8-2,2) bör tolkas med försiktighet. Räkna ytterligare 20 cellkärnor och beräkna kvoten på nytt.

D. Förbehandling med BOND-enzym

Spåda före infärgningen ut med följande BOND Enzyme Concentrate 2 till 1:300 med den medföljande BOND Enzyme Diluent i en av de tillhandahållna BOND Open Containers. Till exempel, för att färga in 10 objektglas prepareras 3 ml arbetsenzymlösning genom att spåda ut 10 µl BOND Enzyme Concentrate 2 i 2990 µl BOND Enzyme Diluent. Det rekommenderas att enzymet prepareras strax före varje infärgningsserie och att man för varje serie använder minst 900 µl.

E. Standardprotokoll för infärgning

Det rekommenderas att Leica HER2 FISH System - 30 Test används med det rekommenderade standardprotokollet för infärgning som visas nedan i Tabell 2.

| Typ av protokoll | Protokollnamn |
|------------------|----------------------------|
| Infärgning | *FISH Protocol A |
| Preparering | *Dewax |
| HIER | *HIER 25 min with ER1 (97) |
| Enzym | *Enzyme 5 for 25 min |
| Denaturering | *D10 |
| Hybridisering | *ISH Hybridization (12Hr) |

Tabell 2: Standardprotokoll Leica HER2 FISH System - 30 Test Staining Protocol

F. Steg i proceduren

De här instruktionerna skall läsas i samband med bruksanvisningen för BOND-MAX och BOND-III System. En ny BOND Universal Covertile bör användas med varje objektglas. Användning av BOND Universal Covertiles, som tidigare har använts för antingen immunohistokemisk eller *in situ*-hybridiseringsinfärgning har inte godkänts för detta test.

1. På systemen BOND-MAX och BOND-III, set till att avfallsbehållarna för stort avfall och riskavfall har tillräcklig kapacitet för att kunna köra de önskade infärgningsserierna.
2. Se till att det finns tillräckligt med alkohol, destillerat eller avjoniserat vatten, BOND Dewax Solution, BOND Epitope Retrieval Solution 1 och BOND Wash Solution i de stora reagensbehållarna för att kunna köra de önskade infärgningsserierna.
3. Se till att en ren BOND Mixing Station finns installerad.
4. Slå på strömmen till systemen BOND-MAX och BOND-III.
5. Slå på strömmen till PC:n som är inkopplad till systemen BOND-MAX och BOND-III.
6. Starta BOND-programvaran.
7. Om du har ett nytt Leica HER2 FISH System - 30 Test kit, läs av streckkoden på

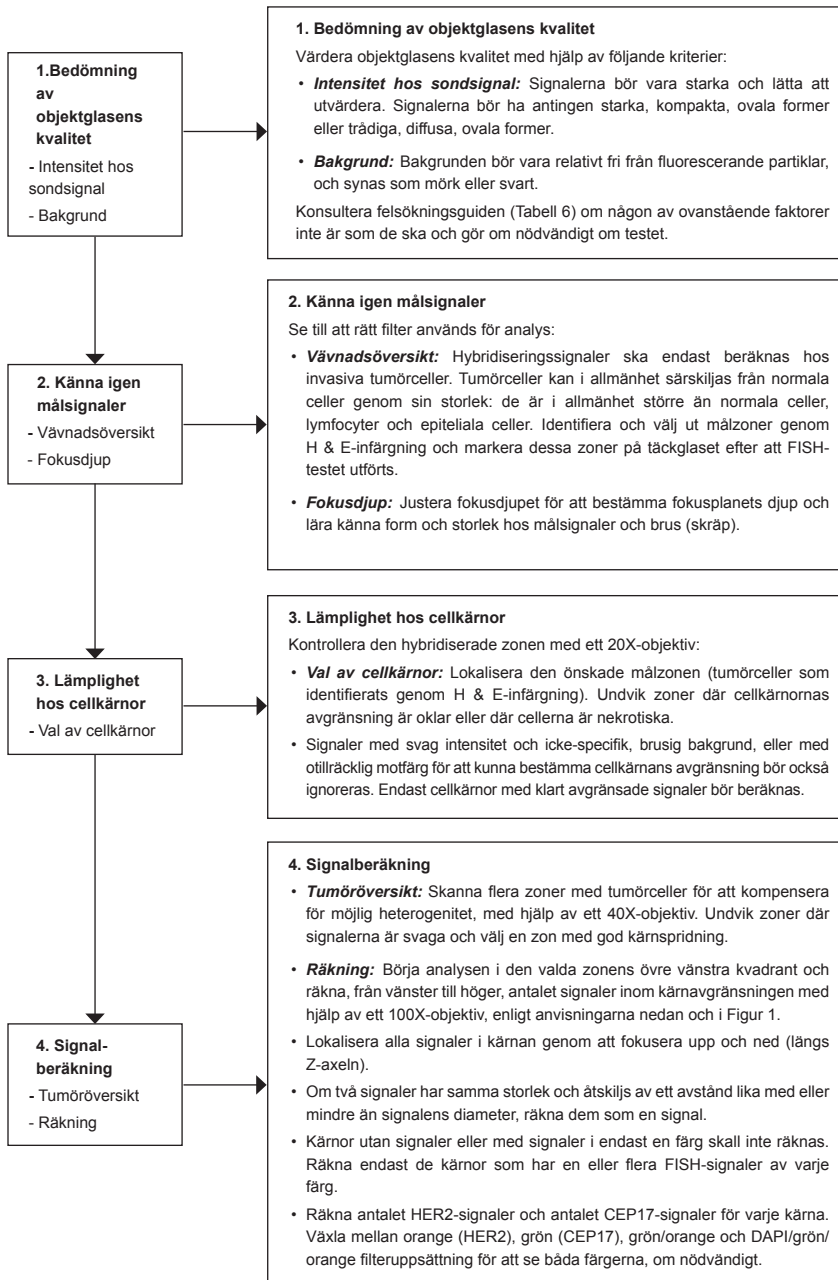
- reagensbrickan med handskannern för att skriva in systemet i reagenslistan för BOND (endast enkel streckkod).
8. Preparera BOND Enzyme 5 i den medföljande BOND Open Container med en utspädningsgrad på 1:300. Till exempel, för 10 objektglas blandar man 10 µl BOND Enzyme Concentrate 2 med 2990 µl BOND Enzyme Diluent.
 9. Läs in den medföljande BOND Open Container och registrera som **Bond Enzyme 5**.
 10. Gå till inställningsskärmen för objektglas och klicka på **Lägg till fall**.
 11. Skriv in uppgifter för det första fallet. Se till att doseringsvolymen är satt till **150 µl** och att prepareringsprotokollet är ***Dewax**. Klicka på **OK**.
 12. Klicka på **Lägg till preparat** med fallet markerat på inställningsskärmen för objektglas.
 13. Lägg först till patientens testobjektglas. Kontrollera att vävnadstypen är satt till **Testvävnad**.
 14. Välj infärgningsläge **En enda**.
 15. Välj process **ISH**.
 16. Välj ***LSI HER2/CEP17 Dual Probe – 30 Test** från listan med sonder. Fliken Protocols är förinställd på korrekt infärgningsprotokoll (***FISH Protocol A**), HIER-protokoll (***HIER 25 min with ER1 (97)**), EIER-protokoll (***Enzyme 5 for 25 min**), denaturering (***D10**) och hybridisering (***ISH Hybridization (12Hr)**).
 17. Upprepa steg 10 till 16 till dess patientens testobjektglas och kontroller (Leica HER2 FISH-kontrollobjektglas och/eller egna kontroller) har skapats. Skriv ut objektglasetiketter.
 18. Märk objektglasen med lämpliga etiketter.
 19. Öppna locken på alla Leica HER2 FISH System - 30 Test behållare och ladda reagensbrickan i BOND-MAX and BOND-III System.
 20. Lägg nya täckglas på varje objektglas.
 21. Ladda objektglasbrickan i BOND-MAX and BOND-III System och tryck på knappen **sätta i/plocka ur**.
 22. Bekräfta att objektglasen har skannats och klicka på **Run (Play)**-knappen på Systemstatusskärmen för att påbörja serien direkt (för Leica HER2 FISH System - 30 Test rekommenderas att man kör detta test över natten via timerstart-funktionen).
 23. Se till att brickans indikatorfält visar **Bearb (OK)** och att satsnummer och sluttid visas.
 24. När serien är avslutad, tryck på **sätta i/plocka ur**-knappen och ta ut objektglasbrickan från BOND-MAX and BOND-III System.
 25. Ta bort täckglasen och skölj objektglasen i avjoniserat vatten.
 26. Dehydrera snabbt i två omgångar ren alkohol, lufttorka sedan.
 27. Lägg till 20 µl DAPI direkt på provet.
 28. Lägg på täckglasets kant och låt lösningen spridas ut maximalt. Se till att få bort eventuella luftbubblor.
 29. Försegla täckglasets kant med nagellack eller liknande försegling.
 30. Placera objektglasen i mörker för att underlätta signalutveckling inför observation under fluorescensmikroskop.
 31. För att bevara signalintensiteten bör infärgade objektglas förvaras i -20 °C.

