

# Leica HER2 FISH System - 30 Test Bedienungsanleitung

Zur Verwendung mit dem Leica Biosystems BOND-MAX and BOND-III System.

TA9217 ist ein Produkt für die Fluoreszenz- *in-situ*-Hybridisierung zur Färbung von 30 Tests (30 mit LSI HER2/CEP17 Dual Probe gefärbten Objektträgern).

Deutsch



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

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

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

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

# Inhaltsverzeichnis

<b>Verwendungszweck</b> .....	<b>3</b>
Für <i>In-Vitro</i> -Diagnostik.....	3
Erforderliche Schulung.....	3
<b>Zusammenfassung und Erläuterungen</b> .....	<b>3</b>
Hintergrundinformationen.....	3
Zusammenfassung der klinischen Konkordanz BOND-MAX System.....	4
Zusammenfassung der klinischen Konkordanz BOND-III System.....	4
Verfahrensprinzip.....	5
Gelieferte Komponenten.....	5
Gebrauchsanweisungen.....	5
Lagerung und Stabilität.....	5
Probenvorbereitung.....	6
Warnhinweise und Sicherheitsmaßnahmen.....	6
<b>Vorgehensweise</b> .....	<b>6</b>
A. Erforderliche, aber nicht im Lieferumfang enthaltene Reagenzien.....	6
B. Erforderliche, aber nicht im Lieferumfang enthaltene Ausrüstung.....	6
C. Methodik.....	7
D. BOND Enzym-Vorbehandlung.....	7
E. Standard-Färbeprotokoll.....	7
F. Verfahrensschritte.....	8
G. Aufbewahrung von Objektträgern.....	9
<b>Signalbeurteilung und Auszählung</b> .....	<b>10</b>
Empfohlene Methode zur Bestimmung des Verhältnisses zwischen LSI HER2 und CEP17.....	11
<b>Leica HER2 FISH System - 30 Test Interpretationshilfe</b> .....	<b>12</b>
<b>Leica HER2 FISH System - 30 Test Auswertungsblatt</b> .....	<b>13</b>
<b>Qualitätskontrolle</b> .....	<b>14</b>
<b>Verwendung von Kontrollobjektträgern</b> .....	<b>14</b>
<b>Einschränkungen</b> .....	<b>15</b>
A. Allgemeine Einschränkungen.....	15
B. Produktspezifische Einschränkungen.....	15
<b>Klinische Konkordanz zwischen Leica HER2 FISH System - 30 Test und Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Mamma</b> .....	<b>16</b>
2x2-Konkordanzergebnisse BOND-MAX System - Mamma.....	16
2x2-Konkordanzergebnisse BOND III System - Mamma.....	17
<b>Klinische Konkordanz zwischen Leica HER2 FISH System - 30 Test und Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Magen</b> .....	<b>17</b>
2x2 Konkordanzergebnisse BOND-MAX System - Magen.....	17
<b>Präzisionstests – BOND-MAX System</b> .....	<b>18</b>
A. Studie zur Präzision innerhalb eines Laufs.....	18
B. Studie zur Präzision innerhalb eines Geräts.....	18
C. Studie zur Präzision zwischen verschiedenen Läufen.....	18
D. Studie zur Präzision zwischen verschiedenen Laboren.....	18
E. Studie zur Präzision zwischen verschiedenen Beobachtern.....	19
F. Studie zur Präzision zwischen verschiedenen Chargen.....	19
<b>Präzisionstests – BOND-III System</b> .....	<b>19</b>
G. Studie zur Präzision innerhalb eines Laufs.....	19
H. Studie zur Präzision innerhalb eines Geräts.....	19
I. Studie zur Präzision zwischen verschiedenen Läufen.....	20
J. Studie zur Präzision zwischen verschiedenen Laboren.....	20
K. Studie zur Präzision zwischen verschiedenen Beobachtern.....	20
L. Studie zur Präzision zwischen verschiedenen Chargen.....	20
<b>Zuverlässigkeit des Assays</b> .....	<b>21</b>
<b>Fehlerbehebung</b> .....	<b>22</b>
<b>Quellen</b> .....	<b>24</b>
<b>Lizenzvereinbarung</b> .....	<b>25</b>
<b>Änderungen gegenüber der vorherigen Ausgabe</b> .....	<b>25</b>
<b>Ausgabedatum</b> .....	<b>25</b>
<b>Symbolidentifizierung</b> .....	<b>25</b>

## Verwendungszweck

### Für *In-Vitro*-Diagnostik

Zweck des Leica HER2 FISH System - 30 Test ist die Erkennung der Amplifikation des HER2/neu-Genes durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) in formalinfixierten, in formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebeproben Brustkrebs- und Magenadenokarzinompräparaten (einschließlich gastroösophagealer Übergangszone). Das Leica HER2 FISH System - 30 Test kann die Beurteilung von Patienten unterstützen, für die eine Therapie mit Herceptin® (trastuzumab) erwogen wird (siehe Packungsbeilage von Herceptin). Das Leica HER2 FISH System - 30 Test ist nicht für das Brustkrebs-Screening bzw. für die Diagnose von Brustkrebs vorgesehen. Alle sonstigen verfügbaren klinischen Informationen, wie Tumorgröße, Anzahl betroffener Lymphknoten und Steroidrezeptorstatus, sollten ebenfalls berücksichtigt werden. Die Entscheidung über die Behandlung von Brustkrebspatientinnen darf nicht ausschließlich auf der Basis der HER2-Genamplifikation getroffen werden.

Hinweis: Alle Patientinnen in den klinischen Herceptin-Studien wurden auf der Basis eines immunzytochemischen Clinical Trial Assays (CTA) ausgewählt. Keine der an diesen Studien teilnehmenden Patientinnen wurde mithilfe des Leica HER2 FISH System - 30 Test ausgewählt. Das Leica HER2 FISH System - 30 Test wurde unter Verwendung unabhängiger Proben mit dem Abbott Molecular PathVysion® HER-2 DNA Probe Kit verglichen. Wie aus der Zusammenfassung der klinischen Konkordanz hervorgeht, wurden dabei akzeptable Konkordanzergebnisse erzielt. Die tatsächliche Korrelation zwischen dem Leica HER2 FISH System - 30 Test und klinischen Ergebnissen wurde nicht ermittelt.

Alle Patienten, die an den klinischen Herceptin-Studien zum fortgeschrittenen Magenkrebs (ToGA-Studien) teilnahmen, wurden auf der Grundlage des Dako HercepTest ausgewählt. Keiner der an diesen Studien teilnehmenden Patienten wurde mithilfe des Leica HER2 FISH System - 30 Test ausgewählt. Der Leica HER2 FISH System - 30 Test wurde unter Verwendung unabhängiger Proben mit dem Abbott Molecular PathVysion® HER-2 DNA Probe Kit verglichen. Wie aus der Zusammenfassung der klinischen Konkordanz hervorgeht, wurden dabei akzeptable Konkordanzergebnisse erzielt. Die tatsächliche Korrelation zwischen den Ergebnissen des Leica HER2 FISH System - 30 Test und klinischen Ergebnissen wurde nicht ermittelt.

*\* Herceptin® ist eine Marke von Genentech, Inc. und F. Hoffmann-La Roche Ltd. PathVysion® ist eine Marke von Abbott Molecular Inc. Alle Rechte vorbehalten. Unter Lizenz verwendet.*

### Erforderliche Schulung

Leica Biosystems bietet für alle Anwender Schulungen bezüglich Probenvorbereitung, Assay-Durchführung und Interpretation von FISH-Tests in Bezug auf das HER2-Gen an.

## Zusammenfassung und Erläuterungen

### Hintergrundinformationen

Das HER2-Gen, auch als neu oder c-erbB2 bezeichnet, befindet sich auf dem langen Arm des Chromosoms 17 an Position 17q11-12 (1). Sowohl das HER2-Gen als auch das codierte 185 kD-Protein spielen nachweislich eine wichtige Rolle bezüglich der malignen Umwandlung und des Tumorwachstums bei Brustkrebs (2).

HER2 fungiert als prognostischer Marker, wobei Genamplifikation und Proteinüberexpression mit einer erhöhten Rezidiv- und Sterblichkeitsrate in Zusammenhang stehen. HER2 fungiert außerdem als prädiktiver Marker für ausgewählte systemische Chemotherapien und gezielte Therapien (3). Insbesondere hat sich die Amplifikation des HER2-Gens als Indikator für eine schlechte Prognose bei lymphknotenpositivem Brustkrebs erwiesen (4-8). Außerdem geht aus einer Studie hervor, dass der prognostische Wert von HER2 bei chemotherapeutisch behandelten Patienten stärker ist (7). Allerdings müssen bei der Prognose des rezidivfreien Überlebens sowie des Gesamtüberlebens des einzelnen Patienten weitere prognostische Faktoren, wie Tumorgröße, Anzahl positiver Lymphknoten und Steroidrezeptorstatus, berücksichtigt werden.

Aufgrund der Überexpression des Onkoproteins HER2 als Ergebnis der in Brustkrebszellen gefundenen Genamplifikation bietet sich HER2 als Ziel einer auf Antikörpern basierenden Therapie an (3) - während die Ergebnisse der ToGA-Studie eindeutig darauf hinweisen, dass der Einsatz von Herceptin® in Kombination mit Chemotherapie bei Magenkrebs eine wirkungsvolle Behandlung darstellt, durch die die Überlebensrate bei HER2-positivem Magenkrebs erhöht wird (9). Herceptin (trastuzumab), ein humanisierter monoklonaler Antikörper (10), der sich mit hoher Affinität an das Onkoprotein HER2 bindet, hemmt nachweislich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Proliferation humaner Tumorzellen, die das Onkoprotein HER2 überexprimieren (11-13). Seit der Entwicklung von Herceptin ist die Erkennung des HER2-Gens und des Proteins HER2 zu einem wichtigen Instrument bei der Beurteilung von Brusttumoren geworden, an dem sich sowohl die Auswahl der Therapie als auch die weitere Patientenbetreuung orientiert (14, 15).

