

# Bond™ Oracle™ HER2 IHC System

## Brugsanvisning

Til brug på Leica Biosystems' BOND fuldautomatiske avancerede farvningssystem.

Product Code TA9145 er designet til farvning af 60 test (150 objektglas):

60 testobjektglas med HER2 Primary Antibody

60 testobjektglas med HER2 Negative Control

15 HER2-kontrolobjektglas med HER2 Primary Antibody

15 positive in-house-vævscontroller med HER2 Primary Antibody



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



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

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

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

# Indhold

<b>Tiltænkt brug</b> .....	<b>4</b>
<b>Resumé og forklaring</b> .....	<b>4</b>
Baggrund.....	4
Udtryk for HER2.....	5
Resumé over klinisk overensstemmelse.....	5
<b>Procedureprincipper</b> .....	<b>5</b>
Medfølgende komponenter.....	6
Instruktioner for anvendelse.....	6
Opbevaring og stabilitet.....	6
Klargøring af prøver.....	6
Advarsler og forholdsregler.....	7
<b>Procedure</b> .....	<b>7</b>
A. Nødvendige reagenser, der ikke medfølger.....	7
B. Nødvendigt udstyr, der ikke medfølger.....	7
C. Metodologi.....	8
D. Oversigt over objektglas.....	8
E. Proceduretrin.....	9
<b>Kvalitetskontrol</b> .....	<b>11</b>
HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody.....	11
Positiv in-house-kontrolvæv – HER2 Primary Antibody.....	11
Negativ in-house-kontrolvævskomponent – HER2 Primary Antibody.....	12
Patientvæv – HER2 Negative Control.....	12
Patientvæv – HER2 Primary Antibody.....	12
Verificering af analysen.....	12
Fortolkning af farvning - bryst.....	13
Fortolkning af farvning - mave.....	13
<b>Screeningsrækkefølge for objektglas</b> .....	<b>14</b>
1. HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody.....	14
2. Positiv in-house-kontrolvævskomponent – HER2 Primary Antibody.....	15
3. Negativ in-house-kontrolvævskomponent – HER2 Positive Control.....	15
4. Patientvæv – farvet ved hjælp af HER2 Negative Control.....	15
5. Patientvæv – farvet ved hjælp af HER2 Primary Antibody.....	15
<b>Begrænsninger</b> .....	<b>15</b>
A. Generelle begrænsninger.....	15
B. Produktspecifikke begrænsninger.....	16
<b>Cellelinjedata</b> .....	<b>16</b>
<b>Klinisk overensstemmelse for Bond Oracle HER2 IHC System v Dako HercepTest -</b>	
<b>Bryst</b> .....	<b>17</b>
2x2 Overensstemmelsesresultater.....	18
3x3 Overensstemmelsesresultater.....	18
<b>Klinisk overensstemmelse for Bond Oracle HER2 IHC System v forhold til</b>	
<b>PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Bryst</b> .....	<b>19</b>
3x2 Overensstemmelsesresultater.....	19
<b>Klinisk overensstemmelse mellem Bond Oracle HER2 IHC System og Ventana Medical</b>	
<b>Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) primært monoklonalt antistof fra kanin</b>	
<b>- mave</b> .....	<b>20</b>
<b>Resultater - Bond Oracle HER2 IHC System vs. Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY</b>	
<b>anti-HER-2/neu (4B5) primært monoklonalt antistof fra kanin - mave</b> .....	<b>20</b>
2x2-overensstemmelsesresultater.....	20
3x3-overensstemmelsesresultater.....	21
<b>Immunoreaktivitet – Normalt panel</b> .....	<b>22</b>

<b>Reproducerbarhedsforsøg .....</b>	<b>23</b>
Præcisionstest inden for og mellem .....	23
A. Præcisionstest inden for kørsler .....	23
B. Præcisionstest mellem kørsler .....	23
C. Reproducerbarhed lot-til-lot .....	23
D. Reproducerbarhed mellem laboratorier .....	24
E. Reproducerbarhed inter-observer .....	24
F. Præcision mellem instrumenter (BOND-MAX vs. BOND-III) .....	25
<b>Fejlfinding .....</b>	<b>26</b>
<b>Referencer .....</b>	<b>28</b>

## Tiltænkt brug

### Til in-vitro-diagnostisk brug

Bond Oracle HER2 IHC System er en semi-kvantitativ immunhistokemisk (IHC) analyse til bestemmelse af HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2)-onkoprotein-status i brystkræftvæv og væv fra adenocarcinomer fra maven (herunder den gastroesophageale forbindelse), som gennemføres med henblik på histologisk evaluering. Bond Oracle HER2 IHC System er indikeret som en hjælp i vurderingen af patienter, som overvejes indstillet til Herceptin® (trastuzumab)-behandling (se indlægssedlen i Herceptin®-pakken).

Bemærk! Alle patienter i de kliniske Herceptin®-forsøg blev udvalgt ved hjælp af en forskningsmæssig immunocytochemisk analyse til kliniske forsøg (CTA). Ingen af patienterne i disse forsøg blev valgt ved brug af Bond Oracle HER2 IHC System. Bond Oracle HER2 IHC System blev sammenlignet med Dako HercepTest™ på et uafhængigt sæt prøver og fandtes at give acceptable, overensstemmende resultater som angivet i resuméet over den kliniske overensstemmelse. Den faktiske korrelation mellem Bond Oracle HER2 IHC System og det kliniske resultat er ikke blevet påvist.

Alle patienter i de kliniske forsøg med Herceptin® og fremskreden mavekræft (ToGA) blev udvalgt ved hjælp af Dako HercepTest. Ingen af patienterne i disse forsøg blev valgt ved brug af Bond Oracle HER2 IHC System. Bond Oracle HER2 IHC System er blevet sammenlignet med Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) primært monoklonalt antistof fra kanin i et uafhængigt prøvesæt og fandtes at give acceptable, overensstemmende resultater som angivet i resuméet over den kliniske overensstemmelse (mave). Den faktiske korrelation mellem Bond Oracle HER2 IHC System og det kliniske resultat er ikke blevet påvist.

## Resumé og forklaring

### Baggrund

Bond Oracle HER2 IHC System indeholder det musemonoklonale anti-HER2-antistof, klon CB11. Klon CB11, der oprindeligt blev udviklet af Corbett et al (1) og fremstillet af Novocastra Laboratories Ltd (nu Leica Biosystems Newcastle Ltd.), rettes mod det interne område af HER2-onkoproteinet.

I en del af bryst- og gastrisk kræftpatienter, oncoprotein HER2 overeksprimeres som en del af processen med malign transformation og tumorprogression (2). HER2-status har også vist sig at have stor betydning for behandling af mavekræft (3). Overekspression af HER2 onkoprotein fundet i brystkræftceller antyder HER2 som en target for antistof-baseret terapi, mens resultaterne fra ToGA forsøg viser klart, at anvendelse af Herceptin® i mavekræft sammen med kemoterapi er en effektiv behandling, som forbedrer den samlede overlevelse i HER2-positiv gastriske kræft (4). Herceptin® er et humaniseret monoklonalt antistof (5), der binder med høj affinitet til HER2 onkoprotein og har været vist sig at hæmme proliferationen af humane tumorceller med overekspression af HER2 onkoprotein både in vitro og in vivo (6-8).

Den første immunhistoperoxidaseteknik blev rapporteret af Nakane og Pierce (9). Siden da er teknikken udviklet flere gange, hvilket har ført til øget følsomhed i forhold til tidligere teknikker. En ny udvikling har været anvendelse af polymermærkning. Denne teknologi har været anvendt for både primære antistoffer og immunhistokemiske detektionssystemer (10). Detektionssystemet Compact Polymer™, der anvendes af Bond Oracle HER2 IHC System, er en del af en serie med nye, kontrollerede polymeriseringsteknologier, der er udviklet specielt til fremstilling af polymere HRP-linker-antistofkonjugater. Da denne polymerteknologi anvendes i Oracle-produktserien, opstår problemet med uspecifik farvning, der kan forekomme med streptavidin/biotin-detektionssystemer på grund af endogent biotin, ikke.

## Udtryk for HER2

HER2 -onkoproteinet udtrykkes på niveauer, der kan registreres af immunhistokemi i op til 20 % af adenocarcinomer fra forskellige steder. Mellem 10% og 20% af invasive ductale carcinomer af brystet (11) og 20% af gastriske cancere (12-14) er positive for HER2 oncoprotein. 90 % af tilfældene af ductal comedo-carcinoma in-situ (DCIS) er positive (15) sammen med næsten alle tilfælde af Pagets-sygdom i brystet (16).

## Resumé over klinisk overensstemmelse

Bond Oracle HER2 IHC System blev udviklet som et alternativ til den forskningsmæssige CTA, der blev anvendt i de kliniske Herceptin®-undersøgelser. Effektiviteten af Bond Oracle HER2 IHC System til bestemmelse af HER2 -onkoprotein-overekspression blev evalueret i en uafhængig undersøgelse, hvor resultaterne fra Bond Oracle HER2 IHC System blev sammenlignet med Dako HercepTest på 431 brystkræft-prøver fra USA. Ingen af disse stammede fra patienter i de kliniske Herceptin®-forsøg. Resultaterne indikerede en 92,34 % overensstemmelse i en 2x2-analyse (95 % konfidensintervaller på 89,42 % til 94,67 %) og 86,54 % i en 3x3-analyse (95 % konfidensintervaller på 82,95 % til 89,62 %) mellem resultaterne fra de to analyser.

Effektiviteten af Bond Oracle HER2 IHC System til bestemmelse af HER2 -onkoprotein-overekspression på adenocarcinomer fra maven (herunder den gastroesophageale forbindelse) blev evalueret i en uafhængig undersøgelse, hvor resultaterne fra Bond Oracle HER2 IHC System blev sammenlignet med Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) primært monoklonalt antistof fra kanin på 287 mavekræftprøver fra Kina. Ingen af disse stammede fra patienter i de kliniske Herceptin®-forsøg. Resultaterne viste en overensstemmelse på 95,12 % i en 2x2-analyse (95 % konfidensintervaller på 91,95 % til 97,31 %) og 89,90 % i en 3x3-analyse (95 % konfidensintervaller på 85,81 % til 93,13 %) mellem resultaterne fra hhv. Bond Oracle HER2 IHC System og Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5).

