

Mode d'emploi du Leica HER2 FISH System - 30 Test

Destiné au système Leica Biosystems' BOND-MAX and BOND-III.

TA9217 est un produit d'hybridation fluorescente *in situ* qui est prévu pour la coloration de 30 tests (30 lames colorées avec 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
Ply Ltd
495 Blackburn Road
Mt Waverly VIC 3149
Australia
☎ +61 2 8870 3500

Table des matières

Utilisation conforme de l'instrument	3
Utilisation du diagnostic <i>in vitro</i>	3
Formation requise	3
Résumé et explications	3
Fond	3
Résumé de la concordance clinique BOND-MAX System	4
Résumé de la concordance clinique BOND-III System	5
Principe de la procédure	5
Composants fournis	5
Instructions d'utilisation	5
Stockage et stabilité	5
Préparation des échantillons	5
Avertissements et précautions	6
Procédure	6
A. Réactifs requis mais non fournis	6
B. Équipement requis mais non fourni	7
C. Méthodologie	7
D. Prétraitement enzymatique BOND	7
E. Protocole de coloration par défaut	8
F. Étapes de la procédure	8
G. Stockage des lames	9
Évaluation des signaux et énumération	10
Méthode recommandée pour la détermination du rapport LSI HER2/CEP17	11
Guide d'interprétation du Leica HER2 FISH System - 30 Test	12
Feuille de notation du Leica HER2 FISH System - 30 Test	13
Contrôle de qualité	14
Utilisation des lames de contrôle	14
Restrictions	15
A. Restrictions générales	15
B. Restrictions spécifiques au produit	15
Concordance clinique du Leica HER2 FISH System - 30 Test avec Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Mammaire	15
Résultats de la concordance 2x2 du BOND-MAX System - Mammaire	16
Résultats de la concordance 2x2 du BOND-III System - Mammaire	17
Concordance clinique du Leica HER2 FISH System - 30 Test avec l'Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Gastrique	18
Résultats de la concordance 2x2 du BOND-MAX System - Gastrique	18
Test de précision – BOND-MAX System	19
A. Test de précision au sein des processus	19
B. Test de précision concernant un instrument	19
C. Test de précision inter-processus	19
D. Test de précision inter-laboratoire	19
E. Test de précision inter-observateur	20
F. Test de précision lot à lot	20
Test de précision – BOND-III System	20
G. Test de précision au sein des processus	20
H. Test de précision concernant un instrument	20
I. Test de précision inter-processus	21
J. Test de précision inter-laboratoire	21
K. Test de précision inter-observateur	21
L. Test de précision lot à lot	21
Robustesse du test	21
Dépannage	23
Références	25
Accord de licence	26
Modifications apportées à l'édition précédente	26
Date de publication	26
Identification des symboles	26

Utilisation conforme de l'instrument

Utilisation du diagnostic *in vitro*

Le Leica HER2 FISH System - 30 Test est conçu pour la détection de l'amplification du gène HER2/neu par hybridation fluorescente *in situ* (FISH) dans des échantillons tissulaires cancer du sein humain enrobé de paraffine et adénocarcinomes de l'estomac (jonction gastro-œsophagienne incluse). Le Leica HER2 FISH System - 30 Test est indiqué comme aide à l'évaluation des patients pour lesquels le traitement Herceptin® (trastuzumab) est envisagé (voir la notice du médicament Herceptin). Le Leica HER2 FISH System - 30 Test n'est pas prévu pour le dépistage ou le diagnostic du cancer du sein. Toutes les autres informations cliniques disponibles doivent également être prises en considération, comme la taille de la tumeur, le nombre de ganglions lymphatiques atteints et le statut des récepteurs stéroïdiens. Aucune décision thérapeutique pour les patients atteints d'un cancer du sein ne doit être basée seulement sur le statut de l'amplification génique HER2.

Remarque : tous les patients soumis aux essais cliniques à l'Herceptin ont été sélectionnés via un essai clinique de recherche immunocytochimique (CTA). Aucun des patients de ces essais n'a été sélectionné au moyen du Leica HER2 FISH System - 30 Test. La comparaison du Leica HER2 FISH System - 30 Test avec le test Abbott Molecular PathVysion® HER-2 DNA Probe Kit à partir d'une série d'échantillons indépendants a révélé des résultats concordants acceptables, comme l'indique le résumé de concordance clinique. La corrélation effective des résultats du Leica HER2 FISH System - 30 Test avec l'issue clinique n'a pas été établie.

Tous les patients soumis aux essais cliniques à l'Herceptin dans le cadre du cancer gastrique avancé (ToGA) ont été sélectionnés via le Dako HercepTest. Aucun des patients de ces essais n'a été sélectionné au moyen du Leica HER2 FISH System - 30 Test. La comparaison du Leica HER2 FISH System - 30 Test avec le test Abbott Molecular PathVysion® HER-2 DNA Probe Kit à partir d'une série d'échantillons indépendants a révélé des résultats concordants acceptables, comme l'indique le résumé de concordance clinique. La corrélation effective des résultats du Leica HER2 FISH System - 30 Test avec le résultat clinique n'a pas été établie.

* Herceptin® est une marque commerciale de Genentech, Inc. et F. Hoffmann-La Roche Ltd. PathVysion® est une marque commerciale de Abbott Molecular Inc. Tous droits réservés. Utilisation sous licence.

Formation requise

Leica Biosystems fournira pour tous les utilisateurs une formation à la préparation des échantillons, la procédure de test et l'interprétation du test FISH portant sur le gène HER2.

Résumé et explications

Fond

Le gène HER2, également appelé neu ou c-erbB2, est localisé sur le bras long du chromosome 17 en position 17q11-12 (1). Le gène HER2 et sa protéine codée 185 kD ont tous deux montré qu'ils jouaient un rôle majeur dans la transformation maligne et la progression tumorale du cancer du sein (2).

HER2 fonctionne comme un marqueur pronostique, l'amplification génique et la surexpression protéique étant liées à une augmentation du taux de rechute et une mortalité plus élevée. HER2 fonctionne également comme marqueur prédictif pour la chimiothérapie systémique sélectionnée et les traitements ciblés (3). De façon spécifique, il a été montré que l'amplification du gène HER2 indiquait un pronostic défavorable dans le cancer du sein à ganglions positifs (4-8). De plus, une étude indique que la valeur pronostique de HER2 est plus forte chez les patients traités par chimiothérapie (7). Toutefois, dans la prévision de la survie sans maladie et globale des patients individuels, il faut également prendre en considération d'autres facteurs pronostiques établis comme la taille de la tumeur, le nombre de ganglions lymphatiques positifs et le statut des récepteurs stéroïdiens.

La surexpression de l'oncoprotéine HER2 résultant de l'amplification génique détectée dans les cellules mammaires cancéreuses suggère HER2 comme cible pour une thérapie à base d'anticorps (3) - tandis que les résultats de l'essai ToGA indiquent clairement que l'utilisation de l'Herceptin pour le cancer gastrique, en association avec la chimiothérapie, est un traitement efficace qui améliore la survie globale des cas de cancer gastrique HER2 positif (9). L'Herceptin (trastuzumab), anticorps monoclonal humanisé (10) qui se lie avec une grande affinité à l'oncoprotéine HER2, a montré sa capacité à empêcher la prolifération des cellules tumorales humaines qui surexpriment l'oncoprotéine HER2 à la fois *in vitro* et *in vivo* (11–13). Depuis le développement de Herceptin, la détection du gène HER2 et la détection de la protéine sont devenus des outils essentiels dans l'évaluation des tumeurs mammaires, en orientant à la fois le choix thérapeutique et la prise en charge ultérieure du patient (14,15).

Dans des cellules en interphase et des cellules en métaphase provenant de lignées cellulaires de cancer du sein humain, FISH a été utilisé pour montrer l'amplification génique HER2 (16-19). Pour quantifier l'amplification génique de HER2, FISH évalue le niveau d'amplification génique de HER2 directement dans les cellules tumorales. La morphologie caractéristique du tissu et la distribution spatiale des copies des oncogènes dans les cancers du sein primaires individuels sans mise en culture sont retenus. Des aberrations dans le nombre de copies du chromosome 17 (aneusomie) sont aussi couramment trouvées dans les tumeurs mammaires. Elles peuvent se présenter comme des suppressions ou gains chromosomiques (polysomie). Cette variation chromosomique a un impact déterminant sur l'interprétation et le rapport du statut de l'amplification génique de HER2. Par conséquent, la mesure du nombre de copies du chromosome 17 en conjonction avec HER2 a une importance critique (4).

Le Leica HER2 FISH System - 30 Test contient la sonde à ADN LSI HER2, une sonde à ADN fluorescente de 226 Kb directement marquée en SpectrumOrange™ qui est spécifique pour le locus du gène HER2 (17q11.2-q12) et la sonde à ADN CEP17, une sonde à ADN fluorescente de 5,4 Kb directement marquée en SpectrumGreen™ qui est spécifique pour la séquence d'ADN alpha-satellite à la région centromérique du chromosome 17 (17p11.1-q11.1). La solution de la sonde a fait l'objet d'une formulation spéciale et d'une validation pour utilisation sur le BOND System et il ne faut pas la modifier ou l'utiliser dans un réglage manuel.