Mit FISH konnte sowohl bei Interphasen- als auch bei Metaphasen-Zellen aus humanen Brustkrebszelllinien HER2-Genamplifikation nachgewiesen werden (16-19). Zur Quantifizierung der HER2-Genamplifikation bestimmt das FISH-System den Grad der HER2-Genamplifikation direkt in den Tumorzellen. Die charakteristische Morphologie des Gewebes und die räumliche Verteilung der Onkogen-Kopien in einzelnen, nicht kultivierten, primären Brustkarzinomen bleiben erhalten. In Brusttumoren finden sich auch häufig Abweichungen bezüglich der Anzahl der Kopien von Chromosom 17 (Aneusomie). Sie können in Form von fehlenden oder überzähligen Chromosomen (Polysomie) auftreten. Diese Chromosomenvariation ist von großer Bedeutung für die Interpretation und Dokumentation des HER2-Genamplifikationsstatus. Deshalb spielt die Ermittlung der Anzahl der Kopien von Chromosom 17 im Zusammenhang mit HER2 eine entscheidende Rolle (4).

Das Leica HER2 FISH System - 30 Test enthält die LSI HER2 DNA-Sonde, eine 226 Kb umfassende, mit SpectrumOrange™ direkt markierte, fluoreszente und für den Genlokus des HER2 (17q11.2-q12) spezifische DNA-Sonde sowie die CEP17 DNA-Sonde, eine 5,4 Kb umfassende, mit SpectrumGreen™ direkt markierte, fluoreszente, für die Alpha-Satellit-DNA-Sequenz im Zentromerbereich von Chromosom 17 (17p11.1-q11.1) spezifische DNA-Sonde. Die Sondenlösung ist speziell für die Verwendung im BOND-MAX and BOND-III System konzipiert und erprobt und sollte nicht verändert oder in einem manuellen Arbeitsablauf eingesetzt werden.

### **Zusammenfassung der klinischen Konkordanz BOND-MAX System**

Das Leica HER2 FISH System - 30 Test wurde entwickelt, um eine vollautomatische Alternative zu den gebräuchlichen Verfahren zur Ermittlung des HER2-Genamplifikationsstatus anbieten zu können. Die Leistungsfähigkeit des Leica HER2 FISH System - 30 Test auf dem BOND-MAX System wurde in einer unabhängigen Studie untersucht, in der die mit dem Leica HER2 FISH System - 30 Test mit dem Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit Assay an 300 Brustkrebspräparaten und 109 Magenadenokarzinomen (einschließlich gastroösophagealer Übergangszone) verglichen wurden. Keine dieser Tumorproben stammte von Patientinnen, die an den klinischen Herceptin-Studien teilnahmen. Die mit Brustgewebe erzielten Ergebnisse ergaben eine Konkordanz von 99,33 % bei der 2x2-Analyse (95%-Konfidenzintervalle von 97,61–99,92 %). Die mit Magenadenokarzinomen (einschließlich Gewebe aus der gastroösophagealen Übergangszone) erzielten Ergebnisse ergaben eine Konkordanz von 98,17 % bei der 2x2-Analyse (95%-Konfidenzintervalle von 93,53–99,78%). Die Konkordanzdaten zeigen auch, dass ein mit dem Leica HER2 FISH System - 30 Test erzieltes positives Resultat mit hoher Wahrscheinlichkeit einem mit dem Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit Assay erzielten positiven Resultat entspricht. Das Leica HER2 FISH System - 30 Test wird in Bezug auf die HER2-Genamplifikation als negativ interpretiert, wenn das Genverhältnis HER2:CEP17 kleiner als 2,0 ist, und als positiv, wenn das Genverhältnis HER2:CEP17 größer oder gleich 2,0 ist. Zweideutige (grenzwertige) Ergebnisse, bei denen das Genverhältnis HER2:CEP17 zwischen 1,8 und 2,2 liegt, sind mit Vorsicht zu interpretieren. In diesen Fällen sollten weitere 20 Kerne ausgezählt und das Verhältnis neu berechnet werden.

## Zusammenfassung der klinischen Konkordanz BOND-III System

Das Leica HER2 FISH System - 30 Test wurde entwickelt, um eine vollautomatische Alternative zu den gebräuchlichen Verfahren zur Ermittlung des HER2-Genamplifikationsstatus anbieten zu können. Die Leistungsfähigkeit des Leica HER2 FISH System - 30 Test auf dem BOND-III System wurde in einer unabhängigen Studie untersucht, in der die mit dem Leica HER2 FISH System - 30 Test erzielten Ergebnisse mit den Ergebnissen des Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit Assay in Bezug auf 300 Brusttumorproben verglichen wurden. Keine dieser Tumorproben stammte von Patientinnen, die an den klinischen Herceptin-Studien teilnahmen. Die Ergebnisse zeigten eine Konkordanz von 99,67 % bei einer 2x2-Analyse (95 % Konfidenzintervalle von 98,16–99,99 %). Die Konkordanzdaten zeigen auch, dass ein mit dem Leica HER2 FISH System - 30 Test erzieltes positives Resultat mit hoher Wahrscheinlichkeit einem mit dem Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit Assay erzielten positiven Resultat entspricht. Das Leica HER2 FISH System - 30 Test wird in Bezug auf die HER2-Genamplifikation als negativ interpretiert, wenn das Genverhältnis HER2:CEP17 kleiner als 2,0 ist, und als positiv, wenn das Genverhältnis HER2:CEP17 größer oder gleich 2,0 ist. Zweideutige (grenzwertige) Ergebnisse, bei denen das Genverhältnis HER2:CEP17 zwischen 1,8 und 2,2 liegt, sind mit Vorsicht zu interpretieren. In diesen Fällen sollten weitere 20 Kerne ausgezählt und das Verhältnis neu berechnet werden.

## Verfahrensprinzip

Das Leica HER2 FISH System - 30 Test enthält für die Färbung formalinfixierter, in Paraffin eingebetteter Gewebe auf der Basis einer Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung erforderliche Komponenten. Nach entsprechender Vorbehandlung, Inkubation mit gebrauchsfertiger LSI HER2/CEP17 Dual Probe und stringenter Waschen werden die Gewebeschnitte dehydriert und mit DAPI eingedeckt. Die Ergebnisse werden mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie unter Verwendung empfohlener Filter bei geeigneten Wellenlängen interpretiert.

Das Leica HER2 FISH System - 30 Test ist ausschließlich für den Einsatz im BOND System vorgesehen.

## Gelieferte Komponenten

Die nachfolgend (in Tabelle 1) aufgeführten Materialien reichen für die Färbung von 30 Tests (30 mit LSI HER2/CEP17 Dual Probe) gefärbten Objektträgern) aus.

<b>LSI HER2/CEP17 Probe</b> <b>6,6 ml</b>	Enthält gebrauchsfertige LSI HER2/CEP17 Dual Probe. Enthält <60% (v/v) Formamid.
<b>Post Hybridization Wash 2</b> <b>9 ml</b>	Enthält gebrauchsfertige Waschlösung zum Spülen nach der Hybridisierung. Enthält <50% (v/v) Formamid.
<b>BOND Enzyme Concentrate 2</b> <b>1 ml</b>	Enthält Proteinase K-Lösung mit 1,7 mg/ml.
<b>BOND Enzyme Diluent</b> <b>65 ml</b>	Enthält Enzymverdünner.
<b>BOND Open Container</b> <b>3 x 7 ml</b>	BOND Open Container verwendet für Enzyme 5.

Tabelle 1: Komponenten des Leica HER2 FISH System - 30 Test

Weitere Sicherheitsinformationen sind den einzelnen Sicherheitsdatenblättern (MSDS) unter [www.LeicaBiosystems.com/TA9217-IFU](http://www.LeicaBiosystems.com/TA9217-IFU) zu entnehmen.

## Gebrauchsanweisungen

Alle im Lieferumfang enthaltenen Reagenzien sind speziell für den Einsatz bei diesem Assay konzipiert, und die Chargennummern sind für jedes einzelne Leica HER2 FISH System - 30 Test spezifisch. Um die korrekte Durchführung des Assays zu gewährleisten, dürfen keine Reagenzien ausgetauscht werden.

## Lagerung und Stabilität

Bei 2–8 °C lagern. Nicht einfrieren. Unmittelbar nach dem Gebrauch erneut bei 2–8 °C lagern. Durch jede Abweichung von diesen Bedingungen verliert der Assay seine Gültigkeit. Es ist darauf zu achten, dass das Verfallsdatum des verwendeten Leica HER2 FISH System - 30 Test nicht überschritten wird. Folgende Anzeichen deuten auf eine Verunreinigung und/oder Instabilität des Leica HER2 FISH System - 30 Test hin: trübe Lösungen (außer Sondenlösung) und Geruchsentwicklung. Andere Lagerbedingungen als die oben angegebenen müssen vom Anwender selbst getestet werden.

## Probenvorbereitung

Für alle Proben sind die Standardmethoden der Gewebeaufbereitung anzuwenden (20). Das Fixieren der Gewebe in formalinhaltigem Fixiermittel sowie die Routineverarbeitung und Einbettung in Paraffin wird empfohlen. Beispielsweise sollten die Proben in Blöcke von 3–4 mm Dicke geschnitten und 18–24 Stunden in 10 % neutral gepuffertem Formalin fixiert werden. Anschließend sollten die Gewebe in abgestuft konzentriertem Alkohol dehydriert, mit Xylol geklärt und in geschmolzenes Paraffinwachs eingebettet werden, dessen Temperatur nicht über 60 °C liegen sollte. Die Gewebeproben sollten auf eine Dicke zwischen 4 und 6 µm zugeschnitten werden.

Auf positiv geladene Objektträger (BOND Plus Slides S21.2113) aufgezogene Gewebeschnitte können vor dem Färben bis zu 12 Monate bei 2–8 °C gelagert werden. Es wird empfohlen, die Objektträger nach der Schnitterstellung eine Stunde lang bei 60 °C zu inkubieren. Gefärbte Schnitte sollten bei -20 °C aufbewahrt werden, um das Fluoreszenzsignal zu erhalten und eine Abschwächung zu vermeiden. Gelagerte Objektträger sollten vor dem Ablesen Raumtemperatur erreichen.

## Warnhinweise und Sicherheitsmaßnahmen

*Nur für professionelle Anwender*

Eine oder mehrere im Produkt enthaltene Komponenten sind gesundheitsgefährdend und können das ungeborene Kind schädigen.

Grundsätzlich dürfen mit diesem Produkt nur Personen über 18 Jahre arbeiten. Die Benutzer sind ausführlich über die korrekten Arbeitsabläufe, die gesundheitsgefährdenden Eigenschaften des Produkts und die erforderlichen Sicherheitsmaßnahmen zu informieren.

Proben vor und nach der Fixierung und alle mit ihnen in Kontakt kommenden Materialien sind wie infektiöses Material zu behandeln und mit den entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen zu entsorgen.