## Procedureprincipper

Bond Oracle HER2 IHC System indeholder de nødvendige komponenter til at gennemføre en immunhistokemisk farvningsprocedure af formalinfikserede, paraffinindstøbte vævsprøver. Efter inkubation med HER2 Primary Antibody (klon CB11), der er klar til brug, anvender dette system en kompakt polymerteknologi, der er klar til brug. Den enzymatiske omdannelse af det efterfølgende tilsatte chromogen medfører dannelse af et synligt reaktionsprodukt på antigenstedet. Vævssnittene kan derefter kontrastfarves, dehydreres, renses og monteres med dækglas. Resultaterne tolkes ved brug af et lysmikroskop. Kontrolobjektglas med fire formalinfikserede, paraffinindstøbte humane brystkræftcellelinjer medfølger til validering af farvningskørsler. De fire cellelinjer demonstrerer HER2 -onkoprotein-ekspressionen ved farvningsintensiteter på 0, 1+, 2+ og 3+. Farvningsintensiteten for disse cellelinjer er blevet afstemt med både antallet af HER2-onkoprotein receptorer pr. celle og HER2-gen-amplifikationsstatus.

Bond Oracle HER2 IHC System (product code TA9145) er beregnet til brug på Leica Biosystems' BOND fuldautomatiske avancerede farvningsssystem.

## Medfølgende komponenter

De materialer, der er anført nedenfor (tabel 1), er tilstrækkelige til at farve 150 objektglas (60 testobjektglas inkuberet med HER2 Primary Antibody, 60 testobjektglas inkuberet med den tilsvarende HER2 Negative Control, 15 HER2 Control Slides inkuberet med HER2 Primary Antibody og 15 positive in-house-vævskontroller inkuberet med HER2 Primary Antibody). Antallet af test er baseret på brugen af en 150 µL automatiseret dispensering per objektglas. Sættet indeholder materialer, der er tilstrækkelige til maksimalt 15 individuelle BOND -farvningskørsler.

<b>HER2 Control Slides, (x15)</b>	Snit af formalinfikserede, paraffinindstøbte humane brystkræftcellerlinjer, som demonstrerer HER2-onkoproteinekspressionen ved farvningsintensiteter på 0, 1+, 2+ og 3+, når de farves i henhold til den medfølgende protokol. Disse snit er fuldt monteret og kræver ikke yderligere bagning.
<b>HER2 Primary Antibody, 13,5 mL</b>	Indeholder klar-til-brug affinitets-isoleret, musemonoklonalt IgG-antistof, klon CB11 og 0,035% 2-methylisothiazol-3(2H)-one.
<b>HER2 Negative Control, 9 mL</b>	Indeholder klar-til-brug muse-IgG i en koncentration ækvivalent til HER2 Primary Antibody og 0,035% 2-methylisothiazol-3(2H)-one.
<b>Peroxide Block, 22,5 mL</b>	Indeholder 3-4 % hydrogenperoxid.
<b>Post Primary, 22,5 mL</b>	Kanin-anti-mus IgG (<10 µg/mL) i Tris-buffer-saltvand indeholdende 10 % (v/v) animalsk serum og 0,01% 2-methylisothiazol-3(2H)-one.
<b>Polymer, 22,5 mL</b>	Poly-HRP gede anti-kanin IgG (<25 µg/mL) i Tris-buffer-saltvand indeholdende 10 % (v/v) animalsk serum og 0,01% 2-methylisothiazol-3(2H)-one.
<b>DAB Part 1, 2,25 mL</b>	Indeholder 66 mM 3,3'-diaminobenzidin tetrahydroklorid, i en stabiliseringsopløsning.
<b>DAB Part B (x2), 22,5 mL</b>	Indeholder ≤0,1 % (v/v) hydrogenperoxid.
<b>Hematoxylin, 22,5 mL</b>	Indeholder <0,1 % hematoxylin.

Tabel 1. Bond Oracle HER2 IHC System-komponenter

## Instruktioner for anvendelse

Alle reagenser er sammensat specifikt til brug sammen med denne test, og lotnumre er specifikke for hvert Bond Oracle HER2 IHC System. For at testen virker som specificeret, må der ikke foretages substitutioner.

## Opbevaring og stabilitet

Opbevares ved 2-8 °C. Må ikke fryses. Anbringes igen i temperaturer mellem 2 til 8 °C lige efter brug. Hvis der afviges fra disse betingelser, er testen ugyldig. Sørg for, at Bond Oracle HER2 IHC System anvendes inden den angivne udløbsdato. Følgende er tegn på, at Bond Oracle HER2 IHC System er kontamineret og/eller ustabil: opløsningerne er uklare, der udvikles lugt, og der er bundfald. Hvis reagenser opbevares under andre betingelser, end dem som er angivet ovenfor, skal disse valideres af brugeren.

## Klargøring af prøver

Alle prøver skal klargøres for at konservere vævet med henblik på immunhistokemisk farvning. Standardmetoder for vævsbehandling bør bruges til alle prøver (17).

Det anbefales, at vævsprøverne klargøres i formalinbaserede fiksativer, behandles rutinemæssigt og paraffinindkapsles. For eksempel bør resektionsprøver udskæres i en tykkelse på 3 eller

4 mm og fikseres i 18-24 timer i 10 % neutral bufferjusteret formalin. Vævsprøverne skal derefter dehydreres i en række alkoholer og renses i xylen efterfulgt af infiltrering med smeltet paraffin voks ved højst 60 °C. Vævsprøver skal skæres i snit på 3-5 µm.

Objektglassene, der kræves til HER2-onkoproteinevaluering og verificering af svulsttilstedeværelse, bør klargøres på samme tid. For at bevare antigeniciteten skal vævssnit, der er monteret på objektglas (Leica BOND Plus Slides – produktkode S21.2113 eller Apex BOND Slides - produktkode 3800040) farves inden 4-6 uger efter de er skåret, hvis de opbevares ved stuetemperatur (18-24 °C). Efter skæring anbefales det, at objektglassene inkuberes i 12-18 timer (natten over) ved 37 °C. Snit, der kræver yderligere montering, kan inkuberes ved 60 °C i yderligere en time.

I USA kræver Clinical Laboratory Improvement Act fra 1988 i 42 CFR 493.1259 (b) at "Laboratoriet skal opbevare farvede objektglas i mindst ti år efter undersøgelsesdatoen samt opbevare prøveblokke i mindst to år efter undersøgelsesdatoen".

## Advarsler og forholdsregler

*Må kun anvendes af uddannet fagpersonale.*

En eller flere af komponenterne i produktet er sundhedsskadelige.

Som hovedregel må personer under 18 år ikke arbejde med produktet. Brugere skal have grundig indføring i de rigtige arbejdsprocedurer, produktets sundhedsskadelige egenskaber og nødvendige sikkerhedsforanstaltninger.

Symptomer på overeksponering for ProClin™ 950, der anvendes som konserveringsmiddel i Oracle-reagenser, kan omfatte lokalirritation af øjne og hud samt irritation af slimhinder og de øvre luftveje. Koncentrationen af ProClin™ 950 i dette produkt er op til maks. 0,35 %. Disse løsninger opfylder ikke OSHA-kriterierne for sundhedsskadelig substanser. Et Material Safety Data Sheet kan rekvireres eller findes på [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com).

Prøver skal før og efter fiksering, ligesom alle materialer eksponeret for prøverne, håndteres som potentielt smittefarlige og bortskaffes under iagttagelse af passende forholdsregler.

Pipetter aldrig reagenser med munden og undgå, at reagenser og prøver kommer i kontakt med huden eller slimhinder. Hvis reagenser eller prøver kommer i kontakt med følsomme områder, skal der skylles efter med rigelige mængder vand. Søg læge. Konsulter landsdækkende og lokale love og regler vedrørende bortskaffelse af alle potentielt toksiske komponenter.

Minimer mikrobiel kontaminering af reagenserne, da der ellers kan forekomme øget uspecifik farvning.

## Procedure

### A. Nødvendige reagenser, der ikke medfølger

- BOND Dewax Solution (produktkode AR9222)
- BOND Epitope Retrieval Solution 1 (produktkode AR9961)
- BOND Wash Solution x10 Concentrate (produktkode AR9590)
- Standardopløsningsmidler anvendt i immunhistokemi (f.eks. ethanol, absolut og 95 %)
- Xylen (eller xylen-erstatninger)
- Monteringsmedium
- Destilleret eller de-ioniseret vand

### B. Nødvendigt udstyr, der ikke medfølger

- Leica Biosystems' BOND-MAX og BOND-III fuldautomatiske avancerede farvningssystem(er)
- BOND Universal Covertiles™ (produktkode S21.2001, S21.4583 eller S21.4611)
- BOND Mixing Stations (produktkode S21.1971)
- Tørreovn, som er i stand til at opretholde 60 °C
- Lysmikroskop (4-40x objektivforstørrelse)
- Objektglas (Leica BOND Plus Slides – produktkode S21.2113 eller Apex BOND Slides - produktkode 3800040)

- Dækglas
- BOND Slide Label & Print Ribbon (produktkode S21.4564)
- BOND Aspirating Probe Cleaning System (produktkode CS9100)

## C. Metodologi

- Inden ibrugtagning af denne metodologi skal brugeren være oplært i "BOND"-fuldautomatiserede immunhistokemiske teknikker.
- For hvert prøvesnit, der skal farves med HER2 Primary Antibody, skal der farves et identisk snit med HER2 Negative Control. Det negative kontrolsnit muliggør differentiering mellem specifik og uspecifik farvning på antigen-stedet. Hver BOND-farvningskørsel skal indeholde et HER2 Control Slide. Hvis cellelinjerne ved slutningen af farvningsprotokollen ikke demonstrerer de korrekte farvningsmønstre (se Bond Oracle HER2 IHC System Interpretation Guide), skal kørslen anses for at være ugyldig.

## D. Oversigt over objektglas

Der skal bruges en ny BOND Universal Covertile (produktkode S21.2001, S21.4583 eller S21.4611) for hvert objektglas. Brugen af BOND Universal Covertiles, som tidligere har været brugt til enten immunhistokemisk eller in-situ-hybridiseringsfarvning er ikke blevet valideret til denne test.

Objektglasbakkens opbygning (tabel 2) sikrer, at Bond Oracle HER2 IHC System reagerer optimalt, så alle 60 test kan anvendes.

Place- ring af objekt- glas	Beskrivelse af objektglas	Reagens	Vævs- type	Objektglasikon
1	Tilfælde 1	*HER2 Negative Control	Test	
2	Tilfælde 2	*HER2 Negative Control	Test	
3	Tilfælde 3	*HER2 Negative Control	Test	
4	Tilfælde 4	*HER2 Negative Control	Test	
5	Tilfælde 1	*HER2 Primary Antibody	Test	
6	Tilfælde 2	*HER2 Primary Antibody	Test	
7	Tilfælde 3	*HER2 Primary Antibody	Test	
8	Tilfælde 4	*HER2 Primary Antibody	Test	
9	HER2 Control Slide	*HER2 Primary Antibody	Positiv	
10	In-house- vævskontrol	*HER2 Primary Antibody	Positiv	

Tabel 2. Objektglasbakkens opbygning med visning af vævstype og reagens



## E. Proceduretrin

Følg nedenstående trin for at klargøre en objektglasbakke med den opbygning, der er beskrevet i tabel 2. Disse anvisninger skal læses sammen med BOND System User Manual.