Résumé de la concordance clinique BOND-MAX System

Le Leica HER2 FISH System - 30 Test a été développé pour fournir une autre solution, entièrement automatisée, que les méthodologies actuelles qui servent à déterminer le statut de l'amplification génique de HER2. La performance du Leica HER2 FISH System - 30 Test sur le BOND-MAX System a été évaluée dans une étude indépendante de comparaison des résultats obtenus avec le Leica HER2 FISH System - 30 Test avec le test Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit sur 300 échantillons de tumeurs mammaires et sur 109 adénocarcinomes de l'estomac (jonction gastro-œsophagienne incluse). Aucun de ces échantillons tumoraux n'a été prélevé sur des patients participant aux études cliniques portant sur l'Herceptin. Les résultats sur le tissu mammaire indiquaient une concordance de 99,33 % dans le cadre d'une analyse 2x2 (intervalles de confiance à 95 % de 97,61–99,92 %). Les résultats sur les adénocarcinomes de l'estomac (incluant du tissu provenant de la jonction gastro-œsophagienne) indiquaient une concordance de 98,17 % dans une analyse 2x2 (intervalles de confiance à 95 % de 93,53–99,78 %). Les données de concordance indiquent également une forte probabilité qu'un résultat positif avec le Leica HER2 FISH System - 30 Test corresponde à un résultat positif au test Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit. Le Leica HER2 FISH System - 30 Test est interprété négativement pour l'amplification génique de HER2 quand le rapport HER2/CEP17 est inférieur à 2,0, et positivement quand le rapport HER2/CEP17 est supérieur ou égal à 2,0. Des résultats équivoques (limite) quand le rapport génique HER2/CEP17 est compris entre 1,8 et 2,2 (ou égal à 1,8 ou 2,2) doivent être interprétés avec prudence. Compter alors 20 noyaux additionnels et recalculer le rapport.

Résumé de la concordance clinique BOND-III System

Le Leica HER2 FISH System - 30 Test a été développé pour fournir une autre solution, entièrement automatisée, que les méthodologies actuelles qui servent à déterminer le statut de l'amplification génique de HER2. La performance du Leica HER2 FISH System - 30 Test sur le BOND-III System a été évaluée dans une étude indépendante de comparaison des résultats obtenus avec le Leica HER2 FISH System - 30 Test et de ceux obtenus avec le Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit Assay sur 300 échantillons de tumeurs mammaires. Aucun de ces échantillons tumoraux n'a été prélevé sur des patients participant à des études cliniques portant sur l'Herceptin. Les résultats ont indiqué une concordance de 99,67% dans une analyse 2x2 (intervalles de confiance à 95% de 98,16 à 99,99%). Les données de concordance indiquent également une forte probabilité qu'un résultat positif avec le Leica HER2 FISH System - 30 Test corresponde à un résultat positif au test Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit. Le Leica HER2 FISH System - 30 Test est interprété négativement pour l'amplification génique de HER2 quand le rapport génique HER2/CEP17 est inférieur à 2,0, et positivement quand le rapport HER2/CEP17 est supérieur ou égal à 2,0. Des résultats équivoques (limite) quand le rapport génique HER2/CEP17 est compris entre 1,8 et 2,2 (ou égal à 1,8 ou 2,2) doivent être interprétés avec prudence. Compter alors 20 noyaux additionnels et recalculer le rapport.

Principe de la procédure

Le Leica HER2 FISH System - 30 Test est doté des composants requis pour exécuter une procédure de coloration basée sur l'hybridation fluorescente *in situ* pour des tissus fixés au formol et enrobés de paraffine. Après un prétraitement approprié, une incubation avec le LSI HER2/CEP17 Dual Probe prêt à l'emploi et un lavage de stringence approprié, les coupes tissulaires sont déshydratées et montées avec du DAPI. Les résultats sont interprétés par microscopie à fluorescence en utilisant les filtres recommandés aux longueurs d'onde appropriées.

Le Leica HER2 FISH System - 30 Test ne doit être utilisé que sur le BOND-MAX and BOND-III System.

Composants fournis

Les matériaux cités ci-dessous (Tableau 1) sont suffisants pour colorer 30 tests (30 lames colorées avec LSI HER2/CEP17 Dual Probe).

LSI HER2/CEP17 Probe 6,6 ml	Contient LSI HER2/CEP17 Dual Probe prêt à l'emploi. Contient <60% (v/v) de formamide.
Post Hybridization Wash 2 9 ml	Contient la solution de lavage post-hydratation prête à l'emploi. Contient <50% (v/v) de formamide.
BOND Enzyme Concentrate 2 1 ml	Contient la solution de protéinase K à 1,7 mg/ml.
BOND Enzyme Diluent 65 ml	Contient un diluant enzymatique.
BOND Open Container 3 x 7 ml	BOND Open Container gebruikt voor Enzyme 5.

Tableau 1 : composants du Leica HER2 FISH System - 30 Test

Consulter les fiches signalétiques individuelles pour les informations de sécurité du produit, disponibles à l'adresse www.LeicaBiosystems.com/TA9217

Instructions d'utilisation

Tous les réactifs fournis sont préparés pour être utilisés avec ce test et les numéros de lot attribués sont spécifiques à chaque Leica HER2 FISH System - 30 Test. Pour que le test soit valable, il ne faut rien remplacer.

Stockage et stabilité

Stocker entre 2 et 8 °C. Ne pas congeler. Replacer à une température comprise entre 2 et 8 °C immédiatement après utilisation. Le non-respect de ces conditions entraîne l'invalidité du test. Vérifier que la date de péremption du Leica HER2 FISH System - 30 Test utilisé n'est pas dépassée. Les signes indiquant une contamination et/ou une instabilité du Leica HER2 FISH System - 30 Test sont la turbidité des solutions (à l'exception de la solution de la sonde) et le développement d'odeur. L'utilisateur doit vérifier les conditions de stockage autres que celles spécifiées ci-dessus.

Préparation des échantillons

Il faut utiliser des méthodes de traitement standard des tissus pour tous les échantillons (20). Il est recommandé de préparer les tissus dans des fixateurs à base de formol, de les traiter de façon routinière et de les enrober à la paraffine. Par exemple, les échantillons doivent avoir une épaisseur de 3 à 4 mm et être fixés pendant 18 à 24 heures dans du formol neutre tamponné à 10%. Les tissus doivent ensuite être déshydratés dans de l'alcool, puis éclaircis au xylène, et enfin imprégnés de paraffine liquide et maintenus à une température ne dépassant pas 60 °C. Les échantillons tissulaires doivent être coupés à une épaisseur de 4 à 6 µm.

Les coupes tissulaires montées sur les lames chargées (BOND Plus Slides S21.2113) peuvent être gardées jusqu'à 12 mois entre 2 et 8 °C avant la coloration. Après la coupe, il est recommandé de laisser les lames incuber à 60 °C pendant une heure. Les coupes colorées doivent être stockées à -20 °C pour préserver le signal fluorescent et empêcher une décoloration. Attendre que les lames stockées soient à température ambiante avant de les observer.

Avertissements et précautions

Uniquement pour les utilisateurs professionnels.

Le produit ferme un ou plusieurs produits dangereux qui peuvent être préjudiciables au fœtus.

Les personnes âgées de moins de 18 ans ne sont pas autorisées à travailler avec ce produit.

Les utilisateurs doivent avoir reçu des instructions précises concernant la procédure correcte, les caractéristiques dangereuses du produit et les prescriptions de sécurité nécessaires.

Les échantillons, avant et après la fixation, ainsi que tous les matériaux exposés à ces échantillons, doivent être traités comme s'ils étaient susceptibles de transmettre une infection et éliminés avec les précautions qui s'imposent.

Ne jamais pipetter les réactifs à la bouche et veiller à éviter tout contact des réactifs et des échantillons avec la peau et les membranes muqueuses. Si les réactifs ou les échantillons entrent en contact avec des zones sensibles, rincer abondamment à l'eau. Demander conseil à un médecin. Il convient de se renseigner sur les réglementations locales ou nationales en vigueur pour l'élimination de tout composant potentiellement toxique.

Minimiser la contamination microbienne des réactifs afin d'éviter une augmentation de coloration non spécifique.