Reagenzien dürfen unter keinen Umständen mit dem Mund pipettiert werden, und der Kontakt von Haut und Schleimhäuten mit Reagenzien und Proben ist zu vermeiden. Empfindliche Bereiche, die mit Reagenzien oder Proben in Kontakt gekommen sind, sind mit reichlich Wasser zu spülen. Ärztlichen Rat einholen. Potenziell toxische Komponenten sind gemäß den auf Bundes-, Landes oder Regionalebene geltenden Bestimmungen zu entsorgen.

Die mikrobielle Verunreinigung der Reagenzien kann zu einer Zunahme unspezifischer Färbungen führen und ist daher auf ein Mindestmaß zu reduzieren.

## Vorgehensweise

### A. Erforderliche, aber nicht im Lieferumfang enthaltene Reagenzien

- BOND Dewax Solution (AR9222)
- BOND Epitope Retrieval Solution 1 (AR9961)
- BOND Wash Solution x10 Concentrate (AR9590)
- Standardlösungsmittel, die bei Assays auf der Basis von Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung zum Einsatz kommen (z. B. Äthanol, absolut und abgestuft)
- Destilliertes oder entionisiertes Wasser
- DAPI Gegenfärbemittel
- Leica HER2 FISH Control Slides (TA9123)
- BOND Aspirating Probe Cleaning System (CS9100)

### B. Erforderliche, aber nicht im Lieferumfang enthaltene Ausrüstung

- Pipetten (zum Abmessen von Volumina von 1-20 µl und 100 – 1000 µl)
- Positiv geladene Objektträger (BOND Plus Slides – S21.2113)
- BOND-MAX (21.0051) or BOND-III (21.2201)
- BOND Universal Covertiles™ (S21.2001, S21.4583 oder S21.4611)
- BOND Mixing Stations (S21.1971)
- BOND Slide Label & Print Ribbon (S21.4564)
- Deckgläser
- Trockenofen (der eine Temperatur von 60 °C halten kann)
- Fluoreszenzmikroskop (60–100x Objektiv) mit geeigneter Lichtquelle. Es empfiehlt sich, die Einsatzdauer der Lampe zu dokumentieren und die Lampe auszutauschen, bevor sie die Nennlebensdauer überschritten hat. Außerdem ist auf eine korrekte Ausrichtung der Lampe zu achten.
- Geeigneter Fluoreszenzfiltersatz (SpectrumOrange™ – Anregungsmaximum bei 559 nm, Emissionsmaximum bei 588 nm, SpectrumGreen™ – Anregungsmaximum bei 497 nm, Emissionsmaximum bei 524 nm und DAPI – Anregungsmaximum bei 367 nm, Emissionsmaximum bei 452 nm). Zu den meisten Mikroskopmodellen sind für den Einsatz mit dem Leica HER2 FISH System - 30 Test optimierte Multiband-Fluoreszenzmikroskopfiltersätze verfügbar. Folgende Filtersätze werden für das Leica HER2 FISH System - 30 Test empfohlen: DAPI/9-Orange Dual Bandpass, DAPI/Green Dual Bandpass, Green/Orange(V.2) Dual Bandpass sowie DAPI/Green/Orange (V.2) Triple Bandpass.

### C. Methodik

- Die Anwendung dieser Methode setzt eine ausreichende Schulung in Bezug auf die automatisierte *in-situ*-Fluoreszenz-Technik voraus.
- Jeder mit LSI HER2/CEP17 Dual Probe gefärbte Testschnitt ermöglicht die Same-Cell-Analyse von HER2-Signalen und Zentromersignalen des Chromosoms 17. Anhand des Verhältnisses von HER2- zu Chromosom-17-Signalen kann der Probe ein quantitativer Wert zugeordnet werden, woraus sich ein negatives Ergebnis (keine Amplifikation) oder positives Ergebnis (Amplifikation) ableiten lässt. Zweideutige (grenzwertige) Ergebnisse (zwischen 1,8 und 2,2) sind mit Vorsicht zu interpretieren. In diesem Fällen sollten weitere 20 Kerne ausgezählt und das Verhältnis neu berechnet werden.

### D. BOND Enzym-Vorbehandlung

Vor dem Färben ist das im Lieferumfang enthaltene BOND Enzyme Concentrate 2 unter Verwendung des BOND Enzyme Diluent in einem der BOND Open Containers im Verhältnis 1:300 zu verdünnen. Um beispielsweise 10 Objektträger zu färben, sind 3 ml Enzymlösung herzustellen, indem 10 µl BOND Enzyme Concentrate 2 in 2990 µl BOND Enzyme Diluent verdünnt werden. Es wird empfohlen, das Enzym vor jedem Färbelauf frisch herzustellen und pro Lauf ein Mindestvolumen von 900 µl zu verwenden.

## E. Standard-Färbeprotokoll

Es wird empfohlen, das Leica HER2 FISH System - 30 Test mit dem in Tabelle 2 dargestellten Standard-Färbeprotokoll anzuwenden.

Protokolltyp	Protokollname
Färbung	*FISH Protocol A
Vorbereitung	*Dewax
HIER	*HIER 25 min with ER1 (97)
Enzym	*Enzyme 5 for 25 min
Denaturierung	*D10
Hybridisierung	*ISH Hybridization (12Hr)

Tabelle 2: Standard-Leica HER2 FISH System - 30 Test Staining Protocol

## F. Verfahrensschritte

Zusätzlich zu den folgenden Anweisungen ist das Benutzerhandbuch zum BOND-MAX and BOND-III System heranzuziehen. Für jeden Objektträger ist ein neues Deckglas BOND Universal Covertile zu verwenden.

Die Verwendung von BOND Universal Covertiles, die zuvor bei der immunhistochemischen Färbung oder Färbung mit *In-situ*-Hybridisierung eingesetzt wurden, wurde für diesen Test nicht validiert.

1. Stellen Sie sicher, dass die Vorrats- und Abfallbehälter am BOND-MAX and BOND-III System genügend Aufnahmekapazität für die erforderlichen Färbeläufe haben.
2. Stellen Sie sicher, dass genügend Alkohol, destilliertes oder entionisiertes Wasser, BOND Dewax Solution, BOND Epitope Retrieval Solution 1 und BOND Wash Solution für die erforderlichen Färbeläufe in den Vorratsbehältern vorhanden ist.
3. Vergewissern Sie sich, dass eine saubere BOND Mixing Station installiert ist.
4. Schalten Sie das BOND-MAX and BOND-III System ein.
5. Schalten Sie den mit dem BOND-MAX and BOND-III System verbundenen PC ein.
6. Starten Sie die BOND Software.
7. Scannen Sie zur Verwendung eines neuen Leica HER2 FISH System - 30 Test Kits den Barcode am Reagenzienschlitten mit dem Handscanner, um das System in den Reagenzienbestand des BOND einzugeben (nur Einzelbarcode).
8. Bereiten Sie BOND Enzyme 5 im mitgelieferten BOND Open Container in einer Verdünnung von 1:300 vor. Geben Sie beispielsweise für 10 Objektträger 10 µl BOND Enzyme Concentrate 2 zu 2990 µl BOND Enzyme Diluent hinzu.
9. Scannen Sie den mitgelieferten BOND Open Container ein und registrieren Sie ihn als **Bond Enzyme 5**.
10. Öffnen Sie den Bildschirm "Add Slide" und klicken Sie auf **Fall hinzufügen**.
11. Geben Sie die Details des ersten Falls ein. Das Dispensiervolumen sollte auf **150 µL** und das Vorbereitungsprotokoll auf **\*Dewax** eingestellt sein. Klicken Sie auf **OK**.
12. Klicken Sie im Bildschirm "Add Slide" auf **OT hinzufügen**, während der Fall hervorgehoben ist.
13. Fügen Sie zuerst die Testobjektträger der Patienten hinzu. Der Gewebetyp sollte auf **Test-Gewebe** gesetzt sein.
14. Wählen Sie den Färbemodus **Einzel** aus.
15. Wählen Sie die Funktion **ISH** aus.
16. Wählen Sie **\*LSI HER2/CEP17 Dual Probe – 30 Test** aus der Sondenliste aus. Auf der Registerkarte "Protocols" wird standardmäßig das richtige Färbeprotokoll (**\*FISH Protocol A**), HIER-Protokoll (**\*HIER 25 min with ER1 (97)**) und EIER-Protokoll (**\*Enzyme 5 for 25 min**) mit den richtigen Werten für Denaturierung (**\*D10**) und Hybridisierung (**\*ISH Hybridization (12Hr)**) angezeigt.
17. Wiederholen Sie Schritt 10 bis 16, bis Patienten-Testobjektträger und Kontrollobjektträger (Leica HER2 FISH Control Slides und/oder interne Kontrollobjektträger) erstellt wurden. Drucken Sie Objektträgeretiketten aus.
18. Versehen Sie die Objektträger mit geeigneten Etiketten.