1. Sørg for, at beholderne til sundhedsfarligt affald på BOND -instrumentet har tilstrækkelig kapacitet til de nødvendige farvningskørsler.
2. Sørg for, at der er tilstrækkeligt alkohol, destilleret eller de-ioniseret vand, BOND Dewax Solution (leveres klar-til-brug), BOND Epitope Retrieval Solution 1 (leveres klar-til-brug) og BOND Wash Solution (leveres som x10 koncentrat) i reagensbeholderne til de nødvendige farvningskørsler.
3. Sørg for, at der er monteret en ren BOND Mixing Station.
4. Tænd det fuldautomatiske, avancerede BOND-farvningssystem.
5. Tænd den BOND controlleren, der er sluttet til det fuldautomatiske, avancerede BOND-farvningssystem.
6. Åbn BOND-softwaren.
7. Hvis du anvender et nyt Bond Oracle HER2 IHC System, skal stregkoderne på reagensbakken scannes med en håndholdt scanner, så systemet anføres på BOND-reagenslisten.
8. Gå til skærmen til opsætning af objektglas, og klik på **Add case**.
9. Indtast oplysningerne for det første tilfælde. Sørg for, at dispenseringsvoluminen indstilles til 150 µL, og at klargøringsprotokollen er **\*Dewax**. Klik på OK.
10. Kontrollér, at tilfældet er fremhævet på skærmen til opsætning af objektglas, og klik på **Add slide**.
11. Tilføj først patienttestobjektglas. Sørg for, at vævstypen er indstillet til **Test tissue**.
12. Bekræft, at dispenseringsvoluminen indstilles til **150 µL**, og at klargøringsprotokollen er **\*Dewax**.
13. Vælg farvningsstilstandsværdien **Single** og **Oracle** (klik ikke på **Oracle control**).
14. Vælg processen **IHC**.
15. Vælg **\*HER2 Negative Control** fra listen. Fanen Protokoller vælger som standard den rigtige farvningsprotokol (**\*IHC Protocol H**) og HIER-protokol (**\*HIER 25 min with ER1 (97)**).
16. Klik på **Add slide**. Objektglasset med negativ kontrolreagens oprettes.
17. Vælg i dialogboksen "Add slide" **\*HER2 Primary Antibody** fra listen. Standardprotokoller og alle andre indstillinger forbliver uændret.
18. Klik på **Add slide**. Testobjektglasset oprettes.
19. Gentag trin 8 til 18, indtil alle tilfælde og patienttestobjektglas er oprettet.
20. Opret derefter HER2 Control Slide. Føj det til det sidste tilfælde, eller opret et nyt tilfælde for kontrolobjektglas afhængigt af standardpraksis på laboratoriet.  
**Vigtigt!** Det er nødvendigt i Bond Oracle HER2 IHC System, at der indgår et HER2-kontrolobjektglas i hver kørsel (dvs. objektglasbakke), for at analysen er gyldig.
21. I dialogboksen "Add slide" skal vævstypen indstilles til **Positive tissue**.
22. Klik på **Oracle control**.

23. Vælg lotnummer for HER2 Control Slide på listen **Lot No**. Lotnummeret fremgår af mærkatområdet på objektglasset.

**Vigtigt!** HER2 Control Slide skal komme fra det Bond Oracle HER2 IHC System, der skal bruges.

24. Vælg **\*HER2 Primary Antibody** fra listen. Bevar dispenseringsvolumen, farvningstilstand, proces og protokolindstillinger.

25. Klik på **Add slide** for at tilføje HER2 Control Slide.

26. Tilføj til sidst et positivt in-house-vævskontrolobjektglas.

27. Fravælg **Oracle control**.

28. Vælg **\*HER2 Primary Antibody** fra listen. Bevar dispenseringsvolumen, farvningstilstand samt proces og protokolindstillinger. Vævstypen forbliver **Positive tissue**.

29. Klik på **Add slide**. Oprettelsen af objektglas er nu afsluttet.

30. Udskriv objektglasmærkater. Alle Oracle -objektglasmærkater har "OC" påtrykt. Mærkaten til HER2 Control Slide indeholder også lotnummeret til Bond Oracle HER2 IHC System.

31. Sæt mærkaterne på objektglassene.

32. Åbn lågene på alle Bond Oracle HER2 IHC System-beholdere, og anbring reagensbakken på BOND.

33. Anbring objektglassene på objektglasbakken i den rækkefølge, der er angivet i afsnit D, tabel 2. Anvend nye Covertiles.

34. Anbring objektglasbakken på BOND, og tryk på knappen **Load/Unload**.

35. Bekræft, at objektglassene er blevet scannet, og klik på knappen **Run (Play)** på skærmen Systemstatus.

36. Sørg for, at **Proc (OK)** vises i bakkeindikatorfeltet, og at batchnummer og afslutningstid vises.

37. Når kørslen er afsluttet, skal du trykke på knappen **Load/Unload** og fjerne objektglasbakkerne fra BOND.

38. Fjern Covertiles, og rens objektglassene med de-ioniseret vand.

39. Dehydrer, rens og monter snit.

## Kvalitetskontrol

Forskelle i vævsfiksering, behandling og indstøbning i brugerens laboratorium kan medføre signifikante variationer i resultaterne og nødvendiggøre regelmæssig udførelse af in-house kontroller ud over de HER2 Control Slides, som leveres af Leica Biosystems' i Bond Oracle HER2 IHC System. I USA kan man rådføre sig med retningslinjerne for kvalitetskontrol fra College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry; se også CLSI (tidligere NCCLS) Quality Assurance for Immunocytochemistry, Approved Guideline (17) og Special Report: Quality Control in Immunohistochemistry (18). Se desuden de forskellige immunhistokemiske kvalitetskontroller og deres formål i tabel 3 nedenfor.

Prøve*	Beskrivelse	HER2 Primary Antibody-farvning	HER2 Negative Control-farvning
<b>HER2 Control Slide</b>	Som leveret i Bond Oracle HER2 IHC System.	Kontrollerer farvningsproceduren og indikerer gyldigheden af reagensens effekt.	Detektion af uspecifik baggrundsfarvning
<b>Positiv in-house-kontrolvæv</b>	Væv indeholdende mål-antigen. Den ideelle kontrol er svagt positivt farvet væv, så små forandringer i det primære antistofs sensitivitet kan detekteres.	Kontrollerer alle trin i analysen. Validerer vævsklargøring og Bond Oracle HER2 IHC System-farvningseffekt.	
<b>Negativ in-housekontrolvæskomponent</b>	Væv eller celler, som forventes at være negative (kunne være indeholdt i patientvæv eller positive/negative kontrolvæskomponenter).	Detektion af uspecifik krydsreaktivitet for antistof til celler/cellekomponenter.	

\*Fikseret og behandlet som patientprøve

Tabel 3. Immunhistokemiske kvalitetskontroller og deres formål

Kontrolvævet skal være biopsipræparater eller kirurgiske prøver, der formalinfikseres, behandles og paraffin-indstøbes så hurtigt som muligt på samme måde som patientprøven/patientprøverne. Prøverne skal håndteres korrekt for at konservere vævets antigenicitet med henblik på immunhistokemisk farvning. Standardmetoder for vævsbehandling bør bruges til alle prøver (17).

### HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody

Hvert af de leverede HER2 Control Slides indeholder fire formalinfikserede, paraffinindstøbte humane brystkræft celleinjekterne med farvningsintensitets-scoringer på 0, 1+, 2+ og 3+. Et objektglas bør farves i hver farvningskørsel (dvs. objektglasbakke). Den korrekte evaluering af HER2 Control Slide, som leveres af Leica Biosystems', indikerer testens validitet (se Bond Oracle HER2 IHC System Interpretation Guide). HER2 Control Slides, der følger med dette system, validerer kun reagensens effekt og ikke vævsklargøringen.

### Positiv in-house-kontrolvæskomponent – HER2 Primary Antibody

Hvis de positive in-house-kontrolvæskomponenter anvendes, skal de være friske biopsipræparater eller kirurgiske prøver, der fikseres, behandles og indstøbes så hurtigt som

muligt på samme måde som patientprøven/patientprøverne. Positive vævskontroller tyder på korrekt klargjorte vævsprøver og korrekte farvningsteknikker. En positiv kontrolkomponent bør inkluderes i hver testkørsel. De positive vævskontroller bør vise svag positiv farvning, så de kan afdække underliggende ændringer i det primære antistofs sensitivitet.

**Bemærk!** Kendt positivt kontrolvæv bør kun anvendes til overvågning af den korrekte effekt af behandlede vævsprøver og testreagenser, IKKE som en hjælp til udarbejdelse af en specifik diagnose ud fra patientprøverne. Hvis det positive kontrolvæv ikke viser korrekt positiv farvning, bør resultaterne fra patientprøverne betragtes som ugyldige.

En multivævs-kontrolblok indeholdende svulster fra alle 4 HER2-gradueringer kan også anvendes effektivt som passende in-house-kontrolmateriale.

### **Negativ in-house-kontrolvævs-komponent – HER2 Primary Antibody**

Hvis de negative in-house-kontrolkomponenter anvendes, skal de være friske biopsipræparater eller kirurgiske prøver, der fikseres, behandles og indstøbes så hurtigt som muligt på samme måde som patientprøven/patientprøverne. Brug et kontrolvæv (kendt som værende HER2-onkoprotein-negativ) ved hver farvningskørsel for at verificere specificiteten af det primære antistof og for at give en indikation af uspecifik baggrundsfarvning. Variationen af forskellige celletyper, som er til stede i de fleste vævssnit, giver internt negative kontrolsteder (dette bør verificeres af brugeren). Normale brystkanaler uden svulster kan bruges som reference for analysens validitet. Hvis der forekommer specifik farvning i det interne negative kontrolvæv, bør resultaterne fra patientens prøver betragtes som ugyldige.

En multivævs-kontrolblok fra alle fire HER2-gradueringer kan anvendes til negativt og positivt kontrolvæv.

### **Patientvæv – HER2 Negative Control**

Brug den medfølgende HER2 Negative Control i stedet for HER2 Primary Antibody sammen med et snit af hver patientprøve for at vurdere uspecifik farvning og til at give bedre tolkning af specifik HER2-onkoprotein-farvning på antigen-stedet.