Procédure

A. Réactifs requis mais non fournis

- BOND Dewax Solution (AR9222)
- BOND Epitope Retrieval Solution 1 (AR9961)
- BOND Wash Solution x10 Concentrate (AR9590)
- Solvants standard utilisés lors des tests basés sur l'hybridation fluorescente in situ (p. ex. éthanol, absolu et au degré déterminé)

- Eau distillée ou eau déionisée
- Contre-coloration au DAPI
- Leica HER2 FISH Control Slides (TA9123)
- BOND Aspirating Probe Cleaning System (CS9100)

B. Équipement requis mais non fourni

- Pipettes (permettant de mesurer des volumes de 1 à 20 µl, de 100 et 1000 µl)
- Lames chargées (BOND Plus Slides – S21.2113)
- BOND-MAX (21.0051) or BOND-III (21.2201)
- BOND Universal Covertiles™ (S21.2001, S21.4583 ou S21.4611)
- BOND Mixing Stations (S21.1971)
- BOND Slide Label & Print Ribbon (S21.4564)
- Lamelles couvre-objet
- Étuve à air chaud (capable de maintenir une température de 60 °C)
- Microscope à fluorescence (objectif de 60–100x) avec source lumineuse appropriée. Noter le nombre d'heures d'utilisation de l'ampoule et remplacer l'ampoule avant la durée de vie prévue. Veiller au bon alignement de la lampe.
- Jeu de filtres de fluorescence approprié (SpectrumOrange™ – pic d'excitation à 559 nm, pic d'émission à 588 nm, SpectrumGreen™ – pic d'excitation à 497 nm, pic d'émission à 524 nm et DAPI – pic d'excitation à 367 nm, pic d'émission à 452 nm). Des jeux de filtres pour microscope à fluorescence multi-passe-bande optimisés pour l'utilisation avec le Leica HER2 FISH System - 30 Test sont disponibles pour la plupart des modèles de microscopes. Les jeux de filtres recommandés pour le Leica HER2 FISH System - 30 Test sont le double passe-bande DAPI/9-Orange, le double passe-bande DAPI/Vert, le double passe-bande Vert/Orange(V.2) et le triple passe-bande DAPI/Vert/Orange (V.2).

C. Méthodologie

- Pour pouvoir suivre cette méthodologie, les utilisateurs doivent être correctement formés à la technique de fluorescence *in situ* automatisée.
- Chaque coupe de l'essai colorée avec LSI HER2/CEP17 Dual Probe permet la même analyse cellulaire des signaux HER2 et centromériques du chromosome 17. Un rapport ultérieur de signaux de HER2 par rapport à ceux du chromosome 17 permettra d'attribuer une valeur quantitative à l'échantillon, indiquant un résultat négatif (non-amplifié) ou positif (amplifié). Les résultats équivoques (limite), compris entre 1,8 et 2,2, doivent être interprétés avec prudence. Compter 20 noyaux additionnels et recalculer le rapport.

D. Prétraitement enzymatique BOND

Avant la coloration, diluer le BOND Enzyme Concentrate 2 fourni avec une dilution au 1/300 en utilisant le BOND Enzyme Diluent fourni dans l'un des BOND Open Containers fournis. Par exemple : pour colorer 10 lames, préparer 3 ml de solution enzymatique de travail en diluant 10 µl de BOND Enzyme Concentrate 2 dans 2 990 µl de BOND Enzyme Diluent. Il est recommandé de préparer l'enzyme peu de temps avant chaque cycle de coloration et d'utiliser un volume minimum de 900 µl par cycle.

E. Protocole de coloration par défaut

Il est recommandé d'utiliser le Leica HER2 FISH System - 30 Test avec le protocole de coloration par défaut recommandé qui figure dans le Tableau 2 ci-dessous.

Type de protocole	Nom du protocole
Coloration	*FISH Protocol A
Préparation	*Dewax
HIER	*HIER 25 min with ER1 (97)
Enzyme	*Enzyme 5 for 25 min
Dénaturation	*D10
Hybridation	*ISH Hybridization (12Hr)

Tableau 2 : Leica HER2 FISH System - 30 Test Staining Protocol par défaut

F. Étapes de la procédure

Ces instructions doivent être lues conjointement avec le mode d'emploi du BOND-MAX and BOND-III System. Utiliser pour chaque lame un nouveau BOND Universal Covertile.

L'emploi de BOND Universal Covertiles utilisés auparavant soit pour la coloration immunohistochimique soit pour l'hybridation in-situ n'a pas été validé avec ce test.

1. Sur le BOND-MAX and BOND-III System, vérifier que les conteneurs pour vrac et déchets dangereux ont suffisamment de capacité pour réaliser les processus de coloration requis.
2. Vérifier que les conteneurs de réactifs en vrac contiennent l'alcool adéquat, l'eau distillée ou déionisée appropriée, la BOND Dewax Solution, la BOND Epitope Retrieval Solution 1 et la BOND Wash Solution pour l'exécution des cycles de coloration requis.
3. Vérifier que la BOND Mixing Station installée est propre.
4. Mettre en marche le BOND-MAX and BOND-III System.
5. Mettre en marche le PC connecté au BOND-MAX and BOND-III System.
6. Ouvrir le logiciel BOND.
7. Dans le cas d'un nouveau kit Leica HER2 FISH System - 30 Test, scanner le code-barres du plateau de réactifs avec le scanner à main pour entrer le système dans l'inventaire de réactifs BOND (code-barres unique seulement).
8. Préparer BOND Enzyme 5 dans le BOND Open Container fourni à une dilution de 1/300. Par exemple, pour 10 lames, ajouter 10 µl de BOND Enzyme Concentrate 2 à 2 990 µl de BOND Enzyme Diluent.
9. Scanner le BOND Open Container fourni et enregistrer comme **Bond Enzyme 5**.
10. Accéder à l'écran de configuration de la lame, puis cliquer sur **Ajouter un cas**.
11. Entrer les données du premier cas. Vérifier que le volume de distribution est réglé à **150 µL** et que le protocole de préparation est ***Dewax**. Cliquer sur **OK**.
12. Une fois le cas mis en évidence sur l'écran de configuration de la lame, cliquer sur **Ajouter lame**.
13. Commencer par ajouter les lames test des patients. Vérifier que le type de tissu est réglé sur **Tissu de test**.
14. Sélectionner le mode de coloration **Simple**.
15. Sélectionner le processus **ISH**.
16. Sélectionner ***LSI HER2/CEP17 Dual Probe – 30 Test** dans la liste de sondes. L'onglet