G. Förvaring av objektglas

Förvara infärgade objektglas i -20 °C och i mörker. Låt objektglasen nå rumstemperatur innan observation efter att de stått i -20 °C.

Bedömning och beräkning av signaler

För att bedöma signalkvaliteten och beräkna HER2- och CEP17-signalerna, följ nedanstående process:



Rekommenderad metod för bestämning av kvoten mellan LSI HER2 och CEP17

För att bestämma kvoten mellan LSI HER2 och CEP17, använd följande metod:

1. Läs av och bestäm antalet LSI HER2- och CEP17-signaler i 20 kärnor (se uträkningsbladet i Figur 2 Leica HER2 FISH System - 30 Test nedan).
2. Räkna ihop alla LSI HER2-signaler. Detta representerar den totala mängden LSI HER2-signaler för denna räkning, t.ex. 143.
3. Räkna ihop alla CEP17-signaler. Detta representerar den totala mängden CEP17-signaler för denna räkning, t.ex. 48.
4. Använd följande beräkning för att få fram slutresultatet:

Totala antalet LSI HER2-signaler delat med totala antalet CEP17-signaler, t.ex. $143/48$ blir en kvot på 2,98, vilket är positivt för HER2-förstärkning.

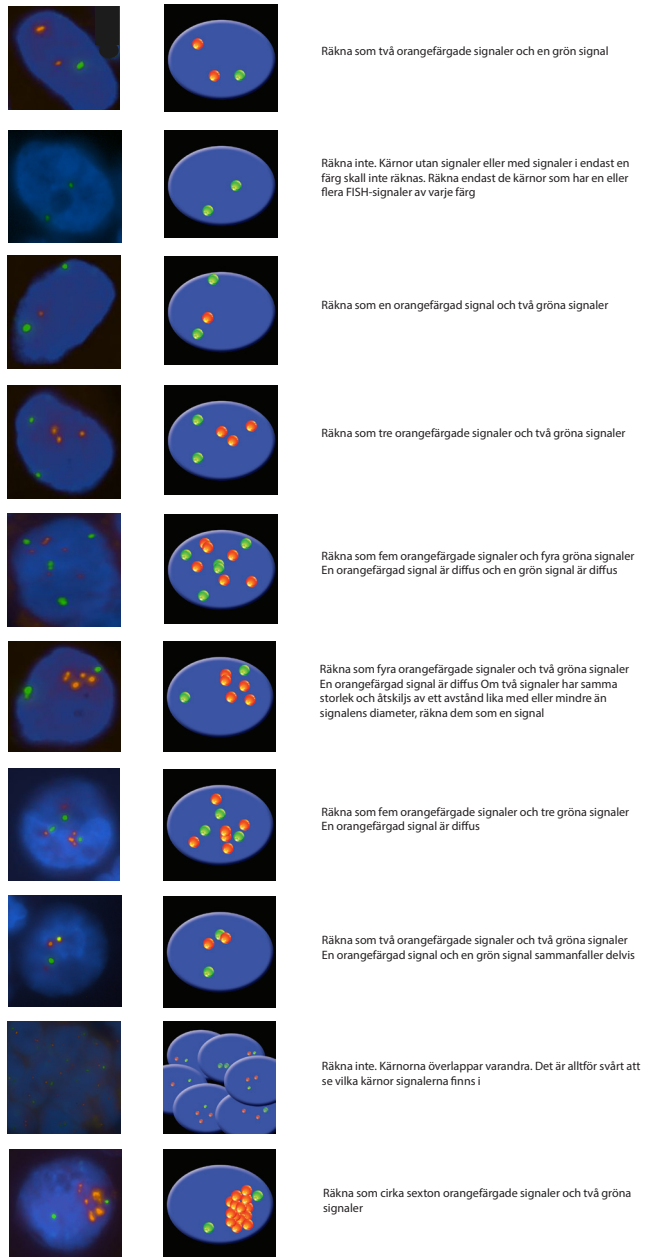
OBS: Om kvoten mellan LSI HER2 och CEP17 är osäker (1,80 - 2,20), räkna då 20 kärnor till och beräkna om kvoten.