### **Patientvæv – HER2 Primary Antibody**

Intensiteten af positiv farvning bør vurderes i sammenhæng med eventuel uspecifik baggrundsfarvning med HER2 Negative Control. Som med alle immunhistokemiske test betyder et negativt resultat, at antigenet ikke blev påvist, ikke at antigenet var fraværende i de analyserede celler eller det analyserede væv. Se Screeningsrækkefølge for objektglas, Begrænsninger, Reproducerbarhedsforsøg og Immunoreaktivitet for at finde mere specifikke oplysninger om Bond Oracle HER2 IHC System-immunoreaktivitet.

### **Verificering af analysen**

Inden første brug af et antistof eller farvningsssystem i en diagnostisk procedure bør brugeren verificere antistoffets specificitet ved at teste det på en række af laboratoriets egne vævsprøver (in-house) med kendte immuncytokemiske effektivitetskarakteristika, som repræsenterer kendt positivt og negativt væv. Se kvalitetskontrolprocedurerne, der tidligere er beskrevet i denne sektion af indlægssedlen, samt kvalitetskravene i CAP Certification Program for Immunohistochemistry og/eller CLSI (tidligere NCCLS) Quality Assurance for Immunocytochemistry, Approved Guideline (17). Disse kvalitetskontrolprocedurer bør gentages for hver ny antistof-lot, eller når som helst der sker ændringer i analyseparametre. Humant invasive (infiltrerende) brystcarcinomer med kendte HER2-onkoprotein-farvningsintensiteter fra 0 til 3+ og andre egnede negative vævstyper er egnede til analyseverifikation.

## Fortolkning af farvning - Bryst

Til bestemmelse af HER2-onkoprotein-ekspresion bør kun membran-farvningsintensiteten og -mønsteret vurderes ved hjælp af skalaen, der vises i tabel 4. Evalueringen af objektglas bør udføres af en patolog ved brug af et lysmikroskop. Til evaluering af den immunhistokemiske farvning og scoringen er et objektiv med 10x forstørrelse passende. Brugen af et 20-40x forstørrelsesobjektiv er nyttigt til bekræftelse af scoren. Cytoplasmisk farvning bør betragtes som uspecifik farvning og må ikke inkluderes i vurderingen af membran-farvningsintensiteten (19). Bond Oracle HER2 IHC System Interpretation Guide indeholder repræsentative billeder af farvningsintensiteter og kan fungere som hjælp til at skelne mellem 0, 1+, 2+ og 3+ farvning. Der bør kun søges resultater vedrørende prøver fra patienter med invasivt brystcarcinom. I tilfælde med carcinom *in situ* og invasivt carcinom i samme prøve bør der kun ses efter resultater fra den invasive komponent.

Immunhistokemisk farvningsmønster	Score	Vurdering
Der ses ingen farvning, eller membranfarvning ses i mindre end 10 % af svulstcellerne.	0	Negativ
En svag/næsten ikke registrerbar membranfarvning ses i mere end 10 % af svulstcellerne. Cellerne er kun farvede i en del af deres membran.	1+	Negativ
En svag til moderat, fuldstændig membranfarvning ses i mere end 10 % af svulstcellerne.	2+	Dobbelttydigt (Svagt positiv)
En stærk fuldstændig membranfarvning ses i mere end 10 % af svulstcellerne.	3+	Stærkt positiv

Tabel 4. Fortolkning af HER2-farvning

Bond Oracle HER2 IHC System-farvningsresultaterne tolkes som negative for HER2-onkoprotein-ekspresion (0 og 1+ farvningsintensitet), dobbelttydige (svagt positive) (2+ farvningsintensitet) og stærkt positive (3+ farvningsintensitet). Bond Oracle HER2 IHC System er ikke beregnet til at give prognostiske informationer til patienten og/eller lægen og er ikke blevet valideret til dette formål. For hver farvningsvurdering bør objektglassene undersøges i den rækkefølge, der er vist nedenfor for at bestemme farvningskorslens validitet samt for at muliggøre semi-kvantitativ vurdering af vævsprøvernes farvningsintensitet.

## Fortolkning af farvning - mave

Til bestemmelse af HER2-onkoprotein-ekspresion bør kun membran-farvningsintensiteten og -mønsteret vurderes ved hjælp af skalaen, der vises i tabel 5 og 6. Evalueringen af objektglas bør udføres af en patolog ved brug af et lysmikroskop. Til evaluering af den immunhistokemiske farvning og scoringen er et objektiv med 10x forstørrelse passende. Brugen af et 20-40x forstørrelsesobjektiv er nyttigt til bekræftelse af scoren. Cytoplasmisk farvning bør betragtes som uspecifik farvning og må ikke inkluderes i vurderingen af membran-farvningsintensiteten (15). Bond Oracle HER2 IHC System Gastric Interpretation Guide indeholder repræsentative billeder af farvningsintensiteter og kan fungere som hjælp til at skelne mellem 0, 1+, 2+ og 3+ farvning. Kun prøver fra patienter med adenocarcinomer i mave eller i den gastroesophageale forbindelse skal scores.

	<b>Immunhistokemisk farvningsmønster</b>	<b>Score</b>	<b>Vurdering</b>
<b>Kirurgiske prøver</b>	Der ses ingen farvning, eller membranfarvning ses i mindre end 10 % af svulstcellerne.	0	Negativ
	En svag/næsten ikke registrerbar membranfarvning ses i mere end 10 % af svulstcellerne. Cellerne er kun farvede i en del af deres membran.	1+	Negativ
	Svag til moderat komplet, basolateral eller lateral membranfarvning ses i 10 % eller flere af svulstcellerne.	2+	Dobbeltydigt (Svagt positiv)
	En stærk fuldstændig, basolateral eller lateral membranfarvning ses i mere end 10 % af svulstcellerne.	3+	Stærkt positiv

Tabel 5. Fortolkning af HER2-farvning i kirurgiske mavekræftprøver

	<b>Immunhistokemisk farvningsmønster</b>	<b>Score</b>	<b>Vurdering</b>
<b>Biopsiprøver</b>	Der ses ingen farvning i nogen svulstcelle	0	Negativ
	Svulstcellemønstre med en svag/næsten ikke erkendbar membranfarvning ses, uafhængigt af procentdelen af farvede celler	1+	Negativ
	Svulstcellemønstre med svag til moderat fuldkommen, basolateral eller lateral membranfarvning ses, uafhængigt af procentdelen af farvede celler	2+	Dobbeltydigt (Svagt positiv)
	Svulstcellemønstre med kraftig fuldkommen, basolateral eller lateral membranfarvning ses, uafhængigt af procentdelen af farvede celler	3+	Stærkt positiv

Tabel 6. Fortolkning af HER2-farvning i biopsiprøver af mavekræft

Til fortolkning af Bond Oracle HER2 IHC System-farvede biopsier anbefales et mønster på mindst fem svulstceller.

## Screeningsrækkefølge for objektglas

Objektglas skal screenes i følgende rækkefølge:

### 1. HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody

En gyldig analyse med Oracle HER2 Control Slide viser følgende:

- Tilstedeværelse af kraftig brun fuldstændig cellemembranfarvning i 3+ kontrolcellelinjen SK-BR-3.
- Tilstedeværelse af svag til moderat brun fuldstændig cellemembranfarvning i 2+ kontrolcellelinjen MDA-MB-453.
- Tilstedeværelse af svag/næsten ikke registrerbar brun ufuldstændig cellemembranfarvning i 1+ kontrolcellelinjen MDA-MB-175.
- Ingen farvning i 0 kontrolcellelinjen MDA-MB-231.

**Vigtigt!** En egenskab ved MDA-MB-175 1+ kontrolcellelinjen er et tydeligt vækstmønster, som cellerne danner grupper i. Disse grupper danner en kontinuerlig klar grænsezone på tværs af cellegruppen. Denne grænsefarvning er kraftigere end for resten af cellemembranen. Det

er den svage/næsten ikke registrerbare ufuldstændige cellemembranfarvning, som er det korrekte HER2-onkoprotein 1+ farvningsmønster. Der kan også ses pletvis immunofarvning i cytoplasmaens Golgi-område i denne cellelinje.

## 2. Positiv in-house-kontrolvævskomponent – HER2 Primary Antibody

TILSTEDEVÆRELSEN af brun membranfarvning bør kunne ses svarende til den kendte HER2-onkoprotein-status af den valgte positive kontrol.

## 3. Negativ in-house-kontrolvævskomponent – HER2 Positive Control

FRAVÆR af membranfarvning bør kunne ses. Negativt kontrolvævskomponent bekræfter, at der ikke er krydsreaktivitet i sættet mellem celler/cellekomponenter. Hvis der forekommer membranfarvning i en negativ kontrolvævskomponent, bør resultaterne fra patientens prøve betragtes som ugyldig.

## 4. Patientvæv – farvet ved hjælp af HER2 Negative Control

FRAVÆR af specifik membranfarvning verificerer den specifikke mærkning af målantigenet med det primære antistof. Anden brunfarvning, der forekommer i prøvens cytoplasma, som er behandlet med HER2 Negative Control som f.eks. i bindevæv, leukocytter, erythrocytter eller nekrotisk væv, bør betragtes som uspecifik baggrundsfarvning og bør rapporteres i dataarkets kommentarafsnit.

## 5. Patientvæv – farvet ved hjælp af HER2 Primary Antibody

HER2-onkoprotein-ekspressionsniveauer bestemmes ved hjælp af de kriterier, der er beskrevet i tabel 4-6 og i Bond Oracle HER2 IHC System Interpretation Guide.

# Begrænsninger

## A. Generelle begrænsninger

Immunhistokemi er en flertrins laboriebaseret proces, som hjælper med fortolkningen og bestemmelsen af histopatologiske karakteristika. Det er en teknik, som kræver specialiseret træning i alle dele af proceduren (herunder valg af passende reagenser, valg af væv, fiksering, behandling og klargøring af IHC-objektglas) samt tolkning. Immunhistokemisk vævsfarvning er afhængig af den forudgående håndtering, fiksering og behandling af vævet. Ukorrekt fiksering, frysning, optøning, vaskning, tørring, opvarmning, skæring eller forurening med andet væv eller andre væsker kan lede til artefakter, antistoffælder eller falske negative resultater. Ikke-overensstemmende resultater kan skyldes variationer i fikserings- og indstøbningsmetoder eller iboende irregulareteter i selve vævet (21). For megen eller ufuldstændig kontrastfarvning kan kompromittere korrekt tolkning af resultaterne.