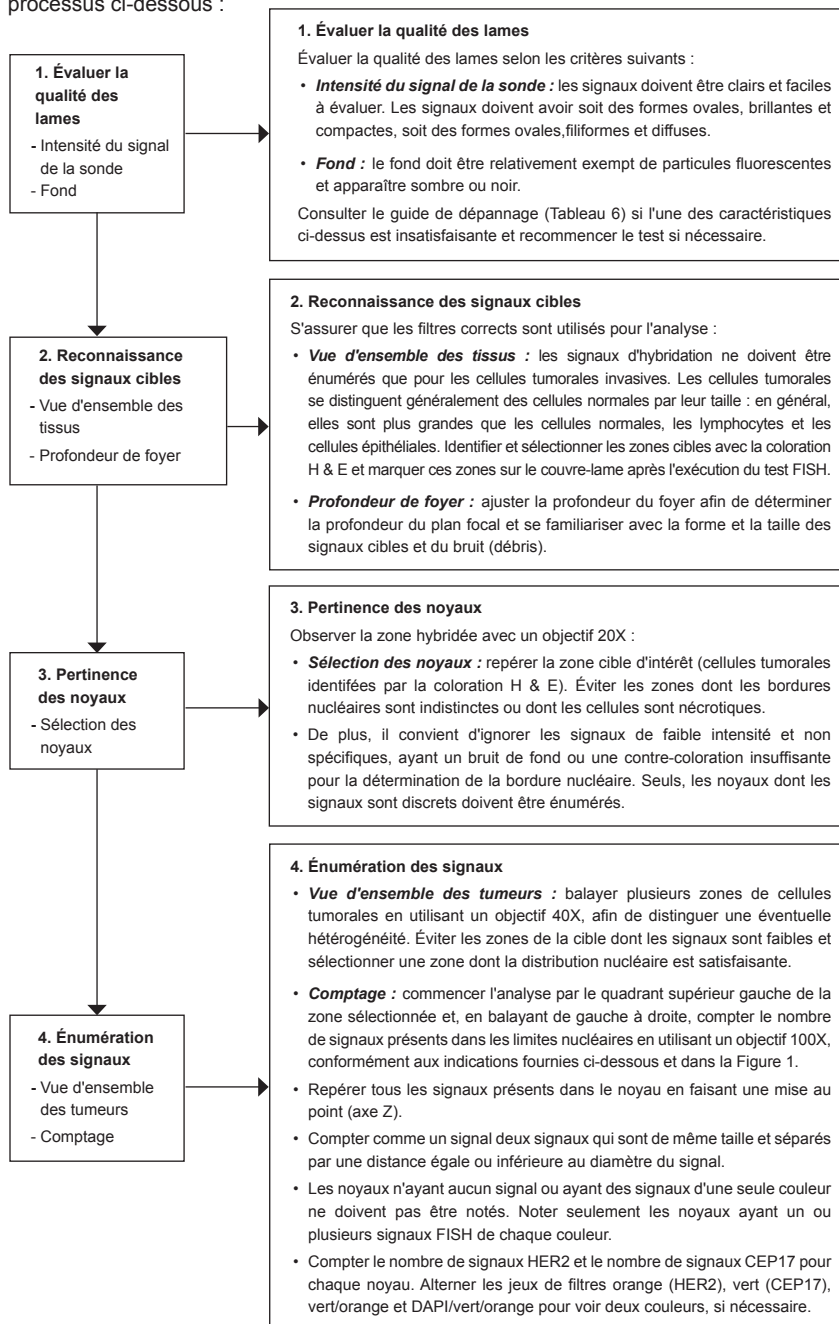
- Protocoles se positionne par défaut sur le protocole de coloration correct (***FISH Protocol A**), le protocole HIER (***HIER 25 min with ER1 (97)**), le protocole EIER (***Enzyme 5 for 25 min**), la dénaturation (***D10**) et l'hybridation (***ISH Hybridization (12Hr)**).
17. Répéter les étapes 10 à 16 jusqu'à la création complète des lames test des patients et des contrôles (lames de contrôle Leica HER2 FISH et/ou contrôles internes). Imprimer les étiquettes des lames.
 18. Étiqueter correctement les lames.
 19. Ouvrir les couvercles de tous les conteneurs du Leica HER2 FISH System - 30 Test, puis charger le plateau de réactifs sur le BOND-MAX and BOND-III System.
 20. Appliquer un nouveau Covertile sur chaque lame.
 21. Charger le plateau porte-lames sur le BOND-MAX and BOND-III System, puis appuyer sur le bouton **chargement/déchargement**.
 22. Confirmer que les lames ont été scannées, puis cliquer sur le bouton **Run (Play)** sur l'écran du statut du système pour lancer immédiatement le cycle (pour le Leica HER2 FISH System - 30 Test, il est recommandé d'exécuter l'analyse pendant la nuit en utilisant la fonction de départ retardé).
 23. Vérifier que le champ d'indication du plateau affiche **Trait. (OK)** et que le numéro de lot et l'heure de finition sont affichés.
 24. Quand le processus est terminé, appuyer sur le bouton **chargement/déchargement** et extraire le plateau porte-lames du BOND-MAX and BOND-III System.
 25. Retirer les Covertiles, puis rincer les lames dans de l'eau déionisée.
 26. Déshydrater rapidement en utilisant deux fois en alternance alcool et air sec.
 27. Appliquer 20 µl de DAPI directement sur l'échantillon.
 28. Poser le couvre-lame et laisser la solution se répandre complètement, en veillant à éliminer les bulles d'air.
 29. Sceller le bord du couvre-lame avec du vernis à ongles ou un agent de scellement similaire.
 30. Placer les lames dans l'obscurité afin de faciliter le développement du signal avant l'observation au microscope à fluorescence.
 31. Pour préserver l'intensité du signal, stocker les lames colorées à -20 °C.

G. Stockage des lames

Stocker les lames colorées à -20 °C dans l'obscurité. Après avoir sorti les lames de leur lieu de stockage à -20 °C, attendre qu'elles soient à température ambiante avant de les observer au microscope.

Évaluation des signaux et énumération

Pour évaluer la qualité des signaux et énumérer les signaux HER2 et CEP17, suivre le processus ci-dessous :



Méthode recommandée pour la détermination du rapport LSI HER2 / CEP17

Pour déterminer le rapport LSI HER2 / CEP17, utiliser la méthode suivante :

1. Enregistrer et déterminer le nombre de signaux LSI HER2 et CEP17 dans 20 noyaux (voir dans la Figure 2 ci-dessous la feuille de notation Leica HER2 FISH System - 30 Test).
2. Faire le total de tous les signaux LSI HER2. Ceci représente le nombre total de signaux LSI HER2 pour le comptage, p. ex. 143.
3. Faire le total de tous les signaux CEP17. Ceci représente le nombre total de signaux CEP17 pour le comptage, p. ex. 48.
4. Pour calculer le résultat final, faire le calcul suivant :
total des signaux LSI HER2 divisé par le total des signaux CEP17,
p. ex. $143/48$ donne 2,98, qui est positif pour l'amplification de HER2.

Remarque importante : si le rapport LSI HER2 / CEP17 est équivoque (compris entre 1,80 et 2,20), compter 20 noyaux supplémentaires et recalculer le rapport.

Rapporter les résultats comme suit :

1. Si le rapport est <2 , une amplification génique HER2 n'a pas été observée
2. Si le rapport est ≥ 2 , une amplification génique HER2 a été observée

Remarque importante : un rapport situé dans ou à proximité de la zone de démarcation (1,80 - 2,20) doit être interprété avec prudence, comme indiqué ci-dessus.

Guide d'interprétation du Leica HER2 FISH System - 30 Test

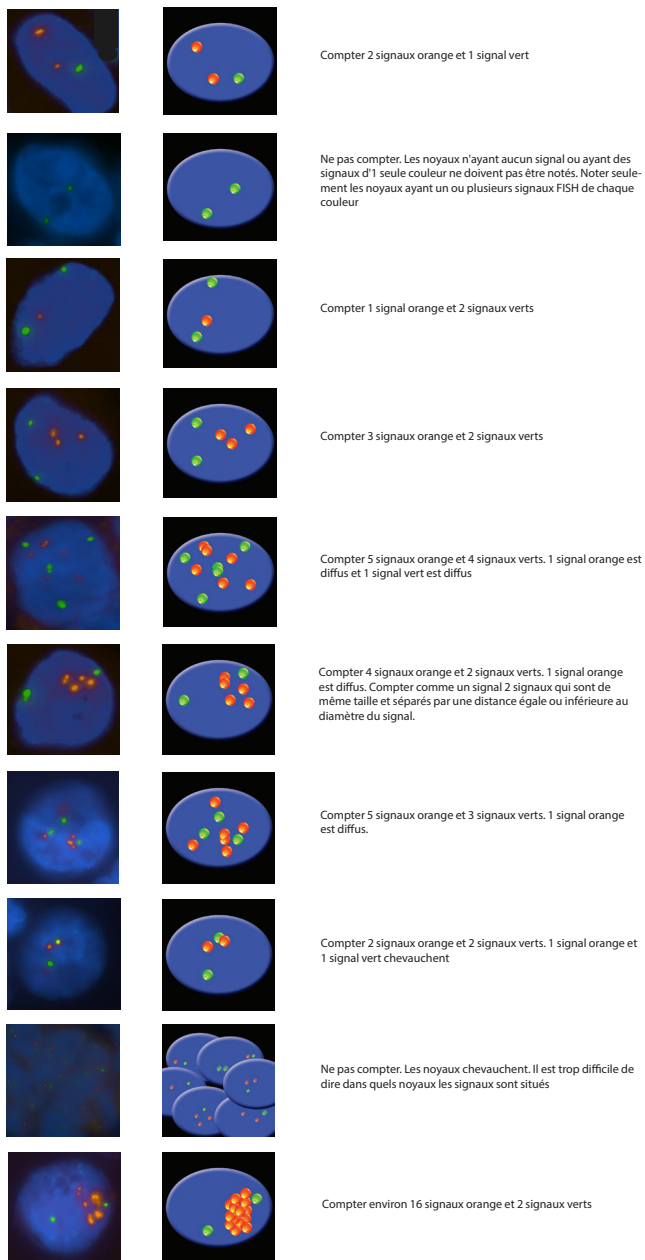


Figure 1 : Guide d'interprétation

Feuille de notation du Leica HER2 FISH System - 30 Test

Français

Comptage des signaux de 20 noyaux					
Noyau #	Nombre de copies de HER2	Nombre de copies de CEP17	Noyau #	Nombre de copies de HER2	Nombre de copies de CEP17
1			11		
2			12		
3			13		
4			14		
5			15		
6			16		
7			17		
8			18		
9			19		
10			20		
Total 1-10			Total 11-20		

	HER2	CEP17	Rapport HER2/CEP17 servant à déterminer l'amplification de HER2
Score total 1-20			
Moyenne par cellule			

Figure 2 : exemple de feuille de notation

Méthode Ariol automatisée pour la détermination HER2 FISH

L'utilisation de l'application de notation numérique Ariol PathVysion® pour l'aide à l'interprétation a été validée indépendamment sur une cohorte différente d'échantillons pour son utilisation avec le Leica HER2 FISH System - 30 Test. Lorsqu'elle est utilisée conjointement au Leica HER2 FISH System - 30 Test, l'application de notation numérique Ariol PathVysion constitue un outil de diagnostic in vitro. Avec le Leica HER2 FISH System - 30 Test, l'application Ariol PathVysion doit être calibrée avec des lames de contrôle tissulaire, et **non pas** avec des Leica HER2 FISH Control Slides (TA9123).