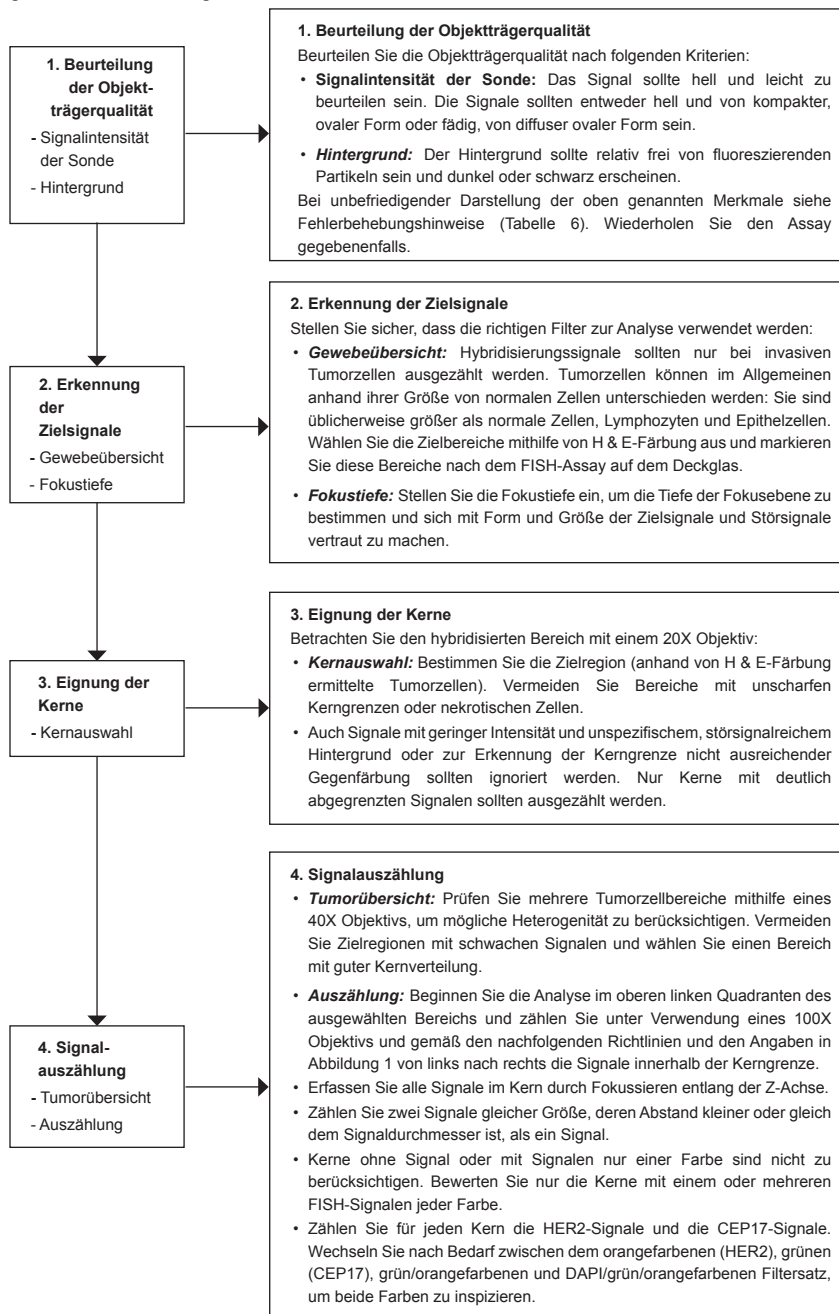
19. Öffnen Sie die Deckel aller Behälter des Leica HER2 FISH System - 30 Test und setzen Sie den Reagenzienschlitten in das BOND-MAX and BOND-III System ein.
20. Decken Sie die Objektträger mit neuen Covertiles ein.
21. Setzen Sie den Objektträgerschlitten in das BOND-MAX and BOND-III System ein und drücken Sie **Lade/Entlade**.
22. Vergewissern Sie sich, dass die Objektträger gescannt wurden, und klicken Sie im Systemstatusbildschirm auf **Run(Play)**, um den Lauf sofort zu starten (für das Leica HER2 FISH System - 30 Test wird die Ausführung über Nacht unter Verwendung der Startverzögerung empfohlen).
23. Vergewissern Sie sich, dass im Schlittenindikatorfeld **Läuft (OK)**, die Chargennummer und der Endzeitpunkt angezeigt werden.
24. Drücken Sie nach Abschluss des Färbelaufs **Lade/Entlade** und entnehmen Sie die Objektträgerschlitten aus dem BOND-MAX and BOND-III System.
25. Entfernen Sie die Covertiles und spülen Sie die Objektträger in entionisiertem Wasser.
26. Dehydrieren Sie sie rasch zweimal mit Alkohol und lassen Sie sie an der Luft trocknen.
27. Geben Sie 20 µl DAPI direkt auf die Probe.
28. Legen Sie ein Deckglas auf und warten Sie, bis sich die Lösung vollständig ausgebreitet hat. Luftblasen sollten entfernt werden.
29. Dichten Sie die Deckglasränder mit Nagellack oder einem ähnlichen Versiegelungsmittel ab.
30. Bewahren Sie die Objektträger im Dunkeln auf, um die Signalentwicklung zu fördern, bevor Sie sie unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachten.
31. Lagern Sie die gefärbten Objektträger zum Erhalt der Signalstärke bei -20 °C.

## G. Aufbewahrung von Objektträgern

Lagern Sie gefärbte Objektträger bei -20 °C im Dunkeln. Die Objektträger sollten nach der Entnahme aus der Lagerung bei -20 °C Raumtemperatur erreichen, bevor sie unter dem Mikroskop betrachtet werden.

## Signalbeurteilung und Auszählung

Zur Beurteilung der Signalqualität und Auszählung der HER2- und CEP17-Signale ist folgendermaßen vorzugehen:



## Empfohlene Methode zur Bestimmung des Verhältnisses zwischen LSI HER2 und CEP17

Bestimmen Sie das Verhältnis zwischen LSI HER2 und CEP17 nach folgender Methode:

1. Bestimmen Sie die Zahl der LSI HER2- und CEP17-Signale in 20 Kernen (siehe Abbildung 2 Leica HER2 FISH System - 30 Test Auswertungsblatt).
2. Ermitteln Sie die Gesamtanzahl der LSI HER2-Signale. Dies ist die Summe der LSI HER2-Signale für die betreffende Zählung, z. B. 143.
3. Ermitteln Sie die Gesamtanzahl der CEP17-Signale. Dies ist die Summe der CEP17-Signale für die betreffende Zählung, z. B. 48.
4. Berechnen Sie das Endergebnis nach folgender Formel:

Summe der LSI HER2-Signale dividiert durch die Summe der CEP17-Signale,  $143/48$  ergibt beispielsweise ein Verhältnis von 2,98, ist also positiv in Bezug auf HER2-Amplifikation.

**Wichtiger Hinweis: Wenn das Verhältnis von LSI HER2- zu CEP17-Signalen zweideutig ist (1,80 - 2,20), zählen Sie weitere 20 Kerne aus und berechnen Sie das Verhältnis neu.**

Die Ergebnisse sind wie folgt zu dokumentieren:

1. Bei einem Verhältnis kleiner 2 wurde keine HER2-Genamplifikation beobachtet.
2. Bei einem Verhältnis größer oder gleich 2 wurde HER2-Genamplifikation beobachtet.

**Wichtiger Hinweis: Ein Verhältnis am Grenzwert (1,80 - 2,20) ist, wie oben beschrieben, mit Vorsicht zu interpretieren.**

# Leica HER2 FISH System - 30 Test Interpretationshilfe

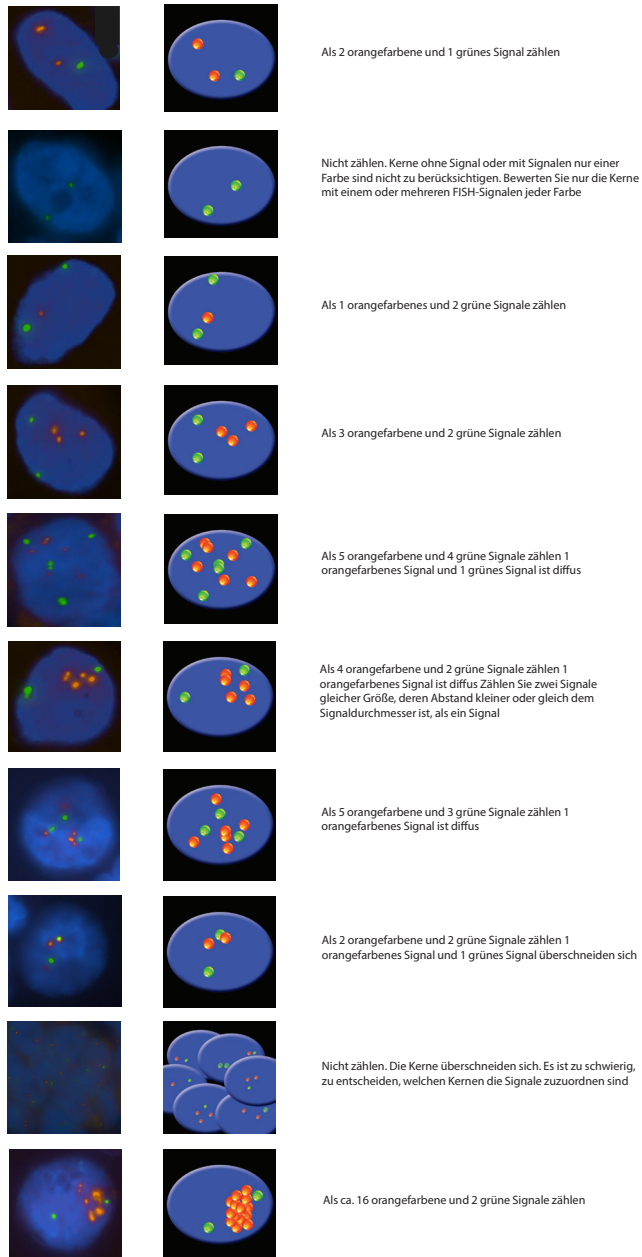


Abbildung 1: Interpretationshilfe

# Leica HER2 FISH System - 30 Test Auswertungsblatt

Signalzählung aus 20 Kernen

Kernnummer	Anzahl der HER2-Kopien	Anzahl der CEP17-Kopien	Kernnummer	Anzahl der HER2-Kopien	Anzahl der CEP17-Kopien
1			11		
2			12		
3			13		
4			14		
5			15		
6			16		
7			17		
8			18		
9			19		
10			20		
Summe 1-10			Summe 11-20		

	HER2	CEP17	Amplifikationsverhältnis HER2:CEP17
Gesamtergebnis 1-20			
Mittelwert pro Zelle			

Abbildung 2: Beispielauswertungsblatt

Deutsch

## Automatisches Ariol-Verfahren zur HER2 FISH-Bestimmung

Die Nutzung der digitalen Scoring-Anwendung Ariol PathVysion® als Interpretationshilfe wurde separat mit einer anderen Stichprobenkohorte für den Einsatz mit dem Leica HER2 FISH System validiert. Die digitale Scoring-Anwendung Ariol PathVysion ist – wenn sie zusammen mit dem Leica HER2 FISH System eingesetzt wird – für den Einsatz in der In-Vitro-Diagnostik indiziert. Bei Verwendung mit dem Leica HER2 FISH System sollte die Anwendung Ariol PathVysion auf die Anwendung mit Gewebe-Kontrollobjektträgern kalibriert werden und nicht auf die Leica HER2 FISH Control Slides (TA9123).

**Alle diagnostischen Entscheidungen trifft der qualifizierte Kliniker.**

Weitere Informationen entnehmen Sie bitte dem Ariol-Bedienerhandbuch.

## Qualitätskontrolle

### Verwendung von Kontrollobjektträgern

Es wird empfohlen, bei jedem Testlauf einen Kontrollobjektträger Leica HER2 FISH Control Slide zu verwenden, um die Leistungsfähigkeit des Assays und die Korrektheit der Signalauszahlung beurteilen zu können. Bei jeder Färbeserie im BOND-MAX and BOND-III System und jeder neuen Reagenziencharge sollten Kontrollobjektträger verwendet werden. Darüber hinaus kann der einzelne Anwender sein eigenes Kontrollmaterial verwenden.