Hvis der forekommer uspecifik farvning, har den ofte en diffus fremtoning. Sporadisk farvning af tilstødende væv kan også forekomme i snit fra væv med for kraftig formalinfiksering. Brug intakte celler til tolkning af farvningsresultater. Nekrotiske eller degenererede celler farves ofte uspecifikt (22). Falsk positive resultater kan forekomme på grund af ikke-immunologisk binding af proteiner eller substratreaktionsprodukter. De kan også skyldes endogene enzymer som for eksempel pseudoperoxidaseaktivitet (erythrocytter) og endogen peroxidaseaktivitet (cytochrom C), afhængigt af hvilken type immunhistokemisk farve der bruges.

Væv fra personer, som er inficerede med hepatitis B-virus, og som indeholder hepatitis B overfladeantigen (HBsAg), kan vise uspecifik farvning med peberrodperoxidase (23).

Uventet immunhistokemisk farvning eller variationer i farvningen kan skyldes ændringer i ekspressionsniveauerne i de kodende gener eller antigener. Enhver ændring i de forventede farvningsmønstre skal fortolkes i forbindelse med alle øvrige diagnostiske undersøgelser.

Fortolkningen af immunhistokemisk farvning skal suppleres med morfologiske undersøgelser under anvendelse af egnede kontrolmaterialer og skal evalueres i lyset af patientens kliniske historik og andre diagnostiske test udført af en kvalificeret patolog.

Analysens effekt (dvs. analysen af både de positive og negative kontrollers egnethed) og fortolkningen af enhver immunhistokemisk farvning, eller fraværet heraf, skal foregå i et certificeret, licenshavende laboratorium under overvågning af en kvalificeret og erfaren patolog, som er ansvarlig for den generelle vurdering af den immunhistokemiske analyse og fortolkningen heraf.

## B. Produktspecifikke begrænsninger

Dette produkt er ikke beregnet til brug inden for flow-cytometri. Effekten og egenskaberne er ikke bestemt til flow-cytometri.

Falske negative resultater kan skyldes nedbrydning af antigenet i vævene i tidens løb. Objektglassene, der kræves til HER2-onkoproteinevaluering og verificering af svulsttilstedeværelse, bør klargøres på samme tid. For at bevare antigeniciteten skal vævssnit, der er monteret på objektglas (Leica BOND Plus Slides – produktkode S21.2113 eller Apex BOND Slides - produktkode 3800040) farves inden 4–6 uger efter de er skåret, hvis de opbevares ved stuetemperatur (18-24 °C). Efter skæring anbefales det, at objektglassene inkuberes i 12-18 timer ved 37 °C. Snit, der kræver yderligere montering, kan inkuberes ved 60 °C i yderligere en time.

Det vil ses minimale naturlige variationer i den immunhistokemiske profil mellem de vækstbatches med de cellelinjer, der anvendes i Bond Oracle HER2 IHC System. Den naturlige variation ligger sikkert inden for de acceptable toleranceniveauer for en biologisk enhed og påvirker ikke fortolkningen af systemets ydelse.

Der forekommer også naturlig biologisk variation i egenskaberne for de cellelinjer, der anvender både flow-cytometri og in situ-hybridisering som vist i tabel 7. Der rapporteres også teknisk og fortolkningsmæssig variation i kontrolcellelinjer, der vurderes via fluorescens in situ-hybridisering (FISH) (24).

Ved vurderingen af HER2 Control Slides skal der tages hensyn til alle relevante udløbsdatoer. Opbevar Bond Oracle HER2 IHC System ved 2-8 °C. Må ikke fryses. Anbringes igen i temperaturer mellem 2 og 8 °C lige efter brug. Hvis der afviges fra disse betingelser, er testen ugyldig.

Erstat ikke Bond Oracle HER2 IHC System-reagenser med andre komponenter fra Leica Biosystems' eller andre producenter. Det vil resultere i, at testen bliver ugyldig.

Det er vigtigt, at alle trin, der er beskrevet i afsnit C til E (Procedure), udføres i den beskrevne rækkefølge. Hvis der afviges fra denne rækkefølge, er testen ugyldig.

Det er vigtigt, at der kun anvendes væv, som er fikseret i formalinbaserede fiksativer, til testen. Brugen af andre typer fiksativer betyder, at testen er ugyldig.

Vævssnit, der ligger uden for den anbefalede tykkelse, er ikke blevet valideret. Brugen af andre snittykkelse kan betyde, at testen er ugyldig.

## Cellelinjedata

Cellelinje	Bond Oracle HER2 IHC System-profil	HER2 -receptorbelastning per celle*	HER2-genamplifikationsstatus <sup>+</sup>	
			HER2-kopinummer	HER2:Kr.17 genkvotient
SK-BR-3	3+	4,3x10 <sup>5</sup>	13,35	3,55
MDA-MB-453	2+	1,4x10 <sup>5</sup>	5,73	2,05
MDA-MB-175	1+	6,3x10 <sup>4</sup>	3,33	1,20
MDA-MB-231	0	9,3x10 <sup>3</sup>	3,15	1,13

\*HER2-receptorbelastningsanalyse vurderet ved flow-cytometri. <sup>+</sup> HER2-genamplifikationsstatus vurderet ved dobbeltprøve (HER2:kromosom 17) FISH.

Tabel 7. HER2 Control Slide-profil



## Klinisk overensstemmelse for Bond Oracle HER2 IHC System v Dako HercepTest - Bryst

Som en del af forsøget undersøgte man egnetheden af Bond Oracle HER2 IHC System til brug som en hjælp ved bestemmelsen af behandling med Herceptin® (trastuzumab)-terapi. Forsøget blev designet med henblik på at undersøge overensstemmelsen mellem Bond Oracle HER2 IHC System og Dako HercepTest, der anses for at være den "gyldne standard" for denne test. Acceptanskriteriet blev defineret som større end 75 % generel overensstemmelse mellem de to test med et konfidensinterval (CI) på 95 %.

Forsøget blev gennemført som et USA-baseret blindforsøg to steder. Hvert forsøgssted blev forsynet med formalinfikserede, paraffinindstøbte brystkræftprøver med kendt HER2-status. Tilfældene blev valgt i omvendt konsekutiv rækkefølge i forhold til de kliniske arkiver, der repræsenterer det konsekutive flow af tilfælde i en histopatologisk afdeling for klinisk test og blev testet uafhængigt for andre prognostiske og/eller forudsigelige faktorer uden bias introduceret i gruppen. Grupper med 160 og 292 prøver blev testet på forsøgssted 1 og forsøgssted 2. Hver gruppe havde samme repræsentation af dobbelttydige/positive (2+, 3+) og negative (0, 1+) tilfælde baseret på tidligere tildelte HER2 IHC-scoringer, hvilket resulterede i en prøvepopulation på 452 prøver i alt. Tolv (12) prøver blev anset for uegnede, da de ikke indeholdt tilstrækkelig invasiv svulst, og de blev taget ud af forsøget. Yderligere ni (9) prøver kunne ikke vurderes, da vævet løftede sig fra objektglassets overflade, hvilket resulterede i en endelig forsøgspopulation på 431 prøver.

Alle tilfælde blev farvet med HercepTest i henhold til producentens anvisninger som angivet på pakkens indlægsseddel. Sekventielle snit fra hvert tilfælde blev farvet med Bond Oracle HER2 IHC System på et automatiseret Leica Biosystems' BOND fuldautomatisk avanceret farvningssystem. Alle tilfælde blev rensset for unikke patientidentificerende oplysninger og blev forsynet med kliniske data vedrørende svulststørrelse, svulststadie, svulstgrad og østrogenreceptor-status.

Alle farvede objektglas blev maskeret og vurderet randomiseret af uddannede observatører på de to forsøgssteder. For 2x2 overensstemmelsesanalysen blev resultaterne fortolket som negative, hvis farvningsintensiteten var 0 eller 1+, og som positive, hvis farvningsintensiteten var 2+ eller 3+. For 3x3 overensstemmelsesanalysen blev resultaterne fortolket som negative, hvis farvningsintensiteten var 0 eller 1, som dobbelttydige, hvis farvningsintensiteten var 2+, og som positive, hvis farvningsintensiteten var 3+. Dataene blev derefter analyseret for positiv farvningsoverensstemmelse og negativ farvningsoverensstemmelse.

### 2x2 Overensstemmelsesresultater

I denne primære analyse kategoriseres resultaterne fra de to test (Bond Oracle HER2 IHC System og Dako HercepTest) som negative (0,1+) eller positive (2+, 3+). Frekvenserne for fire mulige kombinationer vises i et 2x2 tabelformat (se tabel 8). Derefter blev den generelle overensstemmelse baseret på denne 2x2 tabel beregnet ud fra et nøjagtigt overensstemmelsesinterval på 95 % (baseret på binomial fordeling).

Nulhypotesen ( $H_0$ ), som succeskriterierne vurderes ud fra, er, at overensstemmelsen ikke er større end 75 %.

Den observerede overensstemmelse for 431 prøver mellem de to test i en 2x2-analyse viser en overensstemmelse på 92,34 % (398/431) med 95 % CI for 89,42 %-94,67 %. Disse data understøtter afvisningen af nulhypotesen ( $H_0$ ) om, at overensstemmelsen ikke var større end 75 % med  $p$ -værdi  $< 0,0001$ . Procentdelen af positiv overensstemmelse (følsomhed) eller Bond Oracle HER2 IHC System's evne til korrekt at identificere HercepTest -positive tilfælde (procentdelen af prøver, der blev vurderet som positive af både Bond Oracle HER2 IHC System og HercepTest ud af alle HercepTest-positive tilfælde) var 84,87 % (129/152) med 95 % CI for 78,17 %-90,16 %. Procentdelen af negativ overensstemmelse (specificitet) eller testens evne til korrekt at identificere HercepTest-negative tilfælde (procentdelen af prøver, der blev vurderet som negative af både Bond Oracle HER2 IHC System og HercepTest ud af alle HercepTest-negative tilfælde) var 96,42 % (269/279) med 95 % CI for 93,51 %-98,27 %.

		HercepTest		
		Negativ	Positiv	I alt
Bond Oracle HER2 IHC System	Negativ	269	23	292
	Positiv	10	129	139
	I alt	279	152	431

2x2 overensstemmelse (95 % CI) = 92,34 % (89,42 til 94,67 %);  $p < 0,0001$

Tabel 8. 2x2 overensstemmelse for Bond Oracle HER2 IHC System med HercepTest

### 3x3 Overensstemmelsesresultater

Dataene blev grupperet som negative (0 eller 1+), dobbelttydige (2+) eller positive (3+) for 3x3-analysen og viste en overensstemmelse på 86,54 % (373/431) med 95 % CI for 82,95 % til 89,62 %. Derfor blev nulhypotesen ( $H_0$ ) om, at overensstemmelsen ikke var større end 75 % med  $p\text{-værdi} < 0,0001$ , afvist. Procentdelen af positiv overensstemmelse for 3+ (procentdelen af prøver, der blev vurderet som 3+ positive af både Bond Oracle HER2 IHC System og HercepTest ud af alle 3+ HercepTest-positive tilfælde) i dette forsøg, var 73,33 % (66/90) med 95 % CI for 62,97 % til 82,11 %. Procentdelen af negativ overensstemmelse var 96,42 % (269/279) med 95 % CI for 93,51 % til 98,27 %. Se tabel 9.