Toutes les décisions diagnostiques sont prises par un clinicien qualifié.

Pour de plus amples informations, veuillez consulter le manuel d'utilisation d'Ariol.

Contrôle de qualité

Utilisation des lames de contrôle

Il est recommandé d'inclure une Leica HER2 FISH Control Slide à chaque exécution du test pour contrôler la performance de l'analyse et évaluer l'exactitude de l'énumération des signaux. Les lames de contrôle doivent être utilisées pour chaque lot de coloration sur le BOND-MAX and BOND-III System et avec chaque nouveau lot de réactifs. De plus, les utilisateurs individuels peuvent choisir d'utiliser leur propre matériau de contrôle.

Évaluer la qualité des lames de contrôle et faire l'énumération des signaux en fonction des instructions figurant à la section **Évaluation des signaux et énumération**. Les critères de qualité des lames doivent être remplis et les résultats du rapport HER2/CEP17 doivent être dans les plages établies pour une performance acceptable du test. Pour connaître les critères d'acceptation des Leica HER2 FISH Control Slides, voir le Tableau 3.

Lignée cellulaire	Profil du Bond Oracle HER2 IHC System	Charge du récepteur HER2 par cellule*	Leica HER2 FISH System - 30 Test Critères d'acceptation HER2/CEP17
SKBr-3	3+	$4,3 \times 10^5$	L'amplification HER2 est observée
MDA-MB-453	2+	$1,4 \times 10^5$	Le rapport génique HER2/CEP17 doit être compris entre 1,5 et 2,5
MDA-MB-175	1+	$6,3 \times 10^4$	L'amplification HER2 n'est pas observée
MDA-MB-231	0	$9,3 \times 10^3$	L'amplification HER2 n'est pas observée

*Analyse de la charge du récepteur HER2, telle que déterminée par la cytométrie en flux

Tableau 3 : Interprétation de Leica HER2 FISH Control Slide

En cas d'échec des contrôles, il faut exclure du rapport les résultats FISH pour le cas correspondant. Si les lames de contrôle ne satisfont pas aux critères d'acceptation des lames, cela peut signifier un fonctionnement inadéquat du Leica HER2 FISH System - 30 Test. Dans ce cas, il est nécessaire de répéter le test avec de nouvelles lames de contrôle et la ou les lames portant les échantillons du patient. Si les résultats sont hors de la plage spécifiée, alors que les lames de contrôle satisfont aux critères d'acceptation concernant la qualité, il peut être approprié de répéter l'examen de dépistage de cette même lame car il se peut que l'énumération ne soit pas correcte. Consulter le guide de dépannage (Tableau 6) en cas d'échec d'hybridation, en utilisant soit la ou les lames portant l'échantillon, soit la ou les lames de contrôle.

Pour les échantillons cliniques, quand il est difficile d'interpréter le signal d'hybridation et qu'il n'y a pas assez d'échantillons pour recommencer le test, le test n'a aucune valeur d'information. Si les cellules à analyser sont en nombre insuffisant, le test n'a aucune valeur d'information.

Les échantillons du patient doivent être contrôlés conformément aux procédures opératoires standard du laboratoire. La qualité des signaux et les résultats de l'énumération doivent être documentés sur un formulaire de rapport approprié.

Restrictions

A. Restrictions générales

La technique FISH requiert une formation spéciale pour tous les aspects de la procédure (incluant la sélection des réactifs appropriés, du tissu, la fixation, le traitement et la préparation de la lame) et de l'interprétation. La coloration du tissu dépend de la manipulation, de la fixation et du traitement du tissu avant la coloration. Une fixation, une congélation, une décongélation, un lavage, un séchage, un chauffage, une coupe incorrects ou une contamination avec d'autres tissus ou fluides risquent de produire des artefacts morphologiques, une dégradation d'acides nucléiques, une fluorescence de fond ou des résultats faussement négatifs. Des résultats incohérents peuvent être dus à des variations des méthodes de fixation, d'enrobage, ou à des irrégularités inhérentes au tissu (21). Une contre-coloration excessive ou incomplète peut également compromettre la bonne interprétation des résultats.

Une coloration non spécifique résultant d'une sonde non liée a une apparence éparse, granulaire, qui est visible sur le site d'hybridation prévu ou à une certaine distance. Utiliser des cellules intactes pour l'interprétation des résultats de coloration. Les cellules nécrotiques ou dégénérées peuvent se colorer de façon non spécifique (22). Une coloration FISH inattendue ou des variations de coloration peuvent résulter d'altérations des niveaux d'expression des gènes de codage. Tout changement des schémas de coloration attendus doit être interprété en association avec tous les autres examens diagnostiques. L'interprétation de la coloration doit être complétée par des études morphologiques et l'utilisation de matériau de contrôle approprié, et doit être évaluée en fonction de l'anamnèse du patient et d'autres tests diagnostiques par un pathologiste qualifié.

La performance du test (c.-à-d. l'évaluation de l'adéquation des matériaux de contrôle) et l'interprétation de toute coloration ou de l'absence de coloration doivent être réalisées dans un laboratoire accrédité/licencié conformément à la législation en vigueur et placé sous le contrôle d'un pathologiste justifiant des qualifications et de l'expérience nécessaires, ce pathologiste étant responsable de l'évaluation générale du test d'hybridation in situ et de son interprétation. Des résultats faussement positifs dans FISH peuvent être dus à une réactivité croisée de la sonde à d'autres séquences d'acides nucléiques et/ou à une liaison non spécifique. Il faut faire des contrôles appropriés et les documenter et des tests doivent prendre en compte toutes les dates de péremption pertinentes.

On peut également constater une variation technique et interprétationnelle quand la technique FISH est utilisée sur des matériaux dérivés de lignées cellulaires (23).

B. Restrictions spécifiques au produit

Ce produit n'est pas destiné à être utilisé sur un autre test diagnostique quelconque basé sur l'ADN.

Ne pas remplacer les réactifs du Leica HER2 FISH System - 30 Test par d'autres composants fournis par Leica Biosystems ou d'autres fabricants. Cela aurait pour effet d'invalider le test. L'utilisateur doit valider tout écart par rapport aux procédures recommandées.

Il est recommandé d'utiliser pour l'essai des tissus fixés uniquement dans des fixateurs à base de formol. L'utilisation de tout autre type de fixateur peut invalider le test.

Les coupes tissulaires dépassant la plage d'épaisseur recommandée n'ont pas été validées. Toute autre épaisseur de coupe peut invalider le test.

Concordance clinique du Leica HER2 FISH System - 30 Test avec Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Mammaire

Cette étude a examiné l'aptitude du Leica HER2 FISH System - 30 Test en tant que dispositif d'aide à la détermination du traitement Herceptin (trastuzumab). L'étude a été conçue pour examiner la concordance entre le Leica HER2 FISH System - 30 Test et un dispositif de diagnostic approuvé antérieurement, Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, considéré comme « l'étalon or » pour ce test sur tissu mammaire. Le critère d'acceptation pour le contrôle était que la limite inférieure de l'intervalle de confiance unilatéral à 95% soit

supérieure à 90% entre le Leica HER2 FISH System - 30 Test et le Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit manuel, entre des cas de cancer du sein invasif positifs (amplifiés) et négatifs (non amplifiés), fixés au formol, enrobés de paraffine (FFPE).

L'étude réalisée était une évaluation à l'insu, effectuée sur trois sites, d'échantillons de cancer du sein invasif constaté cliniquement. Chacun des sites d'investigation a reçu des blocs archivés, fixés au formol, enrobés de paraffine, de tissu porteur d'un cancer du sein invasif dont les niveaux d'expression de l'oncoprotéine HER2 étaient connus. Une cohorte de 300 échantillons consistant en 75 cas IHC précédemment caractérisés 0/1+ ; 150 cas IHC précédemment caractérisés 2+ ; et 75 cas IHC précédemment caractérisés 3+, a été sélectionnée et répartie équitablement entre les trois sites d'investigation de l'essai.

Tous les cas ont été colorés avec l'Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit Assay manuel, conformément aux instructions d'utilisation du fabricant précisées dans la notice. Des coupes séquentielles provenant de chaque cas ont alors été colorées avec le Leica HER2 FISH System - 30 Test sur le BOND-MAX and BOND-III System.

Toutes les lames colorées ont été masquées et notées de manière aléatoire par un unique observateur formé, sur chacun des trois sites d'investigation de l'essai. Les résultats ont été interprétés négativement quand le rapport génique HER2/CEP17 calculé était $<2,0$ et positivement quand le rapport HER2/CEP17 calculé était $\geq 2,0$. Les données ont ensuite été analysées afin de déterminer la concordance, la conformité de la coloration positive et la conformité de la coloration négative.