Resultaten ska rapporteras på följande sätt:

1. Om kvoten är <2 , har HER2-genförstärkning inte observerats
2. Om kvoten är <2 , har HER2-genförstärkning observerats

OBS: En kvot på eller nära gränsen (1,80 - 2,20) bör tolkas med försiktighet, såsom beskrivits ovan.

Leica HER2 FISH System - 30 Test tolkningsguide



Figur 1: Tolkningsguide

Leica HER2 FISH System - 30 Test uträkningsblad

| 20 kärnor signalräkning | | | | | |
|-------------------------|-------------------|--------------------|--------------|-------------------|--------------------|
| Cellkärna nr | Antal HER2-kopior | Antal CEP17-kopior | Cellkärna nr | Antal HER2-kopior | Antal CEP17-kopior |
| 1 | | | 11 | | |
| 2 | | | 12 | | |
| 3 | | | 13 | | |
| 4 | | | 14 | | |
| 5 | | | 15 | | |
| 6 | | | 16 | | |
| 7 | | | 17 | | |
| 8 | | | 18 | | |
| 9 | | | 19 | | |
| 10 | | | 20 | | |
| Totalt 1-10 | | | Totalt 11-20 | | |

| | HER2 | CEP17 | HER2:CEP17 förstärkningskvot |
|---------------------|------|-------|------------------------------|
| Totalsumma 1-20 | | | |
| Genomsnitt per cell | | | |

Figur 2: Exempel på uträkningsblad

Automatiserad Ariol-metod för HER2 FISH-fastställning

Användandet av Ariol PathVysion® digitala poängsättningsprogram som hjälp vid tolkning har på egen hand godkänts på en annan kohort av prover för användning med Leica HER2 FISH System. Ariol PathVysion digitala poängsättningsprogram, vid användning tillsammans med Leica HER2 FISH System är avsett för In Vitro Diagnostic Use. Vid användning med Leica HER2 FISH System bör Ariol PathVysion-programmet kalibreras för användning med kontrollbilder för vävnad, **inte** Leica HER2 FISH Control Slides (TA9123).

Alla diagnostiska beslut tas av den kvalificerade klinikern.

För mer information hänvisar vi till Ariols användarmanual.

Kvalitetskontroll

Användning av kontrollobjektglas

Vi rekommenderar att en Leica HER2 FISH Control Slide inkluderas i varje testkörning för att övervaka testets funktionalitet och bedöma signalberäkningens exakthet. Kontrollobjektglas bör köras för varje infärgningssats i BOND-MAX and BOND-III System och med varje nytt reagensparti. Enskilda användare kan välja att utöver detta också använda eget kontrollmaterial. Bedöm kontrollobjektglasens kvalitet och utför signalberäkning enligt instruktionerna i avsnittet **Bedömning och räkning av signaler**. Kriterierna för objektglaskvalitet måste mötas och resultaten för HER2:CEP17-kvoten bör ligga inom de fastställda normerna för godtagbar testfunktionalitet. Se Tabell 3 för godtagbarhetskriterier för Leica HER2 FISH Control Slides.

| Cellinje | Bond Oracle HER2 IHC System – profil | HER2-receptorbelastning per cell* | Leica HER2 FISH System - 30 Test HER2:CEP17 godtagbarhetskriterier |
|------------|--------------------------------------|-----------------------------------|--|
| SKBr-3 | 3+ | $4,3 \times 10^5$ | HER2-förstärkning har observerats |
| MDA-MB-453 | 2+ | $1,4 \times 10^5$ | HER2/CEP17 genkvot bör vara mellan 1,5 – 2,5 |
| MDA-MB-175 | 1+ | $6,3 \times 10^4$ | Utan hänsyn till HER2-förstärkning |
| MDA-MB-231 | 0 | $9,3 \times 10^3$ | Utan hänsyn till HER2-förstärkning |

*HER2-receptorbelastning, analys enligt bedömning genom flödescytometri.

Tabell 3: Tolkning av Leica HER2 FISH Control Slide

Om testkontrollerna misslyckas, ska FISH-resultat för det berörda fallet inte rapporteras. Om kontrollobjektglaset inte möter godtagbarhetskriterierna, kan Leica HER2 FISH System - 30 Test ha fungerat bristfälligt. I detta fall blir ett omtest med nya kontrollobjektglas och patientpreparatglas nödvändigt. Om resultaten ligger utanför det specificerade området, men kontrollobjektglaset möter godtagbarhetskriterierna för kvalitet, kan omundersökning av samma objektglas behöva göras eftersom beräkningen eventuellt inte har utförts korrekt. Konsultera felsökningsguiden (Tabell 6) om hybridiseringsfel uppstått med antingen preparatglas eller kontrollobjektglas.

För kliniska preparat gäller att när tolkningen av hybridiseringssignalen är svår och det inte finns tillräckligt med preparatprover för omtestning, så blir testet utan utfall. Om det inte finns tillräckligt med celler för analys blir testet utan utfall.

Patientpreparat bör kontrolleras enligt standardmässiga laborierprocedurer. Signalkvalitet och beräkningsresultat bör dokumenteras på ett för ändamålet avsett rapportformulär.

Begränsningar

A. Allmänna begränsningar

FISH är en teknik som kräver specialiserad utbildning i alla procedurernas aspekter (inklusive urval av lämpliga reagenser, vävnad, fixering, bearbetning och förberedelse av objektglas) och tolkning. Infärgning av vävnad är beroende av hanteringen, fixeringen och bearbetningen av vävnaden före infärgningen. Olämplig fixering, frysning, upptining, tvättning, torkning, upphettning, snittning eller kontamination med andra vävnader eller vätskor kan ge upphov till morfologiska artefakter, nedbrytning av nukleinsyra, bakgrundsfluorescens eller felaktiga negativa resultat. Inkonsekventa resultat kan bero på varierande fixering, inbäddningsmetoder eller på inneboende oregelbundenheter inom vävnaden (21). Överdriven eller ofullständig motinfärgning kan också äventyra korrekt tolkning av resultaten.

Ikke-specifik infärgning orsakat av en obunden sond har en spritt och granulärt utseende och kan synas nära eller långt ifrån den förväntade hybridiseringspunkten. Använd intakta celler för tolkning av infärgningsresultat. Nekrotiska eller degenererade celler kan komma att färgas in ikke-specifikt (22). Övriga FISH-infärgning, eller variationer i infärgningen, kan vara ett resultat av ändringar i de kodande genernas uttrycksnivåer. Eventuella ändringar i förväntade infärgningsmönster ska tolkas tillsammans med alla andra diagnostiska undersökningar. Tolkningsresultatet ska kompletteras med morfologiska studier och med användning av lämpligt kontrollmaterial, samt utvärderas av en kvalificerad patolog med hänsyn tagen till patientens kliniska historik och eventuella andra diagnostiska tester.