		HercepTest			
		Negativ (0 eller 1+)	2+	3+	I alt
Bond Oracle HER2 IHC System	Negativ (0 eller 1+)	269	23	0	292
	2+	10	38	24	72
	3+	0	1	66	67
	I alt	279	62	90	431

3x3 overensstemmelse (95 % CI) = 86,54 % (82,95 % til 89,62 %);  $p < 0,0001$

Tabel 9. 3x3 overensstemmelse for Bond Oracle HER2 IHC System med HercepTest

Konklusionen er, at de data, som dette forsøg genererede, viste, at Bond Oracle HER2 IHC System kan bruges som en hjælp i bestemmelsen af behandlingen for Herceptin® (trastuzumab)-terapi baseret på sin store overensstemmelse med HercepTest.

## Klinisk overensstemmelse for Bond Oracle HER2 IHC System v PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Bryst

Del 2 af forsøget var designet med henblik på at undersøge overensstemmelsen mellem Bond Oracle HER2 IHC System og Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, der anses for at være den "gyldne standard" for genvurderende refleks-analyser anvendt sammen med HER2-immunhistokemi.

Dette forsøg blev gennemført på samme forsøgssteder og anvendte samme forsøgsgruppen som i del 1. Alle tilfælde blev farvet med Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit i henhold til producentens anvisninger som angivet på pakkens indlægsseddel. Sekventielle snit fra hvert tilfælde blev farvet med Bond Oracle HER2 IHC System på et BOND fuldautomatisk avanceret farvningssystem (fra del 1 af det kliniske forsøg). I de 431 tilfælde, der blev farvet, blev der ikke fundet noget resultat i tre tilfælde som følge af utilstrækkelig prøve-hybridisering, hvilket resulterede i en gruppe på 428 tilfælde i alt.

Alle farvede objektglas blev vurderet af uddannede observatører på to forsøgssteder. For 3x2-overensstemmelsesanalysen blev scoringerne fortolket som negative, hvis HER2/CEP17-genforstærkningskvotienten var mindre end ( $<$ ) 2,0, og positiv, hvis den var større end eller lig med ( $>$ ) 2,0 efter en svulstcelletælling på 20.

### 3x2 Overensstemmelsesresultater

Den observerede overensstemmelse for 428 prøver mellem de to test i en 3x2-analyse viser en overensstemmelse på 87,6 % (375/428) med 95 % CI for 84 % til 90 %.

Procentdelen af positiv overensstemmelse (følsomhed) eller Bond Oracle HER2 IHC System's evne til korrekt at identificere PathVysion -positive tilfælde (procentdelen af prøver, der blev vurderet som positive af både Bond Oracle HER2 IHC System og HercepTest ud af alle PathVysion-positive tilfælde) var 93,8 % (61+30/97) med 95 % CI for 86,8 % til 97,4 %.

Procentdelen af negativ overensstemmelse (specificitet) eller testens evne til korrekt at identificere PathVysion-negative tilfælde (procentdelen af prøver, der blev vurderet som negative af både Bond Oracle HER2 IHC System og PathVysion ud af alle PathVysion-negative tilfælde) var 85,8 % (284/331) med 95 % CI for 81,6 % til 89,2 %. Se tabel 10.

		PathVysion HER-2 DNA Probe Kit		
		Negativ	Positiv	I alt
Bond Oracle HER2 IHC System	0/1+	284	6	290
	2+	41	30	71
	3+	6	61	67
	I alt	331	97	428

Generel overensstemmelse (95 % CI) = 87,6 % (84 til 90 %)

Tabel 10. 3x2 Overensstemmelse mellem Bond Oracle HER2 IHC System-farvning og PathVysion HER-2 DNA Probe-sættet.

## Klinisk overensstemmelse mellem Bond Oracle HER2 IHC System og Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) primært monoklonalt antistof fra kanin - mave

Målet med del 3 af undersøgelsen var at generere data fra formalinfixerede, paraffinindlejrede prøver af mavecancer i et fremskredet stadie, at undersøge overensstemmelsen mellem det fuldt automatiserede Bond Oracle HER2 IHC System på det fuldt automatiserede avancerede BOND-farvningssystem ved hjælp af Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) primært monoklonalt antistof fra kanin. Acceptkriteriet for del 3 var defineret som højere end 75 % overensstemmelse mellem de to test.

For 2x2-overensstemmelsesanalysen blev resultaterne fortolket som negative, hvis farvningsintensiteten var 0 eller 1+, og som positive, hvis farvningsintensiteten var 2+ eller 3+. For 3x3-overensstemmelsesanalysen blev resultaterne fortolket som negative, hvis farvningsintensiteten var 0 eller 1, som dobbelttydige, hvis farvningsintensiteten var 2+, og som positive, hvis farvningsintensiteten var 3+. Dataene blev også analyseret for positiv farvningsoverensstemmelse og negativ farvningsoverensstemmelse.

## Resultater - Bond Oracle HER2 IHC System vs. Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) primært monoklonalt antistof fra kanin - mave

### 2x2 Overensstemmelsesresultater

Overensstemmelse mellem det fuldt automatiserede the Bond Oracle HER2 IHC System ved brug af det fuldt automatiserede BOND-farvningssystem og Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) blev testet på 287 prøver.

Den observerede overensstemmelse mellem de to test i en 2x2-analyse var på 95,12 % (273/287) med 95 % CI på 91,95 % - 97,31 %. Disse data understøtter afvisningen af nulhypotesen (H0) om, at overensstemmelsen ikke var større end 75 % med p-værdi < 0,0001. Procentdelen af positiv overensstemmelse (følsomhed) eller evnen hos Bond Oracle HER2 IHC System (Bond max-instrument) til korrekt at identificere prøver, der var positive for Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) (procentdelen af prøver, der blev vurderet som positive af både Bond Oracle HER2 IHC System og Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) af alle de prøver, der var positive for Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5)), var 90,79 % (138/152) med 95 % CI på 85,03 % - 94,87 %. Procentdelen af negativ overensstemmelse (specificitet) eller testens evne til at foretage korrekt identificering af negative tilfælde af Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) (den procentdel af prøverne, der er angivet som negative af både Bond Oracle HER2 IHC System og Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) af alle negative prøver af Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5)) var 100 % (135/135) med 95 % CI på 97,30 % - 100 % (se tabel 11).

		Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5)		
		Negativ	Positiv	I alt
Bond Oracle HER2 IHC System	Negativ	135	14	149
	Positiv	0	138	138
	I alt	135	152	287

Samlet overensstemmelse (95 % CI) = 95,12 % (91,95 % - 97,31 %)

Tabel 11. 2x2-overensstemmelse mellem Bond Oracle HER2 IHC System staining og Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) primært monoklonalt antistof fra kanin på mavevæv.

### 3x3 Overensstemmelsesresultater

Den observerede overensstemmelse mellem de to test i en 3x3-analyse var 89,90 % (258/287) med 95 % CI på 85,81 % til 93,13%. Derfor blev nulhypotesen ( $H_0$ ) om, at overensstemmelsen ikke var større end 75 % med  $p$ -værdi  $< 0,0001$ , afvist. Procentdelen af positiv overensstemmelse for 3+ eller evnen hos Bond Oracle HER2 IHC System til korrekt at identificere prøver, der var positive for Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) (procentdelen af prøver, der blev vurderet som 3+ positive af både Bond Oracle HER2 IHC System og Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) af alle de prøver, der var positive for 3+ Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5)) i denne undersøgelse var 85,94 % (110/128) med 95 % CI for 78,69 % - 91,45%. Procentdelen af negativ overensstemmelse (specificitet) eller testens evne til at foretage korrekt identificering prøver, der var negative for Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) (den procentdel af prøverne, der er angivet som negative af både Bond Oracle HER2 IHC System og Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) af alle de prøver, der var negative for Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5)), var 100 % (135/135) med 95 % CI på 97,30 % - 100 %. Se tabel 12.

		Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5)			
		Negativ (0 eller 1+)	2+	3+	I alt
Bond Oracle HER2 IHC System	Negativ (0 eller 1+)	135	11	3	149
	2+	0	13	15	28
	3+	0	0	110	110
	I alt	135	24	128	287

Samlet overensstemmelse (95 % CI) = 89,90 % (85,81 % - 93,13 %)

*Tabel 12. 3x3-overensstemmelse mellem farvning med Bond Oracle HER2 IHC System og Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) primært monoklonalt antistof fra kanin på mavevæv.*

## Immunoreaktivitet – Normalt panel

Normal vævstype	Farvningsmønstre	
	HER2 Primary Antibody	HER2 Negative Control
Binyre	Negativ	Negativ
Hjerne, cerebellum	Negativ	Negativ
Hjerne, cerebrum	Negativ	Negativ
Bryst	Negativ	Negativ
Knoglemarv	Negativ	Negativ
Colon	Negativ	Negativ
Esophagus	Negativ	Negativ
Øje	Negativ	Negativ
Hypofyse	Moderat cytoplasmatisk farvning observeret i hypofyseceller (1/3)	Negativ
Nyre	Negativ	Negativ
Larynks	Negativ	Negativ
Lever	Negativ	Negativ
Lunge	Negativ	Negativ
Mesothel	Negativ	Negativ
Ovarie	Negativ	Negativ
Pancreas	Negativ	Negativ
Parathyreoid	Negativ	Negativ
Perifer nerve	Negativ	Negativ
Prostata	Negativ	Negativ
Spytkirtel	Negativ	Negativ
Hud	Negativ	Negativ
Tyndtarm	Negativ	Negativ
Milt	Negativ	Negativ
Mave	Svag cytoplasmisk farvning observeret i kirtlerne i maven (2/3)	Negativ
Tværstribet muskel	Negativ	Negativ
Testis	Negativ	Negativ
Thymus	Negativ	Negativ
Thyreoid	Negativ	Negativ
Tonsil	Negativ	Negativ
Livmoderhals	Negativ	Negativ
Uterus	Negativ	Negativ

Tabel 13. Normal paneifarvning

# Reproducerbarhedsforsøg

## Præcisionstest inden for og mellem

Præcisionstesten blev gennemført hos Leica Biosystems, Newcastle Ltd. Det anvendte væv var formalinfikseret, paraffinindstøbt TMA-væv (Tissue Micro Array) leveret af Isu Abxis (Yonsei University Medical Center 134 Shinchon-dong, Seoul, 120-752 Korea), som bestod af 20 stk. vævskerner med invasiv brystcarcinomen med en diameter på 4 mm. De 20 tilfælde blev valgt ud fra tidligere tildelte HER2-vurderinger. På den baggrund blev x5 tilfælde af HER2 3+, x5 tilfælde af HER2 2+, x5 tilfælde af HER2 1+ og x5 tilfælde af HER2 0 inkluderet.