Résultats de la concordance 2x2 du BOND-MAX System - Mammaire

Les données ont été regroupées dans les catégories négative ($<2,00$) ou positive ($\geq 2,00$) pour une analyse 2x2. La conformité observée pour 300 échantillons entre les deux tests dans le cadre d'une analyse 2x2 montre une concordance de 99,33% (298/300) avec un IC à 95% de 97,61–99,92% pour le BOND-MAX System.

Le pourcentage de conformité positive (sensibilité) ou l'aptitude du Leica HER2 FISH System - 30 Test à identifier correctement les cas positifs du test effectué avec l'Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (le pourcentage d'échantillons ayant reçu une notation positive à la fois par le Leica HER2 FISH System - 30 Test et par l'Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit manuel sur tous les cas positifs de l'Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) était de 99,03% (102/103).

Le pourcentage de conformité négative (spécificité) ou l'aptitude du test à identifier correctement les cas négatifs de l'Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (le pourcentage d'échantillons ayant reçu une notation négative à la fois par le Leica HER2 FISH System - 30 Test et par l'Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit sur tous les cas négatifs de l'Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) était de 99,49% (196/197). Voir le Tableau 4.

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

Concordance générale (IC à 95%) = 99,33% (97,61 à 99,92%)

Tableau 4 : Concordance 2x2 du Leica HER2 FISH System - 30 Test sur le BOND-MAX System avec l'Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit sur tissu mammaire.

Résultats de la concordance 2x2 du BOND-III System - Mammaire

Les données ont été regroupées dans les catégories négative ($<2,00$) ou positive ($\geq 2,00$) pour une analyse 2x2. La conformité observée pour 300 échantillons entre les deux tests dans le cadre d'une analyse 2x2 montre une concordance de 99,67% (299/300) avec un IC à 95% de 98,16–99,99% pour le BOND-III System.

Le pourcentage de conformité positive (sensibilité) ou l'aptitude du Leica HER2 FISH System - 30 Test à identifier correctement les cas positifs du test effectué avec l'Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (le pourcentage d'échantillons ayant reçu une notation positive à la fois par le Leica HER2 FISH System - 30 Test et par l'Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit manuel sur tous les cas positifs de l'Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) était de 99,03% (102/103).

Le pourcentage de conformité négative (spécificité) ou l'aptitude du test à identifier correctement les cas négatifs de l'Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (le pourcentage d'échantillons ayant reçu une notation négative à la fois par le Leica HER2 FISH System - 30 Test et par l'Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit sur tous les cas négatifs de l'Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) était de 100% (197/197). Voir le Tableau 5.

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

Concordance générale (IC à 95%) = 99,67% (98,16 à 99,99%).

Tableau 5 : Concordance 2x2 du Leica HER2 FISH System - 30 Test sur le BOND-III System avec l'Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit sur tissu mammaire.

En conclusion, les données obtenues dans cette étude démontrent que le Leica HER2 FISH System - 30 Test peut être utilisé comme dispositif d'aide à l'évaluation des patients pour lesquels un traitement par Herceptin (trastuzumab) est envisageable, du fait de sa concordance élevée avec Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, test diagnostique approuvé antérieurement pour cette indication.

Concordance clinique du Leica HER2 FISH System - 30 Test avec l'Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Gastrique

Cette étude a examiné l'aptitude du Leica HER2 FISH System - 30 Test en tant que dispositif d'aide à la détermination du traitement par Herceptin (trastuzumab). L'étude a été conçue pour examiner la concordance entre le Leica HER2 FISH System - 30 Test et un dispositif de diagnostic approuvé antérieurement, l'Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, considéré comme « l'étalon-or » pour ce test sur tissu gastrique. Le critère d'acceptation pour le contrôle était que la limite inférieure de l'intervalle de confiance unilatéral à 95 % soit supérieure à 90 % entre le Leica HER2 FISH System - 30 Test et l'Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit manuel, entre des cas d'adénocarcinomes de l'estomac (jonction gastro-œsophagienne incluse) positifs (amplifiés) et négatifs (non amplifiés), fixés au formol, enrobés de paraffine (FFPE). L'étude réalisée était une évaluation d'échantillons d'adénocarcinomes gastriques invasifs cliniques. Le contrôle a été effectué sur des blocs tissulaires d'adénocarcinome gastrique archivés, fixés au formol, enrobés de paraffine, dont les niveaux d'expression du gène HER2 étaient connus. Une cohorte de 109 échantillons consistant en 50 cas amplifiés et 59 cas non amplifiés a été sélectionnée.

Tous les cas ont été colorés avec le test Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit manuel, conformément aux instructions d'utilisation du fabricant précisées dans la notice. Des coupes séquentielles provenant de chaque cas ont alors été colorées avec le Leica HER2 FISH System - 30 Test sur le BOND-MAX System.

Toutes les lames colorées ont été notées de manière aléatoire par un unique observateur formé. Les résultats ont été interprétés négativement quand le rapport génique HER2/CEP17 calculé était $<2,0$ et positivement quand le rapport HER2/CEP17 calculé était $\geq 2,0$. Les données ont ensuite été analysées afin de déterminer la concordance, la conformité de la coloration positive et la conformité de la coloration négative.

Résultats de la concordance 2x2 du BOND-MAX System - Gastrique

Les données ont été regroupées dans les catégories négative ($<2,00$) ou positive ($\geq 2,00$) pour une analyse 2x2. La conformité observée pour 109 échantillons entre les deux tests dans le cadre d'une analyse 2x2 montre une concordance de 98,17 % (107/109) avec un IC à 95 % de 93,53–99,78 % pour le BOND-MAX System.

Le pourcentage de conformité positive (sensibilité) ou l'aptitude du Leica HER2 FISH System - 30 Test à identifier correctement les cas positifs du test effectué avec l'Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe (le pourcentage d'échantillons ayant reçu une notation positive à la fois par le the Leica HER2 FISH System - 30 Test et par l'Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit manuel sur tous les cas positifs de l'Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) était de 96,00 % (48/50).

Le pourcentage de conformité négative (spécificité) ou l'aptitude du test à identifier correctement les cas négatifs de l'Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (le pourcentage d'échantillons ayant reçu une notation négative à la fois par le Leica HER2 FISH System - 30 Test et par l'Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit sur tous les cas négatifs de l'Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) était de 100 % (59/59). Voir le Tableau 6.

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

Concordance générale (IC à 95 %) = 98,17 % (93,53–99,78 %)

Tableau 6. Concordance 2x2 du Leica HER2 FISH System - 30 Test sur le BOND-MAX System avec l'Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit sur tissu gastrique.

Test de précision – BOND-MAX System

A. Test de précision au sein des processus

Le test de précision au sein des processus a été effectué dans le cadre d'une étude randomisée et en aveugle. Le test de précision au sein des processus du Leica HER2 FISH System - 30 Test a fait l'objet d'une évaluation menée sur un site d'investigation unique et portant sur 540 échantillons TMA précédemment caractérisés HER2, contenant des cas de cancer du sein fixés au formol et enrobés de paraffine. L'utilisation des TMA pour la détermination de la précision au sein des processus a permis d'avoir un plus grand volume de cas couvrant une fourchette plus large d'expression de HER2 lors d'une exécution unique sur un instrument unique.

À l'énumération des lames colorées lors de l'étude de précision au sein des processus, 532 cas sur 540 cas évalués ont démontré un résultat concordant, donnant ainsi une concordance générale de 98,52% avec 97,10% comme borne inférieure de l'IC à 95%.

B. Test de précision concernant un instrument

Le test de précision concernant un instrument a été effectué dans le cadre d'une étude randomisée et en aveugle. Le test de précision concernant un instrument du Leica HER2 FISH System - 30 Test a fait l'objet d'une évaluation menée sur un site d'investigation unique et portant sur 1 620 échantillons TMA précédemment caractérisés HER2, contenant des cas de cancer du sein fixés au formol et enrobés de paraffine. L'utilisation des TMA pour la détermination de la précision concernant un instrument a permis d'avoir un plus grand volume de cas couvrant une fourchette plus large d'expression de HER2 lors d'exécutions multiples sur un instrument unique.

À l'énumération des lames colorées lors de l'étude de précision concernant un instrument, 1 620 cas sur 1 620 cas évalués ont démontré un résultat concordant, donnant ainsi une concordance générale de 100% avec 99,82% comme borne inférieure de l'IC à 95%.

C. Test de précision inter-processus

Le test de précision inter-processus a été effectué dans le cadre d'une étude randomisée et en aveugle. Le test de précision inter-processus du Leica HER2 FISH System - 30 Test a fait l'objet d'une évaluation menée sur un site d'investigation unique et portant sur 900 échantillons TMA précédemment caractérisés HER2, contenant des cas de cancer du sein fixés au formol et enrobés de paraffine. L'utilisation de TMA pour la détermination du contrôle de précision inter-processus quotidien a permis de tester un plus grand volume de cas couvrant une fourchette plus large d'expression de HER2 lors de plusieurs exécutions à des jours différents.

À l'énumération des lames colorées lors de l'étude de précision inter-processus, 894 cas sur 900 cas évalués ont démontré un résultat concordant, donnant ainsi une concordance générale de 99,33% avec 98,55% comme borne inférieure de l'IC à 95%.