Testets kvalitet (dvs. bedömning av kontrollmaterialens tillämplighet) och tolkningen av infärgningen eller avsaknaden av densamma måste utföras i ett korrekt ackrediterat/licensierat laboratorium under ledning av en lämpligt kvalificerad och erfaren patolog, som är ansvarig för den övergripande bedömningen av *in situ*-hybridiseringstestet och dess tolkning. Felaktiga positiva resultat i FISH kan bero på korsreaktivitet hos sonden gentemot andra sekvenser av nukleinsyra och/eller ikke-specifik bindning. Lämpliga kontroller måste användas och dokumenteras, och tester måste ta i beaktande alla relevanta utgångsdatum.

Teknisk och tolkningsmässig variation kan också förekomma när FISH används på material härrörande från cellinje (23).

B. Produktspecifika begränsningar

Denna produkt är inte avsedd för användning i andra DNA-baserade diagnostest.

Ersätt inte Leica HER2 FISH System-reagenser med andra komponenter från vare sig Leica Biosystems eller andra tillverkare. På så sätt kan testet ogiltigförklaras. Användaren måste själv bekräfta eventuella avvikelser från de rekommenderade procedurerna.

Det rekommenderas att vävnader som har fixerats endast i formalinbaserade fixativ används i testet. Användning av andra typer av fixativ kan komma att ogiltiggöra testet.

Vävnadssnitt som har skurits utom rekommenderad tjocklek har inte validerats. Användning av annan snittjocklek kan göra att testet ogiltigförklaras.

Klinisk konkordans för Leica HER2 FISH System - 30 Test med Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Bröst

Den här studien undersökte Leica HER2 FISH Systems - 30 Test lämplighet för användning som hjälpmedel vid behandlingsbeslut för Herceptin (trastuzumab)-terapi. Studien utformades för att undersöka konkordansen mellan Leica HER2 FISH System - 30 Test och en sedan tidigare godkänd diagnosapparat, Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, anses vara den "gyllene standarden" för bröstvävnadstest. Acceptanskriteriet för testning var att den lägre gränsen av det 95% ensidiga konfidensintervallet ligger över 90% mellan Leica HER2 FISH System - 30 Test och den manuella Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, mellan positiva (förstärkta) och negativa (ikke-förstärkta) formalinfixerade, paraffinbäddade (FFPE) invasiva bröstcancerfall.

Studien utfördes på tre orter som en maskerad utvärdering av invasiva bröstcancerprover. Varje undersökningssort försågs med arkiverade formalinfixerade, paraffinbäddade invasiva bröstcancerprovblock med kända nivåer av HER2-onkoproteinuttryck. En grupp på 300 preparat bestående av 75, 0/1+ tidigare karakteriserade IHC-fall; 150, 2+ tidigare karakteriserade IHC-fall och 75, 3+ tidigare karakteriserade IHC-fall valdes ut, och delades lika mellan de tre undersökningstesterna.

Alla fall färgades in med den manuella Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit Assay enligt tillverkarens bruksanvisning från bipacksedeln. Sekventiella snitt från varje fall färgades sedan in med Leica HER2 FISH System - 30 Test på systemen BOND-MAX och BOND-III.

Alla infärgade objektglas maskerades och gavs slumpmässiga värden av en enda utbildad observatör vid var och en av de tre undersökningstesterna. Värdena tolkades som negativa med en beräknad HER2/CEP17 genkvot på $<2,0$ och positiva med en beräknad HER2/CEP17 genkvot på $\geq 2,0$. Data analyserades därefter för konkordans, positiv infärgningsöverensstämmelse och negativ infärgningsöverensstämmelse.

2x2 Konkordansresultat BOND-MAX System - Bröst

Data grupperades som negativa ($<2,00$) eller positiva ($\geq 2,00$) för en 2x2-analys. Den observerade överensstämmelsen för 300 prover mellan de två testen i en 2x2-analys visar en konkordans på 99,33% (298/300) med en 95% CI på 97,61–99,92% för BOND-MAX System.

Den procentuella positiva överensstämmelsen (sensitivitet) eller förmågan hos Leica HER2 FISH System - 30 Test att korrekt identifiera positiva fall från Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe (procenten preparat som beräknats som positiva av både Leica HER2 FISH System - 30 Test och manuell Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit av alla positiva fall från Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) var 99,03% (102/103).

Den procentuella negativa överensstämmelsen (specificitet) eller testets förmåga att korrekt identifiera negativa fall från Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (procenten preparat som beräknats som negativa av Leica HER2 FISH System - 30 Test och Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit av alla negativa fall från Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) var 99,49% (196/197). Se tabell 4.

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

Total konkordans (95% CI) = 99,33% (97,61 – 99,92%)

Tabell 4: 2x2-Konkordans för Leica HER2 FISH System - 30 Test av BOND-MAX System med Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit på bröstvävnad.

2x2 Konkordansresultat BOND-III System - Bröst

Data grupperades som negativa (<2,00) eller positiva (≥2,00) för en 2x2-analys. Den observerade överensstämmelsen för 300 prover mellan de två testen i en 2x2-analys visar en konkordans på 99,67% (299/300) med en 95% CI på 98,16–99,99% för BOND-III System.

Den procentuella positiva överensstämmelsen (sensitivitet) eller förmågan hos Leica HER2 FISH System - 30 Test att korrekt identifiera positiva fall från Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (procenten preparat som beräknats som positiva av både Leica HER2 FISH System - 30 Test och manuell Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit av alla positiva fall från Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) var 99,03% (102/103).

Den procentuella negativa överensstämmelsen (specificitet) eller testets förmåga att korrekt identifiera negativa fall från Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (procenten preparat som beräknats som negativa av Leica HER2 FISH System - 30 Test och Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit av alla negativa fall från Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) var 100% (197/197). Se tabell 5.

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

Total konkordans (95% CI) = 99,67% (98,16 – 99,99%)

Tabell 5: 2x2 Konkordans för Leica HER2 FISH System - 30 Test av BOND-MAX System med Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit på bröstvävnad.

Slutsatsen blir att de data som tagits fram i denna studie visar att Leica HER2 FISH System - 30 Test kan användas som ett hjälpmedel i bedömningen av patienter för vilka Herceptin (trastuzumab)-behandling övervägs, detta baserat på dess höga konkordans med Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, ett tidigare godkänt diagnostiskt test för denna indikation.