### A. Præcisionstest inden for kørsler

Inden for kørslen blev præcisionstesten af Bond Oracle HER2 IHC System evalueret på i alt 40 konsekutive snit fra en TMA bestående af 20 invasive brystsvulster og 40 HER2 Control Slides. Alle snit blev farvet med Bond Oracle HER2 IHC System på det fuldautomatiske avancerede BOND-farvningssystem. Snittene blev farvet i en kontinuerlig periode ved hjælp af Bond Oracle HER2 IHC System fra samme batch. De farvede snit blev vurderet randomiseret blindt af en enkelt erfaren observatør med henblik på at bestemme præcisionen inden for kørslen.

En evaluering af objektglassene fra undersøgelsen inden for kørslen indikerede, at 733/800 (91,63 %) testdatapoint kunne fortolkes. 40 datapoint blev ekskluderet udelukkende på grund af tilstedeværelsen af DCIS, og yderligere 27 datapoints kunne ikke fortolkes som følge af tab af invasiv svulst (specifik for 3 kerner). Der forekom variationer i farvningen i 61 (8,32 %) ud af 733 mulige farvninger. I 37 tilfælde blev der observeret variation fra 3+ til 2+ (n = 20) og fra 1+ til 0 (n = 17), hvilket ikke var udtryk for en ændring fra klinisk positiv til klinisk negativ eller omvendt i en 2x2 datavurdering. De resterende 24 (3,27 %) tilfælde var udtryk for en ændring fra klinisk negativ (0 eller 1+) til klinisk positiv (2+ eller 3+). Godkendelsesværdi = 96,7 % (95 % CI = 95,15 % til 97,81 %).

### B. Præcisionstest mellem kørsler

Mellem kørslen blev præcisionstesten af Bond Oracle HER2 IHC System evalueret på i alt 24 konsekutive snit fra en TMA bestående af 20 invasive brystsvulster og 24 HER2 Control Slides. Alle snit blev farvet med Bond Oracle HER2 IHC System på det fuldautomatiske avancerede BOND-farvningssystem. Objektglassene blev evalueret ved 8 uafhængige kørsler foretaget på samme laboratorium ved tre separate lejligheder ved hjælp af et Bond Oracle HER2 IHC System fra samme batch. De farvede objektglas blev vurderet randomiseret blindt af en enkelt erfaren observatør med henblik på at bestemme præcisionen mellem kørslen.

En evaluering af objektglassene fra undersøgelsen mellem kørslen indikerede, at 456/480 (95,00 %) testdatapoint kunne fortolkes. 24 datapoint kunne ikke fortolkes som følge af tab af invasiv svulst (specifik for 5 kerner). Der forekom variationer i farvningen i 42 (9,21 %) ud af 456 datapoint. I 30 tilfælde blev der observeret variation fra 3+ til 2+ (n = 10) og fra 1+ til 0 (n = 20), hvilket ikke var udtryk for en ændring fra klinisk positiv til klinisk negativ eller omvendt i en 2x2 datavurdering. De resterende 12 (2,63 %) var udtryk for en ændring fra klinisk negativ (0 eller 1+) til klinisk positiv (2+ eller 3+). Godkendelsesværdi = 97,37 % (95 % CI = 95,90 % til 98,77 %).

### C. Reproducerbarhed lot-til-lot

For at bestemme reproducerbarheden lot-til-lot blev der fremstillet 3 lot med Bond Oracle HER2 IHC System under GMP ved 3 separate lejligheder, ligesom der blev evalueret på 24 brystsvulstsnit (24 testdatapoint) taget fra fire forskellige formalinfikserede, paraffinindstøbte vævsblokke (repræsenterende HER2-farvningsintensiteterne 0, 1+, 2+ og 3+) og tre HER2 Control Slides (12 kontroldatapoint). Der blev foretaget tre uafhængige kørsler på samme laboratorium ved tre separate lejligheder, og hver gang blev der anvendt et separat lot Bond Oracle HER2 IHC System. Alle snit blev farvet med Bond Oracle HER2 IHC System på det fuldautomatiske avancerede BOND-farvningssystem. De farvede objektglas blev maskeret og vurderet randomiseret af en enkelt uddannet observatør med henblik på at bestemme reproducerbarheden lot-til-lot.

En evaluering af objektglassene (test og kontroller) fra lot-til-lot-undersøgelsen indikerede, at 36/36 datapoint kunne fortolkes. Der forekom ikke variation i farvningen i de 36 datapoint mellem de tre forskellige lot Bond Oracle HER2 IHC System. Farvning med Bond Oracle HER2 IHC System er konsistent på tværs af batches.

## D. Reproducerbarhed mellem laboratorier

Reproducerbarheden af Bond Oracle HER2 IHC System mellem laboratorier blev evalueret 3 steder, Leica Biosystems Newcastle (sted A) og to uafhængige laboratorier (sted B og C) på i alt 192 snit fra en TMA bestående af 20 invasive brystsvulster og 24 HER2 Control Slides. Af de 192 farvede TMA-snit blev 96 farvet med HER2 Primary Antibody og 96 med HER2 Negative Control-reagens. Alle snit blev farvet med Bond Oracle HER2 IHC System på det BOND fuldautomatiske avancerede farvningssystem. Objektglassene blev evalueret ved 8 uafhængige kørsler foretaget på hver af de tre forskellige laboratorier ved tre separate lejligheder ved hjælp af et Bond Oracle HER2 IHC System fra samme batch. De farvede objektglas blev vurderet randomiseret blindt af en enkelt erfaren observatør hos Leica Biosystems, Newcastle med henblik på at bestemme reproducerbarheden mellem laboratorier.

En evaluering af objektglassene fra undersøgelsen af reproducerbarheden mellem laboratorier indikerede, at 1477/1920 (76,93 %) testdatapoint kunne fortolkes. 443 testdatapoint kunne ikke fortolkes af følgende grunde:

- Utilstrækkelige ydelse af HER2 -kontrolobjektglasset ved 2/24 lejligheder, hvilket resulterede i, at 2 kørsler/160 testdatapoint blev fjernet. Denne hændelse forekom en gang på sted A og en gang på sted B (80 datatestpoint per laboratorium fjernet).
- Afvigelse fra testplanen på sted C, hvor 24 objektglas i alt blev kontrastfarvet manuelt med hæmatoxylin efter Bond Oracle HER2 IHC System-farvning. Det resulterede i overdreven kontrastfarvning af både HER2-kontrolobjektglassene og TMA-testdatapoint, hvilket resulterede i, at 240 datapoint blev fjernet.
- Tab af invasiv svulst, hvilket resulterede i, at 23 testdatapoint blev fjernet. Denne hændelse forekom ved 23 lejligheder på sted A og var et direkte resultat af tabet af væv i TMA-blokken ved fremstilling af de 192 konsekutive TMA-snit, der var nødvendige for at gennemføre undersøgelsen.
- Farvningen kan ikke fortolkes som følge af utilstrækkelig vask med det fuldautomatiske, avancerede BOND-farvningssystem, hvilket resulterede i, at 20 datapoint blev fjernet.

En evaluering af undersøgelsen af præcisionen mellem laboratorier af de objektglas, der kunne fortolkes, indikerede, at der forekom variation i farvningen i 79 (5,28 %) ud af 1477 mulige farvninger. Af disse var 14/1477 (0,95 %) udtryk for variationer fra 0 til 1+ eller 2+ til 3+ og repræsenterede som sådan ikke en ændring fra klinisk positiv til klinisk negativ eller omvendt i en 2x2-datavurdering. Godkendelsesværdi = 99,05 % (95 % CI = 98,42 % til 99,46 %). Af de 14 farvningshændelser forekom 5/1477 (0,34 %) farvningshændelser hos Leica Biosystems, Newcastle, Ltd (sted A), 8/1477 (0,54 %) forekom på sted B, og 1/1477 (0,07 %) forekom på sted C.

De resterende 65/1477 (4,40 %) farvningshændelser vise variationer fra 2+ til 1+ eller 2+ til 0 repræsenterede derfor en ændring fra klinisk positiv til klinisk negativ eller omvendt i en 2x2-datavurdering. Godkendelsesværdi = 95,6 % (95 % CI = 94,42 % til 96,54 %). Af de 65 klinisk signifikante ændringer forekom 11/65 (16,9 %) hos Leica Biosystems, Newcastle, Ltd (sted A), 24/65 (36,9 %) forekom på sted B, og 30/65 (46,1 %) forekom på sted C. Af de klinisk signifikante ændringer var der ingen tilfælde, hvor 3+ ændrede sig til et negativt (0 eller 1+) resultat eller omvendt.

## E. Reproducerbarhed inter-observatør

40 randomiserede tilfælde af invasiv brystcancer, hvilket gav en jævn fordeling for hver HER2 IHC-graduering (resektionsprøve), blev skåret konsekutivt og leveret til Leica Biosystems, Newcastle (sted A), sted B og sted C med henblik på farvning og fortolkning. Snittene blev randomiseret blindt hvert sted før scoring. Den interlaboratoriemæssige overensstemmelse (sted B og sted C) var 87,5 % (95 % CI = 73,3 % til 95,8 %). Overensstemmelse mellem sted B og sted C og Leica Biosystems Newcastle, Ltd var 92,5 % (95 % CI = 79,6 % til 98,4 %) og 85 % (95 % CI = 70,1 % til 94,29 %). Analysen af det samlede sammenfald mellem de tre observatører (A, B, C) er 82,50 %.



## F. Præcision mellem instrumenter (BOND-MAX vs. BOND-III)

Test af præcisionen mellem instrumenter ved hjælp af Bond Oracle HER2 IHC System blev foretaget på et enkelt uafhængigt europæisk laboratorium. De prøver, der blev testet, blev hentet fra hele formalinfikserede, paraffinindstøbte snit fra et hundrede og otteogtredive (138) tilfælde af invasiv brystcancer (nålekerne og resektionsprøve). Testen mellem instrumenterne blev foretaget prospektivt inden for laboratoriet, hvor konsekutive snit blev farvet på BOND-MAX- og BOND-III-platte. Tre (3) tilfælde blev anset for uegnede som følge af, at prøvens/svulstens tilgængelighed blev fjernet fra forsøget.