D. Test de précision inter-laboratoire

Le test de précision inter-laboratoire a été effectué dans le cadre d'une étude randomisée et en aveugle. Le test de précision inter-laboratoire du Leica HER2 FISH System - 30 Test a fait l'objet d'une évaluation menée sur trois sites d'investigation et portant sur 513 échantillons TMA précédemment caractérisés HER2, contenant des cas de cancer du sein fixés au formol et enrobés de paraffine. L'utilisation de TMA pour la détermination du contrôle de précision inter-laboratoire a permis de tester un plus grand volume de cas couvrant une fourchette plus large d'expression de HER2 lors de plusieurs exécutions sur des instruments multiples.

À l'énumération des lames colorées lors de l'étude de précision inter-laboratoire, 510 cas sur 513 cas évalués ont démontré un résultat concordant, donnant ainsi une concordance générale de 99,42% avec 98,30% comme borne inférieure de l'IC à 95%.

E. Test de précision inter-observateur

Le test de précision inter-observateur a été effectué dans le cadre d'une étude randomisée et en aveugle. Le test de reproductibilité inter-observateur du Leica HER2 FISH System - 30 Test a été évalué sur trois sites d'investigation. Il y avait sur chaque site d'investigation, un unique observateur expérimenté. Dix-huit cas de cancer du sein, sous la forme de coupes complètes, ont été utilisés pour la précision inter-observateur, reflétant les types d'échantillons utilisés dans un environnement clinique.

À l'énumération des lames colorées lors de l'étude de précision inter-observateur, 53 cas sur 54 cas évalués ont démontré un résultat concordant, donnant ainsi une concordance générale de 98,15% avec 90,11% comme borne inférieure de l'IC à 95%.

F. Test de précision lot à lot

Le test de précision lot à lot a été effectué dans le cadre d'une étude randomisée et en aveugle. La précision lot à lot a été déterminée sur trois lots du Leica HER2 FISH System - 30 Test qui avaient été fabriqués indépendamment selon de bonnes pratiques de fabrication (BPF). Chaque lot a été testé sur un site d'investigation unique, avec 540 échantillons TMA précédemment caractérisés HER2, contenant des cas de cancer du sein fixés au formol et enrobés de paraffine. L'utilisation de TMA pour la détermination de la reproductibilité lot à lot permet de tester un plus grand volume de cas couvrant une fourchette plus large d'expression de HER2, sur des lots différents.

À l'énumération des lames colorées lors de l'étude de précision lot à lot, 534 cas sur 540 cas évalués ont démontré un résultat concordant, donnant ainsi une concordance générale de 98,89% avec 97,60% comme borne inférieure de l'IC à 95%.

Test de précision – BOND-III System

G. Test de précision au sein des processus

Le test de précision au sein des processus a été effectué dans le cadre d'une étude randomisée et en aveugle. Le test de précision au sein des processus du Leica HER2 FISH System - 30 Test a fait l'objet d'une évaluation menée sur un site d'investigation unique et portant sur 540 échantillons TMA précédemment caractérisés HER2, contenant des cas de cancer du sein fixés au formol et enrobés de paraffine. L'utilisation des TMA pour la détermination de la précision au sein des processus a permis d'avoir un plus grand volume de cas couvrant une fourchette plus large d'expression de HER2 lors d'une exécution unique sur un instrument unique.

À l'énumération des lames colorées lors de l'étude de précision au sein des processus, 540 cas sur 540 cas évalués ont démontré un résultat concordant, donnant ainsi une concordance générale de 100% avec 99,45% comme borne inférieure de l'IC à 95%.

H. Test de précision concernant un instrument

Le test de précision concernant un instrument a été effectué dans le cadre d'une étude randomisée et en aveugle. Le test de précision concernant un instrument du Leica HER2 FISH System - 30 Test a fait l'objet d'une évaluation menée sur un site d'investigation unique et portant sur 1 620 échantillons TMA précédemment caractérisés HER2, contenant des cas de cancer du sein fixés au formol et enrobés de paraffine. L'utilisation des TMA pour la détermination de la précision concernant un instrument a permis d'avoir un plus grand volume de cas couvrant une fourchette plus large d'expression de HER2 lors d'exécutions multiples sur un instrument unique.

À l'énumération des lames colorées lors de l'étude de précision concernant un instrument, 1 620 cas sur 1 620 cas évalués ont démontré un résultat concordant, donnant ainsi une concordance générale de 100% avec 99,82% comme borne inférieure de l'IC à 95%.

I. Test de précision inter-processus

Le test de précision inter-processus a été effectué dans le cadre d'une étude randomisée et en aveugle. Le test de précision inter-processus du Leica HER2 FISH System - 30 Test a fait l'objet d'une évaluation menée sur un site d'investigation unique et portant sur 900 échantillons TMA précédemment caractérisés HER2, contenant des cas de cancer du sein fixés au formol et enrobés de paraffine. L'utilisation de TMA pour la détermination du contrôle de précision inter-processus quotidien a permis de tester un plus grand volume de cas couvrant une fourchette plus large d'expression de HER2 lors de plusieurs exécutions à des jours différents.

À l'énumération des lames colorées lors de l'étude de précision inter-processus, 891 cas sur 900 cas évalués ont démontré un résultat concordant, donnant ainsi une concordance générale de 99,00% avec 98,11% comme borne inférieure de l'IC à 95%.

J. Test de précision inter-laboratoire

Le test de précision inter-laboratoire a été effectué dans le cadre d'une étude randomisée et en aveugle. Le test de précision inter-laboratoire du Leica HER2 FISH System - 30 Test a fait l'objet d'une évaluation menée sur trois sites d'investigation et portant sur 513 échantillons TMA précédemment caractérisés HER2, contenant des cas de cancer du sein fixés au formol et enrobés de paraffine. L'utilisation de TMA pour la détermination du contrôle de précision inter-laboratoire a permis de tester un plus grand volume de cas couvrant une fourchette plus large d'expression de HER2 lors de plusieurs exécutions sur des instruments multiples.

À l'énumération des lames colorées lors de l'étude de précision inter-laboratoire, 511 cas sur 513 cas évalués ont démontré un résultat concordant, donnant ainsi une concordance générale de 99,61% avec 98,60% comme borne inférieure de l'IC à 95%.

K. Test de précision inter-observateur

Le test de précision inter-observateur a été effectué dans le cadre d'une étude randomisée et en aveugle. Le test de reproductibilité inter-observateur du Leica HER2 FISH System - 30 Test a été évalué sur trois sites d'investigation. Il y avait sur chaque site d'investigation, un unique observateur expérimenté. Dix-huit cas de cancer du sein, sous la forme de coupes complètes, ont été utilisés pour la précision inter-observateur, reflétant les types d'échantillons utilisés dans un environnement clinique.

À l'énumération des lames colorées lors de l'étude de précision inter-observateur, 53 cas sur 54 cas évalués ont démontré un résultat concordant, donnant ainsi une concordance générale de 98,15% avec 90,11% comme borne inférieure de l'IC à 95%.

L. Test de précision lot à lot

Le test de précision lot à lot a été effectué dans le cadre d'une étude randomisée et en aveugle. La précision lot à lot a été déterminée sur trois lots du Leica HER2 FISH System - 30 Test qui avaient été fabriqués indépendamment selon de bonnes pratiques de fabrication (BPF). Chaque lot a été testé sur un site d'investigation unique, avec 540 échantillons TMA précédemment caractérisés HER2, contenant des cas de cancer du sein fixés au formol et enrobés de paraffine. L'utilisation de TMA pour la détermination de la reproductibilité lot à lot permet de tester un plus grand volume de cas couvrant une fourchette plus large d'expression de HER2, sur des lots différents.

À l'énumération des lames colorées lors de l'étude de précision lot à lot, 540 cas sur 540 cas évalués ont démontré un résultat concordant, donnant ainsi une concordance générale de 100% avec 99,45% comme borne inférieure de l'IC à 95%.

Robustesse du test

Des études de robustesse ont été menées sur le BOND-MAX and BOND-III System pour déterminer la plage de tolérance du test concernant le temps et la température de récupération de la chaleur ; le temps de restauration enzymatique, la température et la concentration ; le temps et la température de dénaturation ; le temps et la température d'hybridation ; et le temps

et la température du lavage de stringence. Des études de robustesse portant sur la température et l'humidité et utilisant le protocole par défaut du BOND-MAX and BOND-III System ont également été menées hors des limites recommandées, selon les indications du guide FDA/ORA intitulé ORA LAB5.3 Rev1.7.