Klinisk konkordans för Leica HER2 FISH System - 30 Test till Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Gastrisk

Denna studie undersökte hur passande Leica HER2 FISH System - 30 Test är som hjälpmedel i fastställandet av behandling för Herceptinterapi (trastuzumab). Studien utformades för att undersöka konkordansen mellan Leica HER2 FISH System - 30 Test och en sedan tidigare godkänd diagnosapparat, Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, som anses vara den "gyllene standarden" för detta test. Acceptanskriteriet för testning var att den lägre gränsen av det 95 % ensidiga konfidensintervallet låg över 90 % mellan Leica HER2 FISH System - 30 Test och det manuella Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, mellan positiva (förstärkta) och negativa (icke-förstärkta) formalinfixerade, paraffinbäddade (FFPE) adenocarcinom i magsäcken (inklusive den esofagogastriska förbindelsen).

Studien genomfördes som en utvärdering av kliniska invasiva prover av adenocarcinom i magsäcken. Testen utfördes på arkiverade formalinfixerade, paraffinjutna vävnadsblock av adenocarcinom i magsäcken med kända HER2-genuttrycksnivåer. En grupp av 109 prover som bestod av 50 amplifierade fall och 59 icke-amplifierade fall valdes ut.

Alla fall färgades in med det manuella Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit testet enligt tillverkarens bruksanvisning från bipacksedeln. Sekventiella snitt från varje fall färgades sedan in med Leica HER2 FISH System - 30 Test på BOND-MAX System.

Alla infärgade objektglas poängsattes på ett randomiserat sätt av en enda utbildad observatör. Värdena tolkades som negativa med en beräknad HER2/CEP17 genkvot på $<2,0$ och positiva med en beräknad HER2/CEP17 genkvot på $\geq 2,0$. Data analyserades därefter för konkordans, positiv infärgningsöverensstämmelse och negativ infärgningsöverensstämmelse.

2x2 Konkordansresultat BOND-MAX System – Gastrisk

Data grupperades som negativa ($<2,00$) eller positiva ($\geq 2,00$) för en 2x2-analys. Den observerade överensstämmelsen för 109 prover mellan de två testen i en 2x2-analys visar en konkordans på 98,17 % (107/109) med en 95 % CI på 93,53–99,78 % för BOND-MAX System.

Den procentuella positiva överensstämmelsen (sensitivitet) eller förmågan hos Leica HER2 FISH System - 30 Test att korrekt identifiera positiva fall från Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Sondtestet (procenten prover som beräknats som positiva av både Leica HER2 FISH System - 30 Test och det manuella Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit av alla positiva fall från Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) var 96,00 % (48/50).

Den procentuella negativa överensstämmelsen (specificitet) eller testets förmåga att korrekt identifiera negativa fall från Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (procenten prover som beräknats som negativa av Leica HER2 FISH System - 30 Test och Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit av alla negativa fall från Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) var 100 % (59/59). Se tabell 6.

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

Total konkordans (95 % CI) = 98,17 % (93,53 –99,78 %)

Tabell 6: 2x2 Konkordans för Leica HER2 FISH System - 30 Test på BOND-MAX System med Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit på magsäcksvävnad.

Precisionstestning – BOND-MAX System

A. Precisionsstudie inom körning

Precisionsstudien inom körning utfördes slumpmässigt och avidentifierat. Precisionstestet inom körning av Leica HER2 FISH System - 30 Test utfördes på en enda undersökningsplats på 540 tidigare HER2-karakteriserade TMA-prover med formalinfixerade paraffinbäddade bröstcancerfall. Att TMA-prover användes för att bedöma precision inom körning möjliggjorde en större mängd fall som täckte ett bredare intervall av HER2-uttryck inom samma körning på samma instrument.

Vid beräkning av de objektglas som infärgats i precisionsstudien inom körning, visade 532/540 utvärderade fall ett konkordant resultat, vilket ger en total konkordans på 98,52% med en lägre 95% CI på 97,10%.

B. Precisionsstudie inom instrument

Precisionsstudien inom instrument utfördes slumpmässigt och avidentifierat. Precisionstestet inom instrument av Leica HER2 FISH System - 30 Test utfördes på en enda undersökningsplats på 1620 tidigare HER2-karakteriserade TMA-prover med formalinfixerade paraffinbäddade bröstcancerfall. Att TMA-prover användes för att bedöma precision inom instrument möjliggjorde en större mängd fall som täckte ett bredare intervall av HER2-uttryck inom flera körningar på samma instrument.

Vid beräkning av de objektglas som infärgats i precisionsstudien inom instrument, visade 1620/1620 utvärderade fall ett konkordant resultat, vilket ger en total konkordans på 100% med en lägre 95% CI på 99,82%.

C. Precisionsstudie mellan körningar

Precisionsstudien mellan körningar utfördes slumpmässigt och avidentifierat. Precisionstestet mellan körningar av Leica HER2 FISH System - 30 Test utfördes på en enda undersökningsplats på 900 tidigare HER2-karakteriserade TMA-prover med formalinfixerade paraffinbäddade bröstcancerfall. Användningen av TMA för fastställandet av daglig precisionstestning mellan körningar möjliggjorde testning av en större volym fall som täckte ett bredare urval av HER2-uttryck mellan körningar på olika dagar.

Vid beräkning av de objektglas som infärgats i precisionsstudien mellan körningar, visade 894/900 utvärderade fall ett konkordant resultat, vilket ger en total konkordans på 99,33% med en lägre 95% CI på 98,55%.

D. Precisionsstudie mellan laboratorier

Precisionsstudien mellan laboratorier utfördes slumpmässigt och avidentifierat. Precisionstestet mellan laboratorier av Leica HER2 FISH System - 30 Test utfördes mellan tre undersökningsplatser på 513 tidigare HER2-karakteriserade TMA-prover med formalinfixerade paraffinbäddade bröstcancerfall. Att TMA-prover användes för att bedöma precision mellan laboratorier möjliggjorde en större mängd fall som täckte ett bredare intervall av HER2-uttryck mellan körningar på flera instrument.

Vid beräkning av de objektglas som infärgats i precisionsstudien mellan laboratorier, visade 510/513 utvärderade fall ett konkordant resultat, vilket ger en total konkordans på 99,42% med en lägre 95% CI på 98,30%.

E. Precisionsstudie mellan observatörer

Precisionsstudien mellan observatörer utfördes slumpmässigt och avidentifierat. Reproducerbarhetstestet mellan observatörer av Leica HER2 FISH System - 30 Test utfördes mellan tre undersökningsplatser. En enda erfaren observatör användes på varje undersökningsplats. Arton kompletta snitt från bröstcancerfall användes för att bedöma precision mellan observatörer, vilket reflekterar provtyper som används i klinisk miljö.