Beurteilen Sie die Qualität der Kontrollobjektträger und zählen Sie die Signale nach den Anweisungen unter **Signalbeurteilung und Auszählung**. Die Kriterien für Objektträgerqualität müssen erfüllt sein, und das Verhältnis von HER2:CEP17 sollte innerhalb des für akzeptable Testergebnisse definierten Bereichs liegen. Tabelle 3 enthält die Akzeptanzkriterien für die Leica HER2 FISH Control Slides.

Zelllinie	Profil des Bond Oracle HER2 IHC System	HER2 Rezeptordichte pro Zelle*	Leica HER2 FISH System - 30 Test HER2:CEP17 Akzeptanzkriterien
SKBr-3	3+	$4,3 \times 10^5$	HER2-Amplifikation wird beobachtet
MDA-MB-453	2+	$1,4 \times 10^5$	HER2/CEP17 Gen-Verhältnis sollte zwischen 1,5 und 2,5 liegen
MDA-MB-175	1+	$6,3 \times 10^4$	HER2-Amplifikation wird nicht beobachtet
MDA-MB-231	0	$9,3 \times 10^3$	HER2-Amplifikation wird nicht beobachtet

\*Analyse der HER2-Rezeptordichte mithilfe von Durchflusszytometrie.

Tabelle 3: Interpretation der Leica HER2 FISH Control Slides.

Wenn bei den Kontrollobjektträgern ein Fehler vorliegt, sollten für diesen Fall keine FISH-Ergebnisse dokumentiert werden. Wenn die Kontrollobjektträger nicht die Akzeptanzkriterien erfüllen, hat das Leica HER2 FISH System - 30 Test möglicherweise keine akzeptable Leistung erbracht. In diesem Fall ist eine Wiederholung des Tests mit neuen Kontrollobjektträgern und Patientenproben-Objektträgern erforderlich. Wenn die Ergebnisse außerhalb des angegebenen Bereichs liegen, aber die Kontrollobjektträger die Akzeptanzkriterien für Qualität erfüllen, kann ein erneutes Screening desselben Objektträgers angebracht sein, da möglicherweise die Auszählung nicht korrekt durchgeführt wurde. Im Falle eines Hybridisierungsfehlers bei der Probe oder den Kontrollobjektträgern siehe Fehlerbehebungshinweise in Tabelle 6.

Wenn bei klinischen Proben die Interpretation des Hybridisierungssignals schwierig ist und nicht genügend Probenmaterial für einen erneuten Assay vorhanden ist, ist der Test nicht aussagekräftig. Wenn nicht genügend Zellen für die Analyse vorhanden sind, ist der Test nicht aussagekräftig.

Die Patientenproben sind nach Standardlaborverfahren zu kontrollieren. Signalqualität und Auszählungsergebnisse sind auf einem geeigneten Formular zu dokumentieren.

## Einschränkungen

### A. Allgemeine Einschränkungen

FISH ist eine Technik, die eine spezielle Schulung in Bezug auf alle Aspekte des Verfahrens (einschließlich Auswahl geeigneter Reagenzien, Gewebe, Fixier- und Aufbereitungsmethoden sowie Vorbereitung der Objektträger) sowie in Bezug auf die Interpretation erfordert. Die Gewebefärbung setzt eine sachgemäße Vorbereitung, Fixierung und Infiltration des Gewebes voraus. Unsachgemäßes Fixieren, Gefrieren, Auftauen, Waschen, Trocknen, Erwärmen oder Schneiden oder Verunreinigung mit anderen Geweben oder Flüssigkeiten kann zu morphologischen Artefakten, Zerfall von Nukleinsäuren, Hintergrundfluoreszenz oder falsch negativen Ergebnissen führen. Uneinheitliche Ergebnisse können auf Variationen bei Fixierung oder Einbettmethoden oder auf inhärente Unregelmäßigkeiten innerhalb des Gewebes zurückzuführen sein (21). Auch übermäßige oder unvollständige Gegenfärbung kann eine korrekte Interpretation der Ergebnisse erschweren.

Eine unspezifische Färbung als Folge einer nicht gebundenen Sonde hat ein gestreutes, granuläres Aussehen und tritt an der erwarteten Hybridisierungsstelle oder entfernt davon auf. Verwenden Sie zur Interpretation der Färbeargebnisse intakte Zellen. Nekrotische oder degenerierte Zellen weisen oft eine unspezifische Färbung auf (22). Unerwartete FISH-Färbungen oder Färbearvariationen können das Ergebnis von Veränderungen der Expressionsgrade der codierenden Gene sein. Jede Veränderung der erwarteten Färbemuster sollte im Zusammenhang mit allen anderen diagnostischen Untersuchungen interpretiert werden. Die Interpretation der Färbungen sollte durch morphologische Untersuchungen und die Verwendung geeigneter Kontrollmaterialien ergänzt und im Kontext der klinischen Anamnese des Patienten sowie anderer diagnostischer Untersuchungen durch einen qualifizierten Pathologen beurteilt werden.

Der Assay (d. h. die Bewertung der Eignung der Kontrollmaterialien) und die Interpretation von Färbungen bzw. des Fehlens dieser Färbungen sind in einem entsprechend qualifizierten Labor unter der Leitung eines entsprechend qualifizierten und erfahrenen Pathologen durchzuführen, der für die Gesamtbeurteilung des *In-situ*-Hybridisierungs-Assays und seine Interpretation verantwortlich ist. Falsch positive Ergebnisse der FISH-Analyse können auf Kreuzreaktivität der Sonde auf andere Nukleinsäuresequenzen und/oder unspezifische Bindung zurückzuführen sein. Es müssen geeignete Kontrollen angewendet und dokumentiert werden, und bei den Tests sind alle relevanten Ablaufdaten zu beachten.

Technische und interpretationsbezogene Variationen können auch beobachtet werden, wenn FISH auf Zelllinien-Derivate angewendet wird (23).

### B. Produktspezifische Einschränkungen

Dieses Produkt ist nicht für den Einsatz bei anderen diagnostischen Assays auf DNA-Basis vorgesehen.

Ersetzen Sie die im Leica HER2 FISH System - 30 Test enthaltenen Reagenzien nicht durch andere Komponenten (von Leica Biosystems oder anderen Herstellern). Dadurch würde der Assay seine Aussagekraft verlieren. Der Anwender muss Abweichungen von den empfohlenen Verfahren selbst validieren.

Es wird empfohlen, für den Assay nur mit formalinhaltigen Fixiermitteln behandelte Gewebe zu verwenden. Durch Verwendung anderer Fixiermittel könnte der Assay seine Gültigkeit verlieren.

Mit Gewebepreparaten, deren Dicke außerhalb des empfohlenen Bereichs liegt, wurde das System nicht getestet. Durch die Verwendung von Schnitten anderer Dicke verliert der Assay möglicherweise seine Gültigkeit.

## Klinische Konkordanz zwischen Leica HER2 FISH System - 30 Test und Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Mamma

Bei dieser Studie wurde die Eignung des Leica HER2 FISH System - 30 Test als Hilfe bei der Entscheidung über eine Therapie mit Herceptin (trastuzumab) untersucht. Dabei sollte die Konkordanz zwischen dem Leica HER2 FISH System - 30 Test und einem bereits zugelassenen Diagnostikum, dem Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, das bei Brustgewebe als 'Goldstandard' für diesen Assay gilt. Das Akzeptanzkriterium für den Test bestand darin, dass die Untergrenze des einseitigen 95%-Konfidenzintervalls zwischen dem Leica HER2 FISH System - 30 Test und dem manuellen Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, zwischen positiven (amplifizierten) und negativen (nicht amplifizierten) formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten (FFPE) Fällen von invasivem Brustkrebs über 90 % liegt.

Die Studie wurde als Blind-Evaluierung klinischer invasiver Brustkrebsproben an drei Standorten durchgeführt. An jedem der Untersuchungsstandorte wurden archivierte, formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Gewebeproben aus invasivem Brustkrebs mit bekannten Expressionsgraden des Onkoproteins HER2 bereitgestellt. Eine Kohorte von 300 Proben, die 75 zuvor als 0/1+ eingestufte IHC-Fälle, 150 zuvor als 2+ eingestufte IHC-Fälle und 75 zuvor als 3+ eingestufte IHC-Fälle umfasste, wurde ausgewählt und gleichmäßig auf die drei Untersuchungsstandorte verteilt.

Alle Fälle wurden nach den Angaben des Herstellers auf der Packungsbeilage manuell mit Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit Assay gefärbt. Aufeinanderfolgende Schnitte von den einzelnen Fällen wurden dann mit dem Leica HER2 FISH System - 30 Test auf einem BOND System gefärbt.

Alle gefärbten Objektträger wurden verblindet und an jedem der drei Standorte von jeweils einem geschulten Beobachter auf Zufallsbasis (randomisiert) eingestuft. Die Ergebnisse wurden bei einem errechneten HER2/CEP17-Genverhältnis kleiner 2,0 als negativ und bei einem errechneten HER2/CEP17-Genverhältnis  $\geq 2,0$  als positiv interpretiert. Anschließend wurden die Daten auf Konkordanz sowie Übereinstimmung der positiven und negativen Färbung analysiert.

### 2x2-Konkordanzergebnisse BOND-MAX System - Mamma

Die Daten wurden bei einer 2x2-Analyse als negativ ( $< 2,00$ ) oder positiv ( $\geq 2,00$ ) gruppiert. Dabei zeigte die beobachtete Übereinstimmung zwischen den beiden Tests in einer 2x2-Analyse für 300 Proben eine Konkordanz von 99,33 % (298/300) mit einem 95 %-KI von 97,61–99,92 % für das BOND-MAX System.

Der Anteil der positiven Übereinstimmungen (Sensibilität) bzw. die Fähigkeit des Leica HER2 FISH System - 30 Test, die mithilfe des Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit als positiv klassifizierten Fälle korrekt zu erkennen (das heißt, der Anteil der Proben, die sowohl vom Leica HER2 FISH System - 30 Test als auch vom manuellen Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit als positiv erkannt wurden, an der Gesamtzahl der mithilfe von Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit als positiv klassifizierten Fälle), betrug 99,03 % (102/103).

Der Anteil der negativen Übereinstimmungen (Spezifität) bzw. die Fähigkeit des Tests, die mithilfe von Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit als negativ klassifizierten Fälle korrekt zu erkennen (das heißt, der Anteil der Proben, die sowohl vom Leica HER2 FISH System - 30 Test als auch von Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit als negativ erkannt wurden, an der Gesamtzahl der mithilfe von Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit als negativ klassifizierten Fälle), betrug 99,49 % (196/197). Siehe Tabelle 4.