Der blev brugt identiske lotnumre Bond Oracle HER2 IHC System og BOND-instrumenthjælpereagenser på tværs af hvert instrument. Sektioner blev farvet med tilbagevirkende kraft. Objektglassene blev fortolket på laboratoriet af en enkelt erfaren observatør med henblik på at bestemme præcisionen mellem instrumenterne.

En evaluering af objektglas fra undersøgelsen af præcisionen mellem instrumenter viste en 2x2 overensstemmelse mellem positive (2+, 3+) og negative (0, 1+) på 94,2 % (130/138) med 95 % CI for 88,9 til 97,5 % og en 3x3 overensstemmelse mellem positive (3+), dobbelttydige (2+) og negative (0, 1+) på 87,0 % (120/138) med 95 % CI for 80,2 til 92,1 %.

		BOND-MAX		
		Negativ (0/1+)	Positiv (2/3+)	I alt
BOND-III	Negativ (0/1+)	80	1	81
	Positiv (2/3+)	7	50	57
	I alt	87	51	138

Generel overensstemmelse (95 % CI) = 94,2 % (88,9 til 97,5 %)

Tabel 14. 2x2 overensstemmelse for Bond Oracle HER2 IHC System-farvning på BOND-MAX v BOND-III -platte.

		BOND-MAX			
		Negativ (0/1+)	Dobbeltydig (2+)	Positiv (3+)	I alt
BOND-III	Negativ (0/1+)	80	1	0	81
	Dobbeltydig (2+)	6	5	1	12
	Positiv (3+)	1	9	35	45
	I alt	87	15	36	138

Generel overensstemmelse (95 % CI) = 87,0 % (80,2 til 92,1 %)

Tabel 15. 3x3 overensstemmelse for Bond Oracle HER2 IHC System-farvning på BOND-MAX v BOND-III-platte.

Konklusionen er, at de data, som dette forsøg genererede, viste en høj grad af overensstemmelse mellem Leica Biosystems' BOND-MAX- og BOND-III-systemerne, når evalueringen foregår med Bond Oracle HER2 IHC System.

## Fejlfinding

Problem	Sandsynlig årsag	Afhjælpning
Ingen immunhistokemisk farvning	Kørslen blev afbrudt, før den var færdig	Bekræft ved hjælp af BOND-softwaren, at der er rapporterbare fejl til stede under farvningskørslen, og følg anvisningerne i BOND-softwaren.
	Forkert protokolvalg	Sørg for, at <b>*IHC Protocol H</b> er valgt som standard i farvningsprotokolfeltet i dialogboksen "Add slide".
	Utilstrækkelig deparafinering af objektglas	Sørg for, at tilstanden <b>*Dewax</b> er valgt i feltet Klargøring i dialogboksen Add slide.
	Utilstrækkelig dispense- ring af reagens	Sørg for, at alle BOND-reagenser er blevet allokeret til de rigtige beholdere og placeret korrekt på instrumentet.
	Kontaminering af BOND Wash Solution med natriumazid	Brug frisk BOND Wash Solution klargjort i den korrekte arbejdsstyrke.
Svag specifik immunhistokemisk farvning	Utilstrækkelig epitopgen- finding	Sørg for, at de rigtige BOND Epitope Retrieval-reagenser er blevet allokeret i de rigtige beholdere, og at BOND-softwaren som standard har den korrekte epitopgenfindingsprotokol, <b>*HIER 25 min with *ER1 (97)</b> .
	Utilstrækkelig fiksering eller behandling af testprøve	Sørg for, at der bruges formalinbase-rede fiksativer, og at behandlingsskemaerne er egnede til den prøve, der testes.
	Bond Oracle HER2 IHC System anvendes efter udløbsdatoen	Sørg for, at Bond Oracle HER2 IHC System anvendes inden den angivne udløbsdato.
Kraftig specifik immunhistokemisk farvning	Utilstrækkelig epitopgen- finding	Sørg for, at de rigtige BOND Epitope Retrieval-reagenser er allokeret til de rigtige beholdere, og at BOND-softwaren som standard har <b>*HIER 25 min with ER1 (97)</b> .
	Variation i fiksering	Sørg for, at der bruges formalinbase-rede fiksativer, og at behandlingsskemaerne er egnede til den prøve, der testes. Test om muligt tilfældet igen ved hjælp af en anden blok. Hvis det ikke er muligt, skal du vurdere de områder, der fremviser de bedste fikseringsmønstre sammen med et tilsvarende hæmatoxylin- og eosin-farvet (H&E) snit.

Problem	Sandsynlig årsag	Afhjælpning
Uspecifik baggrundsfarvning	Utilstrækkelig dispense-ring af reagens	Sørg for, at alle BOND-reagenser er blevet allokeret til de rigtige beholdere og placeret korrekt på instrumentet.
	Utilstrækkelig deparafinering af objektglas	Sørg for, at * <b>Dewax</b> er valgt i feltet Klargøring i dialogboksen Add slide.
	Uspecifik immunhistokemisk krydsreaktion i væv	Se Bond Oracle HER2 IHC System-beskrivelsen af krydsreaktivitet for normalt væv (se i tabel 13).
	Uspecifik immunhistokemisk krydsreaktion i områder med vævsnekrose	Sørg for, at der bruges formalinbaserede fiksativer, og at behandlingsskemaerne er egnede til den prøve, der testes. Test om muligt tilfældet igen ved hjælp af en anden blok. Hvis det ikke er muligt, skal du vurdere de områder, der fremviser de bedste fikseringsmønstre sammen med et tilsvarende hæmatoxylin- og eosin-farvet (H&E) snit.
	Tørringsartefakt efter afslutning af en farvningskørsel	Hvis objektglassene skal køres natten over, anbefales det, at funktionen til forsinket BOND-start anvendes. Sørg for, at der er tilstrækkelige mængder destilleret eller de-ioniseret vand, som kan dispenseres på objektglassene i den periode, så objektglassene ikke tørrer ud.
	Snit monteret på objektglas ved hjælp af stivelsesadditiver	Brug objektglas uden stivelse (f.eks. Leica BOND Plus Slides – produktkode S21.2113 eller Apex BOND Slides - produktkode 3800040).
Vævet har løsnet sig fra patient/kontrol-objektglas	Brug af forket type objektglas eller utilstrækkelig dræning af snit	Brug korrekte objektglas til patient/kontrol-snit (f.eks. Leica BOND Plus Slides – produktkode S21.2113 eller Apex BOND Slides - produktkode 3800040). Sørg for, at objektglassene drænes tilstrækkelig og inkuberes i 12-18 timer ved 37 °C (natten over). Snit, der kræver yderligere montering, kan inkuberes ved 60 °C i yderligere en time.

Tabel 16. Bond Oracle HER2 IHC System Trouble Shooting Guide.

Hvis der opstår problemer med Bond Oracle HER2 IHC System, som falder uden for fejlfindingsguiden (se tabel 16), skal du kontakte din lokale Leica Biosystems'-serviceafdeling eller -forhandler for at få hjælp.

## Referencer

1. Corbett IP, Henry JA, Angus B et al. NCL-CB11, a new monoclonal antibody recognizing the internal domain of the c-erbB-2 oncogene protein effective for use on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Journal of Pathology* 1990; 161:15-25.
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. Bang Y, Chung H, Xu J, Lordick F, Sawaki A, Lipatov O et. al. Pathological features of advanced gastric cancer(GC): relationship to human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) positivity in the global screening programme of the ToGA trial. *Journal of Clinical Oncology* 2009; 27:15s, (Abstr 4556).
4. Van Cutsem E, Kang Y, Chung H, Shen L, Sawaki A, Lordick F et. al. Efficacy resultst 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
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Nakane PK and Pierce GB. Enzyme labeled antibodies: Preparations and applications for the localization of antigens. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1967; 14: 929-931.
10. Tsutsumi Y, Serizawa A and Kawai K. Enhanced polymer one-step staining (EPOS) for proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen-applications to intraoperative frozen diagnosis. *Pathology International* 1995; 45(2): 108-115.
11. Walker RA, Bartlett JMS Dowsett M, Ellis IO, Hanby AN, Jasani B, Miller K and Pinder SE. HER2 Testing in the UK- Further Update To Recommendations. *Journal of Clinical Pathology* 2008.
12. Bang YJ et al. Poster 4526 presented at the 44th ASCO Annual Meeting, Chicago, Illinois, USA, 30 May–3 June 2008.
13. Hoffman M, Stoss O, Shi D, Büttner R, van der Vijver M, Kim W et. al. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology* 2008; 52:797-805.
14. M. Tanner, M. Hollmén, T. T. Junttila, A. I. Kapanen, S. Tommola, Y. Soini, H. Helin, J. Salo, H. Joensuu, E. Sihvo, K. Elenius, and J. Isola. Amplification of HER-2 in gastric carcinoma: association with Topoisomerase II $\alpha$  gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab. *Annals of Oncology* (February 2005) 16(2): 273-278.
15. Dickson, RB and Lippman, ME. *Genes, Oncogenes, and Hormones*. Boston, Kluwer Academic Publishers, 1992.
16. Keatings, L. et al. c-erbB-2 oncoprotein expression in mammary and extramammary Paget's disease: an immunohistochemical study. *Histopathology* 1990; 17: 234-247.
17. 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
18. Elias JM, Gown AM, Nakamura RM, Wilbur DC, Herman GE, Jaffe ES, et al. Special Report: Quality control in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology* 1989 ;92: 836-843.
19. Press MF, Cordon-Cardo C, Slamon DJ. Expression of the HER-2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene* 1990; 5: 953-62.

20. Hoffman M, Stoss O, Shi D, Büttner R, van der Vijver M, Kim W et. al. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology* 2008; 52:797-805
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. Omata M, Liew C-T, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology* 1980; 73: 626-32.
24. 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.










## Ændringer af tidligere udgave

Medfølgende komponenter, Symbolidentifikation.

## Trykkesdato

16 juli 2020

## Symbolidentifikation

	Batchkode		Opbevaring		Katalognummer
	Medicinsk udstyr til In vitro-diagnostisk brug		Producent		Skrøbelig
	eIFU - se i brugsanvisningen		Indeholder tilstrækkeligt til <n> test		Bruges før AAAA-MM-DD
<b>SN</b>	Serienummer	<b>Rx Only</b>	Kun recept		

HercepTest™ er et varemærke tilhørende eller underlagt licenser tilhørende DakoCytomation, Denmark A/S Herceptin® er et varemærke tilhørende Genentech, Inc. og F. Hoffmann-La Roche Ltd.