Vid beräkning av de objektglas som infärgats i precisionsstudien mellan observatörer, visade 53/54 utvärderade fall ett konkordant resultat, vilket ger en total konkordans på 98,15% med en lägre 95% CI på 90,11%.

F. Precisionsstudie mellan partier

Precisionsstudien mellan partier utfördes slumpmässigt och avidentifierat. Precision mellan partier bestämdes med hjälp av tre separat tillverkade partier för Leica HER2 FISH System - 30 Test, tillverkade med Good Manufacturing Practice (GMP). Varje parti testades på en enda undersökningsplats på 540 tidigare HER2-karakteriserade TMA-prover med formalinfixerade paraffinbäddade bröstcancerfall. Att TMA-prover användes för att bedöma reproducerbarhet från parti till parti möjliggjorde en större mängd fall som täckte ett bredare intervall av HER2-uttryck mellan partier.

Vid beräkning av de objektglas som infärgats i precisionsstudien mellan partier, visade 534/540 utvärderade fall ett konkordant resultat, vilket ger en total konkordans på 98,89% med en lägre 95% CI på 97,60%.

Precisionstestning – BOND-III System

G. Precisionsstudie inom körning

Precisionsstudien inom körning utfördes slumpmässigt och avidentifierat. Precisionstestet inom körning av Leica HER2 FISH System - 30 Test utfördes på en enda undersökningsplats på 540 tidigare HER2-karakteriserade TMA-prover med formalinfixerade paraffinbäddade bröstcancerfall. Att TMA-prover användes för att bedöma precision inom körning möjliggjorde en större mängd fall som täckte ett bredare intervall av HER2-uttryck inom samma körning på samma instrument.

Vid beräkning av de objektglas som infärgats i precisionsstudien inom körning, visade 530/540 utvärderade fall ett konkordant resultat, vilket ger en total konkordans på 100% med en lägre 95% CI på 99,45%.

H. Precisionsstudie inom instrument

Precisionsstudien inom instrument utfördes slumpmässigt och avidentifierat. Precisionstestet inom instrument av Leica HER2 FISH System - 30 Test utfördes på en enda undersökningsplats på 1620 tidigare HER2-karakteriserade TMA-prover med formalinfixerade paraffinbäddade bröstcancerfall. Att TMA-prover användes för att bedöma precision inom instrument möjliggjorde en större mängd fall som täckte ett bredare intervall av HER2-uttryck inom flera körningar på samma instrument.

Vid beräkning av de objektglas som infärgats i precisionsstudien inom körning, visade 1620/1620 utvärderade fall ett konkordant resultat, vilket ger en total konkordans på 100% med en lägre 95% CI på 99,82%.

I. Precisionsstudie mellan körningar

Precisionsstudien mellan körningar utfördes slumpmässigt och avidentifierat. Precisionstestet mellan körningar av Leica HER2 FISH System - 30 Test utfördes på en enda undersökningsplats på 900 tidigare HER2-karakteriserade TMA-prover med formalinfixerade paraffinbäddade bröstcancerfall. Användningen av TMA för fastställandet av daglig precisionstestning mellan körningar möjliggjorde testning av en större volym fall som täckte ett bredare urval av HER2-uttryck mellan körningar på olika dagar.

Vid beräkning av de objektglas som infärgats i precisionsstudien mellan körningar, visade 891/900 utvärderade fall ett konkordant resultat, vilket ger en total konkordans på 99,00% med en lägre 95% CI på 98,11%.

J. Precisionsstudie mellan laboratorier

Precisionsstudien mellan laboratorier utfördes slumpmässigt och avidentifierat. Precisionstestet mellan laboratorier av Leica HER2 FISH System - 30 Test utfördes mellan tre undersökningsplatser på 513 tidigare HER2-karakteriserade TMA-prover med formalinfixerade paraffinbäddade bröstcancerfall. Att TMA-prover användes för att bedöma precision mellan laboratorier möjliggjorde en större mängd fall som täckte ett bredare intervall av HER2-uttryck mellan körningar på flera instrument.

Vid beräkning av de objektglas som infärgats i precisionsstudien mellan laboratorier, visade 511/513 utvärderade fall ett konkordant resultat, vilket ger en total konkordans på 99,61% med en lägre 95% CI på 98,60%.

K. Precisionsstudie mellan observatörer

Precisionsstudien mellan observatörer utfördes slumpmässigt och avidentifierat. Reproducerbarhetstestet mellan observatörer av Leica HER2 FISH System - 30 Test utfördes mellan tre undersökningsplatser. En enda erfaren observatör användes på varje undersökningsplats. Arton kompletta snitt från bröstcancerfall användes för att bedöma precision mellan observatörer, vilket reflekterar provtyper som används i klinisk miljö.

Vid beräkning av de objektglas som infärgats i precisionsstudien mellan observatörer, visade 53/54 utvärderade fall ett konkordant resultat, vilket ger en total konkordans på 98,15% med en lägre 95% CI på 90,11%.

L. Precisionsstudie mellan partier

Precisionsstudien mellan partier utfördes slumpmässigt och avidentifierat. Precision mellan partier bestämdes med hjälp av tre separat tillverkade partier för Leica HER2 FISH System - 30 Test, tillverkade med Good Manufacturing Practice (GMP). Varje parti testades på en enda undersökningsplats på 540 tidigare HER2-karakteriserade TMA-prover med formalinfixerade paraffinbäddade bröstcancerfall. Att TMA-prover användes för att bedöma reproducerbarhet från parti till parti möjliggjorde en större mängd fall som täckte ett bredare intervall av HER2-uttryck mellan partier.

Vid beräkning av de objektglas som infärgats i precisionsstudien mellan partier, visade 540/540 utvärderade fall ett konkordant resultat, vilket ger en total konkordans på 100% med en lägre 95% CI på 99,45%.

Testets robusthet

Studier av robusthet har utförts på BOND-MAX and BOND-III System för att bestämma testets toleransintervall för värmeåterhämtningstid och temperatur, enzymåtervinningstid, temperatur och koncentration, denatureringstid och temperatur, hybridiseringstid och temperatur, och stringensvättningstid och temperatur. Robusthetsstudier med det standardmässiga BOND-MAX and BOND-III System-protokollet utfördes också utanför de rekommenderade gränsvärden som definierats i FDA/ORA-vägledningsdokumentet ORA LAB5.3 Rev1.7 för temperatur och fukt.