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

Gesamtkonkordanz (95 %-KI) = 99,33 % (97,61 – 99,92 %)

Tabelle 4. 2x2-Konkordanz von Leica HER2 FISH System - 30 Test auf dem BOND-MAX System mit Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit an Mammagewebe.

## 2x2-Konkordanzergebnisse BOND-III System - Mamma

Die Daten wurden bei einer 2x2-Analyse als negativ (<2,00) oder positiv (≥2,00) gruppiert. Dabei zeigte die beobachtete Übereinstimmung zwischen den beiden Tests in einer 2x2-Analyse für 300 Proben eine Konkordanz von 99,67 % (299/300) mit einem 95 %-KI von 98,16–99,99 % für das BOND-III System.

Der Anteil der positiven Übereinstimmungen (Sensibilität) bzw. die Fähigkeit des Leica HER2 FISH System - 30 Test, die mithilfe des Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit als positiv klassifizierten Fälle korrekt zu erkennen (das heißt, der Anteil der Proben, die sowohl vom Leica HER2 FISH System - 30 Test als auch vom manuellen Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit als positiv erkannt wurden, an der Gesamtzahl der mithilfe von Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit als positiv klassifizierten Fälle), betrug 99,03 % (102/103).

Der Anteil der negativen Übereinstimmungen (Spezifität) bzw. die Fähigkeit des Tests, die mithilfe von Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit als negativ klassifizierten Fälle korrekt zu erkennen (das heißt, der Anteil der Proben, die sowohl vom Leica HER2 FISH System - 30 Test als auch von Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit als negativ erkannt wurden, an der Gesamtzahl der mithilfe von Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit als negativ klassifizierten Fälle), betrug 100 % (197/197). Siehe Tabelle 5.

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

Gesamtkonkordanz (95 %-KI) = 99,67 % (98,16 – 99,99 %)

Tabelle 5. 2x2-Konkordanz von Leica HER2 FISH System - 30 Test auf dem BOND-III System mit Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit an Mammagewebe.

Somit zeigen die bei dieser Studie generierten Daten, dass das Leica HER2 FISH System - 30 Test aufgrund seiner hohen Konkordanz mit dem Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, einem bereits für diese Indikation zugelassenen diagnostischen Test, als Hilfe bei der Beurteilung der Eignung von Patienten für eine Therapie mit Herceptin (trastuzumab) eingesetzt werden kann.

# Klinische Konkordanz zwischen Leica HER2 FISH System - 30 Test und Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Magen

Bei dieser Studie wurde die Eignung des Leica HER2 FISH System - 30 Test als Hilfe bei der Entscheidung über eine Therapie mit Herceptin (trastuzumab) untersucht. Dabei sollte die Konkordanz zwischen dem Leica HER2 FISH System -30 Test und einem bereits zugelassenen Diagnostikum, dem Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, das als 'Goldstandard' für diesen Assay bei Magengewebe gilt, ermittelt werden. Das Akzeptanzkriterium für den Test bestand darin, dass die Untergrenze des einseitigen 95%-Konfidenzintervalls zwischen dem Leica HER2 FISH System - 30 Test und dem manuellen Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, zwischen positiven (amplifizierten) und negativen (nicht amplifizierten) formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten (FFPE) Magenadenokarzinomen (einschließlich gastroösophagealer Übergangszone) über 90 % liegt.

Die Studie wurde als Evaluierung klinischer invasiver Magenadenokarzinompräparate durchgeführt. Die Tests wurden mit archivierten, formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Magenadenokarzinom-Gewebeblöcken mit bekanntem HER2-Genexpressionsniveau durchgeführt. Eine Kohorte von 109 Proben, die 50 amplifizierte und 59 nicht amplifizierte Fälle umfasste, wurde ausgewählt.

Alle Fälle wurden nach den Angaben des Herstellers auf der Packungsbeilage manuell mit Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit Assay gefärbt. Aufeinanderfolgende Schnitte von den einzelnen Fällen wurden dann mit dem Leica HER2 FISH System - 30 Test auf dem BOND-MAX System gefärbt.

Alle gefärbten Objektträger wurden von einem einzelnen geschulten Beobachter auf Zufallsbasis (randomisiert) eingestuft. Die Ergebnisse wurden bei einem errechneten HER2/CEP17-Genverhältnis kleiner 2,0 als negativ und bei einem errechneten HER2/CEP17-Genverhältnis  $\geq 2,0$  als positiv interpretiert. Anschließend wurden die Daten auf Konkordanz sowie Übereinstimmung der positiven und negativen Färbung analysiert.

## 2x2 Konkordanzergebnisse BOND-MAX System - Magen

Die Daten wurden bei einer 2x2-Analyse als negativ ( $< 2,00$ ) oder positiv ( $\geq 2,00$ ) gruppiert. Dabei zeigte die beobachtete Übereinstimmung zwischen den beiden Tests in einer 2x2-Analyse für 109 Proben eine Konkordanz von 98,17 % (107/109) mit einem 95%-KI von 93,53–99,78% für das BOND-MAX System.

Der Anteil der positiven Übereinstimmungen (Sensibilität) bzw. die Fähigkeit des Leica HER2 FISH System - 30 Test, die mithilfe des Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit als positiv klassifizierten Fälle korrekt zu erkennen (das heißt, der Anteil der Proben, die sowohl vom Leica HER2 FISH System - 30 Test als auch vom manuellen Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit als positiv erkannt wurden, an der Gesamtzahl der mithilfe von Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit als positiv klassifizierten Fälle), betrug 96,00 % (48/50).

Der Anteil der negativen Übereinstimmungen (Spezifität) bzw. die Fähigkeit des Tests, die mithilfe von Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit als negativ klassifizierten Fälle korrekt zu erkennen (das heißt, der Anteil der Proben, die sowohl vom Leica HER2 FISH System - 30 Test als auch von Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit als negativ erkannt wurden, an der Gesamtzahl der mithilfe von Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit als negativ klassifizierten Fälle), betrug 100 % (59/59). Siehe Tabelle 6.

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

Gesamtkonkordanz (95%-KI) = 98,17 % (93,53 –99,78 %)

Tabelle 6. 2x2-Konkordanz von Leica HER2 FISH System - 30 Test auf dem BOND-MAX System mit Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit an Magengewebe.

## Präzisionstests – BOND-MAX System

### A. Studie zur Präzision innerhalb eines Laufs

Die Studie zur Präzision innerhalb eines Laufs wurde als randomisierte Blindstudie durchgeführt. Der Test des Leica HER2 FISH System - 30 Test auf Präzision innerhalb eines Laufs wurde an einem einzigen Untersuchungsstandort anhand von 540 zuvor in Bezug auf HER2 eingestuftem TMA-Proben durchgeführt, die formalinfixiertes, in Paraffin eingebettetes Brustkrebsgewebe enthielten. Aufgrund der Verwendung von TMAs zur Bestimmung der Präzision innerhalb eines Laufs stand bei einem einzelnen Lauf auf einem einzelnen Gerät eine größere Zahl von Fällen mit einem breiteren Spektrum von HER2-Expressionsgraden zur Verfügung.

Bei der Auszählung der gefärbten Objektträger im Rahmen der Studie zur Präzision innerhalb eines Laufs zeigten 532 von 540 beurteilten Fällen ein konkordantes Ergebnis, was zu einer Gesamtkonkordanz von 98,52 % mit einem unteren 95 %-KI von 97,10 % führte.

### B. Studie zur Präzision innerhalb eines Geräts

Die Studie zur Präzision innerhalb eines Geräts wurde als randomisierte Blindstudie durchgeführt. Der Test des Leica HER2 FISH System - 30 Test auf Präzision innerhalb eines Geräts wurde an einem einzigen Untersuchungsstandort anhand von 1620 zuvor in Bezug auf HER2 eingestuftem TMA-Proben durchgeführt, die formalinfixiertes, in Paraffin eingebettetes Brustkrebsgewebe enthielten. Aufgrund der Verwendung von TMAs zur Bestimmung der Präzision innerhalb eines Geräts stand bei mehreren Läufen auf einem einzelnen Gerät eine größere Zahl von Fällen mit einem breiteren Spektrum von HER2-Expressionsgraden zur Verfügung.

Bei der Auszählung der gefärbten Objektträger im Rahmen der Studie zur Präzision innerhalb eines Geräts zeigten 1620 von 1620 beurteilten Fällen ein konkordantes Ergebnis, was zu einer Gesamtkonkordanz von 100 % mit einem unteren 95 %-KI von 99,82 % führte.

### C. Studie zur Präzision zwischen verschiedenen Läufen

Die Studie zur Präzision zwischen verschiedenen Läufen wurde als randomisierte Blindstudie durchgeführt. Der Test des Leica HER2 FISH System - 30 Test auf Präzision zwischen verschiedenen Läufen wurde an einem einzigen Untersuchungsstandort anhand von 900 zuvor in Bezug auf HER2 eingestuftem TMA-Proben durchgeführt, die formalinfixiertes, in Paraffin eingebettetes Brustkrebsgewebe enthielten. Aufgrund der Verwendung von TMAs zur Bestimmung der Präzision zwischen verschiedenen Läufen stand bei mehreren Läufen an verschiedenen Tagen eine größere Zahl von Fällen mit einem breiteren Spektrum von HER2-Expressionsgraden zur Verfügung.

Bei der Auszählung der gefärbten Objektträger im Rahmen der Studie zur Präzision zwischen verschiedenen Läufen zeigten 894 von 900 beurteilten Fällen ein konkordantes Ergebnis, was zu einer Gesamtkonkordanz von 99,33 % mit einem unteren 95 %-KI von 98,55 % führte.

### D. Studie zur Präzision zwischen verschiedenen Laboren

Die Studie zur Präzision zwischen verschiedenen Laboren wurde als randomisierte Blindstudie durchgeführt. Der Test des Leica HER2 FISH System - 30 Test auf Präzision zwischen verschiedenen Laboren wurde an drei Untersuchungsstandorten anhand von 513 zuvor in Bezug auf HER2 eingestuftem TMA-Proben durchgeführt, die formalinfixiertes, in Paraffin eingebettetes Brustkrebsgewebe enthielten. Aufgrund der Verwendung von TMAs zur Bestimmung der Präzision zwischen verschiedenen Laboren stand bei mehreren Läufen auf verschiedenen Geräten eine größere Zahl von Fällen mit einem breiteren Spektrum von HER2-Expressionsgraden zur Verfügung.