- Aucune différence dans le statut d'amplification n'a été observée quand la température par défaut pour chaque étape dépendante de la chaleur a été élevée de 4 °C ou abaissée de 4 °C, en comparaison du protocole par défaut du Leica HER2 FISH System - 30 Test. Des résultats de très haute qualité ont été observés aux températures par défaut et ces températures sont recommandées.
- Aucune différence dans le statut d'amplification n'a été observée quand le temps de restauration de l'épitope (HIER) induite par la chaleur a été de 20 minutes et 30 minutes à 97 °C avec la solution BOND ER1, en comparaison du protocole par défaut du Leica HER2 FISH System - 30 Test. Des résultats de qualité supérieure ont été observés au temps par défaut de 25 minutes et ce temps d'incubation est recommandé.
- Aucune différence dans le statut d'amplification n'a été observée quand le temps de restauration de l'épitope induite par les enzymes (EIER) a été de 15 minutes et 35 minutes à 37 °C, en comparaison du protocole par défaut du Leica HER2 FISH System - 30 Test. Des résultats de qualité supérieure ont été observés au temps par défaut de 25 minutes et ce temps d'incubation est recommandé.
- Aucune différence dans le statut d'amplification n'a été observée quand la concentration enzymatique de la restauration de l'épitope induite par les enzymes (EIER) a été effectuée avec des proportions concentré enzymatique/diluant enzymatique de 1/200 et 1/500 en utilisant le protocole par défaut du Leica HER2 FISH System - 30 Test protocol. Des résultats de qualité supérieure ont été observés avec la concentration par défaut de 1/300 et cette dilution est recommandée.
- Aucune différence dans le statut d'amplification n'a été observée quand le temps de dénaturation a été de 5 minutes et 15 minutes, en comparaison du protocole par défaut du Leica HER2 FISH System - 30 Test. Des résultats de très haute qualité ont été observés au temps par défaut de 10 minutes et ce temps de dénaturation est recommandé.
- Aucune différence dans le statut d'amplification n'a été observée quand le temps d'hybridation a été de 9 heures et 15 heures, en comparaison du protocole par défaut du Leica HER2 FISH System - 30 Test. Des résultats de qualité supérieure ont été observés au temps par défaut de 12 heures et ce temps d'hybridation est recommandé.
- Aucune différence dans le statut d'amplification n'a été observée quand le temps de lavage post-hybridation a été de 2 minutes, 5 minutes et 7 minutes, en comparaison du protocole par défaut du Leica HER2 FISH System - 30 Test . Des résultats de qualité supérieure ont été observés au temps par défaut de 4 minutes et ce temps de lavage post-hybridation est recommandé.
- Aucune différence dans le statut d'amplification n'a été observée quand le Leica HER2 FISH System - 30 Test a fonctionné à 28 °C et 30 % d'humidité relative, et à 16 °C et 80 % d'humidité relative, en comparaison du protocole par défaut du Leica HER2 FISH System - 30 Test effectué dans des conditions ambiantes.

Les opérations réalisées hors des paramètres testés pour la robustesse du test et recommandés n'ont pas été validées. L'utilisation de tout autre paramètre de contrôle peut invalider le test.

Le texte ci-dessus décrit les conditions testées et les résultats de l'étude. Veuillez noter que Leica n'a pas testé toutes les combinaisons de conditions possibles et ne recommande pas l'utilisation de plages hors limites pour toute condition. Le protocole par défaut du Leica HER2 FISH Staining Protocol est résumé dans le tableau 2.

Dépannage

Problème	Cause probable	Correction
Signal fluorescent/ coloration absent(e) ou faible	Fixation ou traitement inappropriés d'échantillons ayant valeur de test	Vérifier qu'un fixateur à base de formol est utilisé et que les programmes de traitement conviennent à l'échantillon qui passe le test.
	Le Leica HER2 FISH System - 30 Test est utilisé alors que la date de péremption est dépassée.	Vérifier que la date de péremption spécifiée pour le Leica HER2 FISH System - 30 Test n'est pas dépassée.
	Sélection du protocole incorrect	Vérifier que la valeur par défaut du *FISH Protocol A est appropriée dans le champ du protocole de coloration de la boîte de dialogue Ajouter lame.
	Distribution de réactifs en vrac inappropriée	Vérifier que tous les réactifs BOND ont été attribués aux conteneurs de vrac appropriés et qu'ils ont été correctement positionnés sur l'instrument.
	Déparaffinisation inadéquate des lames	Vérifier que le mode *Dewax est sélectionné dans le champ Préparation de la boîte de dialogue Ajouter lame.
	Prétraitement inapproprié	Vérifier que les protocoles de prétraitement par défaut (HIER et digestion enzymatique) sont sélectionnés. Adapter le protocole de prétraitement (HIER ou digestion enzymatique) si nécessaire.
	Dénaturation inadéquate	Vérifier que la dénaturation par défaut appropriée *D10 est sélectionnée.
	Hybridation inadéquate	Vérifier que l'hybridation par défaut appropriée *H12 est sélectionnée. Prolonger le temps d'hybridation si nécessaire.
	Lavage post-hybridation excessif	Diminuer le temps d'incubation du lavage post-hybridation
	Processus interrompu avant la fin	À l'aide du logiciel BOND, confirmer la présence d'une erreur rapportable pendant le processus de coloration et la résoudre en suivant les instructions du logiciel BOND.
Équipement de microscopie à fluorescence inapproprié <ul style="list-style-type: none"> • Jeu de filtres inapproprié • Lampe incorrecte • Lampe périmée • Type d'huile incorrect 	S'assurer que l'équipement de microscopie à fluorescence utilisé est dans son intégralité approprié pour le test réalisé, confirmer : <ul style="list-style-type: none"> • Jeu de filtres approprié • Lampe appropriée • Puissance de la lampe correcte • Huile appropriée utilisée pour la microscopie à immersion dans l'huile 	
Surexposition à la lumière UV (photoblanchiment)	Stocker les lames dans l'obscurité, avant et après l'évaluation, afin de préserver les signaux fluorescents. Pour préserver le signal lors d'un stockage à long terme, stocker les lames à -20 °C.	

Problème	Cause probable	Correction
Signal fluorescent/ coloration de fond non spécifique	Lavage post-hybridation inadéquat	Augmenter le temps d'incubation du lavage post-hybridation.
	Distribution de réactifs en vrac inappropriés	Vérifier que tous les réactifs BOND ont été attribués aux conteneurs de vrac appropriés et qu'ils ont été correctement positionnés sur l'instrument.
	Déparaffinisation inadéquate des lames	Vérifier que Dewax est sélectionné dans le champ Préparation de la boîte de dialogue Ajouter lame.
	Réaction croisée non spécifique avec des zones de nécrose tissulaire	Vérifier qu'un fixateur à base de formol est utilisé et que les programmes de traitement conviennent à l'échantillon qui passe le test. Si possible, retester le cas en utilisant un autre bloc tissulaire. Si ce n'est pas possible, évaluer en association avec une coupe colorée H&E correspondante et sélectionner les zones qui présentent les meilleurs schémas de fixation.
	Les coupes ont adhéré aux lames au moyen d'adhésifs différents des adhésifs prévus.	Utiliser les BOND Plus Slides (S21.2113).
Préservation insatisfaisante de lamorphologie du tissu	Fixation et traitement du tissu inadéquats	Vérifier qu'un fixateur à base de formol est utilisé et que les programmes de traitement conviennent à l'échantillon qui passe le test. Si possible, retester le cas en utilisant un autre bloc tissulaire. Si ce n'est pas possible, évaluer en association avec une coupe colorée H&E correspondante et sélectionner les zones qui présentent les meilleurs schémas de fixation.
	Prétraitement inapproprié	Adapter le protocole de prétraitement (HIER ou digestion enzymatique).
Tissu détaché de la ou des lames du patient/de contrôle	Utilisation d'un type de lames incorrect ou drainage inadéquat de la coupe	Vérifier que les lames appropriées sont utilisées pour les coupes du patient/ de contrôle (par ex. BOND Plus Slides S21.2113). Vérifier que les lames sont correctement drainées et qu'elles sont incubées pendant 1 heure à 60 °C.

Tableau 7 : Guide de dépannage du Leica HER2 FISH System - 30 Test.

Si des problèmes associés au Leica HER2 FISH System - 30 Test ne sont pas traités dans ce guide de dépannage, veuillez contacter votre service technique ou distributeur Leica Biosystems local pour assistance.

Références

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. Nadjji, 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.

Accord de licence

Ce produit contient des sondes FISH PathVysion fournies par Abbott Molecular Inc.

PathVysion, LSI et CEP sont des marques commerciales de Abbott Molecular Inc. Tous droits réservés. Utilisation sous licence.









Modifications apportées à l'édition précédente

Données gastriques ajoutés.

Date de publication

17 juillet 2015

Identification des symboles

	Code du lot		Stockage		Numéro du catalogue
	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>		Fabricant	SN	Numéro de série
	Consulter le mode d'emploi		Contenance suffisante pour <n> tests		À utiliser avant AAAA-MM-JJ

Herceptin est une marque commerciale de Genentech, Inc. et F. Hoffmann-La Roche Ltd.