- Ingen skillnad i förstärkningsstatus observerades när standardtemperaturen för varje värmeberoende steg ökades med 4 °C eller minskades med 4 °C, jämfört med det standardmässiga Leica HER2 FISH System - 30 Test protokollet. Den högsta kvaliteten observerades vid standard temperaturerna och dessa temperaturer rekommenderas.
- Ingen skillnad i förstärkningsstatus observerades när tiden för den värmeinducerade epitopåtervinningen (HIER) kördes i 20 minuter och 30 minuter vid 97 °C med BOND ER1-lösning, jämfört med det standardmässiga Leica HER2 FISH System - 30 Test protokollet. Högst kvalitet uppnåddes efter standardtiden 25 minuter. Denna inkubationstid rekommenderas.
- Ingen skillnad i förstärkningsstatus observerades när tiden för den enzyminducerade epitopåtervinningen (EIER) kördes i 15 minuter och 35 minuter vid 37 °C, jämfört med det standardmässiga Leica HER2 FISH System - 30 Test protokollet. Högst kvalitet uppnåddes efter standardtiden 25 minuter. Denna inkubationstid rekommenderas.
- Ingen skillnad i förstärkningsstatus observerades när enzymkoncentrationen för den enzyminducerade epitopåtervinningen (EIER) kördes med kvoter för enzymkoncentrat/ enzymutspädningsmedel på 1:200 och 1:500 med hjälp av det standardmässiga Leica HER2 FISH System - 30 Test protocol-protokollet. Den högsta kvalitetsgraden observerades vid standardkoncentrationen på 1:300 och denna utspädningsgrad rekommenderas.
- Ingen skillnad i förstärkningsstatus observerades när denatureringstiden kördes i 5 minuter och 15 minuter, jämfört med det standardmässiga Leica HER2 FISH System - 30 Test protokollet. Den högsta kvalitetsgraden observerades vid standardtiden på 10 minuter och denna denatureringstid rekommenderas.
- Ingen skillnad i förstärkningsstatus observerades när hybridiseringstiden kördes i 9 timmar

och 15 minuter, jämfört med det standardmässiga Leica HER2 FISH System - 30 Test protokollet. Den högsta kvalitetsgraden observerades vid standardtiden på 12 timmar och denna hybridiseringstid rekommenderas.

- Ingen skillnad i förstärkningsstatus observerades när tvättningstiden efter hybridisering kördes i 2 minuter, 5 minuter och 7 minuter, jämfört med det standardmässiga protokollet Leica HER2 FISH System - 30 Test . Den högsta kvalitetsgraden observerades vid standardtiden på 4 minuter och denna tvättningstid rekommenderas efter hybridisering.
- Ingen skillnad i förstärkningsstatus observerades när Leica HER2 FISH System - 30 Test kördes vid 28 °C och 30 % relativ luftfuktighet och 16 °C och 80 % relativ luftfuktighet, jämfört med det standardmässiga Leica HER2 FISH System - 30 Test protokollet som kördes vid omgivande förhållanden.

Användning utanför de rekommenderade parametrarna för testets robusthet har inte godkänts. Användning av annan testparameter kan göra testet ogiltigt.

I texten ovan beskrivs de förhållanden som har testats och resultaten från studien. Observera att Leica inte har testat alla möjliga kombinationer av förhållanden och inte rekommenderar värden som inte är standard för alla förhållanden. Det standardmässiga Leica HER2 FISH Staining Protocol-protokollet visas i tabell 2.

Felsökning

| Problem | Möjlig orsak | Åtgärd |
|---|--|--|
| Ingen eller svag fluorescerande signal/infärgning | Olämplig fixering eller bearbetning av testpreparat | Kontrollera att ett formalinbaserat fixativ används och att bearbetningsschemana är lämpliga för preparat som testas. |
| | Leica HER2 FISH System - 30 Test används efter sitt utgångsdatum | Kontrollera att det Leica HER2 FISH System - 30 Test som används är inom sitt angivna utgångsdatum. |
| | Felaktigt val av protokoll | Se till att *FISH Protocol A korrekt anges som standardval i fältet för infärgningsprotokoll i dialogrutan Lägg till preparat. |
| | Olämpliga bulkreagenser har fördelats | Se till att alla BOND-reagenser har fördelats i lämpliga stora behållare och att de har placerats i lämpliga positioner på instrumentet. |
| | Otillräcklig avparaffinering av objektglas | Kontrollera att läget *Dewax har valts i fältet Preparation i dialogrutan Lägg till preparat. |
| | Olämplig förbehandling | Se till att protokoll för standardförbehandling (HIER och enzymatisk nedbrytning) är valda. Justera förbehandlingsprotokollet (HIER eller Enzymatisk nedbrytning) om det behövs. |
| | Otillräcklig denaturering | Se till att rätt standarddenaturering *D10 är vald. |
| | Otillräcklig hybridisering | Se till att rätt standardhybridisering *H12 är vald. Utöka hybridiseringstiden om det behövs. |
| | Överskott tvättning efter hybridisering | Minska inkubationstiden vid tvättning efter hybridisering. |
| | Körning avbruten i förväg | Kontrollera med hjälp av BOND-programvaran om det har uppstått rapporteringsbara fel under infärgningen och åtgärda enligt anvisningarna i BOND-programvaran. |
| | Olämplig flouescensmikroskoputrustning <ul style="list-style-type: none"> • Olämplig filteruppsättning • Felaktig lampa • Utbränd lampa • Felaktig oljetyp | Se till att all flouescensmikroskoputrustning som används är lämplig för det test som utförs, bekräfta: <ul style="list-style-type: none"> • Lämplig filteruppsättning • Lämplig lampa • God lampstyrka • Lämplig olja för användning i mikroskopi med oljeimmersion |
| | Överexponering för UV-ljus (fotoblekning) | Lagra objektglas i mörker före och efter bedömning för att bevara flouescenssignalerna. För att bevara signalen för långsiktig förvaring bör objektglasen lagras i -20 °C. |