Bei der Auszählung der gefärbten Objektträger im Rahmen der Studie zur Präzision zwischen verschiedenen Laboren zeigten 510 von 513 beurteilten Fällen ein konkordantes Ergebnis, was zu einer Gesamtkonkordanz von 99,42 % mit einem unteren 95 %-KI von 98,30 % führte.

## E. Studie zur Präzision zwischen verschiedenen Beobachtern

Die Studie zur Präzision zwischen verschiedenen Beobachtern wurde als randomisierte Blindstudie durchgeführt. Die Tests auf beobachterübergreifende Reproduzierbarkeit der mit dem Leica HER2 FISH System - 30 Test erzielten Ergebnisse wurden an drei Untersuchungsstandorten durchgeführt. An jedem der drei Standorte wurde ein einziger erfahrener Beobachter eingesetzt. Für den Test auf beobachterübergreifende Präzision wurden achtzehn ganze Brustkrebschnitte verwendet, was den im klinischen Kontext verwendeten Probentypen entsprach.

Bei der Auszählung der gefärbten Objektträger im Rahmen der Studie zur Präzision zwischen verschiedenen Beobachtern zeigten 53 von 54 beurteilten Fällen ein konkordantes Ergebnis, was zu einer Gesamtkonkordanz von 98,15 % mit einem unteren 95 %-KI von 90,11 % führte.

## F. Studie zur Präzision zwischen verschiedenen Chargen

Die Studie zur Präzision zwischen verschiedenen Chargen wurde als randomisierte Blindstudie durchgeführt. Die Präzision zwischen verschiedenen Chargen wurde anhand von drei unabhängig voneinander, nach bewährten Herstellungsmethoden produzierten Chargen des Leica HER2 FISH System - 30 Test ermittelt. Jede Charge wurde an einem einzigen Untersuchungsstandort anhand von 540 zuvor in Bezug auf HER2 eingestuften TMA-Proben getestet, die formalinfixiertes, in Paraffin eingebettetes Brustkrebsgewebe enthielten. Aufgrund der Verwendung von TMAs zur Ermittlung der chargenübergreifenden Reproduzierbarkeit stand bei den Tests an verschiedenen Chargen eine größere Zahl von Fällen mit einem breiteren Spektrum von HER2-Expressionsgraden zur Verfügung.

Bei der Auszählung der gefärbten Objektträger im Rahmen der Studie zur Präzision zwischen verschiedenen Chargen zeigten 534 von 540 beurteilten Fällen ein konkordantes Ergebnis, was zu einer Gesamtkonkordanz von 98,89 % mit einem unteren 95 %-KI von 97,60 % führte.

## Präzisionstests – BOND-III System

### G. Studie zur Präzision innerhalb eines Laufs

Die Studie zur Präzision innerhalb eines Laufs wurde als randomisierte Blindstudie durchgeführt. Der Test des Leica HER2 FISH System - 30 Test auf Präzision innerhalb eines Laufs wurde an einem einzigen Untersuchungsstandort anhand von 540 zuvor in Bezug auf HER2 eingestuften TMA-Proben durchgeführt, die formalinfixiertes, in Paraffin eingebettetes Brustkrebsgewebe enthielten. Aufgrund der Verwendung von TMAs zur Bestimmung der Präzision innerhalb eines Laufs stand bei einem einzelnen Lauf auf einem einzelnen Gerät eine größere Zahl von Fällen mit einem breiteren Spektrum von HER2-Expressionsgraden zur Verfügung.

Bei der Auszählung der gefärbten Objektträger im Rahmen der Studie zur Präzision innerhalb eines Laufs zeigten 540 von 540 beurteilten Fällen ein konkordantes Ergebnis, was zu einer Gesamtkonkordanz von 100 % mit einem unteren 95 %-KI von 99,45 % führte.

### H. Studie zur Präzision innerhalb eines Geräts

Die Studie zur Präzision innerhalb eines Geräts wurde als randomisierte Blindstudie durchgeführt. Der Test des Leica HER2 FISH System - 30 Test auf Präzision innerhalb eines Geräts wurde an einem einzigen Untersuchungsstandort anhand von 1620 zuvor in Bezug auf HER2 eingestuften TMA-Proben durchgeführt, die formalinfixiertes, in Paraffin eingebettetes Brustkrebsgewebe enthielten. Aufgrund der Verwendung von TMAs zur Bestimmung der Präzision innerhalb eines Geräts stand bei mehreren Läufen auf einem einzelnen Gerät eine größere Zahl von Fällen mit einem breiteren Spektrum von HER2-Expressionsgraden zur Verfügung.

Bei der Auszählung der gefärbten Objektträger im Rahmen der Studie zur Präzision innerhalb eines Laufs zeigten 1620 von 1620 beurteilten Fällen ein konkordantes Ergebnis, was zu einer Gesamtkonkordanz von 100 % mit einem unteren 95 %-KI von 99,82 % führte.

## I. Studie zur Präzision zwischen verschiedenen Läufen

Die Studie zur Präzision zwischen verschiedenen Läufen wurde als randomisierte Blindstudie durchgeführt. Der Test des Leica HER2 FISH System - 30 Test auf Präzision zwischen verschiedenen Läufen wurde an einem einzigen Untersuchungsstandort anhand von 900 zuvor in Bezug auf HER2 eingestuftes TMA-Proben durchgeführt, die formalinfixiertes, in Paraffin eingebettetes Brustkrebsgewebe enthielten. Aufgrund der Verwendung von TMAs zur Bestimmung der Präzision zwischen verschiedenen Läufen stand bei mehreren Läufen an verschiedenen Tagen eine größere Zahl von Fällen mit einem breiteren Spektrum von HER2-Expressionsgraden zur Verfügung.

Bei der Auszählung der gefärbten Objektträger im Rahmen der Studie zur Präzision zwischen verschiedenen Läufen zeigten 891 von 900 beurteilten Fällen ein konkordantes Ergebnis, was zu einer Gesamtkonkordanz von 99,00 % mit einem unteren 95 %-KI von 98,11 % führte.

## J. Studie zur Präzision zwischen verschiedenen Laboren

Die Studie zur Präzision zwischen verschiedenen Laboren wurde als randomisierte Blindstudie durchgeführt. Der Test des Leica HER2 FISH System - 30 Test auf Präzision zwischen verschiedenen Laboren wurde an drei Untersuchungsstandorten anhand von 513 zuvor in Bezug auf HER2 eingestuftes TMA-Proben durchgeführt, die formalinfixiertes, in Paraffin eingebettetes Brustkrebsgewebe enthielten. Aufgrund der Verwendung von TMAs zur Bestimmung der Präzision zwischen verschiedenen Laboren stand bei mehreren Läufen auf verschiedenen Geräten eine größere Zahl von Fällen mit einem breiteren Spektrum von HER2-Expressionsgraden zur Verfügung.

Bei der Auszählung der gefärbten Objektträger im Rahmen der Studie zur Präzision zwischen verschiedenen Laboren zeigten 511 von 513 beurteilten Fällen ein konkordantes Ergebnis, was zu einer Gesamtkonkordanz von 99,61 % mit einem unteren 95 %-KI von 98,60 % führte.

## K. Studie zur Präzision zwischen verschiedenen Beobachtern

Die Studie zur Präzision zwischen verschiedenen Beobachtern wurde als randomisierte Blindstudie durchgeführt. Die Tests auf beobachterübergreifende Reproduzierbarkeit der mit dem Leica HER2 FISH System - 30 Test erzielten Ergebnisse wurden an drei Untersuchungsstandorten durchgeführt. An jedem der drei Standorte wurde ein einziger erfahrener Beobachter eingesetzt. Für den Test auf beobachterübergreifende Präzision wurden achtzehn ganze Brustkrebschnitte verwendet, was den im klinischen Kontext verwendeten Probentypen entsprach.

Bei der Auszählung der gefärbten Objektträger im Rahmen der Studie zur Präzision zwischen verschiedenen Beobachtern zeigten 53 von 54 beurteilten Fällen ein konkordantes Ergebnis, was zu einer Gesamtkonkordanz von 98,15 % mit einem unteren 95 %-KI von 90,11 % führte.

## L. Studie zur Präzision zwischen verschiedenen Chargen

Die Studie zur Präzision zwischen verschiedenen Chargen wurde als randomisierte Blindstudie durchgeführt. Die Präzision zwischen verschiedenen Chargen wurde anhand von drei unabhängig voneinander, nach bewährten Herstellungsmethoden produzierten Chargen des Leica HER2 FISH System - 30 Test ermittelt. Jede Charge wurde an einem einzigen Untersuchungsstandort anhand von 540 zuvor in Bezug auf HER2 eingestuftes TMA-Proben getestet, die formalinfixiertes, in Paraffin eingebettetes Brustkrebsgewebe enthielten. Aufgrund der Verwendung von TMAs zur Ermittlung der chargenübergreifenden Reproduzierbarkeit stand bei den Tests an verschiedenen Chargen eine größere Zahl von Fällen mit einem breiteren Spektrum von HER2-Expressionsgraden zur Verfügung.

Bei der Auszählung der gefärbten Objektträger im Rahmen der Studie zur Präzision zwischen verschiedenen Chargen zeigten 540 von 540 beurteilten Fällen ein konkordantes Ergebnis, was zu einer Gesamtkonkordanz von 100 % mit einem unteren 95 %-KI von 99,45 % führte.

## Zuverlässigkeit des Assays

Es wurden Zuverlässigkeitsstudien mit dem BOND-MAX and BOND-III System durchgeführt, um den Toleranzbereich des Assays in Bezug auf Hitzedemaskierungsdauer und -temperatur; Enzymdemaskierungsdauer, -temperatur und -konzentration; Denaturierungsdauer und -temperatur; Hybridisierungsdauer und -temperatur sowie Dauer und Temperatur des stringenten Waschens zu ermitteln. Zuverlässigkeitsstudien unter Verwendung des Standardprotokolls für das BOND-MAX and BOND-III System wurden auch außerhalb der in der FDA/ORR-Richtlinie ORR LAB5.3 Rev1.7 in Bezug auf Temperatur und Feuchtigkeit definierten Grenzwerte durchgeführt.

- Keine Änderung des Amplifikationsstatus war bei Erhöhung oder Senkung der Standardtemperatur in den einzelnen wärmeabhängigen Schritten um 4 °C gegenüber dem Standardprotokoll des Leica HER2 FISH System - 30 Test zu beobachten. Die höchsten Qualitätswerte wurden bei den Standardtemperaturen erzielt, und diese Temperaturen werden empfohlen.
- Keine Änderung des Amplifikationsstatus gegenüber dem Standardprotokoll des Leica HER2 FISH System - 30 Test wurde beobachtet, wenn wärmeinduzierte Epitopdemaskierung (HIER) 20 Minuten und 30 Minuten bei 97 °C mit BOND ER1 Lösung durchgeführt wurde. Die höchsten Qualitätswerte wurden bei der Standarddauer von 25 Minuten erzielt, und diese Inkubationsdauer wird empfohlen.
- Keine Änderung des Amplifikationsstatus gegenüber dem Standardprotokoll des Leica HER2 FISH System - 30 Test wurde beobachtet, wenn enzyminduzierte Epitopdemaskierung (EIER) 15 Minuten und 35 Minuten bei 37 °C durchgeführt wurde. Die höchsten Qualitätswerte wurden bei der Standarddauer von 25 Minuten erzielt, und diese Inkubationsdauer wird empfohlen.
- Keine Änderung des Amplifikationsstatus wurde beobachtet, wenn die enzyminduzierte Epitopdemaskierung (EIER) mit einem Verdünnungsverhältnis (Enzymkonzentrat zu Verdünnungsmittel) von 1:200 und 1:500 mit dem Standardprotokoll Leica HER2 FISH System - 30 Test protocol durchgeführt wurde. Die höchsten Qualitätswerte wurden bei der Standardkonzentration von 1:300 erzielt, und dieses Verdünnungsverhältnis wird empfohlen.
- Keine Änderung des Amplifikationsstatus gegenüber dem Standardprotokoll des Leica HER2 FISH System - 30 Test wurde beobachtet, wenn mit einer Denaturierungsdauer von 5 Minuten und 15 Minuten gearbeitet wurde. Die höchsten Qualitätswerte wurden bei der Standarddauer von 10 Minuten erzielt, und diese Denaturierungsdauer wird empfohlen.
- Keine Änderung des Amplifikationsstatus gegenüber dem Standardprotokoll des Leica HER2 FISH System - 30 Test wurde beobachtet, wenn mit einer Hybridisierungsdauer von 9 Stunden und 15 Stunden gearbeitet wurde. Die höchsten Qualitätswerte wurden bei der Standarddauer von 12 Stunden erzielt, und diese Hybridisierungsdauer wird empfohlen.
- Keine Änderung des Amplifikationsstatus gegenüber dem Standardprotokoll des Leica HER2 FISH System - 30 Test wurde beobachtet, wenn mit einer Waschdauer nach der Hybridisierung von 2, 5 und 7 Minuten gearbeitet wurde. Die höchsten Qualitätswerte wurden bei der Standardwaschdauer von 4 Minuten erzielt, und diese Waschdauer nach der Hybridisierung wird empfohlen.
- Keine Änderung des Amplifikationsstatus gegenüber dem Standardprotokoll des Leica HER2 FISH System - 30 Test bei Umgebungsbedingungen wurde beobachtet, wenn das Leica HER2 FISH System - 30 Test bei 28 °C und 30 % relativer Luftfeuchtigkeit sowie bei 16 °C und 80 % relativer Luftfeuchtigkeit angewendet wurde.

Assay-Bedingungen außerhalb der bei den Zuverlässigkeitsstudien ermittelten empfohlenen Parameter wurden nicht validiert. Durch die Verwendung anderer Testparameter verliert der Assay möglicherweise seine Gültigkeit.

Im vorausgehenden Text werden die Testbedingungen sowie die Ergebnisse der Studie beschrieben. Dabei ist zu beachten, dass nicht alle möglichen Konstellationen von Leica getestet wurden und dass nicht empfohlen wird, bei allen Bedingungen von den Standardwerten abzuweichen. Das Standardprotokoll Leica HER2 FISH Staining Protocol ist in Tabelle 2 dargestellt.

## Fehlerbehebung

Problem	Wahrscheinliche Ursache	Fehlerbehebungsmaßnahme
Kein(e) oder schwache(s) Fluoreszenzsignal/ Färbung	Unzureichende Fixierung oder Infiltration der Testprobe	Stellen Sie sicher, dass ein Fixiermittel auf Formalinbasis verwendet wird und dass die Verarbeitungsabläufe für die zu testende Probe geeignet sind.
	Das Leica HER2 FISH System-30 Test wird nach Ablauf des Verfallsdatums verwendet.	Es ist darauf zu achten, dass das Verfallsdatum des verwendeten Leica HER2 FISH System - 30 Test nicht überschritten wird.
	Falsche Protokollauswahl	Stellen Sie sicher, dass im Färbeprotokollfeld des Dialogs "OT hinzufügen" der Standardwert *FISH Protocol A ausgewählt ist.
	Abgabe ungeeigneter Vorratsreagenzien	Stellen Sie sicher, dass alle BOND-Reagenzien den richtigen Vorratsbehältern zugeordnet und an den richtigen Positionen in das Gerät eingesetzt wurden.
	Unzureichende Entparaffinierung von Objektträgern	Stellen Sie sicher, dass der Modus *Dewax im Feld "Preparation" des Dialogs "OT hinzufügen" ausgewählt ist.
	Unzureichende Vorbehandlung	Stellen Sie sicher, dass die Standardvorbehandlungsprotokolle (HIER und Enzymatic Digestion) ausgewählt sind. Ggf. ist das Vorbehandlungsprotokoll (HIER oder Enzymatic Digestion) anzupassen.
	Unzureichende Denaturierung	Stellen Sie sicher, dass eine geeignete Standarddenaturierung *D10 ausgewählt ist.
	Unzureichende Hybridisierung	Stellen Sie sicher, dass eine geeignete Standardhybridisierung *H12 ausgewählt ist. Ggf. ist die Hybridisierungsdauer zu erhöhen.
	Zu langes Waschen nach der Hybridisierung	Waschdauer nach der Hybridisierung verringern.
	Färbelauf vor dem Abschluss abgebrochen	Prüfen Sie mithilfe der BOND Software, ob während des Färbelaufs Fehler gemeldet wurden, und beheben Sie sie nach den von der BOND Software ausgegebenen Anweisungen.
	Ungeeignetes Fluoreszenzmikroskopzubehör <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ungeeigneter Filtersatz</li> <li>• Falsche Lampe</li> <li>• Schwache Lampe</li> <li>• Falscher Öltyp</li> </ul>	Stellen Sie sicher, dass für den durchzuführenden Assay geeignetes Fluoreszenzmikroskopzubehör verwendet wird: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Geeigneter Filtersatz</li> <li>• Geeignete Lampe</li> <li>• Lampe mit ausreichender Leuchtstärke</li> <li>• Für Ölimmersionsmikroskopie geeignetes Öl</li> </ul>
Zu starke Einwirkung von UV-Licht (Photobleichung)	Bewahren Sie die Objektträger zum Erhalt der Fluoreszenzsignale vor und nach der Auswertung im Dunkeln auf. Zum langfristigen Signalerhalt empfiehlt sich eine Lagerung bei -20 °C.	

Problem	Wahrscheinliche Ursache	Fehlerbehebungsmaßnahme
Unspezifische(s) Hintergrundfluoreszenzsignal/-färbung	Unzureichendes Waschen nach der Hybridisierung	Waschdauer nach der Hybridisierung erhöhen.
	Abgabe ungeeigneter Vorratsreagenzien	Stellen Sie sicher, dass alle BOND Reagenzien den richtigen Vorratsbehältern zugeordnet und an den richtigen Positionen in das Gerät eingesetzt wurden.
	Unzureichende Entparaffinierung von Objektträgern	Stellen Sie sicher, dass der Modus Dewax im Feld "Preparation" des Dialogs "OT hinzufügen" ausgewählt ist.
	Unspezifische Kreuzreaktion mit nekrotischen Gewebebereichen	Stellen Sie sicher, dass ein Fixiermittel auf Formalinbasis verwendet wird und dass die Verarbeitungsabläufe für die zu testende Probe geeignet sind. Testen Sie den Fall nach Möglichkeit mit einem anderen Block erneut. Falls dies nicht möglich ist, werten Sie die Bereiche mit den besten Fixierungsmustern mit einem entsprechenden mit H&E gefärbten Schnitt aus.
	Schnitte haften bei Verwendung alternativer Klebemittel an den Objektträgern	Verwenden Sie BOND Plus Slides (S21.2113).
Schlechter Erhalt der Gewebemorphologie	Unzureichende Gewebefixierung und -infiltration	Stellen Sie sicher, dass ein Fixiermittel auf Formalinbasis verwendet wird und dass die Verarbeitungsabläufe für die zu testende Probe geeignet sind. Testen Sie den Fall nach Möglichkeit mit einem anderen Block erneut. Falls dies nicht möglich ist, werten Sie die Bereiche mit den besten Fixierungsmustern mit einem entsprechenden mit H&E gefärbten Schnitt aus.
	Unzureichende Vorbehandlung	Vorbehandlungsprotokoll anpassen (HIER oder Enzymatic Digestion).
Gewebe hat sich von Patienten-/ Kontrollobjektträger(n) gelöst	Verwendung des falschen Objektträgertyps oder unzureichende Drainage	Stellen Sie sicher, dass für Patienten-/ Kontrollschnitte die richtigen Objektträger verwendet werden (z. B. BOND Plus Slides S21.2113). Stellen Sie sicher, dass die Objektträger ausreichend entwässert und 1 Stunde bei 60 °C inkubiert werden.

Tabelle 7: Fehlerbehebungshinweise zum Leica HER2 FISH System - 30 Test

Falls bei Verwendung des Leica HER2 FISH System - 30 Test Probleme auftreten, die nicht durch die Fehlerbehebungshinweise abgedeckt sind, wenden Sie sich bitte an den Kundendienst von Leica Biosystems oder an Ihren Fachhändler.



## Quellen

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

## Lizenzvereinbarung

Dieses Produkt enthält von Abbott Molecular Inc gelieferte PathVysion FISH-Sonden.

PathVysion, LSI und CEP sind Marken von Abbott Molecular Inc. Alle Rechte vorbehalten. Unter Lizenz verwendet.









## Änderungen gegenüber der vorherigen Ausgabe

Magendaten hinzugefügt.

## Ausgabedatum

24 Juli 2015

## Symbolidentifizierung

	Chargenbezeichnung		Lagerung		Katalognummer
	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum		Hersteller	<b>SN</b>	Seriennummer
	Gebrauchsanleitung beachten		Ausreichend für <n> Tests		Verwendbar bis JJJJ-MM-TT

Herceptin ist eine Marke von Genentech, Inc. und F. Hoffmann-La Roche Ltd.