| Problem | Möjlig orsak | Åtgärd |
|---|--|--|
| Fluorescerande signal/infärgning för icke-specifik bakgrund | Otillräcklig tvättning efter hybridisering | Öka inkubationstiden vid tvättning efter hybridisering. |
| | Olämpliga bulkreagenser har fördelats | Se till att alla BOND-reagenser har fördelats i lämpliga stora behållare och att de har placerats i lämpliga positioner på instrumentet. |
| | Otillräcklig avparaffinering av objektglas | Se till att Dewax har valts i fältet Preparation i dialogrutan Lagg till preparat. |
| | Icke-specifik korsreaktion med zoner med vävnadsnekros | Kontrollera att ett formalinbaserat fixativ används och att bearbetningsschemana är lämpliga för preparat som testas. Testa fallet igen med ett annat segment, om så är möjligt. Om det inte går bedöms de ytor som uppvisar bäst fixeringsmönster tillsammans med ett motsvarande H&E-infärgat snitt. |
| | Snitt fästa vid objektglas med alternativa klister | Använd (BOND Plus Slides – produktkod S21.2113 eller Apex BOND Slides - produktkod 3800040) |
| Dåligt bibehållande av vävnadsmorfologi | Otillräcklig fixering och bearbetning av vävnad | Kontrollera att ett formalinbaserat fixativ används och att bearbetningsschemana är lämpliga för preparat som testas. Testa fallet igen med ett annat segment, om så är möjligt. Om det inte går bedöms de ytor som uppvisar bäst fixeringsmönster tillsammans med ett motsvarande H&E-infärgat snitt. |
| | Olämplig förbehandling | Justera förbehandlingsprotokollet (HIER eller Enzymatisk nedbrytning). |
| Vävnad har lossnat från patient-/ kontrollobjektglas | Felaktig typ av objektglas har använts eller snittet har inte dränerats tillräckligt | Kontrollera att lämpliga objektglas används för patient-/kontrollsnitt (t.ex. BOND Plus Slides – produktkod S21.2113 eller Apex BOND Slides - produktkod 3800040). Kontrollera att objektglasen får tillräcklig dränering och inkuberas i en timme vid 60 °C. |

Tabell 7: Felsökningsguide för Leica HER2 FISH System - 30 Test

Om det uppstår problem med Leica HER2 FISH System - 30 Test som inte behandlas i felsökningsguiden, var vänlig kontakta din lokala Leica Biosystems-teknikserviceavdelning eller distributör för att få hjälp.

Referenser

1. Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA. The neu oncogene encodes an epidermal growth factor related protein. *Nature* 1986;319:226–30.
2. Lonardo F, Di Marco E, King CR, Pierce JH, Segatto O, Aaronson SA, et al. The normal erbB-2 product is an atypical receptor-like tyrosine kinase with constitutive activity in the absence of ligand. *New Biologist* 1990; 2: 992–1003.
3. Wolff A.C., Hammond E.H., Schwartz J.N., et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 25, 1-28, 2007.
4. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235:177-182.
5. Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 1992;10:7:1049-1056.
6. Gullick WJ, Love SB, Wright C, et al. c-erbB-2 protein overexpression in breast cancer is a risk factor in patients with involved and uninvolved lymph nodes. *British Journal of Cancer* 1991;63:434-438.
7. Borg A, Tandon AK, Sigurdsson H, et al. HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. *Cancer Research* 1990;50:4332-4337.
8. Tandon AK, Clark GM, Chamness AU, et al. HER-2/neu oncogene protein and prognosis in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 1989; 7:1120-1128.
9. Van Cutsem E, Kang Y, Chung H, Shen L, Sawaki A, Lordick F m.fl. Efficacy results from the ToGA trial: A phase III study of trastuzumab added to standard chemotherapy (CT) in first-line human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive advanced gastric cancer (GC). *Journal of Clinical Oncology* 2009; 27: LBA4509.
10. Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JBB, Henner D, Wong WLT, et al. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 1992; 89: 4285–9.
11. Hudziak RM, Lewis GD, Winget M, Fendly BM, Shepard HM, Ullrich A. p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Molecular & Cell Biology* 1989; 9: 1165–72.
12. Lewis GD, Figari I, Fendly B, Wong WL, Carter P, Gorman C, et al. Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185HER2 monoclonal antibodies. *Cancer Immunology and Immunotherapy* 1993; 37: 255–63.
13. Baselga J, Norton L, Albanell J, Kim Y-M, Mendelsohn J. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Research* 1998; 58: 2825–31.
14. Ellis I.O., Bartlett J., Dowsett M., Humphreys S., Jasani B., Miller K., Pinder S.E., Rhodes A. and Walker R. Best practise No. 176: Updated recommendations for Her-2 testing in the UK. *Journal of Clinical Pathology* 57; 233-237, 2004.
15. Walker R.A, Bartlett, J., Dowsett, M., Ellis, I., Hanby, A., Jasani, Miller, K., Pinder, S. HER2 Testing in the UK – further update to recommendations. *Journal of Clinical Pathology* 2007.054866
16. Press MF, Zhou JY, Ma Y, et al. Evaluation of HER-2/neu gene amplification by fluorescence in situ hybridization in invasive breast carcinoma. In: *FISH: Clinical Applications in Cancer and Genetics* February 8-11, 1994; Lake Tahoe, CA.
17. Pauletti G, Singh R, Press MF, et al. HER-2/neu gene amplification detected by fluorescence in situ hybridization: A comparative study with other techniques. Abstract 3247, *Proceedings of the American Association for Cancer Research* 1994 35:545.
18. Szöllösi J, Balázs M, Feuerstein BG, et al. Phenotype genotype relationship in erbB-2 amplification. *International Society for Analytical Cytology* 1994 Abstracts. 92. Abstract 536D.
19. Kallioniemi O, Kallioniemi A, Kurisu W, et al. ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1992;89:5321-5325.
20. The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Quality assurance for immunocytochemistry; Approved guideline. NCCLS document MM4-A (1-56238-396-5) NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 1999; 19087–1898: USA
21. Nadj, M. and Morales, A. R. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. *Laboratory Medicine* 1983; 14: 767.
22. Jackson P. 2007. Quality Assurance in Immunohistochemistry. In: *Immunohistochemistry, 2007* (ed. Renshaw S), PP 205–237. Scion Publishing Ltd.
23. Bartlett JMS, Ibrahim M, et al External Quality Assurance of HER2 FISH Testing: Results of a UK NEQAS Pilot Scheme. *Journal of Clinical Pathology*. 2006.

Licensavtal

Den här produkten innehåller PathVysion FISH-sonder tillhandahållna av Abbott Molecular Inc. PathVysion, LSI och CEP är varumärken tillhörande Abbott Molecular Inc. Med ensamrätt. Används under licens.









Ändringar jämfört med tidigare utgåva

Medföljande komponenter, symbolidentifiering.

Utgivningsdatum

28 september 2020

Identifiering av symboler

| | | | | | |
|---|---|---|----------------------|---|-----------------------------|
|  | Satskod |  | Förvaring |  | Katalognummer |
|  | Medicinsk enhet för <i>in vitro</i> -diagnostik |  | Tillverkare | SN | Serienummer |
|  | eFU - läs användningsanvisningarna |  | Räcker till <n> test |  | Använd senast ÅÅÅÅ-MM-DD |
| R_x Only | Endast recept | | | | |

Herceptin är ett varumärke tillhörande Genentech, Inc. och F. Hoffmann-La Roche Ltd.